

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RATLARDA ROZİGLİTAZONUN MİTOKONDRIYAL
GENOM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ZELİHA CANSEL ÖZMEN**

**TEZ DANIŞMANLARI
Prof.Dr. MUHLİSE ALVUR
Prof.Dr. ABDULKERİM BEDİR**

SAMSUN/2008

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin hazırlanması aşamalarında yardım ve destek aldığım değerli hocalarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Muhlise Alvr ve Prof. Dr. Abdulkerim Bedir'e, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Ramazan Amanvermez, Yrd. Doç. Dr. Birşen Bilgici, Yrd. Doç. Dr. Bahattin Avcı ve Yrd. Doç. Dr. Özgür K. Tuncel'e, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Cafer Eroğlu'na, çalışma arkadaşım Dr. Ali Okuyucu'ya, yardımlarını esirgemeyen Dr. Aynur Düzgün, Dr. Tülay Özdemir, Dr. Rukiye Nar, Dr. Mukadder Erdem'e ve diğer asistan arkadaşlarıma, Biyokimya Anabilim Dalı ve Laboratuar çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım ve uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını eksik etmeyen değerli eşim Zafer Özmen'e, anlayış ve sabrını esirgemeyen sevgili kızım Ekin Sinem'e ve her zaman yanımda olduklarını hissettiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Önsöz	I
İçindekiler	II
Tablolar	VII
Şekiller	IX
Kısaltmalar	X
Özet	XIII
Summary	XIV
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1 Mitokondri	3
2.1.1 Mitokondrinin Yapısı	3
2.1.1.1 İç Membran	3
2.1.1.2 Dış Membran	4
2.1.1.3 Matriks	4
2.1.1.3.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA)	5
2.1.1.3.1.1 mtDNA'nın Replikasyonu	6
2.1.1.3.1.2 mtDNA'nın Transkripsiyonu ve Translasyonu	8
2.1.1.3.1.3 Mitokondriyal Kalıtım	10
2.1.1.3.1.4 mtDNA, Mutasyonlara Neden Daha Fazla Maruz Kalır?	10
2.1.1.3.1.5 mtDNA Mutasyonları	11
2.1.1.3.1.6 mtDNA Tamir Mekanizmaları	14
2.1.1.3.1.7 mtDNA ve Hastalıklarla Olan İlişkisi	14
2.1.2 Mitokondrinin Fonksiyonları	16
2.1.2.1 Oksidatif Fosforilasyon (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS)	16
2.2 Serbest Radikaller	19
2.2.1 Oksijen Radikalleri	21
2.2.1.1 Süperoksit Radikali (O ₂ ^{•-})	22

2.2.1.2 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	22
2.2.1.3 Hidroksil Radikali (*OH ⁻)	23
2.2.1.4 Singlet Oksijen (O ₂ ^{↑↓})	24
2.2.2 Reaktif Nitrojen Ürünleri	24
2.2.3 Endojen Oksidatif Stres Kaynakları	24
2.2.4 Antioksidan Savunma Mekanizmaları	25
2.2.4.1 Hücre İçi Antioksidan Sistemler	25
2.2.4.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)	25
2.2.4.1.2 Katalaz (CAT)	26
2.2.4.1.3 Redükte Glutasyon (GSH)	26
2.2.4.1.4 Glutasyon Redüktaz (GSR)	26
2.2.4.1.5 Glutasyon Peroksidaz (GPx)	27
2.2.4.1.6 Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	27
2.2.4.2 Membran Antioksidanları	28
2.2.4.3 Hücre Dışı Antioksidan Sistemler	28
2.3 mtDNA ve Oksidatif Stres	28
2.4 Tiazolidinedionlar (TZD'lar)	30
2.4.1 Roziglitazon	30
2.4.2 TZD'ların Etki Mekanizması	31
2.4.3 TZD'ların Etkileri	32
2.4.3.1 Glukoz Metabolizması Üzerine Olan Etkileri	32
2.4.3.2 Lipid Metabolizması Üzerine Olan Etkileri	33
2.4.3.3 Kardiyovasküler Sistem ve Kan Basıncı Üzerine Olan Etkileri	33
2.4.4 TZD'ların Yan Etkileri	34
2.4.4.1 Hipoglisemi	34
2.4.4.2 Hepatotoksisite	34
2.4.4.3 Ödem ve Kilo Artışı	34
2.4.4.4 Kardiyak Yan Etkiler	35
2.4.5. TZD'ların Kontrendikasyonları	35
2.5 Real-Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	35
2.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	35
2.5.2 Kantitatif Real-Time PCR (QPCR)	36

2.5.2.1	QPCR Cihazları	37
2.5.2.2	QPCR’da Kullanılan Metodlar	37
2.5.2.2.1	SYBR Green Metodu	37
2.5.2.3	Primer-Prob Dizaynı	39
2.5.2.4	Sonuçların Yorumlanması	39
2.5.2.4.1	Absolü Kantitasyon	41
2.5.2.4.2	Relatif Kantitasyon	42
2.5.2.4.2.1	Relative Standard Eğri Metodu	42
2.5.2.4.2.2	Komparatif Threshold Siklus (C _T) Metodu	43
2.5.2.5	Melting Curve Analizi	43
2.5.2.6	QPCR’ın Avantajları ve Dezavantajları	43
2.5.2.7	QPCR’ın Kullanım Alanları	44
3.	Gereç ve Yöntem	45
3.1	Kullanılan Araç ve Gereçler	45
3.2	Kullanılan Kimyasallar	46
3.3	Hayvanlar	48
3.4	İlaç Hazırlanması ve Uygulanması	48
3.5	Ratlardan Lenfosit ve Dokuların Elde Edilmesi	48
3.6	Lenfosit ve Dokulardan DNA İzolasyonu	49
3.6.1	İzolasyon Kiti İçeriği ve Solüsyonlarının Hazırlanması	49
3.6.2	Lenfositlerden DNA İzolasyonu:	50
3.6.3	Rat Dokularından DNA İzolasyonu	51
3.7	İzole Edilen DNA Miktarlarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	52
3.8	Kantitatif Real-Time PCR Metodunun Uygulanması	54
3.8.1	Biyoinformatik Analiz	54
3.8.1.1	36B4 Standart Primerlerinin Belirlenmesi	54
3.8.1.2	36B4 Primerlerinin Belirlenmesi	54
3.8.1.3	D-Loop Standart Primerlerinin Belirlenmesi	55
3.8.1.4	D-Loop Primerlerinin Belirlenmesi	55
3.8.1.5	mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Primerlerinin Belirlenmesi	56
3.8.2	Rat Nükleer Genom Standardının Elde Edilmesi	58

3.8.2.1 36B4 Standart Sekansının PCR ile oğaltılması	58
3.8.2.2 36B4 Standart PCR Ürününün Saflaştırılması	59
3.8.2.3 36B4 Standart PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi	59
3.8.2.4 36B4 Standardının Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu	60
3.8.2.5 36B4 Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması	60
3.8.2.6 Rat Nükleer Genom Standardının Elde Edilmesi	61
3.8.3 Numunelerde 36B4 PCR alışılması	63
3.8.4 Rat mtDNA Standardının Elde Edilmesi	65
3.8.4.1 D-loop Standart Sekansının PCR ile oğaltılması	65
3.8.4.2 D-loop Standart PCR Ürününün Saflaştırılması	66
3.8.4.3 D-loop Standart PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi	66
3.8.4.4 D-loop Standardının Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu	67
3.8.4.5 D-loop Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması	67
3.8.4.6 Rat mtDNA Standardının Elde Edilmesi	68
3.8.5 Numunelerde D-loop PCR çalışılması	69
3.8.6 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Standardının Elde Edilmesi	70
3.8.6.1 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Sekansının PCR ile çoğaltılması	70
3.8.6.2 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi	71
3.8.6.3 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Saflaştırılması	72
3.8.6.4 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu	73
3.8.6.5 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Plazmid Genomuna Aktarılması	73
3.8.6.5.1 İnsert (Ürün) Miktarının Belirlenmesi	73
3.8.6.5.2 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Plazmid ile Ligasyonu	73
3.8.6.6 Plazmidin Kompetent Hücreye Aktarılması	74
3.8.6.7 Plazmid İzolasyonu	74

3.8.6.8 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Standardının Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu	75
3.8.6.9 mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması	76
3.8.7 Numunelerde mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon PCR Çalışılması	76
3.9 Numunelerde Hücre Başına Düşen mtDNA Kopya Sayılarının Hesaplanması	78
3.10 Numunelerde mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Frekansının Hesaplanması	78
3.11 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	78
4. Bulgular	79
4.1 PCR Çalışmasının Validasyon Sonuçları	79
4.2 Numunelerin Absolü Kantitasyon Sonuçları	80
5. Tartışma	87
6. Sonuçlar	95
7. Kaynaklar	96

TABLULAR

		Sayfa
Tablo I	OXPPOS enzimleri ve mtDNA'da kodlanan subunitler	5
Tablo II	mtDNA ve nDNA arasındaki kodon farklılıkları	8
Tablo III	mtDNA ve nDNA'nın yapısal ve fonksiyonel farkları	9
Tablo IV	mtDNA ve ilişkili olduğu hastalıklar	16
Tablo V	Oksijen türevi bileşikler	21
Tablo VI	Oksijenin indirgenmesi	22
Tablo VII	Lenfositlerden izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık oranları	52
Tablo VIII	Dokuların yaş ağırlıkları, izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık oranları	53
Tablo IX	453 bp'lik 36B4 standart ampliconu	54
Tablo X	80 bp'lik 36B4 ampliconu	54
Tablo XI	321 bp'lik D-loop standart ampliconu	55
Tablo XII	D-loop bölgesinde PCR ile çoğaltılan 83 bp'lik amplicon	55
Tablo XIII	mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon bölgesi	56
Tablo XIV	mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon varlığında PCR ile çoğaltılan 81 bp'lik amplicon	56
Tablo XV	Primerlerin pozisyonu, amplicon uzunluğu ve primer sekansları	57
Tablo XVI	36B4 standart PCR master miks hazırlanması	58
Tablo XVII	36B4 standart PCR protokolü	58
Tablo XVIII	Rat nükleer genom standardı için 36B4 PCR master miks hazırlanması	62
Tablo XIX	Rat nükleer genom standardı için 36B4 PCR protokolü	62
Tablo XX	Rat nükleer genom standardının ölçülmesi	63
Tablo XXI	Numuneler için hazırlanan 36B4 PCR master miksi	64
Tablo XXII	Numuneler için hazırlanan 36B4 PCR protokolü	64
Tablo XXIII	D-loop standart PCR master miks hazırlanması	65

Tablo XXIV	D-loop standart PCR protokolü	65
Tablo XXV	Rat mtDNA standardının ölçülmesi	69
Tablo XXVI	Rat mitokondriyal D-loop PCR master miks hazırlanması	70
Tablo XXVII	Rat mitokondriyal D-loop PCR protokolü	70
Tablo XXVIII	mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon PCR master miks hazırlanması	71
Tablo XXIX	mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon PCR protokolü	71
Tablo XXX	PCR ürününün plazmid ile ligasyonu	73
Tablo XXXI	Numuneler için hazırlanan mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon PCR master miksi	77
Tablo XXXII	Numuneler için hazırlanan mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon PCR protokolü	77
Tablo XXXIII	36B4, D-loop ve mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon çalışmalarının slope ve verimlilik sonuçları	79
Tablo XXXIV	Karaciğer dokusunda mtDNA/hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri	80
Tablo XXXV	İnce bağırsak dokusunda mtDNA /hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri	81
Tablo XXXVI	Pankreas dokusunda mtDNA /hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri	81
Tablo XXXVII	Lenfositlerde mtDNA /hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri	82
Tablo XXXVIII	Kontrol dokuları ve lenfositlerde mtDNA/ hücre sayılarının ortalama, minumum ve maksimum değerleri	85
Tablo XXXIX	Kontrol dokuları ve lenfositlerde delesyon frekansının ortalama, minumum ve maksimum değerleri	86

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1	Mitokondrinin yapısı	4
Şekil 2	mtDNA'nın yapısı	6
Şekil 3	D-loop oluşumu	7
Şekil 4	mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon bölgesi	13
Şekil 5	OXPPOS enzim kompleksleri	19
Şekil 6	Tiazolidinedion grubu antidiabetik ilaçlar	31
Şekil 7	TZD'ların PPAR- γ reseptörüne bağlanması	32
Şekil 8	PCR aşamaları	36
Şekil 9	(a) SYBR Green I'in kimyasal yapısı (b) SYBR Green metodu	38
Şekil 10	PCR amplifikasyonunun başlangıç, logaritmik ve plato fazları	41
Şekil 11	Absolü kantitasyon	42
Şekil 12	36B4 standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü	60
Şekil 13	D-loop standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü	67
Şekil 14	mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü	72
Şekil 15	36B4, D-loop ve mtDNA ⁴⁸³⁴ delesyon çalışmalarının slope ve verimlilik grafiği	80
Şekil 16	Roziglitazon dozlarına göre karaciğer dokusunda % delesyon frekansı	83
Şekil 17	Roziglitazon dozlarına göre ince bağırsak dokusunda mtDNA/hücre	83
Şekil 18	Roziglitazon dozlarına göre Pankreas dokusunda mtDNA/hücre	84
Şekil 19	Kontrol dokularında ve lenfositlerinde mtDNA/ hücre	85
Şekil 20	Kontrol dokuları ve lenfositlerinde % delesyon frekansı	86

KISALTMALAR

RNaz-P	Ribonükleaz P
RNaz-MRP	Ribonükleaz mitokondriyal RNA işlemci endonükleaz
TCA	Trikarboksilik asit siklusu
FMN	Flavin mononükleotid
AMPK	5' AMP activated protein kinaz
8-OHdG	8-hidroksi-deoksiguanozin
8-OHdGTPaz	8-hidroksi-deoksiguanozintrifosfataz
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ANT	Adenin nükleotid translokaz
ADP	Adenozindifosfat
AMP	Adenozinmonofosfat
ATP	Adenozintrifosfat
H zincir	Ağır zincir
L zincir	Hafif zincir
AP endonükleaz	Apürinik endonükleaz
36B4	Asidik Ribozomal Fosfoprotein PO
BER	Baz eksizyon tamir
CRP	C Reaktif Protein
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
D-loop	Displacement Loop
PolG	DNA polimeraz gama'nın
ETZ	Elektron Transport Zinciri
Endo III	Endonuclease III
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FADH ₂	Flavin Adenin Dinükleotid (redükte form)
FAD	Flavin Adenin dinükleotit (okside form)
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FDA	Food and Drug Administration

FapyGua	Foramido pirimidin Guanin
FPG	Formamidopyrimidine DNA Glycosylase
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GLUT	Glucose Transporter
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSR	Glutasyon redüktaz
HSP	H zincir transkripsiyon promoter bölgesi
O _H	H zincirin replikasyon orjini
HBSS	Hank's Balanced Salt solution
HbA1c	Hemoglobin A1c
HDL	High Density Lipoprotein (Yüksek molekül ağırlıklı lipoprotein)
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit radikali
(·OH)	Hidroksil radikali
IL-6	İnterlökin 6
QPCR	Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir reaksiyon
CAT	Katalaz
CPEO	Kronik Progresiv External Oftalmopleji
LSP	L zincir transkripsiyon promoter bölgesi
O _L	L zincirin replikasyon orjini
LHON	Leber'in Herediter Optik Nöropatisi
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük molekül ağırlıklı lipoprotein)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mtNOS	Mitokondriyal nitrik oksit sentaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen fosfat
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit (redükte form)
(NO·)	Nitrik oksit
NO	Nitrik Oksit (Nitric Oxid)
nDNA	Nükleer DNA
NER	Nükleotid eksizyon tamir
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
GSSG	Okside glutasyon
PPRE	Peroksimom proliferatör response element

PPAR γ	Peroxisom Proliferatör Active Reseptör-Gama
PBS	Fosfat buffer salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon
ROÜ	Reaktif Oksijen Ürünleri
GSH	Redükte glutatyon
GSH	Redükte glutatyon
RXR	Retinoid X Reseptor
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
RNaz MRP	RNA processing endonükleaz
RZG	Rozigitazon
SNPs	Tek nükleotid polimorfizm
CYP2C8	Sitokrom 2C8
CYP2C9	Sitokrom 2C9
SOD	Süperoksit dismutaz
(O ₂) ⁻	Süperoksit radikali
TZD	Tiazolidinedion
tRNA	Transfer RNA
IT _{H1} ve IT _{L1}	Transkripsiyon başlama alanı
mtTFA	transkripsiyon faktörü A
mtTERM	Transkripsiyonun sonlanmasına aracılık eden faktör
TBE	Tris Borate EDTA
TNF α	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
UV	Ultraviole

ÖZET

RATLARDA ROZİGLİTAZONUN MİTOKONDRIYAL GENOM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Mitokondrial DNA'da görülen yaygın delesyon 4834 baz uzunluğundadır. Bu delesyon normal yaşlanma sürecinde oksidatif fosforilasyon kapasitesinin azalmasının bir sonucu olarak görülebilir ve aynı zamanda serbest radikallerin üretilmesi ile de ilişkili olabilir. Yaygın delesyon genellikle oksidatif hasarın bir belirteci olarak da kullanılmaktadır. Rozigitazon, Tip II diabetes tedavisinde kullanılan tiazolidinedion sınıfına ait bir ilaçtır. Bu sınıf ilaçlar peroksizom proliferatör aktive reseptör-gama'nın ligandı olarak etki gösterirler.

Bu çalışmada amaç, farklı rat dokularında yaygın delesyon görülme sıklığının incelenerek rozigitazonun mitokondriyal DNA üzerine olan etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla Sprague-Dawley cinsi erkek ratların karaciğer, ince bağırsak, pankreas dokuları ve lenfositlerinden nükleer ve mitokondriyal DNA izolasyonu yapıldı. Kantitatif PCR ile numunelerin nükleer DNA, mitokondriyal DNA ve yaygın delesyon kopya sayıları belirlendi. Yaygın delesyon frekansı ve hücre başına düşen mitokondriyal DNA kopya sayıları hesaplandı.

Rozigitazonun tüm dozlarında karaciğer dokusunda yaygın delesyon frekansı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Bununla beraber ince bağırsak ve pankreas dokularında hücre başına düşen mitokondriyal DNA kopya sayısı rozigitazonun tüm dozlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşüktü. Aynı zamanda kontrol grupları arasında da yaygın delesyon frekansı ve hücre başına düşen mitokondriyal DNA kopya sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı.

Sonuç olarak, karaciğer dokusunda yaygın delesyon frekansındaki azalmaya yol açması rozigitazonun oksidan bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Fakat pankreas ve ince bağırsaktaki mitokondriyal DNA kopya sayılarında azalmaya neden olması rozigitazonun oksidan etkisinin olduğunu düşündürebilir.

Anahtar Kelimeler: Rozigitazon, Yaygın Delesyon, Oksidatif Stres

SUMMARY

THE EFFECTS OF ROSIGLITAZONE ON THE RAT MITOCHONDRIAL GENOM: AN INVESTIGATION DONE WITH MOLECULAR METHODS

The common deletion seen at mitochondrial DNA has a length of 4834 base pair. This deletion could be seen as a result of the reduction of oxidative phosphorylation capacity in the normal aging process, and it may be also related to the production of free radicals. The common deletion is often used as a spesific indicator of oxidative damage as well. Rosiglitazone is a drug which belongs to tiazolidinedione class used in the treatment of Type II diabetes mellitus. Drugs of this class acts as ligands for the peroxisome proliferators activated receptor-gamma.

The aim of this study was to investigate the effects of rosiglitazone on the mitochondrial DNA by examining the frequency of the common deletion in the different rat tissues. For this purpose, nuclear and mitochondrial DNA was isolated from of liver, small intestine, pancreas and lymphocytes of the male Sprague-Dawley rats. Nuclear DNA, mitochondrial DNA and common deletion copy numbers of the samples was determined by quantitative PCR. The mitochondrial DNA copy number per cell and common deletion frequencies were calculated.

The common deletion frequency in the liver tissue at all doses of rosiglitazone was found to be signifciantly lower than in the control group. However, the mitochondrial DNA copy numbers per cell in the tissues of small intestine and pancreas were signifciantly lower than in all rosiglitazone doses compared to the control group. At the same time, there was a signifciant statistical difference in the common deletion frequency and mitochondrial DNA copy numbers per cell between the control groups.

As a conclusion, rosiglitazone treatment let to decrease the common deletion frequency in the tissue of liver, indicating no oxidant effect of it. But rosiglitazone caused to decrease the mitochondrial DNA copy numbers in the tissues of small intestine and pancreas, this condition might be considered rosiglitazone's oxidant effect.

Key Words: Rosiglitazone, Common Deletion, Oxidative Stress

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan mitokondriyal DNA (mtDNA) dizisi ilk defa 1981’de Anderson ve arkadaşları (8) tarafından saptanmıştır. mtDNA, kapalı sirküler bir yapıya sahiptir ve 16569 baz çifti uzunluğundadır. Memeli hücreler, birkaç yüz ile birkaç bin arasında mitokondri içerir. Her bir mitokondri de, 2-10 kopya mtDNA bulundurur (31). mtDNA, 13 adet mitokondriyal elektron transport zincir (ETZ) proteinini, 22 tRNA (transfer RNA)’yı ve 2 rRNA (ribozomal RNA)’yı kodlayan 37 gen içerir (69, 276).

İnsan mtDNA’sı, biri H-zincir (ağır zincir) diğeri L-zincir (hafif zincir) olmak üzere, çift zincirli sirküler bir yapı gösterir. H-zincir daha çok pürin bazlarını, L-zincir ise daha çok pirimidin bazlarını içerir (308, 332). Mitokondri matriksinde yer alan mtDNA, nükleustan bağımsız olarak replikasyon, transkripsiyon ve translasyon yapma yeteneğine sahiptir (220, 338).

Mitokondri hücre içine giren oksijenin yaklaşık % 90’dan fazlasının tüketildiği önemli bir hücreyel organeldir (341). Normal fizyolojik respirasyon sırasında tüketilen moleküler oksijenin %1-2’si süperoksid ($(O_2^{\cdot-})$) radikallerine çevrilir (230). $(O_2^{\cdot-})$ radikalinin büyük bir kısmı esas olarak solunum zinciri komplekslerinden kompleks I (NADH ubikinon oksidoredüktaz) ve kompleks III (ubikinon sitokrom C oksidoredüktaz)’te üretilmektedir (9). Mitokondride oksijenin suya indirgendiği basamaklarda oluşan $(O_2^{\cdot-})$, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil ($^{\cdot}OH$) radikalleri, mitokondride protein, lipid, RNA (ribonükleik asit) ve DNA (deoksiribonükleik asit)’yı içeren makromoleküllerde hasar yapmaktadır (270).

mtDNA histon proteinlerini içermemesi, DNA tamir sisteminin zayıf olması, oksidanların oluştuğu mitokondri iç zarına yakın yerleşimli olması ve intron içermemesi nedenleriyle oksidan hasarlara karşı daha duyarlıdır (150, 152, 198, 336). mtDNA’daki mutasyonların nükleer DNA(nDNA)’daki mutasyonlardan 10-20 kat daha hızlı olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir (67, 151, 162).

Ratlar, günümüzde genetik temeli olan insan hastalıklarının anlaşılmasında geçerli bir modeldir (64, 145). İnsanlardaki 4977 baz çift (bç)’lik mtDNA delesyonunun ratlardaki karşılığı olan 4834 bç’lik mtDNA delesyonu, normal yaşlanma ile beraber dokularda oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) kapasitesinin azalmasının bir sonucu olarak birikmektedir (39, 67, 102). Bu delesyon, yüksek insidansı nedeniyle ‘yaygın

delesyon' (mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon) olarak adlandırılmaktadır (352) ve oksidatif hasarın spesifik belirteci olarak kullanılmaktadır (85). Delesyon birikiminin, respiratuvar zincir anormallikleri ve serbest radikallerin üretilmesi ile ilişkili olabileceği bulunmuştur (184, 248, 340).

Tiazolidinedion (TZD) grubu bir ilaç olan Roziglitazon (RZG), 2000 yılında, Tip II diabet tedavisi için kan glukozunu düşürmek amacıyla piyasadaki yerini almıştır (309). Etkilerini, nükleer bir reseptör olan peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama (PPAR γ)'nın aktivasyonu ile gösterirler. TZD'lar kas, yağ dokusu ve karaciğerde insülin duyarlılığını artıran ilaçlardır (214, 223, 260, 361).

TZD'ların PPAR γ -bağımsız mekanizma ile izole doku ve hücrelerde mitokondriyal kompleks I'ı inhiye ettiği belirtilmiştir. RZG'nun kompleks I'deki bu inhibitör etkisinin reaktif oksijen ürünleri (ROÜ)'nin oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (40, 104). Diğer taraftan RZG'un, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırarak ROÜ oluşumunu engellediği de bildirilmiştir (106, 114, 241).

Biz de bu bilgilerin ışığında, farklı rat dokularında QPCR (kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyon) ile mtDNA kopya sayını ve oksidatif hasarın bir belirteci olan mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon görülme sıklığını inceleyerek RZG'un mtDNA üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 MİTOKONDRI

2.1.1 Mitokondrinin Yapısı

Mitokondri, hücrede enerji üretiminden sorumlu organel olup, oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde yani hemen hemen tüm ökaryotlarda bulunurken bakteri, yeşil alg ve memeli eritrositlerinde bulunmamaktadır (277) (Şekil 1).

Mitokondri, yaklaşık 0,5-1 µm büyüklüğündedir (192). Ovalden çubuğa kadar değişen şekillerdedir. Sayıları hücrenin fonksiyonuna ve ihtiyacına bağlı olarak birkaç yüz ile birkaç bin arasında değişmektedir (13, 313). Canlı hücreler incelendiğinde, mitokondrinin şeklinin ve büyüklüğünün değiştiği ve hareket ettiği görülmektedir (7).

Elektron mikroskopik incelemelerde, mitokondrinin iç ve dış membrana sahip olduğu gösterilmiştir (232, 297). Dış ve iç membranların arasındaki bölge intermembran aralık, iç membranın çevrelediği bölge ise matriks olarak adlandırılmıştır (7).

2.1.1.1 İç Membran

İç membran matrikse doğru krista denilen yapıları oluşturur. Kristalar, iç membranın yüzey alanını artırır. Doku tiplerine göre krista sayısı ve alanı değişiklik gösterir. İç membran yüksek oranda kardiyolipin içeren ikili fosfolipid yapıdan oluşmuştur. Kardiyolipin, iç membrana özellikle iyonlar için geçirgen olmayan özellik kazandırır (7). Mitokondri iç membranı, adenosin difosfat (ADP), adenosin trifosfat (ATP) ve pirüvat gibi küçük moleküllere ve mitokondri fonksiyonu için gerekli diğer metabolitlerin çoğuna geçirgen değildir. İyon ya da moleküllerin bu membrandan geçebilmesi için transport moleküllerine ihtiyaç vardır (51). İç membran enerji üretiminin bulunduğu kısım olduğu için ETZ reaksiyonlarını gerçekleştiren proteinleri, ATP sentaz kompleksini ve metabolitlerin matriks ve intermembran aralık arasındaki geçişi düzenleyen özel transport proteinlerini içerir (7). Mitokondri iç membranı protein bakımından oldukça zengindir. Bunların çoğu elektron transportu ve oksidatif fosforilasyonla doğrudan ilgilidir (51).

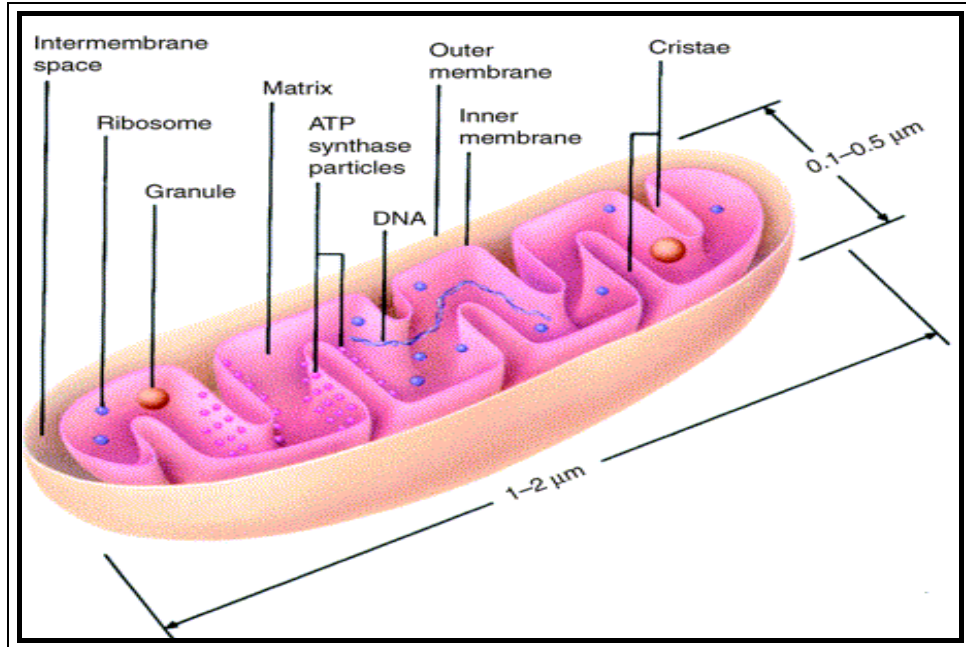
2.1.1.2 Dış Membran

Dış membranda çok sayıda porin adı verilen transport proteinleri bulunur. Porin-lipid yapısındaki bu dış membran, 5000 daltondan küçük moleküllere ve iyonlara karşı seçici geçirgenlik gösterir (232, 297). Bu moleküller intermembran aralığa girer fakat iç membranı geçemez. Dış membran matrikste metabolize olabilen lipid bileşenlerinin sentezi için gerekli enzimleri de içerir (7).

İç ve dış membran arasında bulunan intermembran aralık krista içi aralıklarla devam eder (232, 297).

2.1.1.3 Matriks

Kristaların arasını matriks denilen homojen bir madde doldurur. Matriks, TCA siklusu için gerekli enzimlerin ve pirüvat, aminoasit, yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumlu pek çok enzimin yanında özel mitokondriyal ribozomlar, tRNA'lar, mitokondriyal DNA ve mitokondriyal DNA ekspresyonu için gerekli enzimleri de içerir (7, 232, 297). Üre ve Hem sentezinin mitokondride gerçekleşen reaksiyonlarının enzimleride matrikste bulunmaktadır. Matriks ayrıca nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), ADP ve Pi içerir (331).



Şekil 1: Mitokondrinin yapısı (192)

2.1.1.3.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Mitokondri, ökaryot organizmalarda, nükleus haricinde DNA'sı olan tek hücreli organeldir ve nükleustan bağımsız olarak replikasyon, transkripsiyon ve translasyon yapma yeteneğine sahiptir. mtDNA, mitokondri matriksi içinde yer alır (220, 338). Memeli hücreler, birkaç yüz ile birkaç bin arasında mitokondri içerir. Her bir mitokondri ise, 2-10 kopya mtDNA bulundurur (31).

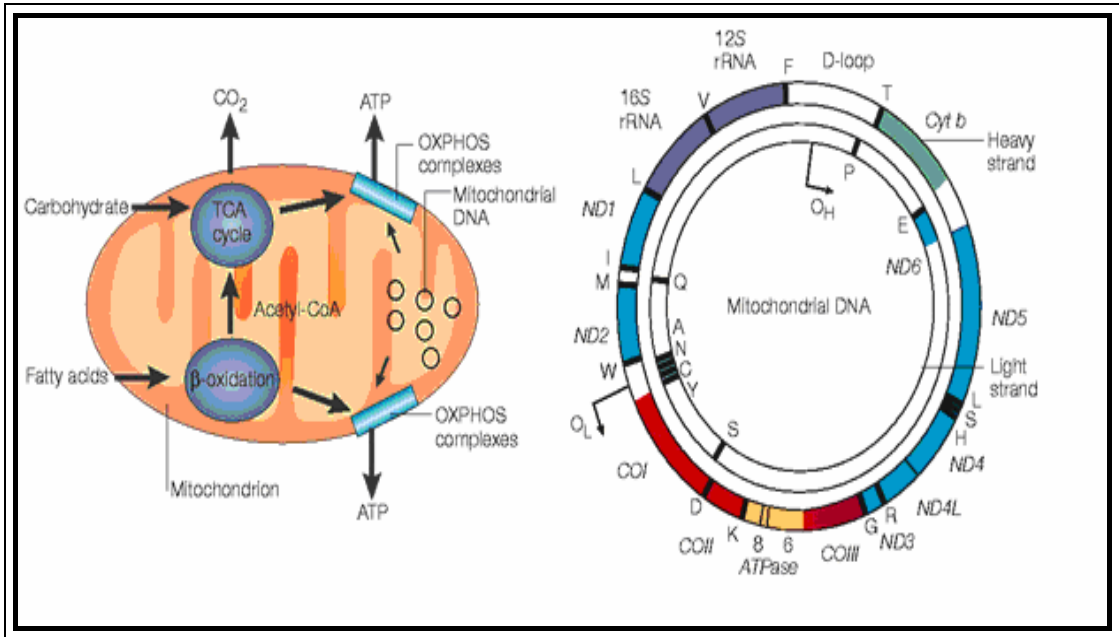
İnsan mtDNA dizisi ilk defa 1981'de Anderson ve arkadaşları (8) tarafından saptanmıştır. mtDNA, kapalı sirküler bir yapıya sahiptir ve 16 569 baz çifti (bç) uzunluğundadır. mtDNA, 13 adet mitokondriyal elektron transport zincir (ETZ) proteinini, 22 tRNA (transfer RNA)'yı ve 2 rRNA (ribozomal RNA)'yı kodlayan 37 gen içerir (69,276). ETZ için gerekli yaklaşık 100 proteinin 13'ü mtDNA'da kodlanmakla beraber kalan proteinler nDNA'da kodlanarak mitokondriye transfer edilmektedir (278). mtDNA'da kodlanan 13 proteinin yedisi kompleks I, biri kompleks III, üçü kompleks IV ve ikisi kompleks V'e ait subunitlerdir (8). Tablo I'de OXPHOS enzimleri ve mtDNA'da kodlanan subunitler gösterilmektedir (201).

Tablo I: OXPHOS enzimleri ve mtDNA'da kodlanan subunitler

Kompleks	Enzim	Subunit sayısı	mtDNA'da kodlanan subunitler
Kompleks I	NADH Ubikinon Oksidoredüktaz	43	7 (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6)
Kompleks II	Süksinat oksidoredüktaz	4	-
Kompleks III	Ubikinon sitokrom C oksidoredüktaz	11	1 (sitokrom b)
Kompleks IV	Sitokrom c oksidaz	13	3 (COX1, COX2, COX3)
Kompleks V	ATP sentaz	17	2 (ATPaz 6, ATPaz 8)

mtDNA, H zincir (ağır zincir) ve L zincirlerinin (hafif zincir) oluşturduğu, çift zincirli sirküler bir yapı gösterir. H zinciri daha çok pürin bazlarını, L zinciri ise daha çok pirimidin bazlarını içerir (276, 308, 332). Şekil 2’de mtDNA’nın yapısı gösterilmektedir (261).

mtDNA’da kodlanmayan iki bölge vardır. Birisi, mtDNA’nın 16024 ve 576. nükleotidler arasında kontrol bölgesi de denilen yaklaşık 1,1 kilo baz (kb) uzunluğundaki D-loop (Displacement Loop) bölgesidir (13, 284). D-loop, replikasyon ve transkripsiyonun kontrolünün yapıldığı gen kodlanmayan bir bölgedir. Bu bölge, H-L zincirlerine ait transkripsiyon promoter bölgeleri (HSP-LSP bölgeleri) ve H zincirine ait replikasyon orjini içerir (O_H) (59,74). Diğer kodlanmayan bölge ise, ~ 30 nükleotid uzunluğundadır ve L zincirin replikasyon orjinini içerir (O_L) (308).

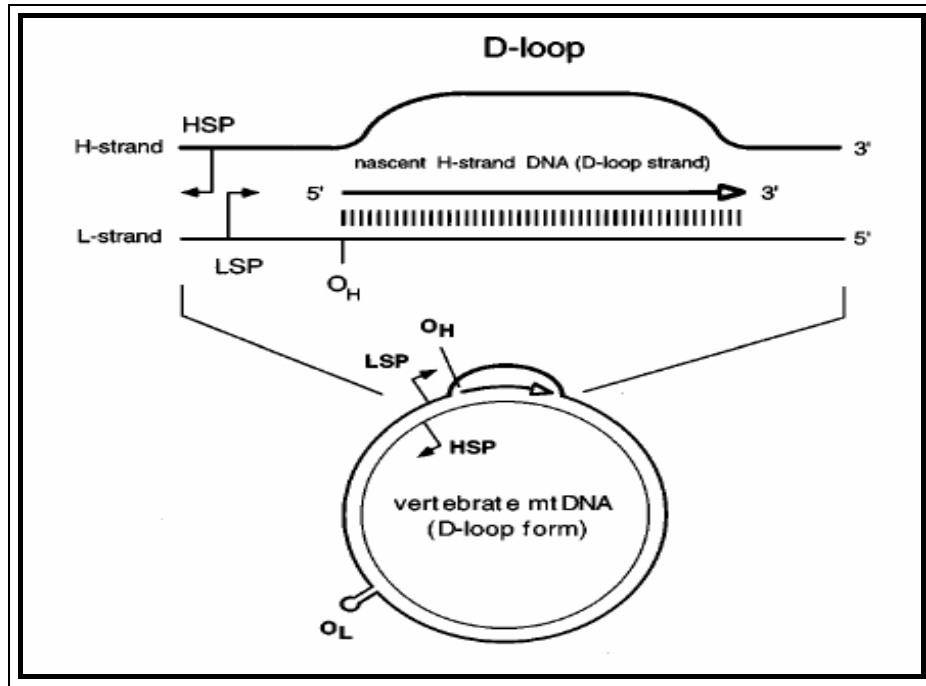


Şekil 2: mtDNA’nın yapısı

2.1.1.3.1.1 mtDNA’nın Replikasyonu

Mitokondriler bölünerek çoğalırlar ve diğer organellerden farklı olarak kendi DNA’larına sahip olduğu için replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonu mitokondri içinde yapılır (7). mtDNA’nın replikasyonu nDNA’dan farklıdır. Ancak mtDNA’nın replikasyonu ve gen ekspresyonu nükleer genler tarafından kontrol edilir (59,74). Mitokondride replikasyon O_H ’de bir noktadan, hafif zincirin promotorundan transkribe

olan RNA primeriyle başlar (277). İlk primerin yapılması mtRNA polimeraz ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (mtTFA)'ya ihtiyaç duyar. mtTFA, mtRNA polimeraz tarafından başlatılan transkripsiyonu aktive eder. Uzayan LSP transkripti RNA/DNA hibriti oluşturur. Ribonükleaz mitokondriyal RNA işlemci endonükleaz (RNaz MRP), RNA/DNA hibridinin olgun RNA primerlerine dönüşmesinde rol oynar (283). Kısa RNA transkript, DNA polimeraz gama (PolG) 'nın baz ekleyebileceği serbest 3' ucuyla her iki zincirle de etkileşime girer. Transkript, PolG ile uzatıldıktan sonra DNA replikasyonunun sonlanmasıyla belirlenen D-loop oluşur (86). (Şekil 3)



Şekil 3: D-loop oluşumu

Uzama ağır zincirin uzaması yönünde devam eder ve hafif zincirin replikasyon orjinini geçtiğinde, tek zincirli DNA'da hafif zincir için kalıplık edecek mtDNA primeri sentezlenir. Uzama ağır zincirle ters yönde olmak üzere başlar. RNA primerlerinin uzaklaştırılması ve sentezlenmesi tamamlanmış DNA zincirlerinin ligaz ile birleştirilmesinden sonra replikasyon işlemi tamamlanır. Bu işlemler mitokondride bulunan tek DNA polimeraz olan PolG tarafından gerçekleştirilir (86). PolG, mtDNA'nın replikasyon ve tamir gibi olaylarının meydana gelmesinden sorumlu mitokondriyal bir polimerazdır (349). PolG, 5'-3' polimerizasyon ve 3'-5' ekzonükleaz

aktivite gösterir. Nükleotid seçiciliği ve ekzonükleotik yanlışları düzeltme aktivitesi, baz yerleştirilmesinin doğrulukla yapılmasını sağlar (86).

2.1.1.3.1.2 mtDNA'nın Transkripsiyonu ve Translasyonu

mtDNA'nın transkripsiyonu da nDNA'dan farklılık gösterir. Ökaryotlarda nDNA'da transkripsiyon için her gen kendine ait spesifik bir promotere sahiptir. Oysa mtDNA polisistronik bir transkripsiyon gösterir (59, 74, 332). D-loop bölgesinde, H ve L zincirin promotlerinde yerleşmiş olan iki majör transkripsiyon başlama alanı vardır (IT_{H1} ve IT_{L1}) (53).

Mitokondriyal transkripsiyon, RNA polimeraz ve mtTFA'ya ihtiyaç duyar (308). mtTFA, HSP ve LSP'nin upstream bölgelerine bağlanarak mtDNA'nın konformasyonel değişikliğini indükler ve RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmasına izin verir (94). Transkripsiyonun sonlanmasına aracılık eden faktör (mtTERM), mtDNA'ya bağlanır ve DNA heliksinde bükülmeye neden olur. Fiziksel bir bariyer oluşturarak transkripsiyonu sonlandırır (136, 285). Sentezlenen dizi ribonükleaz P (RNaz-P) ile kesilerek mRNA, tRNA ve rRNA'lar birbirinden ayrılır (59, 74, 332). Genlerin çoğu H zincirden transkribe edilir. H zincir 2 tane rRNA geni, 14 tane tRNA geni ve 12 tane protein kodlayan geni içerir (74, 150).

mtDNA tarafından kodlanan mRNA'lar mitokondri içinde translasyona uğrar. Mitokondri translasyonunda önemli bir nokta, evrensel kodlamadan farklılık göstermesidir. Bundan dolayı mtDNA tarafından kodlanan proteinlerin translasyonu için mtDNA'nın kendisi tarafından kodlanan uygun tRNA'lara ihtiyaç vardır. mtDNA ve nDNA arasındaki kodon farklılıkları Tablo II'de gösterilmiştir (356).

Tablo II: mtDNA ve nDNA arasındaki kodon farklılıkları

Kodon	nDNA	mtDNA
UGA	Stop	Trp
AGA	Arg	Stop
AGG	Arg	Stop
AUA	Ile	Met

Memeli mitokondriyal mRNA'sı, ribozoma bağlanmayı kolaylaştıracak öncü sekanslara sahip değildir ve 7-metilguanilat cap yapısı bulunmamaktadır. Böylelikle ribozomu başlama kodonuna yönlendiren tanıma mekanizmasından yoksun bırakılmıştır. Düşük translasyon verimi, mitokondrideki mesajcı yoğunluğu ile yeterli hale getirilmeye çalışılmıştır (108, 120, 320). Tablo III'de mtDNA ve nDNA'nın yapısal ve fonksiyonel farkları gösterilmektedir (261).

Tablo III: mtDNA ve nDNA'nın yapısal ve fonksiyonel farkları

Karakter	nDNA	mtDNA
Büyükölük	~ 3,3x10 ⁹ bç	16.569 bç
Hücre başına DNA sayısı	Haploid hücrede 23	Her hücrede birkaç bin kopya (poliploidi)
Kodlanan genlerin sayısı	~ 20.000-30.000	37 (13 polipeptid, 22 tRNA ve 2 rRNA)
Gen dansitesi	~ 1/40.000 baz çifti	1/450 baz çifti
Kodlanan DNA yüzesi	~ %3	~ %93
İntron	Çoğu gende bulunur	Yok
Kodon kullanımı	Universal genetik kod	AUA metionini, TGA triptofanı, AGA ve AGG stop kodonu kodlar
İlişkili proteinler	Nükleozom ilişkili histon proteinleri ve non- histon proteinler	Histon yoktur
Kalıtım	Mendelien ve paternal	Maternal
Replikasyon	DNA polimeraz α ve δ 'yı kullanır	DNA polimeraz γ 'yı kullanır.
Transkripsiyon	Genlerin çoğu için spesifik	Polisistronik

2.1.1.3.1.3 Mitokondriyal Kalıtım

Nükleer genlerin aksine, insan mtDNA'nın sadece anneden kalıtıldığı bilinmektedir. Annenin mtDNA'sı tüm yavrulara aktarılır, babanın mtDNA'sı ise mitokondriyal kalıtıma katkıda bulunmamaktadır (291,333).

Hücre bölünmesi esnasında mitokondri ve mtDNA, yavru hücrelere rastgele dağılır. Hücrelerdeki tüm mtDNA'ların aynı olması gerekirken, mutasyon nedeniyle normal ve mutant DNA bir arada bulunur (116). Hücrelerde belirli bir mutant ve normal mtDNA'nın bir arada bulunmasına 'heteroplazmi' denir. Bu durum letal mutasyonların tolere edilerek kalıcı olmasını sağlar. Tüm mtDNA'lar tek tip (mutant ya da normal) olursa buna da 'homoplazmi' denir. Replikasyon esnasında mtDNA kardeş hücrelere paylaştırıldığı için mutant ve normal DNA oranı hücreden hücreye değişmektedir (150,333). Heteroplazmik olarak bulunan mutasyonlarda hastalığın ortaya çıkması, mutant DNA oranına bağlıdır. Normal mtDNA oranının, belirli bir değerin altına düşmesi, ölümcül hastalıklara yol açabilir (220).

2.1.1.3.1.4 mtDNA, Mutasyonlara Neden Daha Fazla Maruz Kalır?

mtDNA'nın oksidatif hasara nDNA'dan daha yatkın olduğu ileri sürülmüştür (259). Daha sonraları QPCR'ın geliştirilmesiyle, insan, rat, fare ve mantar gibi çeşitli hücre tiplerindeki oksidatif stresin mtDNA'da nDNA'dan 3-10 kat daha fazla hasara neden olduğu gösterilmiştir (268, 348). Çünkü;

- mtDNA, nDNA gibi histon proteinlerince korunmaz ve bu nedenle mutajenler mtDNA'yı daha çok etkiler.
- Mitokondrilerde DNA onarım sistemi yetersizdir. mtDNA'nın nükleotid eksizyon tamir (NER) için gerekli enzimlerden yoksun olduğu, bununla beraber baz eksizyon tamir (BER) sisteminin oksidatif DNA hasarının uzaklaştırılması için temel yol olduğu ortaya çıkarılmıştır (30, 32, 71, 273). Urasil DNA glikozilaz, apürinik endonükleaz (AP endonükleaz) ve alkilenmiş bazların onarım sistemleri vardır ancak aktiviteleri çok düşüktür (74, 150, 152, 234, 291).
- mtDNA'nın turn-over sayısı çok yüksektir (67).

- mtDNA'nın replikasyonu polimeraz-gama enzimi tarafından yapılır. PolG'nin proofreading aktivitesindeki yetmezlik nedeniyle mutasyon oranı nDNA'dan daha fazla görülmektedir (75, 202).
- mtDNA intron içermediği için, rastgele bir mutasyon genellikle kodlayıcı DNA zincirini etkileyecektir (336).
- mtDNA'sı oksidanların olduğu mitokondri iç zarına yakın yerleşimlidir (198). Mitokondride gerçekleşen OXPHOS sırasında fazla miktarda serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar ve mtDNA bu radikallere maruz kalır (150).

2.1.1.3.1.5 mtDNA Mutasyonları

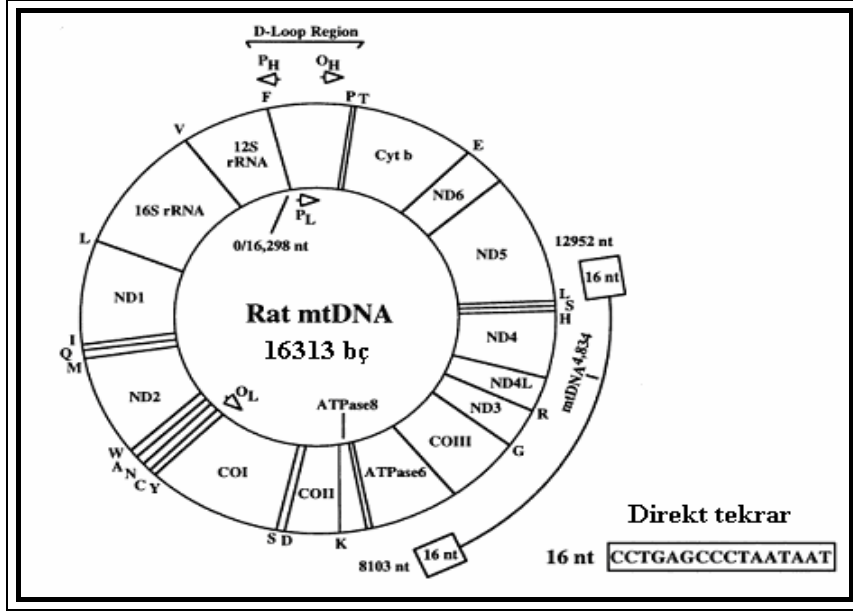
Birçok çalışmada mtDNA'daki mutasyonların nDNA'daki mutasyonlardan daha hızlı olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir (152). mtDNA mutasyonları, baz değişimi ve insersiyon-delesyon mutasyonları olarak iki temel gruba ayrılmaktadır. Baz değişimi mutasyonları, aminosit değişikliğine neden olan missense mutasyonları ve protein sentezi ile ilişkili nokta mutasyonlarını içermektedir. Sıklıkla görülen mutasyonlar, A-G ve G-A transizyon mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, ROÜ gibi endojen faktörler tarafından oluşturulan DNA adduklarının replikatif bypass'ı ya da DNA replikasyon hatalarından ortaya çıkmaktadır (155).

mtDNA'daki somatik mutasyonlar yaşlanmanın ya da yaşlanma ile ilişkili hatalıkların nedeni olarak gösterilmektedir (101, 131, 189). Çeşitli çalışmalarda yaşlanan normal ve malign dokularda mitokondriyal nokta mutasyonlarında artış saptanırken (67, 151, 162) çalışmaların çoğu mtDNA'daki delesyonlara odaklanmıştır (85, 102, 279, 310). mtDNA delesyonları ile ilgili yapılan çalışmalar, delesyon tipi mtDNA mutasyonlarının yaşlanma ve yaşlanma ile alakalı hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (76,133). mtDNA delesyonlarının sadece yaşlanmanın belirtisi olmadığı aynı zamanda yaşlanmanın nedeni de olabileceği bildirmiştir (148). Bu delesyonlar, iskelet kası, miyokard ve beyin gibi postmitotik dokularda farklı oranlarda birikmektedir (58).

Delesyonların, mtDNA'nın replikasyonu sırasında olduğu bilinmektedir ve normal yaşlanma ile beraber OXPHOS kapasitesinin azalmasının bir sonucu olarak birikmektedir (39, 67). Delesyona uğramış olan ve normal mtDNA, her hücrede beraber bulunur. Mutant mtDNA kopyalarının oranı, dokuların mitotik aktivitesi ile ve daha

önemlisi dokuların mitokondriyal ATP üretimine ihtiyacı ile orantılıdır (352). Ozawa ve arkadaşları (353), değişik PCR primerleri kullanarak tüm mtDNA molekülünü taramışlar ve 180'in üzerinde değişik büyüklüklerde delesyon varolabileceğini rapor etmişlerdir. Her iki replikasyon orjininin ortadan kalktığı delesyon tipi, O_H ve O_L delesyonları, Pearson Sendromu, Oküler myopatiler, Kronik Progresiv External Oftalmopleji (CPEO) ve Kearns Sayre Sendromu ile ilişkilidir (333). Bu hastaların %35-50'de görülen delesyon ise 13 bç'lik direkt tekrarlarının yanında yer alan 8468-13446 nükleotidleri arasındaki 4977 bç'lik delesyondur (123). Diğer delesyonlar da farklı uzunluk ve lokalizasyonlar göstermektedir (217).

Ratlar, günümüzde genetik temeli olan insan hastalıklarının anlaşılmasında geçerli bir modeldir ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir (64, 145). İnsanlardaki 4977 bç'lik mtDNA delesyonunun ratlarda görülen şekli olan 4834 bç'lik mtDNA delesyonunun yaşlı dokularda biriktiği bulunmuştur ve mtDNA'da 8103-8118 (ATP6 geni) ve 12937-12952 (ND5 geni) nükleotidleri arasında lokalize 2 tane 16 bç tekrarı içeren 4834 bç'lik bölgenin delesyonu olarak tanımlanmaktadır (102). Bu delesyon, yüksek insidansı nedeniyle *yaygın delesyon* (mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu, common deletion) olarak adlandırılmaktadır (352) ve oksidatif hasarın spesifik bir belirteci olarak kullanılmaktadır (85). mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu aynı zamanda bazı ilaçlar (216) veya stresle de (267) artış göstermektedir. Ratlarda yapılan çalışmalarda, bazı dokularda diyet kısıtlaması ile bu delesyonun azaldığı tespit edilmiştir (49, 154). Şekil 4'te mtDNA'da mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon bölgesi gösterilmektedir (67).



Şekil 4: mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon bölgesi

mtDNA delesyonlarının birikiminin nedeni tam olarak anlaşılmasına rağmen, respiratuvar zincir anormallikleri ve serbest radikallerin üretilmesi ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (184, 248, 340). Oksidatif stres de mtDNA baz modifikasyonları nedeniyle delesyon veya fonksiyon kaybına neden olmaktadır (303, 304). Daha küçük boyuttaki delesyona uğramış mtDNA'nın replikatif üstünlüğü, yaşlı dokularda delesyonlu mtDNA'nın daha hızlı birikmesine yol açmaktadır (72, 87).

mtDNA delesyonlarının çoğu direkt tekrarlar ile ilişkilidir. Bu olayın nedeni, yanlış eşleşme yoluyla direkt tekrarların sınırlandırdığı bölgedeki homolog rekombinasyon olayıdır (225). Yapılan bir çalışmada, ratlardaki direkt tekrarlardan 3 tanesi mitokondriyal delesyonlarla ilişkili bulunmuştur ve direkt tekrar sekansının bir kopyasının ayrı ayrı kesme noktalarında kaldığı, DNA sekansı ile doğrulanmıştır. 16 nükleotid direkt tekrarı ile olan delesyon tipinde rat mtDNA'nın 4834 bp'lik kısmı uzaklaştırıldığı görülmüştür. mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonunun, çalışılan bütün dokularda yaş ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. O_H ve O_L'leri korunmakla beraber, mtDNA'nın %30'u delesyona uğramıştır (67) ve delesyona uğramış mtDNA kısmında, sitokrom c oksidazın, NADH ubikinon oksidoredüktaz ve ATP sentazın subunitlerini içeren proteinler kodlanmaktadır (39). mtDNA delesyonunun prevalansı, direkt tekrar büyüklüğüne, delesyonun büyüklüğüne ve mutasyona uğramış molekülde replikasyon orjininin varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir (67).

2.1.1.3.1.6 mtDNA Tamir Mekanizmaları

İnsan hücrelerinin mtDNA'nda, UV'nin indüklediği tamir edilmeyen pirimidin dimerlerinin bulunmasıyla mitokondriyal DNA tamir kapasitesinin olmadığı düşünülmekle beraber (60) bugün mtDNA'da oluşan bazı hasarların onarılabildiği bilinmektedir (79, 239).

nDNA hasarı onarılamayacak kadar büyük olduğunda, hücre apoptotik mekanizmasını çalıştırmaktadır. mtDNA'nın birden çok kopyasının bulunması nedeniyle oluşan hasar mtDNA tarafından kompanse edilebilmektedir. mtDNA, nDNA'dan daha savunmasız olduğu için, oksidatif strese ve kimyasal hasarlara daha fazla maruz kalır. Bu nedenle oksidatif olarak modifiye olmuş bir baz olan 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG), mtDNA'da çok daha fazla miktarda oluşur ve birikir (156). Oksidatif modifiye edilmiş mtDNA molekülündeki 8-OHdG rezidüleri, mitokondriyal 8-OHdGTPaz tarafından uzaklaştırılabilir. Ancak bu enzim, diğer modifiye bazları uzaklaştıramaz (179, 314).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mitokondrinin, UV-radyasyon, karsinojenik polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve sisplatin gibi kemoterapötik ajanların indüklediği DNA adduklarının uzaklaştırılması için majör yol olan NER için gerekli enzimlerden yoksun olduğu ortaya çıkarılmıştır (30, 32, 71, 273). Mitokondride NER tamir sistemi olmadığı için UV hasarı tamir edilememektedir (60, 269).

Mitokondrilerde, DNA sarmalını tahrip etmeyen küçük miktardaki baz hasarları, BER tarafından onarılır. mtDNA'da meydana gelen sitozinin urasile deaminasyonu, alkalasyon, bazların oksidatif modifikasyonları (8-OHdG) ve DNA replikasyonu sırasında oluşan hasarlar düzeltilebilir (156). Bu arada, alkile baz alanlarının tamiri çift zincir kırık tamiri ve yanlış eşleşme tamiri olduğuna dair deneysel kanıtlar gösterilmiştir (342).

PolG, 3'-5' yanlışları düzeltme özelliğine sahip olmasına rağmen mtDNA'da yüksek oranda mutasyon görülmesinin zayıf onarım sistemine bağlı olduğu rapor edilmiştir (156).

2.1.1.3.1.7 mtDNA ve Hastalıklarla İlişkisi

Bütün organizmaların enerjiye ihtiyaç duymalarından dolayı ATP üretiminde oluşacak yetersizlikler, mitokondriyal hastalıkların oluşmasındaki en önemli nedendir

(150). Oksidatif fosforilasyon beyinde, kasta, kalpte, karaciğerde, böbrekte ve pankreasın insülin oluşturan adacıklarında birincil enerji kaynağı olduğundan, mitokondriyal hastalıklar bu organlarda öncelikli olarak kendini gösterir. Klinik tablo ve hastalığın şiddeti, mtDNA mutasyon tipine, mutant DNA'nın oranına ve doku dağılımına bağlıdır (231, 334). Son yıllarda yapılan çalışmalar, mtDNA mutasyonlarının nörodejeneratif hastalıklar (336), yaşlanma (316) ve kanserle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (148, 182).

Çeşitli hastalıklar ve mtDNA delesyonları arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda, mtDNA delesyonlarının oluşumunda yaşlanma kadar hastalık patogenezi ve şiddetinin de rol oynadığı gösterilmiştir (164, 185). Aynı yaş grubundaki hastalıklı ve sağlıklı bireylerden alınan doku örnekleriyle yapılan bir çalışmada, hastalık patogenezi ve şiddetinin, mtDNA delesyonlarının oluşma yaşını aşağıya çektiği rapor edilmiştir. Hastalıklı dokularda biriken toksik maddelerin oksidatif etkiyi artırdığı ve dolayısıyla erken oksidatif hasar meydana getirdiği ileri sürülmüştür (185).

İlk olarak, mtDNA mutasyonu sonucu ortaya çıkan 'LHON' (Leber's Hereditary Optic Neuropathy) hastalığını tanımlanmış ve günümüze kadar geçen süre içerisinde çeşitli hastalıklarda mtDNA'nın rolü ile ilgili çalışmalar devam etmiştir. İnsanlarda tanımlanan beyin, kalp, iskelet kası, böbrek ve endokrin bezlere ait bir çok kronik dejeneratif hastalıkların moleküler temelinde mtDNA mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir (333, 337). Mitokondriyal hastalıkların, körlük, sağırılık, diyabet, renal fonksiyon bozuklukları ve karaciğer hastalıklarını içeren bir çok klinik bulgularla da ilişkili olduğu bildirilmiştir (220, 335). Tablo IV'de mtDNA ve ilişkili olduğu hastalıklar gösterilmektedir (322).

Tablo IV: mtDNA ve ilişkili olduğu hastalıklar

Asbesitoz/ Mezotelyoma	
AZT (HIV tedavisi)	Diabetes Mellitus
Kanser	İskemi- reperfüzyon zedelenme
Meme	Karaciğer hastalıkları
Kolorektal	Alkolik hepatit
Gastrik (H.Pylori enfeksiyonu)	Hemokromatozis
Hereditör paraganglioma	Nörodejeneratif hastalıklar
Feokromasitoma	Alzheimer hastalığı
Papiller renal hücreli	ALS
Uterin leiomyom	Friedreich ataksi
Kardiyovasküler hastalıklar	Huntington hastalığı
Ateroskleroz	Parkinson hastalığı
Progresif kalp yetmezliği	

2.1.2 Mitokondrinin Fonksiyonları

Mitokondri, lipid ve karbonhidratların yıkımından elde edilen ve oksidatif fosforilasyon işlemiyle ATP'ye dönüştürülen kullanılabilir enerjinin büyük bölümünün üretiminden sorumludur (61). Ayrıca Hem sentezi, lipid sentezi, aminoasit sentezi, nükleotid sentezi, karaciğerde amonyağın üre siklusu ile detoksifikasyonu, kolesterol metabolizması, östrojen ve testosteron sentezi, nörotransmitter metabolizması, serbest radikal üretimi ve detoksifikasyonu da mitokondride gerçekleşen metabolik olaylardır (107, 275).

2.1.2.1 Oksidatif Fosforilasyon (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS)

OXPHOS terimi, mitokondrilerin ADP ve inorganik fosfattan (Pi) ATP üretmesini tanımlamak için kullanılır. Karbonhidratların ve yağların yıkılmasından elde edilen kullanılabilir enerjinin büyük kısmı mitokondride yer alan oksidatif fosforilasyonla sağlanır (61). Bütün basamaklar mitokondri iç membranda gerçekleşmektedir (213, 244).

ATP sentezi, iç mitokondriyal membranın diğer tarafına bir proton gradienti ile NADH veya FADH₂'den oksijene elektronların akışı ile gerçekleştirilir. Glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve sitrik asit siklusunda yapılan NADH ve FADH₂, yüksek enerjili moleküllerdir. Çünkü her biri yüksek bir transfer potansiyeline sahip bir çift elektron içerir. Oksidatif fosforilasyon sırasında NADH ve FADH₂'den çıkan elektronlar O₂ ile birleşir ve bu yükseltgenme/indirgenme reaksiyonları sırasında açığa çıkan enerji ADP'den ATP sentezlemek için kullanılır (61).

OXPHOS, 5 enzim kompleksinden oluşur (kompleks I, II, III, IV, V). Bu enzimleri oluşturan polipeptidler, yaklaşık 90 kadar nükleer gen ve 13 mtDNA geni tarafından kodlanmıştır. Elektronların NADH'tan O₂'e taşınması, enerji üreten bir reaksiyondur. Enerjinin kullanıma uygun şekilde toplanabilmesi için, elektronların elektron taşıma zincirini oluşturan bir dizi taşıyıcıdan geçirilerek, yavaş yavaş çıkarılması gerekir. Bu taşıyıcılar mitokondri iç zarında dört kompleks halinde düzenlenmiştir. Beşinci bir protein kompleks, enerji sağlayan elektron taşıma reaksiyonunun ATP senteziyle birleşmesini sağlar (61). Şekil 5'de OXPHOS enzim kompleksleri görülmektedir.

Kompleks I (NADH: Ubikinon Oksidoredüktaz), OXPHOS sisteminin 7'si mitokondride kodlanan, 43 subunitten oluşan en büyük enzim kompleksidir. Enzim, bir FMN ve 8 Fe-S kümelerinden oluşan bir çok prostetik grup içerir (48). NADH ile gelen elektronlar, elektron taşıma zincirine, kompleks I'den girer. Bu iki elektron önce NADH'dan flavin mononükleotide aktarılır ve NADH, NAD⁺'a oksitlenir. Elektronlar daha sonra demir-kükürt kompleksi üzerinden küçük, lipitte çözünen bir molekül olan koenzim Q (ubikinon)'ya aktarılır. Matriksten elektron çifti başına 4 proton intermembran aralığına çıkarılır (61, 224).

Kompleks II (Süksinat oksidoredüktaz), sadece nDNA'da kodlanan komplekstir. Trikarboksilik asit siklusu (TCA)'nda süksinatın fumarata okside edilmesini ve süksinattan ETZ'ne elektron verilmesini sağlar (47). Kompleks II, iki tip prostetik grup ve en az 4 farklı protein içerir ve iç mitokondriyal membrana bağlanmıştır. Bir proteinde, FAD ve Fe-S merkezi vardır (221). Elektronlar süksinattan, süksinat dehidrogenazın FADH₂'ye indirgediği FAD'ye aktarılır. Daha sonra Fe-S kümelerinin birkaçı ile ubiquinole indirgenmesi için ubiquinona aktarılır (177, 271). Kompleks I'de elektronların NADH'tan koenzim Q'ya aktarılmasındakinin aksine,

elektronların FADH₂'den koenzim Q'ya aktarımı serbest enerjide önemli bir düşüş sağlamaz. Bu nedenle kompleks II'de zardan proton pompalanmaz, ATP sentezi oluşmaz. Sonuç olarak, FADH₂'den çıkan elektronların elektron taşıma zincirinden geçişi sırasında sadece kompleks III ve IV'te serbest enerji elde edilir (61).

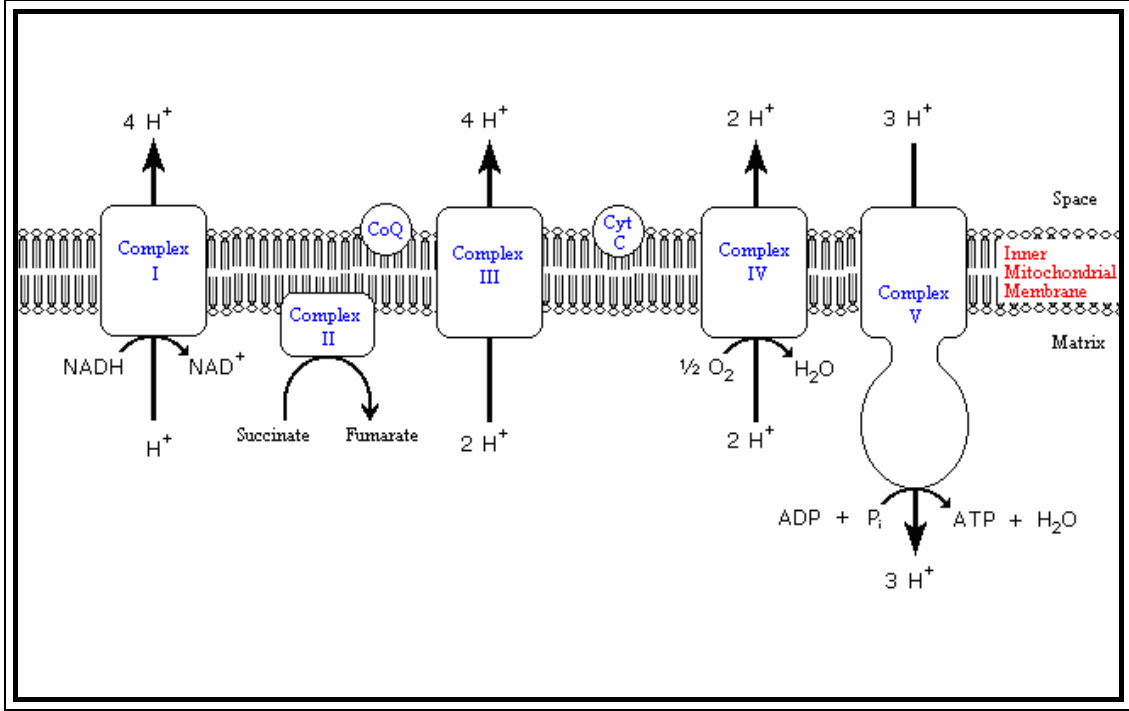
Elektron taşıyan enzimlerin her birinin etkisiyle redükte ubikinon havuzu dolar. koenzim Q, elektron ve protonların hareketli taşıyıcısı olarak iş yapar ve oksitlenerek elektronları kompleks III'e geçirir. (221).

Kompleks III (Ubikinon: sitokrom C oksidoredüktaz, sitokrom bc₁ kompleksi), elektronları ubikinolden sitokrom c'ye aktarıırken matriksten intermembran aralığına proton transferi yapar (221). Kompleks III, her bir monomeri 11 subunitten oluşmuş homodimer yapı içerir. Mitokondri genomu tarafından kodlanan subunit, sitokrom b olarak adlandırılır (355). Bir ubikinol molekülünün oksidasyonu sırasında dört proton zarlar arası boşluğa geçer (68, 83).

Kompleks III'te elektronlar, sitokrom b'den sitokrom c' ye geçirilir. İç zarın dış yüzüne bağlı, hareketli bir periferel zar proteini olan sitokrom c, elektronları son olarak O₂'e aktaracak olan kompleks IV'e taşır (61).

Kompleks IV (Sitokrom c oksidaz), 13 subunitten oluşur, bunların 3'ü mtDNA'da kodlanır. Redükte sitokrom c havuzundan moleküler oksijene elektron transferini sağlar ve oksijeni suya indirger. Kompleks IV'ten dört elektron, iki molekül oksijene verilir. Bu reaksiyon sırasında mitokondri iç membranından iki proton intermembran aralığına geçer (280).

Kompleks V (ATP sentaz), ADP+Pi'den ATP oluşumu sağlar. mtDNA tarafından kodlanmış iki tane subunit içerir. İç zar protonlara geçirgen değildir ve protonlar sadece protona özgü kanallardan (Fo) matrikse geri dönebilir. Kompleks V, membrana bağlı integral protein (Fo) ve büyük periferel zar proteini F₁'den oluşur. İntermembran aralıkta protonlar, enzim kompleksinde subunit rotasyonuna yol açan Fo proteini yoluyla kompleks V'e girerler. Bu rotasyondan oluşan enerji daha sonra F₁ proteininde ATP sentezi için kullanılır (280). Geçen her üç protona karşılık bir ATP sentezlenir (68, 83). Mitokondri iç zarı genelde yüklü molekülleri geçirmez, ADP ve P_i'i matrikse, ATP'yi de sitozol dışına taşıyan 'adenin nükleotid translokaz' (ANT) sistemi bulunur. ANT, iç zarda bulunur ve zarlar arası boşlukta ADP bağlar, onu matrikse taşıırken bir ATP molekülü eş zamanlı dışarıya salınır (221).



Şekil 5: OXPHOS enzim kompleksleri

Oksijen, OXPHOS’da son elektron alıcısıdır. Bu elektron transferi ile ortaya çıkan enerji, kompleks I, III ve IV’de protonları iç mitokondriyal membranın diğer tarafına pompalamak için kullanılır (291,297). Kemiosmotik modele göre, elektron akışı zardan proton transferi ile olur, hem kimyasal hem de elektriksel fark meydana gelir. ETZ’de matriks alanından protonlar intermembran aralığına transfer edilir, intermembran aralığının sitoplazmik alanında protonlar depolanır, matriks alanı ise negatif yüklenir. Zar üzerinde elektrokimyasal gradiyent şeklinde potansiyel enerji oluşur. Bu enerjinin bir kısmı zarın iki tarafında farklı yüklü iyonlar olduğu için membran potansiyeli olarak, geri kalanı ise proton konsantrasyonu dışta daha yüksek olduğu için kimyasal gradiyent olarak depolanır. Sonuç olarak bu elektrokimyasal gradiyent OXPHOS sisteminin beşinci kompleksi tarafından kullanılır (68, 83, 244, 271).

2.2. SERBEST RADİKALLER

Elektronlar orbital denem bölgelerde dönerler. Her orbital normal şartlarda birbirine zıt yönde dönen 2 elektron ihtiva eder (56, 354). En dış elektron yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda ortaklaşmamış elektron bulunduran, stabil olmayan, kısa ömürlü molekül ya da molekül gruplarına “radikal” adı verilmektedir ve

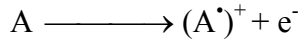
R[•], R⁻ gösterilmektedir (163). Serbest radikaller, atomik yörüngelerinde ortaklaşmamış elektron bulundurarak, bağımsız olarak varolabilen moleküllerdir. Ortaklaşmamış elektronun kazandırdığı en önemli özellik, bir çok radikal ile bu elektronun paylaşılabilmesidir (77, 127, 160). Radikaller, en sık olarak ETZ'de elektronların transferi ile oluşur (56, 354).

Serbest radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşur. Elektriksel olarak nötral, pozitif veya negatif yüklü olabilirler (126).

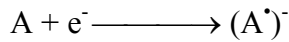
- Kovalent bağların homolitik kırılması; yüksek enerjili elektromagnetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde paylaşılmamış olarak kalmakta ve radikal formu oluşmaktadır (5, 163, 274).



- Nötral bir atomdan bir elektron kaybı; nötral bir atomun elektron kaybetmesi ile dış elektron yörüngelerinde paylaşılmamış elektron kalması durumunda radikal formu oluşmaktadır (5)(126).



- Nötral bir atoma bir elektronun eklenmesi; nötral bir atoma veya moleküle elektron transferi ile dış elektron yörüngelerinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu da radikal oluşumuna neden olabilir (5). Biyolojik sistemlerde en sık bu reaksiyona rastlanılmaktadır (126).



Hücrelerde oksidatif hasarların oluşumunda ilk sırada yer alan serbest radikaller normal hücresel bileşenleri bağlayarak, membran lipidlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerler, proteinleri denatüre ederler ve nükleik asitlere saldırırlar. Ayrıca serbest radikallerin, DNA üzerine etkisiyle DNA zincirinde kopmalar ve bazlarda kırılmalar meydana gelir (5). Tablo V'te oksijen türevi bileşikler gösterilmektedir (1).

Tablo V: Oksijen türevi bileşikler

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($^{\bullet}OH$)	Hipoklorik asit ($HOCl$)
Peroksil ($L(R)OO^{\bullet}$)	Hidroperoksit ($L(R)OOH$)
Alkoksil ($L(R)O^{\bullet}$)	Ozon (O_3)
Hidroperoksil (HOO^{\bullet})	Singlet oksijen (1O_2)
Nitrik oksit (NO^{\bullet})	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

2.2.1. Oksijen Radikalleri

Normal şartlarda oksijen kararlı, kokusuz, tatsız, renksiz ve sudaki çözünürlüğü sınırlı olan bir gazdır. İnsan hayatı için hem gerekli hemde toksik olan bir moleküldür (6). Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklaşmamış elektrona sahip, doğada dioksijen şeklinde bulunan (O_2) kararsız bir elementtir (126, 163). Bu nedenle de oksijen bir radikal olmaktadır (6).

Oksijen, iki elektronu ortaklaşmamış şekilde bir elektron dağılımına sahip olduğu için bazen biradikal olarak değerlendirilir. Oksijen molekülünün reaktif bir özelliği olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir (56, 163, 325).

Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla, moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin en önemlileri oksijen radikalleridir (147, 163).

Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak devamlı yapılırlar. Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri, moleküler oksijen ve onun reaktif ürünleri olup bu radikaller, oksijenli solunum sırasında oluşurlar (147, 318, 362). Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) olarak adlandırılır. Tablo VI'da oksijen'in indirgenme reaksiyonları gösterilmektedir (98, 228).

Tablo VI: Oksijenin indirgenmesi

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HOO\cdot$	Hidroperoksil radikali
$HOO\cdot \rightarrow H^+ + (O_2\cdot)^-$	Süperoksit radikali
$(O_2\cdot)^- + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + (\cdot OH)^-$	Hidroksil radikali
$(\cdot OH)^- + e + H^+ \rightarrow H_2O$	

2.2.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2\cdot^-$)

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken bazı tehlikeleri de beraberinde getirir. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijene bir elektron eklenmesi ile ($O_2\cdot^-$) radikali oluşur (176).

($O_2\cdot^-$) radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan ($O_2\cdot^-$) mitokondriyal elektron transfer zincirinde, NADH' in okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'a okside olması ile üretilir. ($O_2\cdot^-$), bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. ($O_2\cdot^-$), nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Artmış ($O_2\cdot^-$) düzeyleri, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. ($O_2\cdot^-$)'in aşırı üretimi ile ATP sentezi inhibe edilir ve elektron transport zinciri yavaşlar (56, 208, 209, 354).

($O_2\cdot^-$), ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi enzim katalizörlüğünde elektron indirgenmesi sonucunda endojen olarak da oluşturulur (171, 206, 360). Lipooksijenaz ve siklooksijenaz ise diğer ($O_2\cdot^-$) oluşturan enzimlerdir (171). ($O_2\cdot^-$) ayrıca yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar ile bazı bileşiklerin otooksidasyonunda ve fagositozda oluşur (229).

2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 , oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da ($O_2\cdot^-$)'lerin enzimatik ve nonenzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşmaktadır (5, 163,

299). Ürat oksidaz, glukoz oksidaz, d-aminoasit oksidaz gibi birçok enzim oksijene iki elektron transfer ederek direk H₂O₂ oluşturabilirler (128).

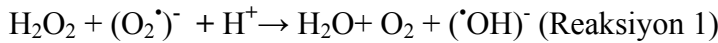
H₂O₂, membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerine toksik etkilere sahip olabilir. Fakat eşleşmemiş elektrona sahip olmadığı için radikal olarak adlandırılmaz (228). Ancak üretildiği bölgede kalan (O₂)^{•-} 'in aksine membranları geçerek sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle (O₂)^{•-} 'in ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşarak (O₂)^{•-} ile reaksiyona girer ve en reaktif ve zarar verici radikal olan (•OH)⁻ radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (56, 208, 209, 266, 300, 325, 354).

H₂O₂'in redoks özelliği ve geçiş metalleri varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturmasına karşı vücut, savunma sistemi geliştirmiştir. İstenmeyen H₂O₂ katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır (122).

2.2.1.3. Hidroksil Radikali (•OH)⁻

(•OH)⁻ radikali en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği yerlerde birçok molekül ile reaksiyon verebilir. İyonize radyasyonun etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması ile oluşabildiği gibi, H₂O₂'in metaller ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilmektedir (5, 126).

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan (•OH)⁻ radikali, su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler, bu radikalın paylaşılmamış elektron içeren en dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (126). H₂O₂, (O₂)^{•-} ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan (•OH)⁻ radikalini oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu tepkimeye Haber-Weiss tepkimesi denir (Reaksiyon 1) ve tepkime katalizörsüz ortamda oldukça yavaşken, demirin katalizörlüğünde çok hızlıdır (6, 122).



H₂O₂'in Fe⁺² gibi indirgenmiş metallerle reaksiyona girmeye oldukça fazla eğilimi vardır (166). Bu eğilim neticesinde H₂O₂ ile Fe⁺² arasında Fenton reaksiyonu adı verilen reaksiyon gerçekleşir (Reaksiyon 2) ve son ürün olarak (•OH)⁻ radikali ortaya çıkar (117, 166).



2.2.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir. Bununla birlikte elektron dönme yönlerinin zıtlığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur (122).

Serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal reaksiyonlarını başlattığı için radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet oksijen, son yörüngedeki oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi sonucu oluşabileceği gibi ($O_2^{\bullet-}$) radikalinin dismutasyonu ve H_2O_2 'in hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (5, 126, 299).

2.2.2. Reaktif Nitrojen Ürünleri

Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda son derece stabildirler. Düşük konsantrasyonlarda, ortamda oksijen varlığında bile stabilitesini koruyabilen nitrik oksit (NO^{\bullet}) bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür. Oksijen ve NADPH bağımlı reaksiyon ile nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir (257).

NO^{\bullet} eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez, öte yandan peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur (228). (NO^{\bullet}) metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp bir radikal olan azot dioksiti (NO_2^{\bullet}) oluşturur (169).

(NO^{\bullet}) bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipid peroksidasyonundan korur. Bununla birlikte ($O_2^{\bullet-}$) düzeylerinin arttığı durumlarda ($O_2^{\bullet-}$) ile reaksiyona girer ve bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$) oluşturabilir (243, 325) ve bu da daha ileri şekliyle ($OH^{\bullet-}$) radikaline dönüşür (228).

2.2.3. Endojen Oksidatif Stres Kaynakları

Fizyolojik şartlar altında serbest radikal üretiminin en önemli kısmını mitokondriyal elektron transport zinciri oluşturur. Mitokondride enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken tüketilen oksijenin %1-5'i ($O_2^{\bullet-}$) yapımı ile sonuçlanır.

Buradaki radikal yapımının nedeni NADH Ubikinon Oksidoredüktaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılarından oksijene elektron kaçağı olmasıdır (295).

Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom p450 sistemi ile (295), araşidonik asitten prostaglandin ve lökotrien sentezi sırasında (207), fagositik hücrelerde NADPH oksidaz enzim aktivasyonunun da (344), otooksidasyon olayların da (255), ksantin oksidaz ve glikojen oksidaz gibi oksidan enzim reaksiyonlarında da (11) serbest radikaller ve ROÜ üretilmektedir.

2.2.4. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

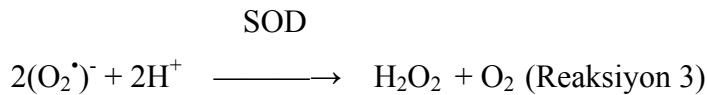
Serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran maddelere “antioksidan maddeler” denilmektedir (274).

2.2.4.1 Hücre İçi Antioksidan Sistemler

Reaktif oksijen ürünleri, SOD, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GSR), sitokrom oksidaz gibi enzimatik ve redükte glutatyon (GSH) gibi non-enzimatik hücre içi antioksidanlar tarafından indirgenir (5, 248, 274).

2.2.4.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Antioksidan savunmanın ilk basamağını $(O_2)^{\bullet -}$ 'in H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzim olan SOD oluşturur (Reaksiyon 3). İnsanda SOD'nın iki izomer tipi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. Mn-SOD mitokondri matriksinde bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz (5, 248, 274). $(O_2)^{\bullet -}$ radikalinin H_2O_2 'e çevrilmesiyle mitokondriyal Fe-S içeren enzimler, $(O_2)^{\bullet -}$ ataklarından korur (105).

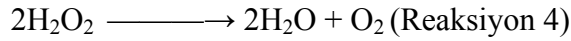


Mn-SOD aktivitesi, dokular arasında eşit olmayan bir şekilde dağılmıştır. Farelerde karaciğer ve böbrekteki aktivitesi, beyin kalp, kas, dalaktan ve akciğerden daha yüksek bulunmuştur (323).

2.2.4.1.2 Katalaz (CAT)

H₂O₂ oldukça toksik etki gösterebilir ve bazı enzimlerle detoksifiye edilir. Bunlardan birisi olan katalaz, H₂O₂'i su ve oksijene ayrıştıran, hem grubu içeren bir metalloenzimdir (Reaksiyon 4). Sıçan dokularında katalaz aktivitesi, karaciğerde en yüksek olmakla beraber böbrek, akciğer, kalp ve beyinde bulunmaktadır. Ancak katalaz, H₂O₂'in uzaklaştırılmasında glutatyon peroksidaz kadar öneme sahip değildir (10, 138, 246).

CAT



2.2.4.1.3 Redükte Glutatyon (GSH)

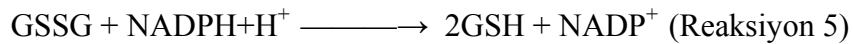
Redükte glutatyon (GSH), yapısında glutamik asit, sistein ve glisin bulunduran, karaciğerde sentezlenen bir tripeptid olup aktif bir (-SH) grubu içerir (80, 236). Vücudun birçok hücresinde bulunur ve hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı korur. DNA sentezinde ve hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, metabolik fonksiyonların yerine getirilmesinde, toksik maddelerin inaktivasyonunda ve serbest radikallerin zararlı etkilerinin önlenmesinde görev yapmaktadır (46, 54, 144, 146).

Mitokondri, hücredeki total GSH'un ~ %10-12'ni içerir (328). Mitokondri, GSH biyosentezi için gerekli enzimlerden yoksundur. Spesifik GSH-transporter gibi GSH'ı mitokondriye taşıyan birkaç sistem mevcuttur. (119, 199). Glutatyon'un ~ %90'ı redükte formdadır. Redükte-okside form, doku, yaş ve metabolik duruma bağlı olarak değişmektedir (251).

2.2.4.1.4 Glutatyon Redüktaz (GSR)

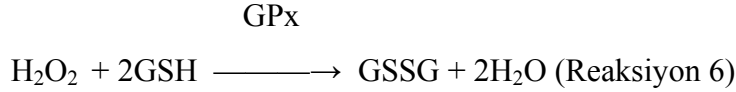
Hidroperoksitlerin redükte olması sırasında meydana gelen okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktazın (GSR) katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte (GSH) hale döner (Reaksiyon 5). Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır (5). GSR, mitokondri matriksinde yer alır (161).

GSR



2.2.4.1.5 Glutatyon Peroksidaz (GPx)

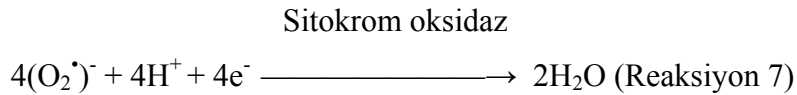
Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumlu, tetramerik yapıda, dört selenyum içeren bir enzimdir. Sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan H₂O₂ ve yağ asidi peroksitlerini ortadan kaldırır (Reaksiyon 6) (5) (248). Memeli dokularında hemen hemen her yerde bulunur. GPx, mitokondriyal matriks (12) ve intermembran aralığı (235) içeren çeşitli kompartmanlarda yer alır. Mitokondriyal ve ekstramitokondriyal GPx, aynı gen tarafından kodlanır (89).



Gpx aktivitesi karaciğer, böbrek ve kalp mitokondrilerinde yüksek, beyin ve iskelet kası mitokondrilerinde ise daha düşük bulunmuştur (88). Gpx aktivitesindeki azalma hücre içi H₂O₂ artışına ve hücre hasarına neden olmaktadır (5, 33, 248).

2.2.4.1.6 Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz

Sitokrom-c, mitokondri intermembran aralıkta bulunur ve (O₂)^{•-}'i uzaklaştırma kapasitesine sahiptir. (O₂)^{•-} tarafından redüklenen sitokrom c, elektron alıcısı sitokrom c oksidaz ile okside edilerek rejenere olur (124, 172, 205). Bu oksidasyon, mitokondrinin ATP üretmekte kullanabileceği proton hareket gücünü oluşturur (197). Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, (O₂)^{•-} suya çevirerek etki göstermektedir (Reaksiyon 7) (5).



Bu reaksiyon fizyolojik şartlarda sürekli olan normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji elde edilir. Ancak çoğu zaman (O₂)^{•-} üretimi bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek (O₂)^{•-}'in zararlı etkilerini önlerler (5, 78).

2.2.4.2 Membran Antioksidanları

Membranların hidrofobik lipid yüzünde hücre içi ortamdan farklı olarak lipidlerde çözünen ve hücrel enzimlerle yok edilemeyen radikaller üretilir. Başta α - tokoferol (E vitamini) olmak üzere, β -karoten, ubiquinal bileşikleri ve koenzim Q membran antioksidanlarıdır. (82, 122).

2.2.4.3 Hücre Dışı Antioksidan Sistemler

Vücut sıvıları ve organik ürünler antioksidan enzimlerin hiçbirini içermez. Bu nedenle antioksidan enzimlerin hücre dışı ortamda hiç bir etkisi yoktur. Transferrin, laktoferrin, askorbik asit, haptoglobulinler, albumin, seruloplazmin, bilirubin, ürik asit gibi proteinler ve glukoz temel hücre dışı antioksidanlardır (43, 122, 126).

Hücreler arası ortamda üretilen serbest radikal metabolitlerinin, demir ve bakır gibi katalizör metal iyonları ile karşılaşmalarının engellenmesi, hücre dışı antioksidan savunmanın temel fonksiyonudur (122).

2.3. mtDNA VE OKSİDATİF STRES

Oksidatif hasar, DNA'da, pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlara, abazik alanlara, tek ve çift zincir kırıklarına neden olmaktadır. mtDNA'da, oksidatif stres altında okside deoksiguanin nükleotidi (8-OHdG), nDNA'dan daha hızlı artarak birikir. 8-OHdG, DNA'da adenin ile ve replikasyon sırasında sitozinle birleşir. Bunun sonucu olarakta transversiyon mutasyonları görülür (155). mtDNA'da oksidatif modifiye baz düzeyi, nükleer DNA'dan 10-20 kat daha yüksek bulunmuştur (230).

DNA modifikasyonları, kanser, Tip II diyabet, ateroskleroz, kronik inflamatuvar olaylar, iskemik hasarlar ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkları içeren çeşitli patolojilerde gösterilmiştir. Mitokondriyal respiratuvar zincir, intraselüler ROÜ oluşumunun majör kaynağıdır ve ROÜ'nin hasar yapıcı etkilerinin önemli bir hedefi de mtDNA olmaktadır (81). Oksidatif stres, elektron transportu, mitokondriyal membran potansiyeli ve ATP oluşumunda bozulma yoluyla hücre zedelenmesine yol açarak, mtDNA'da hasara yol açmaktadır (230).

Mitokondri, hücre içine giren oksijenin yaklaşık %90'dan fazlasının tüketildiği önemli bir hücrel organeldir (341). Normal fizyolojik respirasyon sırasında tüketilen moleküler oksijenin %1-2'i, $(O_2)^{\cdot -}$ radikallerine çevrilir (230). Mitokondride oksijenin

suya indirgendiği basamaklarda oluşan $(O_2)^{\cdot-}$, H_2O_2 ve $(^{\cdot}OH)^-$ radikalleri, mitokondride protein, lipid, RNA ve DNA'yı içeren makromoleküllerde hasar yapmaktadır (270).

Moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesi ile stabil bir ara ürün olan ve bir çok ROÜ'nin prekürsörü olarak bilinen $(O_2)^{\cdot-}$ radikali oluşur (230). Normal şartlar altında, üretilen $(O_2)^{\cdot-}$ radikali mitokondriyal bir enzim olan MnSOD tarafından H_2O_2 'e dönüştürülür. Yeni bir reaktif molekül oluşturma potansiyeline sahip olan H_2O_2 ise tamamen etkisiz hale getirilmek üzere GPx enzimi tarafından suya çevrilir (166). H_2O_2 ve $(O_2)^{\cdot-}$ anyonunun, Haber-Weiss reaksiyonu ile etkileşmesi ile ya da H_2O_2 'in Fenton reaksiyonu ile parçalanması ile $(^{\cdot}OH)^-$ radikali oluşur (230). $(^{\cdot}OH)^-$ radikali bilinen en reaktif molekül olma özelliği ile bulunduğu ortamlarda proteinler, yağ molekülleri ve özellikle DNA molekülleri üzerinde büyük miktarda hasara neden olur (117). Mitokondri içinde üretilen diğer önemli radikal ise $(NO^{\cdot})^-$ 'tir. Sınırlı miktarda olsa da mitokondri kendi $(NO^{\cdot})^-$ sentezini yapabilme kabiliyetine sahiptir (166). $(NO^{\cdot})^-$, mitokondriyal nitrik oksit sentaz (mtNOS) tarafından üretilir ve kompleks III elektron transferini inhibe ederek mitokondri ve mitokondriyal subunitlerde, H_2O_2 ve $(O_2)^{\cdot-}$ üretimini artırır. Kompleks IV 'de $(NO^{\cdot})^-$ inhibisyonuna duyarlıdır. $(O_2)^{\cdot-}$, mitokondriyal matrikste $(NO^{\cdot})^-$ ile reaksiyona girerek yüksek reaktif form olan peroksinitrite dönüşür (44).

H_2O_2 ve $(O_2)^{\cdot-}$ 'in mitokondriyal üretiminin hızı mitokondriyal metabolik duruma bağlıdır. Mitokondriyal dinlenme durumu, solunum hızının nispeten yavaş olması ve ADP'nin olmaması ile karakterizedir ve bu da muhtemelen respiratuvar zincirdeki komponentlerin yüksek redükte durumunun bir sonucu olarak yüksek H_2O_2 ve $(O_2)^{\cdot-}$ üretim hızı ile ilişkilidir. Bunun aksine, yüksek oksijen alım hızı ve fazla ADP kullanılabilirliğinin olduğu aktif mitokondriyal durum, respiratuvar zincirdeki komponentlerin yüksek okside durumunun bir sonucu olarak nispeten düşük H_2O_2 ve $(O_2)^{\cdot-}$ üretim hızı gösterir (34, 35).

Radikal üretimi için doğru lokalizasyon hala tartışmalıdır. Bununla beraber, respiratuvar komplekslerin farklı alanlarında, farklı miktarlarda elektronlar, elektron transfer zincirinde birikir ve $(O_2)^{\cdot-}$ oluşur (3, 227). Solunum zinciri komplekslerinden kompleks I (NADH ubikinon oksidoredüktaz) ve kompleks III (ubikinon sitokrom C oksidoredüktaz)'ün, $(O_2)^{\cdot-}$ radikalinin büyük bir kısmının üretildiği iki temel bölge olduğu belirtilmiştir (9, 281).

(O₂)⁻ radikalinin çoğunun, in vitro şartlarda, kompleks I tarafından oluştuğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. (O₂)⁻ radikalinin oluşumu öncelikle, iç mitokondriyal membranın matris alanında görülmektedir. Kompleks I tarafından (O₂)⁻ radikalinin oluşumunun, kompleks II'nin süsratı olan süksinatın varlığında stimüle edildiği de bulunmuştur (230). Kompleks I'deki Fe-S grupları ve FMN alanının ROÜ oluşumunda önemli olduğu görülmüştür (17).

Kompleks III, elektronların ubikinolden rieske proteininde Fe-S merkezine transfer olmasıyla sitokrom c'ye indirgenir. Ubikinolün oksidasyonu, semikinon radikalini oluşturan tek basamaklı elektron transferini içerir ve unstabil semikinon (Q⁻)'un, (O₂)⁻ radikalini oluşturmak üzere oksijenle reaksiyona girer (38, 258).

mtDNA mutasyonlarının, ROÜ'nin de eşlik ettiği oksidatif fosforilasyon reaksiyonları sırasında oluştuğu kabul edilmektedir (65).

2.4. TIAZOLİDİNEĞONLAR (TZD'lar)

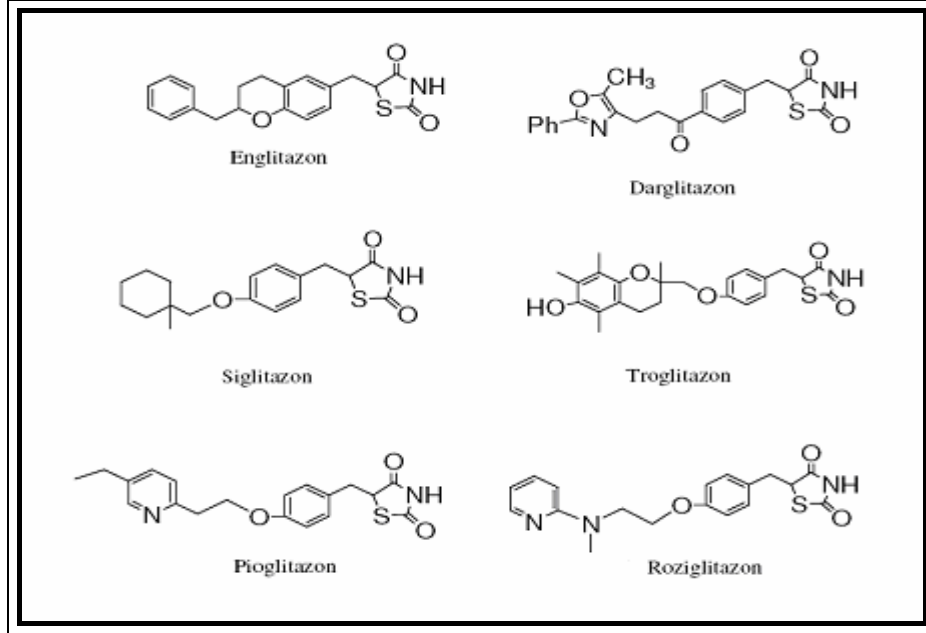
Siglitazon, troglitazon, englitazon, roziglitazon, pioglitazon ve darglitazon tiazolidinedion (TZD) grubu bileşiklerdir (214). TZD sınıfı ilaçların prototipi ciglitazon, ilk olarak 1982'de tanımlanmıştır. Bu ajan, yetersiz etki ve kötü yan etkileri nedeniyle fazla kullanılamamıştır (103).

İlk olarak piyasaya sürülen troglitazondur. Troglitazon lipid peroksidasyonunu inhibe eden ve insülin rezistansında iyi etkileri olan bir ilaç olarak geliştirildi ancak ağır karaciğer toksisitesi ve bazı fatal sonuçlar nedeniyle 2000 yılının mart ayında piyasadan kaldırıldı. Bu grup ilaçlardan FDA tarafından onaylı roziglitazon ve pioglitazon kullanılmaktadır (103, 130). Şekil 6'da TZD grubu antidiabetik ilaçlar gösterilmektedir (347).

2.4.1. Roziglitazon

Roziglitazon, pioglitazon ile beraber 2000 yılında, Tip II diabet tedavisi için kan glukozunu düşürmek amacıyla piyasadaki yerini almıştır (309). Roziglitazon 2,4 ve 8 mg'lık tabletler halinde mevcuttur. Oral alım ile biyoyararlılığı yüksektir ve absorbe edildiği zaman plazmadaki proteinlere büyük oranda bağlanır (>%99) (130, 309, 317). Roziglitazon başlıca CYP2C8 ve daha az olarak CYP2C9 tarafından metabolize edilir. Normal karaciğer fonksiyonu ile yarılanma ömrü 3-4 saat olan roziglitazon (309), safra

yolundan feçesle atılır (214, 223). Roziglitazonun iki majör metaboliti, para-hidroksi ve N-desmetil roziglitazon ve minör metaboliti orto-hidroksi roziglitazon, insan karaciğer mikrozoamlarında belirlenmiştir (18).



Şekil 6: Tiazolidinedion grubu antidiabetik ilaçlar

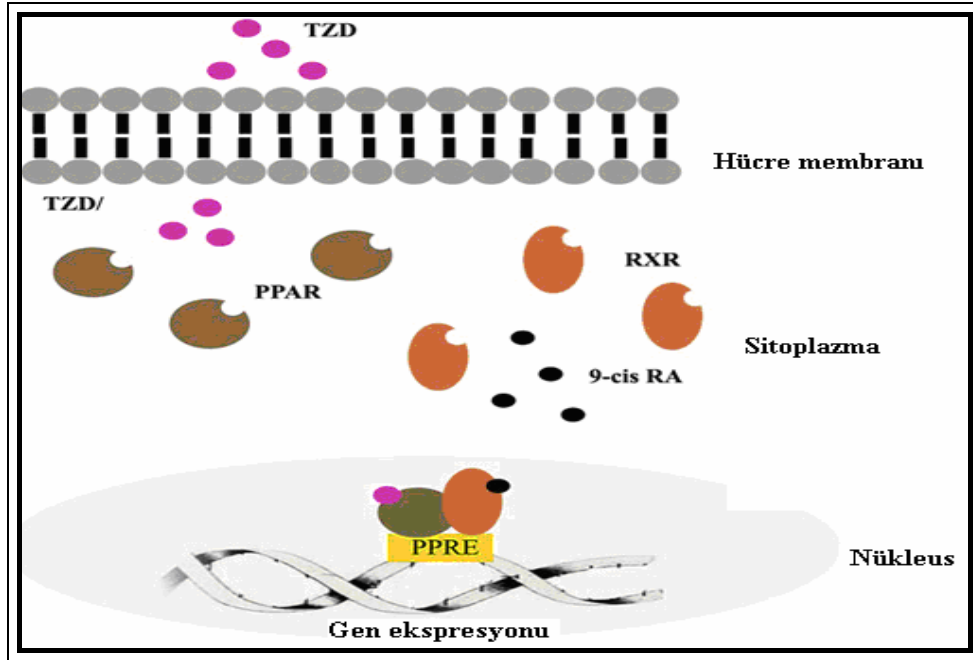
2.4.2. TZD'ların Etki Mekanizması

TZD'lar etkilerini peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ (PPAR- γ)'a bağlanarak gösterirler (282). PPAR- γ , nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. Bütün PPAR'lar retinoid X reseptör ile heterodimerik halde bulunur. PPAR-RXR kompleksi peroksizom proliferatör response element (PPRE) ile bağlanır ve karbonhidrat ve lipid metabolizmasını etkileyen genlerin ekspresyonunu düzenler (26). (Şekil 7)

PPAR reseptörleri 3 tipe ayrılmıştır: **PPAR α** : Karaciğerde, yağ dokusunda, kalp, kas, böbrek ve enterositlerde bulunur. Yağ asidi metabolizmasında ve ksenobiotik detoksifikasyon yollarında rol alır. Bu reseptör hipolipidemik ilaç olan fibratların (gemfibrozil, bezafibrat ve fenofibrat v.s) hedef gen ekspresyonunu stimüle eder (143, 168). Yakın zamanda lökotrien B₄'ün PPAR α 'nın doğal bir ligandı olduğu ve inflamatuvar cevapta rol oynadığı gösterilmiştir (70). **PPAR β** : İnsan vücudunda her yerde eksprese olabilir. Biyolojik fonksiyonu ve ligandları tam olarak bilinmemektedir (238). **PPAR γ** : İki tipi bulunur. PPAR γ 1, karaciğer, ince bağırsak, kolon, dalak, böbrek,

pankreas, kas ve kalp dokularında, PPAR γ 2 ise primer olarak adipoz dokuda eksprese edilir (26). TZD grubu ilaçlar, nonsteroid-antiinflamatuvar ilaçlar ve 15-deoksi-prostaglandin J, PPAR γ ligandlarıdır (175).

TZD'ların net etkisi, periferel insülin direncinde azalmadır ve özellikle iskelet kasında olmak üzere periferel dokuda insülinin uyardığı glukoz alımını artırmaktır (170, 219). İnsülin duyarlılığını artırması yanında, plazma glukoz, insülin ve trigliserid düzeylerini de düşürürler (214, 223, 260, 361). Olası etkileri arasında GLUT-1 ve GLUT-4'te artış, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) etkisinde azalma ve plazma serbest yağ asitlerinde azalma da sayılabilir (317).



Şekil 7: TZD'ların PPAR- γ reseptörüne bağlanması (157)

2.4.3. TZD'ların Etkileri

2.4.3.1. Glukoz Metabolizması Üzerine Olan Etkileri

TZD grubunda yer alan rosiglitazon, glukoz düzeylerini ve glukoz üretimini azaltmakta, glukoz klirensini artırmaktadır. İnsülin duyarlılığını artırarak ve pankreas beta hücre fonksiyonunu düzelterek Tip II diyabet tedavisinde yeni bir seçenek oluşturmaktadır (327). Yapılan çalışmalarda TZD'ların açlık kan şekeri, postprandiyal kan şekeri ve serbest yağ asidi düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir (211). TZD'lerin Tip

II diyabet hastalarında Hemoglobin A1c (HbA1c) ve açlık plazma glukoz konsantrasyonundaki %20-30 azalmaya paralel olarak açlık plazma serbest yağ asidi konsantrasyonunu da %20-30 azalttığı rapor edilmiştir (96, 97, 307, 196).

2.4.3.2. Lipid Metabolizması Üzerine Olan Etkileri

TZD'ler, özellikle adipozitlerde belirgin olarak farklılaşma sağlayan, hücre içine yağ asidi alımını artıran ve plazma serbest yağ asidi miktarını azaltan ilaçlardır (27, 302). TZD'lerin lipid metabolizması üzerindeki etkileri muhtemelen yağ asidi ve trigliserid sentezini inhibe etmelerine bağlıdır. Bu da beraberinde VLDL (çok düşük yoğunluklu lipoprotein) düzeylerindeki azalmayı getirir. LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) ve total kolesterolü arttırdığı gösterilmişse de ortaya çıkan bu LDL moleküllerinin oksidasyona daha dayanıklı ve daha az aterojenik özellikleri olduğu savunulmuştur (36, 109, 250). TZD'lar adipoz dokuda yağ asidi alımını ve depolanmasını artırır. Böylece kas, karaciğer ve pankreatik hücreleri gibi insüline duyarlı dokuları yüksek düzeydeki serbest yağ asidlerinin zararlı metabolik etkilerinden korurlar (2).

PPAR agonistleri, obezite ve Tip II diyabet'te, yağ dokusunda düşük olan adiponektin üretimini artırır. Adiponektin, insülin reseptör düzeyinde TNF- α 'nın etkisini önleyerek insülin duyarlılığını sağlar (2, 195).

2.4.3.3. Kardiyovasküler Sistem ve Kan Basıncı Üzerine Olan Etkileri:

CRP (C-Reaktif protein), IL-6 (İnterlökin-6) ve TNF α , gibi inflamatuvar parametreleri azaltır ve vasküler düz kas hücre çoğalması ve göçünü inhibe ederek antiaterojenik etki gösterirler (130, 317). TZD'lar periferik vasodilatasyonu artırır ve periferik direnci azaltarak antihipertansif etki yaparlar (317). Pioglitazon ve roziglitazonun özellikle diastolik olmak üzere kan basıncında hafif azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (100, 125, 254).

2.4.4. TZD'ların Yan Etkileri

2.4.4.1. Hipoglisemi

Hipoglisemi, oral antidiabetik ilaçların yan etkilerinden biridir. Fakat insülin sekresyonunu etkilemediğinden dolayı TZD'larda bu yan etki ortaya çıkmamaktadır (103).

Sulfonilüre ya da insülin alan hastalarda roziglitazon'un eklenmesi, genellikle tedavinin 4. haftasında belirgin hale gelen hipoglisemiye neden olabilir. Bu koşullarda sulfonilüre ya da insülin dozu azaltılmalı, tiazolidinedion tedavisine devam edilmelidir (130).

2.4.4.2. Hepatotoksisite

TZD grubunun ilk ilacı olan troglitazon, ciddi hepatotoksisite ve ölümlere yol açması nedeniyle 2000 yılında klinik kullanımdan çekilmiştir. Bu grubun diğer üyeleri olan roziglitazon ve pioglitazonun bugüne kadar çok ciddi hepatotoksisite ve ölümlere neden olduğu kesinlik ifade etmese de geniş çaplı yapılan bir araştırmada, diğer oral antidiyabetiklerle karşılaştırıldığında bu ilaçların kullanımının, karaciğer yetmezliği ve hepatitte artış ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (52, 249). Muhtemelen karaciğer yağ miktarının azalmasının bir sonucu olarak karaciğer enzimlerinde hafif bir artış ortaya çıkmaktadır (22).

2.4.4.3. Ödem ve Kilo Artışı

TZD'ların en önemli yan etkisi sıvı retansiyonu ve subkutanöz yağ dokusunda artıştır (193, 223, 252, 260, 361). TZD'ların vücut ağırlığının artışına neden olduğu gösterilmekle birlikte (149) bu olayın nedeninin sıvı retansiyonu olduğunu öne sürülmektedir (20). Sıvı retansiyonu ve artmış kalp yetmezliği riski özellikle insülin ile kombine edildiğinde görülür (223). PPAR γ aktivasyonundan dolayı adipogenezin artması ve iştah artışı diğer bir kilo artış mekanizmasıdır (130).

2.4.4.4. Kardiyak Yan Etkiler

RZG özellikle diastolik olmak üzere kan basıncında hafif azalmaya neden olur (100, 125, 254). Kardiyomyopati ya da konjestif kalp yetmezliği öyküsü olan hastalarda RZG ile diüretik tedavisine yanıtı pulmoner ödem bildirilmiştir. Bununla birlikte kalp yetmezliği, daha önce böyle bir öyküsü olmayan hastalarda da ortaya çıkmıştır (130).

2.4.5. TZD'ların Kontrendikasyonları

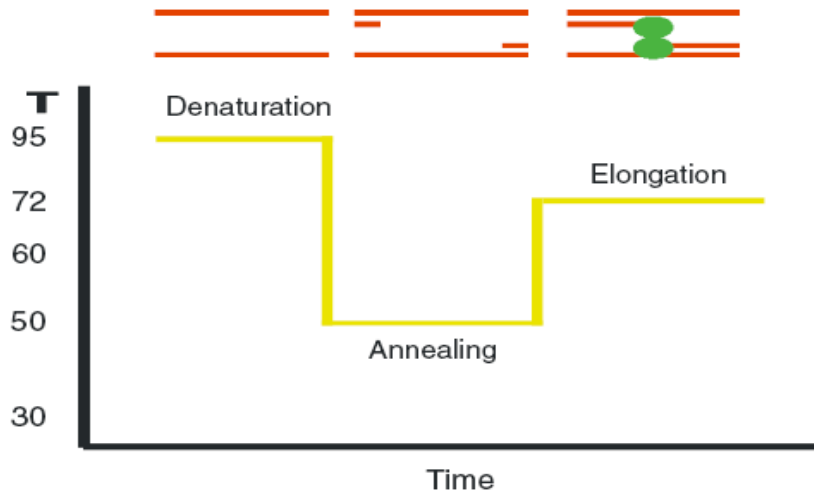
Bu ilaçların ödem yaptığı ve bu nedenle de kalp yetmezliğinde kullanılmaması gerektiği ileri sürülmektedir (193, 223, 252, 260, 361). Kardiyak dekompanse bulgu ve belirtileri gelişen hastalarda kesilmelidir (130). Aktif karaciğer hastalığının varlığında, ALT düzeyinin normalin 2,5 katını aşması durumunda, Tip I diyabet, diyabetik ketoasidoz ve non-ketotik hiperozmolar koma'da, diyabetik retinopati, hemodiyaliz, periferik gangren ve nöropatilerde de kullanılmamalıdır (16, 309).

2.5. KANTİTATİF REAL-TIME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, DNA içerisinde yer alan, baz dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir gen bölgesini in vitro koşullarda enzimatik olarak amplifiye etmek için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Bu uygulama için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir (265).

Tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması ile gerçekleşen PCR reaksiyonu; 94 °C–98 °C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37°C–65°C aralığında gerçekleştirilen annealing ve 72°C'de gerçekleştirilen elongasyon aşamalarından oluşur ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır (242). Şekil'8 de PCR aşamaları gösterilmektedir (174).



Şekil 8: PCR aşamaları

Dr. Kary B. Mullis (215) 1980'li yıllarda yaptığı PCR çalışmaları ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel ödülü almıştır. Real-time PCR ile ilgili ilk çalışmalar ise Russel Gene Higuchi ve arkadaşları (137) tarafından ilk kez 1993 yılında yayınlanmıştır.

2.5.2. Kantitatif Real-Time PCR (QPCR)

QPCR, PCR amplifikasyonunu görülür hale getirme ve moniterize etme olanağı veren, floresan işaretli probalar veya şelat edici boyaların kullanıldığı, fluoresansın çoğaltılan DNA (amplikon) ile doğru orantılı olduğu, online izlenebilen bir çoğaltma yöntemidir. Ürünün çoğalması floresan sinyalinde artışa neden olduğundan, her siklusta artan DNA miktarı reaksiyon süresince hassas olarak ölçülür. Real-time PCR'da konvansiyonel PCR'dan farklı olarak, ürünlerin analizi sikluslar sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi ve DNA bantlarının ultraviyole ışık altında görüntülenmesi gibi ek işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time kantitatif PCR, oluşan amplikonların ergime derecelerini (T_m) de belirleme olanağı veren bir yöntemdir. Tüm reaksiyonun eş zamanlı kontrolü, T_m 'in değerlendirilebilmesi, standart eğrinin hesaplanabilmesi ve internal kalite kontrolün kullanılabilmesi önemli avantajlarıdır. Bu da tekrarlanabilirliğe ve kantitatif sonuçların elde edilmesine olanak vermektedir (21, 55, 319).

2.5.2.1 QPCR Cihazları

Real-Time PCR ölçümü için mevcut birçok cihaz arasından ihtiyaçlar göz önünde bulundurularak tercih yapmak mümkündür. Bugün için yaygın olarak kullanımda olan üç ayrı sistem şunlardır: ABI Prism 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA), LightCycler cihazı (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) ve “BioRad Instruments” ın “i-cycler ‘dır (226, 272).

LightCycler cihazı sıcak hava akımıyla ısınan bir kapalı sistemdir ve analiz 20 µL numune alabilen borosilikat camlarda gerçekleşmektedir. Floresans eksitasyonu mavi ışıklı emitting-diot ile ve okuma da 3 farklı dalga boyunda filtreye sahip 3 silikon fotodiyot ile yapılır. Bu açıdan multipleks PCR da gerçekleştirilebilir ve floresans dataları PCR amplifikasyonu sırasında gözlenebilir. Hızlı termal cycling ve yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip kapillerlerin kullanılması 30-40 sikluluk bir PCR çalışmasının 20-30 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleşebilmesine olanak sağlamasına karşın yalnızca 32 reaksiyon gerçekleştirebilen bir sistemdir. Performans olarak hem duyarlılığı hem özgülüğü ABI 7700 sistemine eşit olarak bildirilmiştir (226, 272).

2.5.2.2 QPCR’da Kullanılan Metodlar

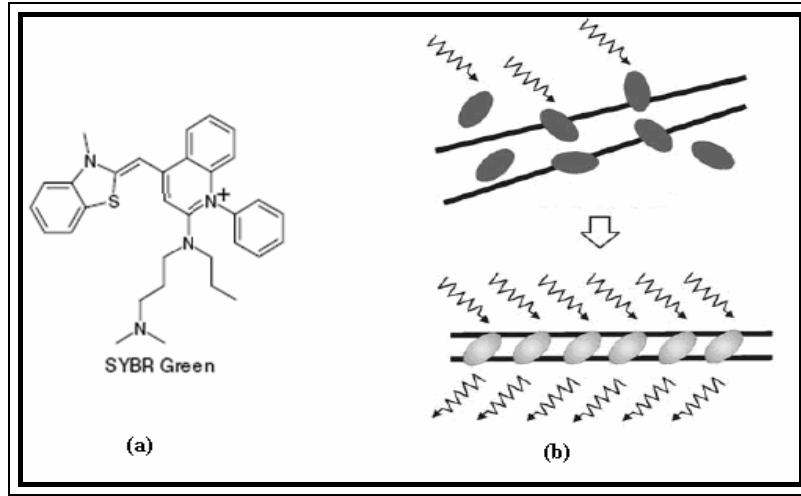
Real-time PCR’da kullanılan metodlar spesifik ve spesifik olmayan metodlar olarak 2 ana başlık altında incelenebilir. Spesifik metodlar her PCR ölçümü için bir veya daha fazla floresans probun sentez ve dizaynını gerektirir ve FRET teknolojisinin kullanıldığı tekniklerdir. Spesifik metodlarda TaqMan® veya hidroliz proplar, molecular beacon proplar, Scorpions® proplar ve hibridizasyon proplar gibi prob sistemleri kullanılır. Spesifik olmayan metodlar ise her PCR ölçümü için sentez ve dizayn gerektirmeyen SYBRGreen® ve etidyum bromid gibi floresans veren boyaların kullanıldığı metodlardır. Spesifik olmayan metodlardan günümüzde daha çok SYBR Green boyası kullanılmaktadır (41).

2.5.2.2.1 SYBR Green Metodu

Spesifik olmayan ve sık kullanılan bu methodda, SYBR Green, çift zincirli DNA’ya bağlanarak floresans emisyonunda artışa neden olmaktadır. SYBR Green çift zincirli DNA’nın minor oluşuna bağlanır (115, 141). SYBR Green, 497 nm dalga

boyunda yükseltgenir, 520 nm dalga boyunda indirgenir ve 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder (174).

PCR siklusları esnasında denatürasyon aşamasında bağlanmamış SYBR Green düşük miktarda floresans verir. Annealing derecesinde moleküller oluşan çift zincirli primer hedef DNA'ya bağlanmaya başlarlar. Polimerizasyon basamağında daha fazla molekül sentezlenen DNA'ya bağlanır ve oluşan floresans real-time monitörize edilerek değerlendirilir (115). (Şekil 9)



Şekil 9: (a) SYBR Green I'in kimyasal yapısı (174)

(b) SYBR Green metodu (174)

Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problara ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri (“melting curve”) yapılması gerekmektedir (296, 321).

2.5.2.3 Primer-Prob Dizaynı

İyi düzenlenmiş primerler ve problemler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon ya da genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilir. İdeal bir amplifikasyon için, primer-prob seçimi T_m sonucuna bakılarak yapılmalıdır ve primerlerin ve problemlerin boyları birbirine yakın olmalıdır. Bu nedenle primer ve problemlerin düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır ki bunların bir bölümünü sistem üretici firmalar da sağlamaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır:

1. T_m dereceleri primer için 58-60°C prob için 68-70°C olmalı
2. G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı
3. Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı
4. Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
5. Maksimum ampikon büyüklüğü 400 bp'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
6. Problemler ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla ardışık Guanin),
7. Problemlerdeki % 30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı,
8. Problemlerin 5' ucunda G olmamalı (84, 264).

2.5.2.4 Sonuçların Yorumlanması

PCR amplifikasyonunda oluşan ürün başlangıçtaki DNA miktarına bağlıdır. Ürün PCR siklusları ile plato fazına ulaşmaya kadar eksponansiyel olarak artış gösterir. Her siklus sonrası meydana gelen ürün miktarı:

$P = T (2)^n$ formülüyle hesaplanır.

P: Ürün (Product)

n: Siklus sayısı

T: Başlangıçtaki DNA sayısı (Template)

PCR ürünleri her bir siklusta tam olarak iki katına ulaşamazlar. Her siklus sonucunda meydana gelen ürün miktarı:

$P = T (1+E)^n$ formülü ile hesaplanır

P: ürün (Product)

n: siklus sayısı

T: başlangıçtaki DNA sayısı (Template)

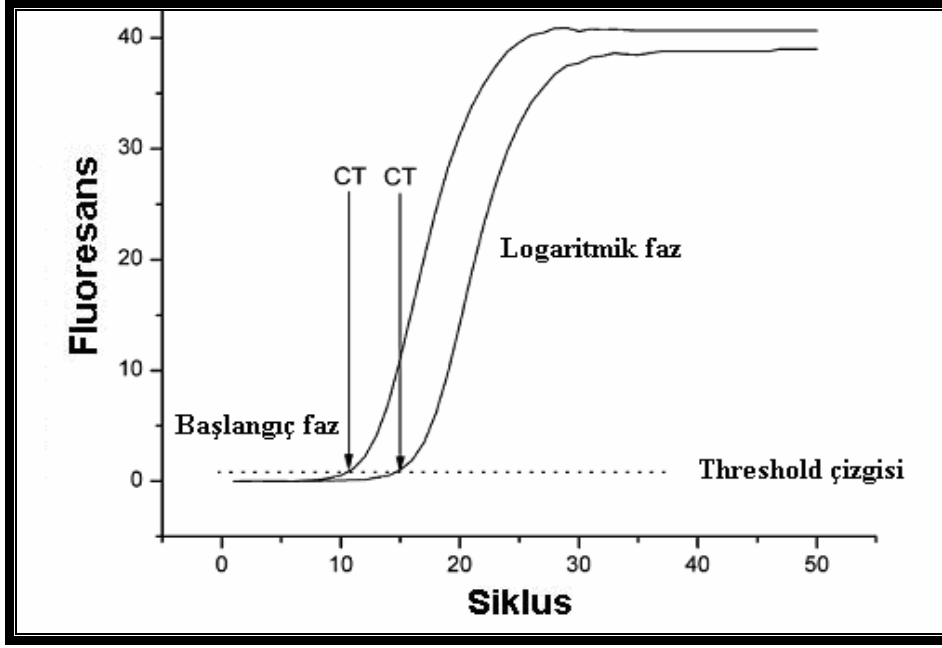
E = PCR verimliliği (Efficiency) (21, 55, 242).

PCR reaksiyonunun verimliliği (E), standart eğrinin slope (S) değerinden anlaşılır. Verimlilik, $E = 10^{-1/S} - 1$ formülünden hesaplanır. Efficiency'nin etkisi, exponansiyel olarak siklus sayısına bağlıdır. Eğer E=1 ise ampikon miktarı her siklуста iki katına çıkmaktadır. Eğer E=0,8 ise ampikon miktarı sadece 1,2 siklуста iki katına ulaşmaktadır (191, 240, 324). Verimlilik tipik olarak % 90-110 arasında değişmektedir ve kısa PCR ürünleri daha yüksek verimlilikle çoğalmaktadır (42, 247).

PCR reaksiyonu sırasında hedef bölgenin amplifikasyonunu yansıtan floresans emisyonundaki artış dedektör sistemi ile eş zamanlı okunabilir (115). Bilgisayarın software programı $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$ eşitliğini kullanarak ΔRn değerini hesaplamaktadır. Rn^+ , ürünün floresans emisyonunu, Rn^- ise baseline bölgesindeki floresans emisyonu ifade etmektedir (112, 135). Software programı PCR amplifikasyonu sırasında hesaplanan floresans emisyon verilerini toplayarak ΔRn değerleri siklus numarasına karşı gelecek şekilde amplifikasyon eğrisi çizer. PCR amplifikasyonunun erken sikluslarında ΔRn değeri baseline değerini aşamaz (345).

Baseline değerini aşan ilk siklus “threshold siklus, (Ct)” olarak adlandırılır. PCR sonrası, her bir amplifikasyon eğrisi, onların Ct sayısı ile belirtilir. Ct değerleri kantite edilen hedef DNA miktarının artması ile orantılı olarak azalır (345).

Kantitatif real-time PCR sırasında amplifikasyon farklı evreler meydana getirir. Bunlar; başlangıç fazı, logaritmik faz ve plato fazıdır. *Başlangıç fazında* ürün oluşmakta, ancak floresans background seviyesinin altında kalmaktadır. *Logaritmik fazda* ürünün eksponansiyel birikimiyle floresans background seviyesinin üzerine çıkmaktadır ve floresans her PCR siklusunda ikiye katlanan ürün miktarıyla direkt orantılı olarak yükselmektedir. Son olarak *plato fazı* DNA veya floresans miktarında reaksiyon bileşenlerinin (primer, taq polimeraz vs.) tükenmesi ve ortamdaki inhibitör maddelerin varlığı nedeniyle anlamlı artışın olmadığı evredir (113). (Şekil 10)



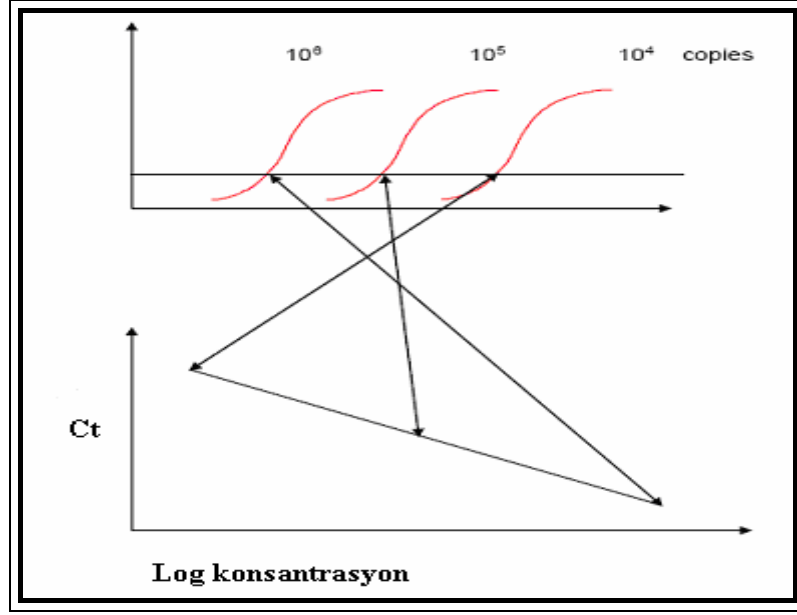
Şekil 10: PCR amplifikasyonunun başlangıç, logaritmik ve plato fazları (174)

Başlangıçtaki DNA miktarını kantite etmek için farklı yaklaşımlar mevcuttur.

2.5.2.4.1 Absolü Kantitasyon

Absolü kantitasyonda standart eğri kullanılarak başlangıç kopya sayısı tespit edilir. Bu metodda, konsantrasyonları bilinen standart örneğin seri dilüsyonları hazırlanır. Standart eğri, standart dilüsyonlarının amplifikasyonu sonrası, her bir dilüsyonun oluşturduğu Ct değerlerine karşı başlangıç kopya sayısının logaritması ile oluşturulur. Bu standart egride, bilinmeyen numunenin Ct değeri karşılaştırılarak başlangıç kopya sayısı tespit edilir. Standart eğri en az dört nokta içermelidir (42,247). (Şekil 11)

Standart olarak ilgili gen klonlanmış plazmid, genomik DNA, cDNA, in vitro transkriptler ya da total RNA gibi çeşitli kaynaklar kullanılmaktadır (42,247).



Şekil 11: Absolü kantitasyon

2.5.2.4.2 Relatif Kantitasyon

Real-time PCR mRNA kantifikasyonuna ait yanlışlıklar başlangıç materyaline ait küçük farklılıkların amplifikasyon üründe katlanarak yansımından da kaynaklanabilir. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek ve elde edilen sonucun normalizasyonu bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol farklı doku ve organizmalarda belli bir biçimde ekspresye olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık kullanılanları Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), β actin ve rRNA'dır (28, 190, 359).

2.5.2.4.2.1 Relatif Standard Eğri Metodu

Bu methoda kalibratör kullanılır. Normalize edilen her bir değer kalibratöre bölünerek kalibratörle normalize edilmiş değer elde edilir ve relatif ekspresyon değerine ulaşılır. Kantite edilen değerler kalibratörün n-katı şeklinde ifade edilir (142, 245, 346).

2.5.2.4.2.2 Komparatif Threshold Siklus (C_T) Metodu

Bu metotta miktarı bilinen standart kullanılmaz. Ancak hedef sekansının miktarı seçilen bir referans değerle karşılaştırılır. Sonuçlar referans değere oranı şeklinde verilir. C_T 'nin doğru hesaplanabilmesi için, hedefin amplifikasyonunun verimliliği ile referansın amplifikasyonunun verimliliğinin yaklaşık eşit olması gerekir (321, 346).

2.5.2.5 Melting Curve Analizi

SYBR Green, etidyum bromid gibi PCR reaksiyonu esnasında meydana gelen çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresans emisyonunda artışa neden olan boyaların kullanıldığı metotta, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü ift zincirli DNA'ya bağlanan boya, primerlerin arasında gerçekleşebilecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da floresan oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz durumu gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (ergime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her ift zincirli DNA, kendine özgü melting temperature, (T_m : Çift zincirli DNA'nın % 50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir (28).

Melting curve analizinde, cihaz PCR tüplerini yavaşca ısıtmaya başlar ve çift zincirli DNA'lar birbirinden ayrılır. Floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünler çoğaldığında (primer dimerlerinde) aradığımız DNA'nın T_m derecesi ile aralarında farklılık olacaktır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesinden kaynaklanmaktadır (321).

2.5.2.6 QPCR'ın Avantajları ve Dezavantajları

- Konvansiyonel PCR “plato fazında” yani end-point ölüm yaparken, real time PCR “ekponansiyel büyüme fazında” ölüm yapmaktadır.
- Floresan sinyalin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır.
- Konvansiyonel ölümlerden 1000 kat daha az nükleik asit ile çalışılabilmektedir.
- PCR sonrası elektroforez gerektirmez.
- Hızlıdır (< 1 saat).

- Günlük numune çalışma sayısı yüksektir (~200 numune/gün).
- Kontaminasyon riski düşüktür.
- Sensitivitesi yüksektir (< 5 kopya).
- Geniş dinamik aralığa sahiptir (10-1010 kopya).
- Tekrarlanabilir (CV < % 2.0).
- Sonuçlar kantite edilebilir.
- Multiplex PCR kullanımına uygundur.
- Floresans veren problr kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilir (139).

Real-time PCR metodunda günümüz teknolojisini ile eşzamanlı maksimum 4 reaksiyon yürütülebilmektedir. Ayrıca yüksek teknik beceri ve teknik destek gerektirmektedir ve kullanılan cihaz, teçhizat vs. maliyeti yüksektir (140).

2.5.2.7 QPCR'ın Kullanım Alanları

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dnstrme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır (174).

Plazma serbest nükleik asit tayini, anne kanında fetal DNA tayini, kromozom bozukluklarının tespiti, tek nükleotid polimorfizmler (SNP), allelik diskriminasyon tayini, gen ekspresyonu kantitasyonu, viral kantitasyon, patojen tespiti, DNA hasarı ölçümü, metilasyon tespiti, mikroarray sonuçlarını doğrulamak, mikrosatellit analizleri, ilaç tedavisinin etkinliğinin takibi, moniterize edilmesi mitokondrial DNA alışmaları, solid organ transplantasyon sonuçlarının takibi, hematopoetik kök hücre transplantasyonu sonrası şimerizmin moniterize edilmesi başlıca kullanım alanları olarak özetlenebilir (73, 134, 153, 312).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

1. Santrifüj (MSE, MISTRAL 3000I, Serial no: 5691/02/075).
2. Mikropipetler (Sealpette Jencons 0.5-10, Treff Lab 20- 200, 100-1000, Genex Beta 10-100,
3. 50, 2-20, Dialab 200-1000, Rainin Pipet-plus R 20, Socorex 50-200).
4. Mikrosantrifüj (SIGMA 3K30, Serial no: 76262).
5. Mikrosantrifüj (Jouan A-14, Seri no: 39903105).
6. 1,5 ml ve 0,6 ml nükleaz içermeyen eppendorf tüp
7. 0,2 ml PCR tüp
8. Derin dondurucu (-70 °C, NUAIRE)
9. Benmari (ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N Serie: 3940517).
10. Vorteks (VM3, Windaus)
11. LightCycler (Serial No: 1400879, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
12. Laminar-flow (Bilser, Seri no: 6087, Ankara, Türkiye)
13. Laminar-flow (Nuair, Model no: Nu-425-400E)
14. LightCycler kapiller tüpler (04 929 292 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
15. LightCycler kapiller tüp santrifüj adaptörü (Roche, 1909312)
16. Ultrasonic Cleaner (Seri no: 030607)
17. EDTA içeren kan toplama tüpleri
18. Havan
19. Spektrofotometre (IMPLEN NanoPhotometer, Seri no: 1271,U.K.)
20. Jel görüntüleme sistemi (Avagene, PacificImage Electronics)
21. Güç kaynağı (Microcomputer Electrophoresis Power Supply BioKim International, S\N 42039)
22. pH metre (Microprocessor pH meter EDT Instruments RE 357)
23. Mikrodalga fırın (Arçelik, MD 554, Seri no. 0300472807)
24. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, Ser no: 300258)
25. Distile su cihazı (Ecoro Reverse Osmosis Systems, USA)
26. PCR Cihazı (Genius, Techne (Cambridge) Ltd, UK. Model: FGEN02CD)

3.2 Kullanılan Kimyasallar

1. Etidyum Bromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridinium bromide
 $C_{21}H_{20}N_3Br$, 106H3637, SIGMA)
2. Histopaque-1077 (109H6043, SIGMA)
3. pH4, pH7, pH10 kalibratörler (Orion Application Solution 910104, 910107,
910110 CAS Reg.No 7732-18-5)
4. Absolü Etanol (C_2H_5OH , MA: 36.07 g/mol, K33723886 436, Merck)
5. 2X SYBR Greene I (Sigma-Aldrich, S9430)
6. dNTP Set (Fermentas, R0181)
7. Roziglitazon (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, CAS1222320-73-4)
8. Dimethylsulfoxid (DMSO) (MERCK-Schuchardt, Art.802912)
9. PBS (Phosphat Buffer Salin), 10 mM, pH 7.4
 - NaCl, 136 mM (Merck, Art.6400)
 - KCl, 2.7 mM (Merck, Art.4935)
 - Na_2HPO_4 , 10 mM (Merck, Art.6586)
 - KH_2PO_4 , 10 mM (Merck, Art.4871)
10. Eter (Merck, Art. 926)
11. HBSS pH: 7.2, 1L
 - NaCl, 8.0 gr, (Merck, Art.6400)
 - KCl, 0.40 gr, (Merck Art.4935)
 - Na_2HPO_4 , 0.0477 gr, (Merck Art. 6586)
 - KH_2PO_4 , 0.06 gr, (Merck Art.4871)
 - $NaHCO_3$, 0.35 gr, (Merck Art.6323)
 - D-Glukoz, 1.0 gr, (Sigma, G-5000)
12. RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich, R4130-1L)
13. Isopropanol (Merck, Art.995)
14. Sıvı azot gazı (TİGEM, Samsun)
15. Agarose (Sigma, A-5093)
16. 5X TBE Buffer pH 8.3, 1L
 - Tris (hydroxymethyl)-aminometan, 450mM, (Merck, Art.8387)
 - Borik Asit, 450mM, (Merck, Art.160)
 - Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA), 10 mM, (Pancreac, 131026)

TBE Buffer, 0.5X olarak hazırlandıktan sonra kullanılır.

17. pUC Miks Marker 8 (Fermantas, SM0301)
18. FastStart DNA Master Hybridization Probe kit (Roche, 12 239 272 001)
19. High-pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Cat. No. 11 796 828 001, Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
20. High-pure PCR Product Purification kit (Cat. No. 1 732 676, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
21. Uracil-DNA-Glycosylase, (Roche, 1 775 375, 500 units)
22. Sephadex™ G-50 Medium filtre (Amersham Biosciences, 17-0043-01, 100 g)
23. JM109 Kompetent hücre (Promega, Catalog: L-2001)
24. pGEM-T ve pGEM-T Easy Vector Sistem (Promega, Cat: P2291)
25. Luria-Bertani (LB) Besiyeri
 - Tryptone Agar (10 g/L) (OXOID, LP0042)
 - Yeast extract (5 g/L) (OXOID, LP0021)
 - NaCl (10 g/L)
 - Agar (15 g/L)
 - Distile su

Tüm bileşenler çözüldükten sonra pH 7.5'e ayarlanır ve otoklavda 15 dakika steril edilir.
26. Plazmid izolasyon kiti (Promega, Wizard Plus SV Minipreps. Cat No: A1460)
27. Ampisilin (Fako A.Ş, Potency 91)
28. 36B4 Standart Forward Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
29. 36B4 Standart Reverse Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
30. 36B4 Forward Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
31. 36B4 Reverse Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
32. D-loop Standart Forward Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
33. D-loop Standart Reverse Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
34. D-loop Forward Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
35. D-loop Reverse Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
36. mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon Forward Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)
37. mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon Reverse Primer (Ella Biotech GmbH, Almanya, 20 µM)

3.3 Hayvanlar

Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cerrahi Araştırmalar Merkezinde yetiştirilen 7 – 8 haftalık, 248 - 275 g arasında, 16 tane erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Hayvan alışması için üniversite etik kurulundan onay alındı. Ratlar, ayrı kafeslerde $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, % 40-60 nemli ortamda ve 12 saat ışıklı, 12 saat karanlık ortamda beslendi. Ratlara su ve yem kısıtlaması yapılmadı. (Samsun Yem Sanayii. Samsun, Türkiye)

Ratlar, her grupta 4 tane olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve aşağıda gösterilen dozlar uygulandı:

Grup A: 2,0 mg/kg RZG

Grup B: 1,0 mg/kg RZG

Grup C: 0,5 mg/kg RZG

Grup K: Kontrol (İlaç verilmedi)

3.4 İlaç Hazırlanması ve Uygulanması

50 mg RZG, 4ml DMSO'da çözölerek 12,5 mg/ml stok RZG1 hazırlandı. Bu stok solüsyondan 32 μL alınarak PBS ile 1 ml'ye tamamlandı. Grup A ratlara oral gavaj ile her sabah aynı saatte, 14 gün boyunca uygulandı. Stok 1'den seri dilüsyon ile stok RZG2 (6,25 mg/ml) ve stok RZG3 (3,125 mg/ml) hazırlandı. Grup B ve grup C ratlara oral gavaj ile her sabah aynı saatte, 14 gün boyunca uygulandı. Verilen tüm dozlarda final DMSO konsantrasyonu %3 (v/v) idi. Kontrol ratlara ise eşit volümde PBS içinde %3 DMSO verildi.

3.5 Ratlardan Lenfosit ve Dokuların Elde Edilmesi

Ratlar, 14. gün ilaç uygulanmasından 4 saat sonra kısa eter anestezisini takiben öldürüldü. EDTA'lı tüpe kan alındı. Lenfosit izolasyonu için 1 ml Histopaque-1077 üzerine tabaka oluşturacak şekilde 1,5 ml kan eklenerek 1500 g, 4°C 'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant başka bir tüpe alınarak üzerine 1 ml HBSS eklendi ve $400\text{ g}'de$, 4°C 'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, 400 μL RPMI-1640 Medium, 50 μL otolog plazma ve 50 μL DMSO eklendi ve hücreler resüspanse edildi. Numuneler kullanılana kadar -70°C 'de saklandı.

Anestezi sonrası öldürülen ratlardan, karaciğer, ince bağırsak ve pankreas dokuları kesilerek çıkarıldı. Dokular soğuk PBS ile yıkanarak kandan temizlendi ve HBSS solüsyonu (Mg ve Ca içermeyen) içinde laboratuvara getirildi. Tüm dokular çalışılacağı zamana kadar -70°C 'de saklandı.

3.6 Lenfosit ve Dokulardan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit kullanıldı. (Roche)

3.6.1 İzolasyon Kiti İçeriği ve Solüsyonlarının Hazırlanması

Tissue Lysis Buffer: Kullanıma hazır .20 ml şişe, 4 M ürea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA içermektedir. [pH: 7.4 (25°C)].

Binding Buffer: Kullanıma hazır. 6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM tris-HCl, % 20 Triton X-100 (v/v) içermektedir [pH: 4.4 (25°C)].

Proteinaz K: 90 mg liyofilizat içeren şişe içine 4,5 mL distile su ilave edildi ve tam olarak çözünene kadar beklendi. Daha sonra proteinaz K solüsyonu 300 μL 'lik aliquotlara ayrıldı. -70°C 'de saklandı.

Inhibitor Removal Buffer: 33 mL'lik şişe içerisine 20 mL absöü etanol eklenerek hazırlandı. 5 mM guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl içermektedir [pH:6.6 (25°C)].

Wash Buffer (yıkama solüsyonu): 20 mL'lik şişe içerisine 80 mL etanol eklenerek hazırlandı. 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl içermektedir. [pH: 7.5, (25°C)].

Elution Buffer: Kullanıma hazır. 40 ml'lik şişe, 10 mM Tris içermektedir. [pH: 8.5, (25°C)].

3.6.2 Lenfositlerden DNA İzolasyonu

DNA, High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre izole edildi.

1. -70°C 'de saklanan lenfositler 37°C 'de hızla çözüldü.
2. 1 000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı
3. Pellet üzerine 200 μL Tissue Lysis Buffer ve 40 μL Proteinaz K ilave edilerek karıştırıldı.
4. 55°C 'ye getirilmiş Benmari cihazında 1 saat inkübe edildi
5. 200 μL binding buffer ilave edildi ve karıştırıldı.
6. 72°C 'ye getirilmiş Benmari cihazında 10 dakika inkübe edildi.
7. 100 μL izopropanol eklenerek karıştırıldı.
8. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere konuldu. Karışım filtre tüplerine aktarıldı
9. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
10. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
11. 500 μL inhibitor removal buffer, filtre tüplerine eklendi.
12. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
13. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
14. 500 μL wash buffer filtre tüplerine eklendi.
15. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi
16. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
17. 500 μL wash buffer filtre tüplerine eklendi.
18. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
19. 14 000 g'de 25°C 'de 10 saniye santrifüj edildi.
20. Kolektör tüpler atıldı ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirildi.
21. Daha önceden 70°C 'ye ısıtılmış 200 μL elüsyon buffer ilave edildi.
22. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
23. Elde edilen DNA'lar -70° 'ye kaldırıldı.

3.6.3 Rat Dokularından DNA İzolasyonu

DNA, High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre izole edildi:

1. -70°C 'de saklanan dokular çözünmeden yaklaşık 25-50 mg tartılarak sıvı azot gazı ile pulverize edildi.
2. Pulverize edilen rat dokuları eppendorf tüplere aktarıldı.
3. Doku üzerine 200 μL Tissue Lysis Buffer ve 40 μL Proteinaz K ilave edilerek karıştırıldı.
4. 55°C 'ye getirilmiş Benmari cihazında 1 saat inkübe edildi.
5. 200 μL binding buffer ilave edildi ve karıştırıldı.
6. 72°C 'ye getirilmiş Benmari cihazında 10 dakika inkübe edildi.
7. 100 μL izopropanol eklenerek karıştırıldı.
8. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere konuldu. Karışım filtre tüplerine aktarıldı.
9. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
10. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
11. 500 μL inhibitor removal buffer, filtre tüplerine eklendi.
12. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
13. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
14. 500 μL wash buffer filtre tüplerine eklendi.
15. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
16. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
17. 500 μL wash buffer filtre tüplerine eklendi.
18. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi.
19. 14 000 g'de 25°C 'de 10 saniye santrifüj edildi
20. Kolektör tüpler atıldı ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirildi.
21. Daha önceden 70°C 'ye ısıtılmış 200 μL elüsyon buffer ilave edildi.
22. 8 000 g'de 1 dakika 25°C 'de santrifüj edildi
23. Elde edilen DNA'lar deney yapılana kadar -70° 'de saklandı.

3.7 İzole Edilen DNA Miktarlarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonu, nanofotometre (IMPLEN) cihazı ile $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçüldü. Tablo VII'de lenfositlerden izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık oranları, Tablo VIII'de ise dokuların pulverize edildikten sonraki yaş ağırlıkları, izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık oranları gösterilmektedir.

Tablo VII: Lenfositlerden izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık oranları

DOKU	DNA Miktarı ($\mu\text{g/ml}$)	A_{260} / A_{280}
A1- Lenfosit	4,0	2,0
A2- Lenfosit	5,5	1,833
A3- Lenfosit	7,5	1,667
A4- Lenfosit	13	1,857
B1- Lenfosit	9,5	1,727
B2- Lenfosit	19	1,810
B3- Lenfosit	13,5	1,8
B4- Lenfosit	5,0	1,429
C1- Lenfosit	23,5	1,808
C2- Lenfosit	15	1,765
C3- Lenfosit	13	1,857
C4- Lenfosit	21,5	1,792
K1- Lenfosit	8,0	1,778
K2- Lenfosit	5,5	1,575
K3- Lenfosit	12	1,846
K4- Lenfosit	2,0	1,33

Tablo VIII: Dokuların yaş ağırlıkları, izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık oranları

DOKU	DOKU	Miktarı DNA	A₂₆₀ / A₂₈₀
A1- Karaciğer	28,0	370	1,963
A2- Karaciğer	50,0	267	1,880
A3- Karaciğer	38,6	532	1,987
A4- Karaciğer	43,4	437	1,947
B1- Karaciğer	37,0	637	1,961
B2- Karaciğer	39,2	249	1,926
B3- Karaciğer	40,0	490	1,974
B4- Karaciğer	35,0	238	1,951
C1- Karaciğer	35,5	314	1,897
C2- Karaciğer	49,4	434	1,966
C3- Karaciğer	35,0	143	1,932
C4- Karaciğer	38,1	431	1,966
K1- Karaciğer	40,6	299	1,961
K2- Karaciğer	34,3	208	1,986
K3- Karaciğer	36,4	300	1,939
K4- Karaciğer	45,0	224	1,935
A1- İnce bağırsak	28,0	314	1,810
A2- İnce bağırsak	50,0	110	1,825
A3- İnce bağırsak	38,6	284	1,812
A4- İnce bağırsak	43,4	409	1,812
B1- İnce bağırsak	37,0	223	1,820
B2- İnce bağırsak	39,2	137	1,815
B3- İnce bağırsak	40,0	391	1,810
B4- İnce bağırsak	35,0	370	1,825
C1- İnce bağırsak	35,5	226	1,812
C2- İnce bağırsak	49,4	283	1,811
C3- İnce bağırsak	35,0	269	1,833
C4- İnce bağırsak	38,1	247	1,836
K1- İnce bağırsak	40,6	227	1,823
K2- İnce bağırsak	34,3	441	1,809
K3- İnce bağırsak	36,4	152	1,836
K4- İnce bağırsak	45,0	224	1,806
A1- Pankreas	41,6	36,5	1,921
A2- Pankreas	48,0	25	2,000
A3- Pankreas	44,6	90	1,858
A4- Pankreas	35,0	122	1,855
B1- Pankreas	31,5	80,5	1,830
B3- Pankreas	35,0	76	1,854
B4- Pankreas	41,0	40	1,860
C1- Pankreas	35,0	48	1,882
C2- Pankreas	41,0	158	1,827
C3- Pankreas	41,0	95,5	1,802
C4- Pankreas	41,5	36	1,800
K1- Pankreas	32,4	34,5	1,865
K2- Pankreas	38,4	42,5	1,889
K3- Pankreas	37,4	47,5	1,792

3.8 Kantitatif Real-Time PCR Metodunun Uygulanması

3.8.1 Biyoinformatik Analiz

3.8.1.1 36B4 Standart Primerlerinin Belirlenmesi

Numunelerdeki nükleer genom sayısının belirlenmesi için literatür taraması yapılarak, rat genomunda 12. kromozomda bulunan, tek kopya olarak eksprese edilen ve psödogeni olmayan, asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) geni seçildi (4). LightCycler Probe Design Software 2.0 programı kullanılarak 453 bç uzunluğunda ampikon oluşturan 36B4 standart primerleri belirlendi (GenBank accession no: NW 047376.1). Tablo IX'de 453 bç'lik 36B4 standart ampikonu görülmektedir. Altı çizili olan yerler primerlerin bağlanma bölgeleridir.

Tablo IX: 453 bç'lik 36B4 standart ampikonu

Primer pozisyonları: 42317245-42317661
5'- gaacaaccccgctctggaga agctgctgcctcacatccgggggaacgtgggctttgtgtcaccaggaggacctaccgagattagggacatgctgctggccaataaggttaagggcggtaggacggatgagaggagtagctgtgctccgggtacgagttggggtaccacagaataccttctgttttaggtgccagctgctgccgagccggtgccatgccccgtgtgaggtcacagtacctgctcagaacaccggtctggggcccgagaagaccttttccaagctttgggcatcaccactaaatctccagaggtaccattgaaatcctggtgagtagccatgcttgcagtg gtaactccgtattgcagagtccttgggattggaccttctgtgtctctgggtggtaactgctctctttcctcagagcgatgtgc - 3'

3.8.1.2 36B4 Primerlerinin Belirlenmesi:

LightCycler Probe Design Software 2.0 programında, 453 bç'lik 36B4 standart sekansı kullanılarak 80 bç'lik ampikon oluşturan 36B4 primerleri belirlendi (GenBank accession no: NW 047376.1). Tablo X'da 80 bç'lik 36B4 ampikonu görülmektedir. Altı çizili olan yerler primerlerin bağlanma bölgeleridir.

Tablo X: 80 bç'lik 36B4 ampikonu

Primer pozisyonları: 42317245-42317288
5'-gcagtgtaact ccgtattgcagagtcctt gggattggaccttctgtgtctctgggtggtaactgctctctttcctcagagcgatgtgc -3'

3.8.1.3 D-loop Standart Primerlerinin Belirlenmesi

Numunelerdeki mtDNA kopya sayılarının belirlenmesi için D-loop bölgesi seçildi. LightCycler Probe Design Software 2.0 programı kullanılarak 321 bç uzunluğunda ampikon oluşturan D-loop standart primerleri belirlendi (GenBank accession X14848). Tablo XI’da 321 bç’lik D-loop standart ampikonu görülmektedir. Altı çizili olan yerler primerlerin bağlanma bölgeleridir.

Tablo XI: 321 bç’lik D-loop standart ampikonu

Primer pozisyonları: 15786-16106
5'- ttcagggccatcaattggttcac gtccatacgttcccctaaataagacatctcgatggtaacgggtct aatcagcccatgatcaacataactgtggtgatatacattggtatttttaatttcggatgccttctcaacata gccgtaaggcatgaaggtcagcacaagtctgtggaaccttttagttaagggtcattatcctcatagac aaagctcgaaagactattttatcatgtttgtaagacataaatattataaataactgaaaaatctgcaacaaac ccccccaccct acac ct gaa act caat g cc aaaccccaaaaacattaagcaag aattaaataa -3'

3.8.1.4 D-loop Primerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Nicklas ve arkadaşları tarafından dizayn edilen, 321 bç’lik D-loop standart ampikonu içinde 83 bç’lik ampikon oluşturan primerler kullanılmıştır (GenBank accession X14848) (225). Tablo XII’de 83 bç’lik D-loop ampikonu görülmektedir. Altı çizili olan yerler primerlerin bağlanma bölgeleridir.

Tablo XII: D-loop bölgesinde PCR ile çoğaltılan 83 bç’lik ampikon

Primer pozisyonları: 15772-15854
5'- accaggeatc tggttcttactcagggccatcaattggttcac gtccatacgttcccct taaataagacatctcgatggtaacgggtctaatcagccca-3'

3.8.1.5 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Primerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Nicklas ve arkadaşları tarafından dizayn edilen, rat mtDNA'nda yerleşim gösteren mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon bölgesine ait primerler kullanılmıştır (GenBank accession X14848) (225). Tablo XIII'de mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon bölgesi renkli olarak görülmektedir. Tablo XIV'de ise delesyon varlığında PCR ile çoğaltılan 81 bç'lik bölüm görülmektedir. Altı çizili olan yerler primerlerin bağlanma bölgeleridir.

Tablo XIII: mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon bölgesi

8041	acactgacta	atcaaactta	tcatacaaca	aataatgta	attcacacac	caaaaggacg
8101	aacctgagcc	ctaataatg	tatcctaata	tatatttatt	ggctcaacca	accttctagg
8161	gcttttccc	catacattta	ccctaccac	tcagctatct	atagacctaa	gcatagccat

12841	ttatcggaag	cctagccctt	accggaatac	ctttcctcac	aggattctat	tcaaaagatc
12901	tcateatcga	agccatcaac	acgtgtaaca	ccaacgctg	agccctaataa	tcactttaa
12961	tcgccacatc	cataactgct	gtgtacagca	tacggatcat	ctactteg	tc accatgacaa

Tablo XIV: mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Varlığında PCR ile Çoğaltılan 81 bç'lik ürün

Primer pozisyonları: 8094-13008
5'-aaggacgaacctgagccctaataattcactttaategccacatccataactgct
gtgtacagcatacggatcatctacttg -3'

PCR çalışmalarında kullanılan tüm primerlerin pozisyonu, amplikon uzunluğu ve primer sekansları Tablo XV’de gösterilmektedir.

Tablo XV: Primerlerin pozisyonu, amplikon uzunluğu ve primer sekansları

Primer Adı	Pozisyonu	Amplikon uzunluğu (bp)	Primer Sekansı
36B4 Standart Forward	42317661-42317680	453	5'- GAACAACCCCGCTCTGGAGA- 3'
36B4 Standart Reverse	42317228-42317245		5'- GCACATCGCTCTGAGGAA- 3'
36B4 Forward	42317288-42317307	80	5'- TCCGTATTGCAGAGTCCTTG- 3'
36B4 Reverse	42317228-42317245		5'- GCACATCGCTCTGAGGAA- 3'
D-loop Standart Forward	15786-15806	321	5'- GGCCATCAATTGGTTCATCGT- 3'
D-loop Standart Reverse	16084-16106		5'- GGCATTGAAGTTTCAGGTGTAGG- 3'
D-loop Forward	15772-15793	83	5'- GGTTCTTACTTCAGGGCCATCA- 3'
D-loop Reverse	15831-15854		5'- GATTAGACCCGTTACCATCGAGAT- 3'
mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Forward	8094-8116	81	5'- AAGGACGAACCTGAGCCCTAATA- 3'
mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Reverse	12984-13008		5'- CGAAGTAGATGATCCGTATGCTGTA- 3'

3.8.2 Rat Nükleer Genom Standardının Elde Edilmesi

3.8.2.1 36B4 Standart Sekansının PCR ile Çoğaltılması

PCR Cihazı (Genius) ile standart olarak kullanılacak 36B4 ampikonu, 36B4 standart primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Numune olarak bir rat genomu kullanıldı. PCR’da kullanılan master miks ve PCR programı sırasıyla tablo XVI ve tablo XVII’de gösterilmiştir.

Tablo XVI: 36B4 standart PCR master miks hazırlanması

1	Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
	H ₂ O; Steril ve PCR Grade	40.5 µL	-
	Taq Buffer	5.0 µL	1 X
	MgCl ₂ ; Stok Solüsyonu	1.0 µL	2.0 mM
	36B4 Standart Forward Primer	0,625 µL	0,25 µM
	36B4 Standart Reverse Primer	0,625 µL	0,25 µM
	Taq DNA Polymerase	0,25 µL	1,25 U/ 50 µL
	dNTP (Fermentase)	1 µL	0,2 mM
	DNA Template	1 µL	50 ng/50 µL
	Toplam	50 µL	
2	Nazikce karıştırıldıktan sonra PCR tüpüne aktarıldı.		
3	PCR tüpü, PCR cihazına yerleştirildi.		
4	Tablo XVII’de belirtilen PCR protokolü uygulandı.		

Tablo XVII: 36B4 Standart PCR protokolü

Evre	Isı	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	4 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	30
Annealing	60 °C	30 saniye	30
Elongasyon	72 °C	1 dakika	30
Final Ekstansiyon	72 °C	5 dakika	1
Soğutma	6 °C	4 saat	1

3.8.2.2 36B4 Standart PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre saflaştırıldı.

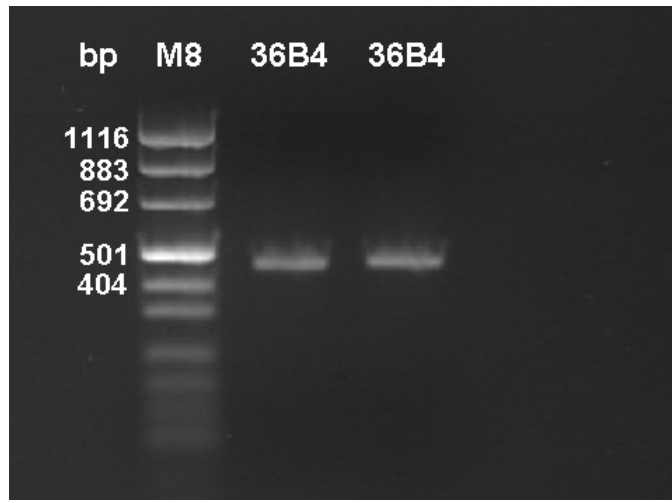
1. 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere 100 µL PCR ürünü aktarıldı.
2. Üzerine 500 µL binding buffer ilave edildi ve karıştırıldı.
3. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere yerleştirildi. Karışım filtre tüplerine aktarıldı.
4. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
5. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
6. 500 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklendi.
7. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
8. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
9. 200 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklendi.
10. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
11. Kolektör tüpler atıldı ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirildi.
12. 200 µL Elüsyon Buffer ilave edildi.
13. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
14. Eppendorf tüplerde oluşan glass fiber kalıntılarını uzaklaştırmak için 16 000 g'de 2 dakika 15-25°C'de tekrar santrifüj edildi.
15. Supernatant başka bir 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüpe alındı.

3.8.2.3 36B4 Standart PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi

453 bç'lik 36B4 PCR ürününün elde edilip edilmediğini görmek amacıyla PCR sonrası saflaştırılan DNA, agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

1. Erlenmayerde, 1 gr agaroz (Sigma, A-0169), 50 ml TBE buffer (0,5X) içinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında 600 watt'ta bir taşım kaynatıldı.
3. Çözünen agaroz üzerine 3 µL Ethidium Bromide eklendi.
4. Sekizli tarak elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz, ılık hale gelince tanka döküldü.
5. 30-40 dk kadar agarozun donması beklendi.

6. İlk kuyucuğa 15 µL Marker 8 (M8) yüklendi.
 7. 15 µL PCR ürünleri ,3 µL 6X Loading Buffer ile karıştırıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi. Yürütücü tampon olarak 0,5 X TBE Buffer kullanıldı.
 8. PCR ürünlerine, 80V'ta 50 dakika elektroforez uygulandı.
 9. Bandlar elektroforez sonrası, U.V. ışıkta, jel görüntüleme cihazında değerlendirildi
- 36B4 standartlarına ait 453 bç'lik elektroforez bandları şekil 12'de gösterilmektedir.



Şekil 12: 36B4 standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü

3.8.2.4 36B4 Standardının Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu

Saflaştırılan 36B4 standart numunesinin miktarı nanospektrofotometre ile ölçüldü. 36B4 standart konsantrasyonu 13 µg/ml olarak bulundu.

- Absorbans₂₆₀: 0,027
- Absorbans₂₈₀: 0,01
- Absorbans_{260/280}: 2,0

3.8.2.5 36B4 Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması

- 36B4 standart ampliconun uzunluğu: 453 bç
- 1 bç ağırlığı: 660 Dalton (Da)
- 1 ampliconun ağırlığı: 453 x 660 = 298980 Da olarak hesaplandı.
- 1 Dalton: $1 / 6,02 \times 10^{23}$ gr

- 1 amplikonun ağırlığı: $298980 \times 1/6,02 \times 10^{23} \text{ gr} = 4,96 \times 10^{-13} \mu\text{g}$ olarak hesaplandı.
- Nanospektrofotometre ile 36B4 standart konsantrasyonu $13 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğundan;
- 36B4 standart amplikon kopya sayısı: $13 \mu\text{g/ml} / 4,96 \times 10^{-13} \mu\text{g}$
 : $2,6 \times 10^{13}$ kopya / ml
 : $2,6 \times 10^{10}$ kopya / μl olarak bulundu.

3.8.2.6 Rat Nükleer Genom Standardının Elde Edilmesi

- $13 \mu\text{g/ml}$ ($2,6 \times 10^{10}$ kopya / μl) ölçülen 36B4 standardı deiyonize su ile dilüe edilerek, konsantrasyonu $130 \text{ fg}/\mu\text{l}$ 'e ayarlandı.
- 10 kat seri dilüe edilerek 5 adet 36B4 standardı hazırlandı.
 Standart 1: $130 \text{ fg}/\mu\text{l}$
 Standart 2: $13 \text{ fg}/\mu\text{l}$
 Standart 3: $1,3 \text{ fg}/\mu\text{l}$
 Standart 4: $0,13 \text{ fg}/\mu\text{l}$
 Standart 5: $0,013 \text{ fg}/\mu\text{l}$
- PCR'da $2 \mu\text{l}$ numune kullanıldığından dolayı standartlar, $260-0,026 \text{ fg}/\mu\text{l}$ arasında elde edildi.

Yukarıdaki standartlar ve nükleer genom standardı olarak kullanılacak bir rat DNA numunesi, 36B4 primerleri kullanılarak LightCycler PCR cihazı ile çalışıldı. Rat genom standardı için hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı sırasıyla tablo XVIII ve tablo XIX'de gösterilmiştir.

Tablo XVIII: Rat nükleer genom standardı için 36B4 PCR master miks hazırlanması

1	Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
	H ₂ O; Steril ve PCR Grade	11.9 µL	-
	MgCl ₂ ; Stok Solüsyonu	1.6 µL	3.0 mM
	36B4 Forward Primer	0,25 µL	0.25 µM
	36B4 Reverse Primer	0,25 µL	0.25 µM
	SYBR Green	2.0 µL	0.2 X
	LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	2.0 µL	0.5 U/ 20 µL
	Toplam	18 µL	
2	Nazikce karıştırıldıktan sonra 18'er µL master miks solüsyonu kapiller tüplere aktarıldı. Üzerine 2 µL numune eklendi.		
3	Kapiller tüpler 7 000 g'de 5 saniye santrifüj edildi.		
4	Kapiller tüpler LightCycler cihazının rotoruna yerleştirildi.		
5	Tablo XIX'da belirtilen PCR protokolü uygulandı.		

Tablo XIX: Rat nükleer genom standardı için 36B4 PCR protokolü

Evre	Isı	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	5 saniye	40
Annealing	56 °C	10 saniye	40
Elongasyon	72 °C	6 saniye	40
Soğutma	6 °C	4 saat	1

- Çalışma, Second Derivation maximum'a göre analiz edildi.
Slope: -3,508 r: -1,00 olarak bulundu.
- PCR ile elde edilen Ct ve konsantrasyon değerleri tablo XX'da gösterilmiştir.

Tablo XX: Rat nükleer genom standardının ölçülmesi

Numuneler	Ct	Konsantrasyon (fg/20 µl)
Standart 1: 260 fg/ µl	17,98	277
Standart 2: 26 fg/ µl	21,62	25,5
Standart 3: 2,6 fg/ µl	25,19	2,44
Standart 4: 0,26 fg/ µl	28,73	0,24
Standart 5: 0,026 fg/ µl	31,97	0,028
NTC	>36	<0,002
Rat nükleer genom standardı	22,54	13,95

- Rat genom standardı 13,95 fg/20 µl ölçüldü. Çalışma için 2 µl kullanıldığından, 1 µl'deki miktar 13,95 / 2: 6,97 fg olarak bulundu.
- Rat genom standardının kopya sayısının bulunması için 6,97 fg/ µl, 453 bç amplikonun ağırlığına bölündü. Standart olarak kullanılacak numunede, kaç kopya nükleer genom olduğu bulundu.
6,97 fg/ µl / 4,966 x 10⁻⁴ fg: ~ 14 000 kopya / µl .
- Bir rat genom uzunluğu 2,75 x 10⁹ – 2,82 x 10⁹ bç arasındadır.
- Bir rat genom uzunluğu ortalama 2,8 x 10⁹ bç kabul edildi. Rat genom uzunluğu, bir baz çiftinin ağırlığı olan 660 Da ile çarpılarak, bir rat genom ağırlığı ~ 3 pg bulundu.
- Standart olarak kullanılacak numune 14 000 kopya/µl olduğundan,
- Konsantrasyonu: 14 000 x 3 pg
: 42 000 pg/ µl
: 42 ng/ µl olarak bulundu..
- 42 ng/ µl olan bu numune, rat genom standardı olarak kabul edildi.

3.8.3 Numunelerde 36B4 PCR çalışılması

- 42 ng/ µl ölçülen 36B4 standardından, 10 kat seri dilüsyon ile 5 adet standart hazırlandı.
Standart 1: 42 ng/ µl
Standart 2: 4,2 ng/ µl
Standart 3: 0,42 ng/ µl

Standart 4: 0,042 ng/ µl

Standart 5: 0,0042 ng/ µl

- PCR’da 10 µl numune kullanıldığından dolayı standartlar, 420-0,042 ng/ µl arasında elde edildi.
- Nükleer genom kopya sayılarının bulunması için numuneler ile yukarıdaki standartlar LightCycler PCR cihazı ile çalışıldı.

Numuneler için hazırlanan PCR master miks ve PCR programı sırasıyla tablo XXI ve tablo XXII’de gösterilmiştir.

Tablo XXI: Numuneler için hazırlanan 36B4 PCR master miksi

1	Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
	H ₂ O; Steril ve PCR Grade	3,9 µL	-
	MgCl ₂ ; Stok Solüsyonu	1,6 µL	3.0 mM
	36B4 Forward Primer	0,25 µL	0.25 µM
	36B4 Reverse Primer	0,25 µL	0.25 µM
	SYBR Green	2.0 µL	0.2 X
	LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	2.0 µL	0.5 U/ 20 µL
	Toplam	10 µL	
2	Nazikce karıştırıldıktan sonra 10’er µL master miks solüsyonu kapiller tüplere aktarıldı. Üzerine 10 µL numune eklendi.		
3	Kapiller tüpler 7 000 g’de 5 saniye santrifüj edildi.		
4	Kapiller tüpler LightCycler cihazının rotoruna yerleştirildi.		
5	Tablo XXII’de belirtilen PCR protokolü uygulandı.		

Tablo XXII: Numuneler için hazırlanan 36B4 PCR protokolü

Evre	Isı	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	5 saniye	40
Annealing	56 °C	10 saniye	40
Elongasyon	72 °C	6 saniye	40
Soğutma	6 °C	4 saat	1

3.8.4 Rat mtDNA Standardının Elde Edilmesi

3.8.4.1 D-loop Standart Sekansının PCR ile çoğaltılması

PCR Cihazı (Genius) ile standart olarak kullanılacak D-loop ampliconu, D-loop standart primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Numune olarak, bir rat genomu kullanıldı. PCR’da kullanılan master miks ve PCR programı tablo XXIII ve tablo XXIV ’de gösterilmiştir.

Tablo XXIII: D-loop standart PCR master miks hazırlanması

1	Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
	H ₂ O; Steril ve PCR Grade	40.5 µL	-
	Taq Buffer	5.0 µL	1 X
	MgCl ₂ ; Stok Solüsyonu	1.0 µL	2.0 mM
	D-loop Standart Forward Primer	0,625 µL	0,25 µM
	D-loop Standart Reverse Primer	0,625 µL	0,25 µM
	Taq DNA Polymerase	0,25 µL	1,25 U/ 50 µL
	dNTP (Fermentase)	1 µL	0,2 mM
	DNA Template	1 µL	50 ng/50 µL
	Toplam	50 µL	
2	Nazikce karıştırıldıktan sonra PCR tüpüne aktarıldı.		
3	PCR tüpü, PCR cihazına yerleştirildi.		
4	Tablo XXIV’de belirtilen PCR protokolü uygulandı.		

Tablo XXIV: D-loop standart PCR protokolü

Evre	Isı	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	4 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	30
Annealing	62 °C	30 saniye	30
Elongasyon	72 °C	1 dakika	30
Final ekstansiyon	72 °C	5 dakika	1
Soğutma	6 °C	4 saat	1

3.8.4.2 D-loop Standart PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre saflaştırıldı.

1. 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere 100 µL PCR ürünü aktarıldı.
2. Üzerine 500 µL binding buffer ilave edildi ve karıştırıldı.
3. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere yerleştirildi. Karışım filtre tüplerine aktarıldı.
4. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
5. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
6. 500 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklendi.
7. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
8. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere konuldu.
9. 200 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklendi.
10. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
11. Kolektör tüpler atıldı ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirildi.
12. 200 µL Elüsyon Buffer ilave edildi.
13. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edildi.
14. Eppendorf tüplerde oluşan glass fiber kalıntılarını uzaklaştırmak için 16 000 g'de 2 dakika 15-25°C'de tekrar santrifüj edildi.
15. Supernatant başka bir 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüpe alındı.

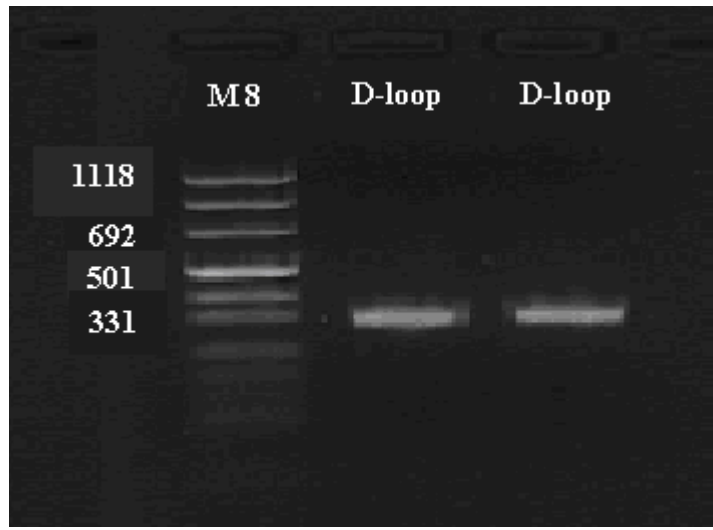
3.8.4.3 D-loop Standart PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi

321 bç'lik 36B4 PCR ürününün elde edilip edilmediğini görmek amacıyla PCR sonrası saflaştırılan DNA, agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

1. Erlenmayerde, 1 gr agaroz (Sigma, A-0169), 50 ml TBE buffer (0,5X) içinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında 600 watt'ta bir taşım kaynatıldı.
3. Çözünen agaroz üzerine 3 µL Ethidium Bromide eklendi.
4. Sekizli tarak elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz, ılık hale gelince tanka döküldü.
5. 30-40 dk kadar agarozun donması beklendi.

6. İlk kuyucuğa 15 µL Marker 8 (M8) yüklendi.
7. 15 µL PCR ürünleri ,3 µL 6X Loading Buffer ile karıştırıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi.
8. PCR ürünlerine, 80V'ta 50 dakika elektroforez uygulandı.
9. Bandlar elektroforez sonrası, U.V. ışıktta, jel görüntüleme cihazında değerlendirildi.

D-loop standartlarına ait 321 bç'lik elektroforez bandları şekil 13'de gösterilmektedir.



Şekil 13: D-loop standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü

3.8.4.4 D-loop Standardının Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu

- Saflaştırılan D-loop standart numunesinin miktarı nanospektrofotometre ile ölçüldü. D-loop standart konsantrasyonu 23 µg/ml olarak bulundu.
- Absorbans₂₆₀: 0,048
- Absorbans₂₈₀: 0,026
- Absorbans_{260/280}: 1,917

3.8.4.5 D-loop Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması

- D-loop standart ampliconun uzunluğu: 321 bç
- 1 bç ağırlığı: 660 Da
- 1 Ampliconun ağırlığı: 321 x 660 = 211 860 Da olarak hesaplandı.
- 1 Dalton: 1/ 6,02x10²³ gr

- 1 Amplikonun ağırlığı: $211\ 860 \times 1 / 6,02 \times 10^{23} \text{ gr} = 3,52 \times 10^{-13} \mu\text{g}$ olarak hesaplanır.
- Nanospektrofotometre ile ölçülen D-loop standart konsantrasyonu $23 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunduğundan,
- D-loop standart amplikon kopya sayısı: $23 \mu\text{g/ml} / 3,52 \times 10^{-13} \mu\text{g}$
: $6,5 \times 10^{13}$ kopya / ml
: $6,5 \times 10^{10}$ kopya / μl bulundu.

3.8.4.6 Rat mtDNA Standardının Elde Edilmesi

- $23 \mu\text{g/ml}$ ($6,5 \times 10^{10}$ kopya / μl) ölçülen D-loop standardından, 10 kat seri dilüsyonla 9 adet D-loop standardı hazırlandı.
Standart 1: $6,5 \times 10^9$ kopya / μl (2,3 ng/ μl)
Standart 2: $6,5 \times 10^8$ kopya / μl (230 pg/ μl)
Standart 3: $6,5 \times 10^7$ kopya / μl (23 pg/ μl)
Standart 4: $6,5 \times 10^6$ kopya / μl (2,3 pg/ μl)
Standart 5: $6,5 \times 10^5$ kopya / μl (230 fg/ μl)
Standart 6: $6,5 \times 10^4$ kopya / μl (23 fg/ μl)
Standart 7: $6,5 \times 10^3$ kopya / μl (2,3 fg/ μl)
Standart 8: $6,5 \times 10^2$ kopya / μl (0,23 fg/ μl)
Standart 9: $6,5 \times 10^1$ kopya / μl (0,023 fg/ μl)
- PCR’da 10 μl numune kullanıldığından standartlar, $6,5 \times 10^{10}$ – $6,5 \times 10^2$ kopya / μl arasında elde edildi.

Yukarıdaki standartlar ve mtDNA standardı olarak kullanılacak bir rat DNA numunesi, D-loop primerleri kullanılarak LightCycler PCR cihazı ile çalışıldı. Hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı sırasıyla tablo 25 ve tablo 26’da gösterilmiştir.

- Çalışma, Second Derivation maximum’a göre analiz edildi.
Slope: -3,426 r: -1,00 olarak bulundu.
- PCR ile elde edilen Ct ve konsantrasyon değerleri tablo XXV’de gösterilmiştir.

Tablo XXV: Rat mtDNA standardının ölçülmesi

Numuneler	Ct	Kopya/ µl)
Standart 1: 6,5 x 10 ¹⁰ kopya / µl	7,82	5,8 x 10 ⁹
Standart 2: 6,5 x 10 ⁹ kopya / µl	9,97	1,37 x 10 ⁹
Standart 3: 6,5 x 10 ⁸ kopya / µl	13,55	1,25 x 10 ⁸
Standart 4: 6,5 x 10 ⁷ kopya / µl	17,00	1,23 x 10 ⁷
Standart 5: 6,5 x 10 ⁶ kopya / µl	20,68	1,03 x 10 ⁶
Standart 6: 6,5 x 10 ⁵ kopya / µl	24,20	9,7 x 10 ⁴
Standart 7: 6,5 x 10 ⁴ kopya / µl	27,83	8,5 x 10 ³
Standart 8: 6,5 x 10 ³ kopya / µl	31,10	9,4 x 10 ²
Standart 9: 6,5 x 10 ² kopya / µl	35,69	4,3 x 10 ¹
NTC	>40,49	---
Rat mtDNA Standardı	12,12	3,28 x 10 ⁸

3.8.5 Numunelerde D-loop PCR Çalışması

- Rat mtDNA standardı 3,28 x 10⁸ kopya olarak bulundu.
- 10 kat seri dilüsyon ile 7 adet standart hazırlandı.
Standart 1: 3,28.10⁸ kopya
Standart 2: 3,28.10⁷ kopya
Standart 3: 3,28.10⁶ kopya
Standart 4: 3,28.10⁵ kopya
Standart 5: 3,28.10⁴ kopya
Standart 6: 3,28.10³ kopya
Standart 7: 3,28.10² kopya
- PCR'da 10 µl numune kullanıldığından dolayı standartlar, 3,28.10⁹-3,28.10³ kopya arasında elde edildi.
- mtDNAsayılarının bulunması için numuneler ile yukarıdaki standartlar LightCycler PCR cihazı ile çalışıldı.

Numuneler için hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı sırasıyla tablo XXVI ve tablo XXVII'de gösterilmiştir.

Tablo XXVI: Rat mitokondriyal D-loop PCR master miks hazırlanması

1	Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
	H ₂ O; Steril ve PCR Grade	3.4 µL	-
	MgCl ₂ ; Stok Solüsyonu	1.6 µL	3.0 mM
	D-loop Forward Primer	0,25 µL	0.25 µM
	D-loop Reverse Primer	0,25 µL	0.25 µM
	SYBR Green	2.0 µL	0.2 X
	LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	2.0 µL	0.5 U/ 20 µL
	UNG (Roche)	0.5 µL	0.5 U/ 20 µL
	Toplam	10 µL	
2	Nazikce karıştırıldıktan sonra 10 µL master miks solüsyonu kapiller tüplere aktarıldı. Üzerine 10 µL numune eklendi.		
3	Kapiller tüpler 7 000 g'de 5 saniye santrifüj edildi.		
4	Kapiller tüpler LightCycler cihazının rotoruna yerleştirildi.		
5	Tablo XXVII'de belirtilen PCR protokolü uygulandı.		

Tablo XXVII: Rat mitokondriyal D-loop PCR protokolü

Evre	Isı	Süre	Siklus
UNG ile Dekontaminasyon	30 °C	5 dakika	1
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	5 saniye	45
Annealing	56 °C	10 saniye	45
Elongasyon	72 °C	6 saniye	45
Soğutma	6 °C	4 saat	1

3.8.6 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Standardının Elde Edilmesi

3.8.6.1 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Sekansının PCR ile Çoğaltılması

PCR cihazı (Genius) ile standart olarak kullanılacak 81 bç'lik mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon amplikonu, mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Numune

olarak, bir rat genomu kullanıldı. PCR’da kullanılan master miks ve PCR programı tablo XXVIII ve tablo XXIX’de gösterilmiştir.

Tablo XXVIII: mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon PCR master miks hazırlanması

1	Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
	H ₂ O; Steril ve PCR Grade	40.5 µL	-
	Taq Buffer	5.0 µL	1 X
	MgCl ₂ ; Stok Solüsyonu	1.0 µL	2.0 mM
	mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Forward Primer	0,625 µL	0,25 µM
	mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Reverse Primer	0,625 µL	0,25 µM
	Taq DNA Polymerase	0,25 µL	1,25 U/ 50 µL
	dNTP (Fermentase)	1 µL	0,2 mM
	DNA Template	1 µL	
	Toplam	50 µL	
2	Nazikce karıştırıldıktan sonra PCR tüpüne aktarıldı.		
3	PCR tüpü, PCR cihazına yerleştirildi.		
4	Tablo XXIX’de belirtilen PCR protokolü uygulandı.		

Tablo XXIX: mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon PCR protokolü

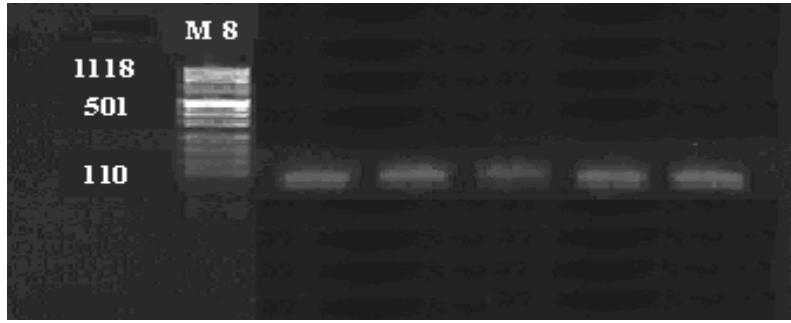
Evre	Isı	Süre	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	4 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	45 saniye	30
Annealing	56 °C	30 saniye	30
Elongasyon	72 °C	30 saniye	30
Final Ekstansiyon	72 °C	2 dakika	1
Soğutma	6 °C	4 saat	1

3.8.6.2 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi

mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon PCR ürününün elde edilip edilmediğini görmek amacıyla PCR sonrası saflaştırılan DNA, agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

1. Erlenmayerde, 1 gr agaroz (Sigma, A-0169), 50 ml TBE buffer (0,5X) içinde çözüldü.

2. Mikrodalga fırında 600 watt'ta bir taşım kaynatılarak çözülmesi sağlandı.
 3. Çözünen agaroz üzerine 3 µL Ethidium Bromide eklendi.
 4. Sekizli tarak elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz, ılık hale gelince tanka döküldü.
 5. 30-40 dk kadar agarozun donması beklendi.
 6. İlk kuyucuğa 15 µL Marker 8 yüklendi.
 7. 15 µL PCR ürünleri, 3 µL 6X Loading Buffer ile karıştırıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi.
 8. PCR ürünlerine, 80V'ta 50 dakika elektroforez uygulandı.
 9. Bandlar elektroforez sonrası, UV ışıkta, jel görüntüleme cihazında değerlendirildi.
- mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standartlarına ait 81 bç'lik elektroforez bandları şekil 14'de gösterilmektedir.



Şekil 14: mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü

3.8.6.3 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Saflaştırılması

mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon PCR ürünleri, SephadexTm G-50 Medium filtre kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre saflaştırıldı.

1. SephadexTm G-50 Medium filtre, kolektör tüpe yerleştirildi.
2. 50 µg SephadexTm G-50, filtreye eklendi ve üzerine 600 µL dH₂O ilave edildi.
3. İyice çalkalandıktan sonra suyu uzaklaştırmak için 1 000 g'de 4 dakika santrifüj edildi.
4. Kolektör tüp atılıp filtre tüpü nükleaz içermeyen eppendorf tüpe yerleştirildi.
5. 40 µL PCR ürünü SephadexTm G-50 filtreye pipetlendi.
6. 1 000 g'de 4 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası, filtre atıldı.
8. Elüe edilen PCR ürünü alındı.

3.8.6.4 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu

Saflaştırılan mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standart numunesinin miktarı nanospektrofotometre ile ölçüldü. mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standart konsantrasyonu 46 µg/ml olarak bulundu.

- Absorbans₂₆₀: 0,091
- Absorbans₂₈₀: 0,050
- Absorbans_{260/280}: 1,804

3.8.6.5 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Plazmid Genomuna Aktarılması

3.8.6.5.1 Ürün (İnsert) Miktarının Belirlenmesi

- İnsert miktarı aşağıda gösterilen formüle göre hesaplanmıştır.
- $$\frac{\text{Vektör (ng)} \times \text{insert büyüklüğü (kb)} \times \text{insert/vektör oranı}}{\text{Vektör büyüklüğü (kb)}} = \text{insert miktarı (ng)}$$
- pGEM®-T Easy vektör, ~ 3kb uzunluğundadır ve konsantrasyonu 50ng/µl 'dir.
- $$\frac{50 \text{ ng} \times 0,08 \text{ kb}}{3 \text{ kb}} \times \frac{3}{1} = \sim 4 \text{ ng (insert miktarı)}$$
- 46 µg/ml olarak bulunan mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standart konsantrasyonu 10 kat dilüe edilerek ~ 4 ng/ µL'ye ayarlandı.

3.8.6.5.2 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Ürününün Plazmid ile Ligasyonu

Elde edilen PCR ürünün pGEM®-T Easy Vektöre yerleştirilmesi için aşağıda yazılan ligasyon miksi hazırlanarak 4°C'de, bir gece inkübasyona bırakıldı. PCR ürününün plazmid ile ligasyon protokolü tablo XXX'da gösterilmektedir.

Tablo XXX: PCR ürününün plazmid ile ligasyonu

Komponent	Standart reaksiyon
2X Rapid Ligasyon Buffer	5 µL
pGEM-T Easy Vektör (50 ng)	1 µL
PCR Ürünü	1 µL
T4 DNA Ligaz (3u/µL)	1 µL
dH ₂ O	2 µL
Toplam	10 µL

3.8.6.6 Plazmidin Kompetent Hücreye Aktarılması

1. -80 °C'de saklanan JM 109 kompetent hücre çıkarıldıktan sonra buz üzerinde 5 dakika bekletildi.
2. Bir gece 4 °C'de bekletilen plazmid içeren tüp kısa süreli santrifüj edildi.
3. 50 µL kompetent hücrenin bulunduğu eppendorf tüpe 2 µL plazmid eklendi.
4. Karışım buz üzerinde 20 dakika bekletildi.
5. Başka bir eppendorf tüpe 475 µL LB besiyeri konularak 37 °C etüve bırakıldı.
6. 20 dakikanın sonunda hücreler 42 °C'de 45-50 saniye bekletilerek ısı şoku yapıldı.
7. Isı şokundan sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi.
8. Etüvde bekleyen LB besiyeri hücrelerin üzerine eklendi. Hafifçe vortekslendi.
9. 150 rpm'de, 37 °C'de inkübatöre bırakıldı ve 4 saat bekletildi.
10. 4 saat sonra, 4 bölmeye ayrılmış LB agar besiyerine sırayla; 50 µL, 10 µL, 5 µL, 1 µL kompetent hücre ve plazmid karışımı pipetlenerek agara yayıldı.
11. Bir gece 150 rpm'de, 37 °C'de etüvde bırakılarak, mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon ürününü içeren plazmidin kompetent hücreye girmesi beklendi.
12. Ertesi gün, LB agar besiyerinde üreyen hücre kolonilerinden birisi alındı.
13. Koloni, 50-100 µg ampisilin eklenen 5 ml besiyerine steril pipet ucu ile konuldu.
14. Hücrelerin çoğalması için 200 rpm'de 37 °C'de 7 saat inkübasyona bırakıldı.

3.8.6.7 Plazmid İzolasyonu

1. Üç adet eppendorf tüpe 1,5 ml LB besiyeri ve çoğalan hücreler pipetlendi.
2. Tüpler, 10 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatant atılarak dipte çöken hücrelere ~85 µL hücre resüspanسیون solüsyonu eklendi. Üç eppendorf tek tüpte ~250 µL olarak birleştirildi ve karıştırıldı.
4. Eppendorfun üzerine 250 µL hücre lizis solüsyonu eklendi.
5. Eppendorf 4 kez alt üst edildi.
6. 10 µL alkalın proteaz solüsyon eklendi.
7. Eppendorf 4 kez alt üst edildi.
8. 5 dakika oda ısısında bekletildi.
9. 350 µL nötralizasyon buffer eklendi.

10. Eppendorf 4 kez alt üst edildi.
11. Oda ısısında 16 000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
12. Santrifüj sonrası plazmid DNA dışındaki DNA'lar çöktüğü için süpernatant alınarak spin kolona aktarıldı.
14. Süpernatant spin kolona aktarıldıktan sonra oda ısısında, 16 000 g'de, 1 dakika santrifüj edildi.
15. Kolektör tüp atıldı.
15. 750 µL wash solüsyon eklendi.
16. Oda ısısında, 16 000 g'de, 1 dakika santrifüj edildi.
17. Kolektör tüp atıldı.
18. 250 µL wash solüsyon eklendi.
19. Oda ısısında, 16 000 g'de, 1 dakika santrifüj edildi.
20. Kolektör tüp atıldı.
21. Spin kolon, 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı.
22. 100 µL nükleaz içermeyen dH₂O eklendi.
23. Oda ısısında, 10 000 g'de, 1 dakika santrifüj edildi.
24. Tekrar aynı spin kolona 100 µL nükleaz içermeyen dH₂O eklendi.
25. Oda ısısında, 10 000 g'de, 1 dakika santrifüj edildi.
26. Toplam 200 µL elüat elde edildi.

3.8.6.8 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Standardının Nanospektrofotometre ile Kantitasyonu

mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standart numunesinin miktarı nanospektrofotometre ile ölçüldü.

- mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standart konsantrasyonu 65,5 µg/ml olarak bulundu.
- Absorbans₂₆₀: 0,131
- Absorbans₂₈₀: 0,071
- Absorbans_{260/280}: 1, 85

3.8.6.9 mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması

- mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon ürünü içeren plazmidin uzunluğu: 3096 bç (3015 bç plazmid +81 bç mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon ürünü)
- 1 bç ağırlığı: 660 Da
- 1 Plazmidin ağırlığı: 3096 x 660= 2043360 Da olarak hesaplandı.
- 1 Dalton: 1/ 6,02x10²³ gr
- 1 Plazmidin ağırlığı: 2043360 x 1/ 6, 02x10²³ gr
: 34 x 10⁻¹³ µg olarak hesaplandı.
- Nanospektrofotometre ile mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standart konsantrasyonu 65,5 µg/ml olarak bulunduğundan,
- mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standart kopya sayısı: 65,5 µg/ml / 34 x 10⁻¹³ µg
: ~ 2 x 10¹³ kopya / ml
: ~ 2 x 10¹⁰ kopya / µl bulundu.

3.8.7 Numunelerde mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon PCR Çalışılması

- 2 x 10¹⁰ kopya / µl mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standardından, 10 kat seri dilüsyonla 7 adet mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standardı hazırlandı.
Standart 1: 2 x 10⁷ kopya / µl
Standart 2: 2 x 10⁶ kopya / µl
Standart 3: 2 x 10⁵ kopya / µl
Standart 4: 2 x 10⁴ kopya / µl
Standart 5: 2 x 10³ kopya / µl
Standart 6: 2 x 10² kopya / µl
Standart 7: 2 x 10¹ kopya / µl
- PCR'da 10 µl numune kullanıldığından standartlar, 2 x 10⁸ – 2 x 10² kopya / µl arası elde edildi.

Yukarıdaki standartlar ile mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon primerleri kullanılarak tüm numuneler, LightCycler PCR cihazı ile çalışıldı. Hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı sırasıyla tablo XXXI ve tablo XXXII'de gösterilmiştir.

Tablo XXXI: Numuneler için hazırlanan mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon PCR master miksi

1	Komponent	Volüm	Final Konsantrasyon
	H ₂ O; Steril ve PCR Grade	3.4 µL	-
	MgCl ₂ ; Stok Solüsyonu	1.6 µL	3.0 mM
	mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Forward Primer	0,25 µL	0.25 µM
	mtDNA ⁴⁸³⁴ Delesyon Reverse Primer	0,25 µL	0.25 µM
	SYBR Green	2.0 µL	0.2 X
	LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	2.0 µL	0.5 U/ 20 µL
	UNG (Roche)	0.5 µL	0.5 U/ 20 µL
	Toplam	10 µL	
2	Nazikce karıştırıldıktan sonra 10 µL master miks solüsyonu santrifüj adaptöründe soğutulmuş kapiller tüplere aktarıldı. Üzerine 10 µL numune eklendi.		
3	Kapiller tüpler 7 000 g'de 5 saniye santrifüj edildi.		
4	Kapiller tüpler LightCycler cihazının rotoruna yerleştirildi.		
5	Tablo XXXII'de belirtilen PCR protokolü uygulandı.		

Tablo XXXII: Numuneler için hazırlanan mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon PCR protokolü

Evre	Isı	Süre	Siklus
UNG ile Dekontaminasyon	30 °C	5 dakika	1
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	5 saniye	45
Annealing	56 °C	10 saniye	45
Elongasyon	72 °C	3 saniye	45
Soğutma	6 °C	4 saat	1

3.9. Numunelerde Hücre Başına Düşen mtDNA Kopya Sayılarının Hesaplanması

QPCR ile absölü kantitasyon yapılarak bütün numunelerin nükleer ve mitokondriyal kopya sayıları bulundu. Numunelerin D-loop kopya sayıları, 36B4 kopya sayılarına bölündü ve iki ile çarpılarak hücre başına düşen mitokondriyal DNA kopya sayıları hesaplandı.

(mtDNA/hücre = (D-loop kopya/36B4 kopya) x2). Bütün numuneler üçer kez çalışıldı.

3.10 Numunelerde mtDNA⁴⁸³⁴ Delesyon Frekansının Hesaplanması

QPCR ile absölü kantitasyon yapılarak bütün numunelerin mitokondri kopya sayıları ve mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon kopya sayıları bulundu. Numunelerin mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon kopya sayıları D-loop kopya sayılarına bölündü ve 100 ile çarpılarak delesyon frekansı (%) hesaplandı.

(delesyon frekansı (%))= (mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon kopya/D-loop kopya) x100). Bütün numuneler üçer kez çalışıldı.

3.11 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Veriler SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktarılarak, istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Grupların karşılaştırılan parametreler açısından normal dağılıma uymadıkları tespit edildi. Farklı RZG dozlarında, dokular ve lenfositlerin mtDNA/hücre sayıları ve delesyon frekansının belirlenmesinde non-parametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı.

İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

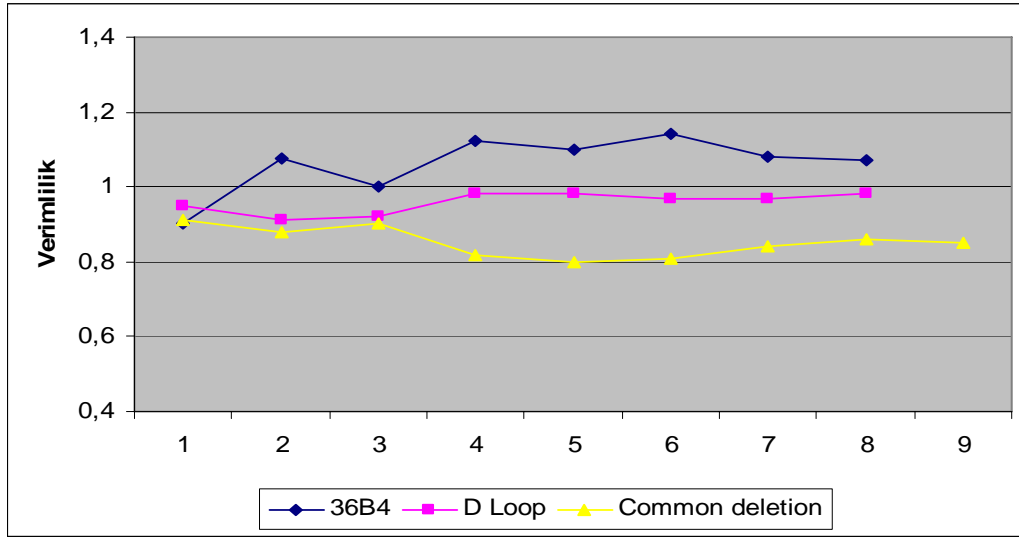
4. BULGULAR

4.1 PCR Çalışmasının Validasyon Sonuçları

Çalışmaların doğruluğunu görmek amacıyla farklı tarihlerde yapılan 36B4, D-loop ve mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon PCR çalışmalarından elde edilen slope ve verimlilik değerleri tablo XXXIII'de gösterilmiştir. Şekil 15'de ise verimlilik değerleri grafiksel olarak verilmiştir.

Tablo XXXIII: 36B4, D-loop ve mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon çalışmalarının slope ve verimlilik sonuçları

	36B4		D-loop		mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon	
	Slope	Verimlilik	Slope	Verimlilik	Slope	Verimlilik
1. Çalışma	-3,589	0,90	-3,439	0,95	-3,554	0,91
2. Çalışma	-3,147	1,078	-3,55	0,91	-3,640	0,88
3. Çalışma	-3,314	1,003	-3,534	0,92	-3,589	0,90
4. Çalışma	-3,060	1,121	-3,379	0,98	-3,843	0,82
5. Çalışma	-3,10	1,101	-3,380	0,98	-3,899	0,80
6. Çalışma	-3,024	1,141	-3,386	0,97	-3,889	0,81
7. Çalışma	-3,145	1,079	-3,395	0,97	-3,77	0,84
8. Çalışma	-3,160	1,072	-3,368	0,98	-3,706	0,86
9. Çalışma					-3,741	0,85
Ortalama	-3,19	1,06	-3,43	0,96	-3,74	0,85



Şekil 15: 36B4, D-loop ve mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon çalışmalarının slope ve verimlilik grafiği

4.2 Numunelerin Absolü Kantitasyon Sonuçları

Çalışma sonrasında elde edilen rat dokuları ve lenfositlerine ait mtDNA/hücre ve delesyon frekansı Tablo XXXIV, XXXV, XXXVI ve XXXVII'de ortalama, minimum ve maksimum değerleri ile birlikte gösterilmiştir.

Tablo XXXIV: Karaciğer dokusunda mtDNA/hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri

	Doz	Ortalama	Minimum	Maksimum
mtDNA/hücre	2 mg/kg	45100,1	21583,6	91730,8
	1 mg/kg	47818,8	24958,9	68838,9
	0,5 mg/kg	45450,3	32228,1	65540,7
	kontrol	45450,8	35788,8	62307,7
delesyon frekansı (%)	2 mg/kg	3,24	2,38	4,40
	1 mg/kg	3,53	2,42	5,03
	0,5 mg/kg	3,87	3,14	5,65
	kontrol	4,22	3,35	4,81

Tablo XXXV: İnce bağırsak dokusunda mtDNA/hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri

	Doz	Ortalama	Minimum	Maksimum
mtDNA/hücre	2 mg/kg	2032,2	532,5	5126,4
	1 mg/kg	3321,1	2504,3	5161,5
	0,5 mg/kg	2858,4	1368,7	5910,2
	kontrol	5613,1	2668,8	11583,5
delesyon frekansı (%)	2 mg/kg	2,88	1,99	4,17
	1 mg/kg	2,85	1,79	4,24
	0,5 mg/kg	2,77	2,25	3,23
	kontrol	2,88	1,66	4,09

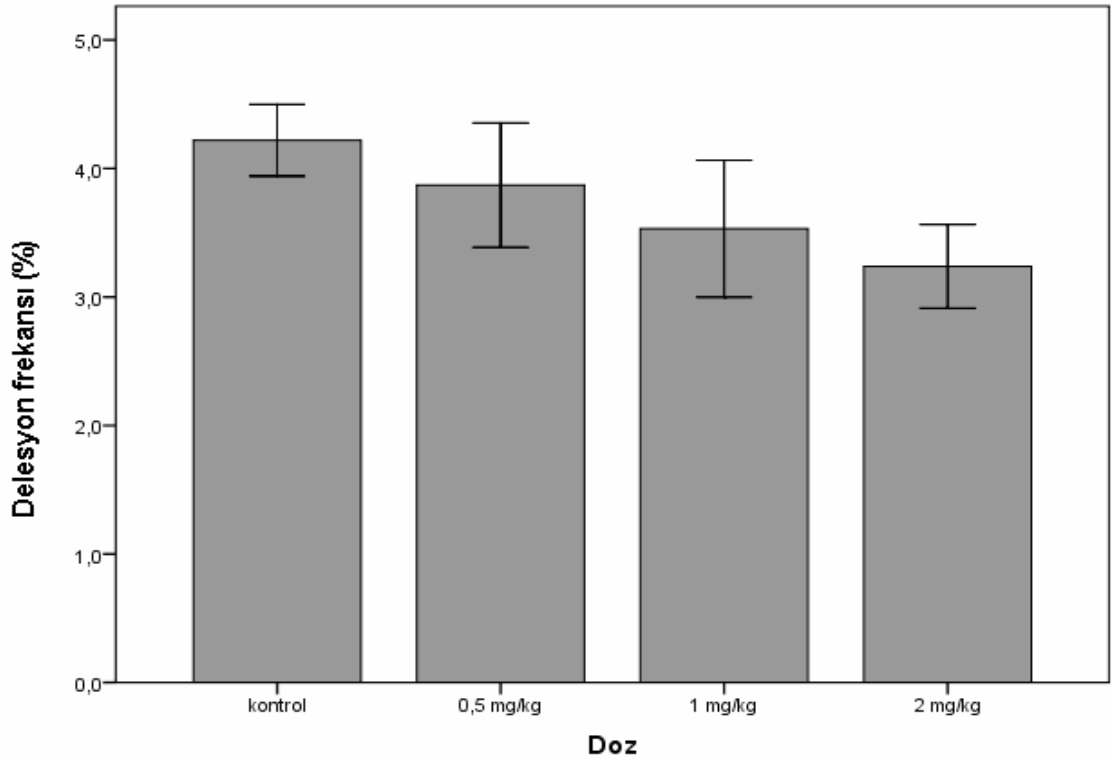
Tablo XXXVI: Pankreas dokusunda mtDNA/hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri

	Doz	Ortalama	Minimum	Maksimum
mtDNA/hücre	2 mg/kg	40617,8	10506,6	85920,9
	1 mg/kg	16961,9	10770,1	21559,1
	0,5 mg/kg	23350,5	7684,4	49052,6
	kontrol	58229,4	30941,2	91285,3
delesyon frekansı (%)	2 mg/kg	4,66	3,52	6,24
	1 mg/kg	4,70	3,62	6,61
	0,5 mg/kg	4,69	2,66	6,79
	kontrol	4,77	4,24	5,36

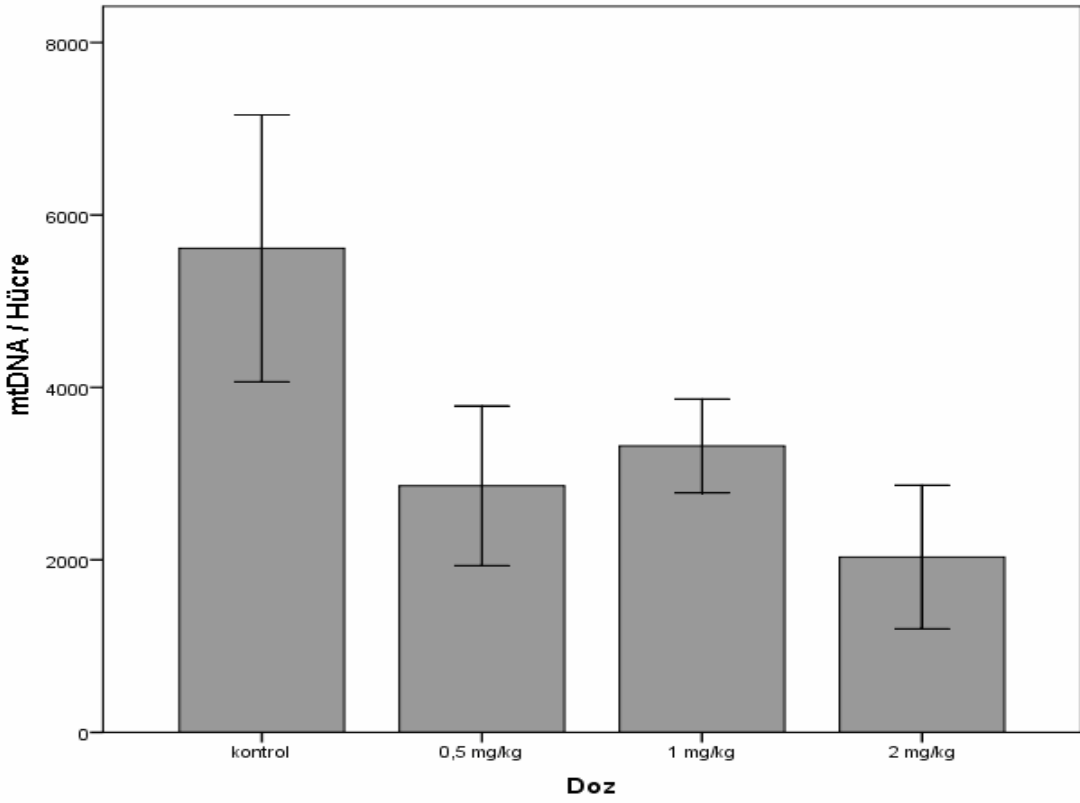
Tablo XXXVII: Lenfositlerde mtDNA /hücre ve delesyon frekansının, ortalama, minimum ve maksimum değerleri

	Doz	Ortalama	Minimum	Maksimum
mtDNA/hücre	2 mg/kg	23971,4	15141,4	39915,2
	1 mg/kg	28687,2	12463,3	65208,8
	0,5 mg/kg	28294,5	12798,3	42113,1
	kontrol	25454,2	10196,1	37502,3
delesyon frekansı (%)	2 mg/kg	5,82	4,82	7,65
	1 mg/kg	5,27	3,69	7,18
	0,5 mg/kg	5,73	4,42	7,24
	kontrol	5,21	1,96	7,61

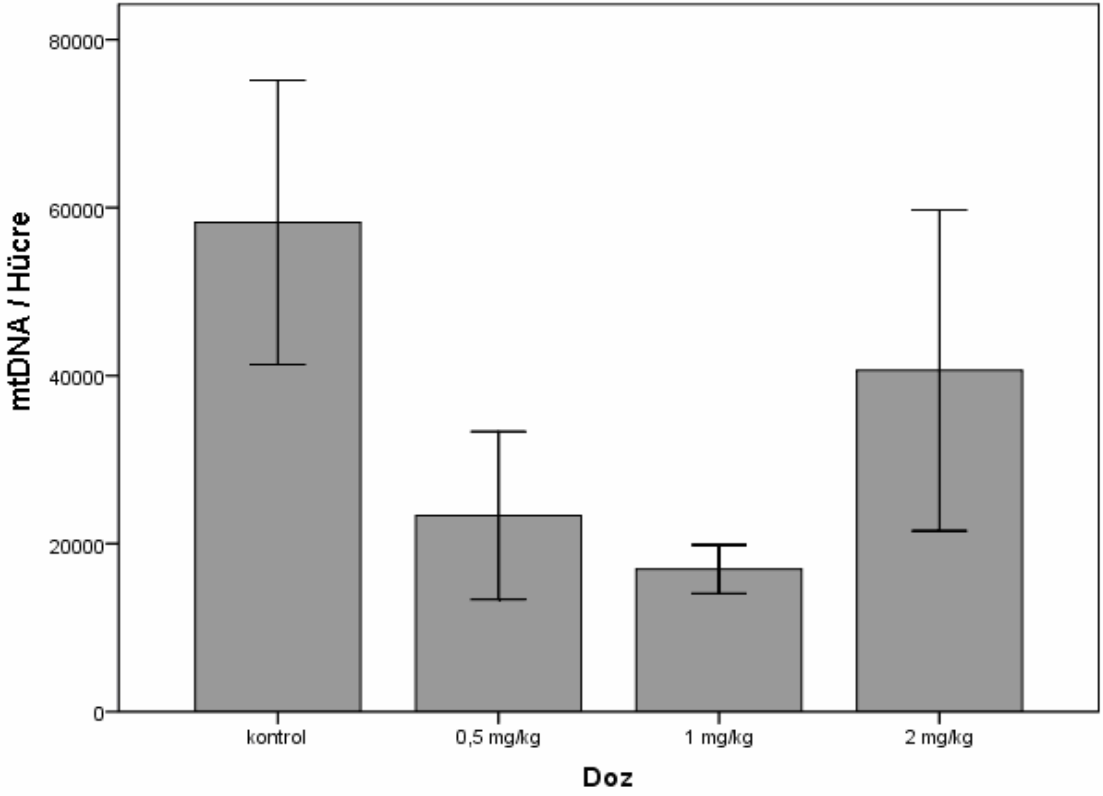
Rat dokuları ve lenfositlerinde mtDNA/hücre sayıları ve delesyon frekansı açısından RZG'un tüm dozları ile kontrol grubu Kruskal-Wallis testi yapılarak karşılaştırıldı. Karaciğer dokusunda RZG'un tüm dozlarında kontrol grubuna göre delesyon frekansındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo XXXIV). İnce bağırsak ve pankreasta ise RZG'un tüm dozlarında kontrol grubuna göre mtDNA/hücre sayılarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo XXXV, Tablo XXXVI). Şekil 16'da RZG dozlarına göre karaciğer dokusunda delesyon frekansı, şekil 17'de RZG dozlarına göre ince bağırsak dokusunda mtDNA/hücre sayıları ve şekil 18'de RZG dozlarına göre pankreas dokusunda mtDNA/hücre sayıları ve %95 güven aralıkları (Confidence Intervale, CI) gösterilmiştir.



Şekil 16: Rosiglitazon dozlarına göre karaciğer dokusunda delesyon frekansı (%95CI)



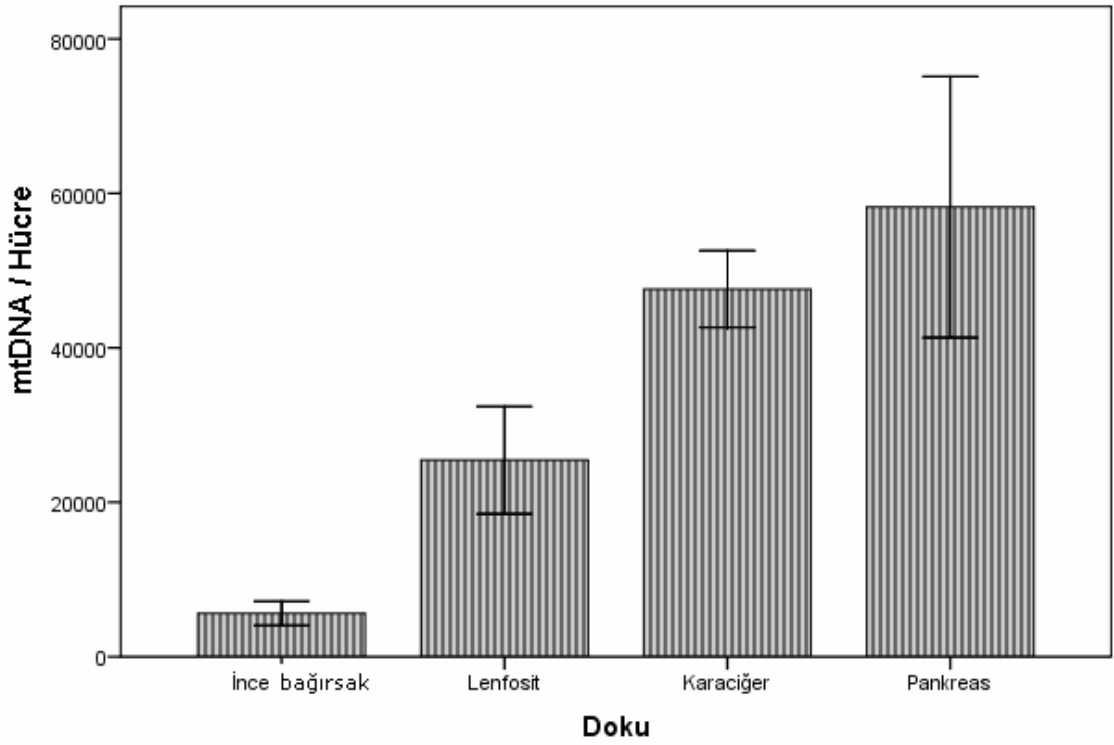
Şekil 17: Rosiglitazon dozlarına göre ince bağırsak dokusunda mtDNA/hücre (%95 CI)



Şekil 18: Rosiglitazon dozlarına göre pankreas dokusunda mtDNA/hücre (%95 CI)

Tüm dokular ve lenfositlerde, mtDNA/ hücre ve delesyon frekansında fark olup olmadığını anlamak için kontrol grupları seçilerek Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel analiz yapıldı.

Kontrol grupları esas alındığında, dokular ve lenfositlerde mtDNA/ hücre sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Kontrol grupları arasında, mtDNA/hücre sayıları, pankreas>karaciğer>lenfosit>ince bağırsak olarak bulundu ($P < 0,05$). Şekil 19'da kontrol dokularında ve lenfositlerde mtDNA/hücre gösterilmektedir. Tablo XXXVIII'de ise kontrol dokuları ve lenfositlerin mtDNA/hücre sayılarının ortalama, minimum ve maksimum değerleri gösterilmektedir.

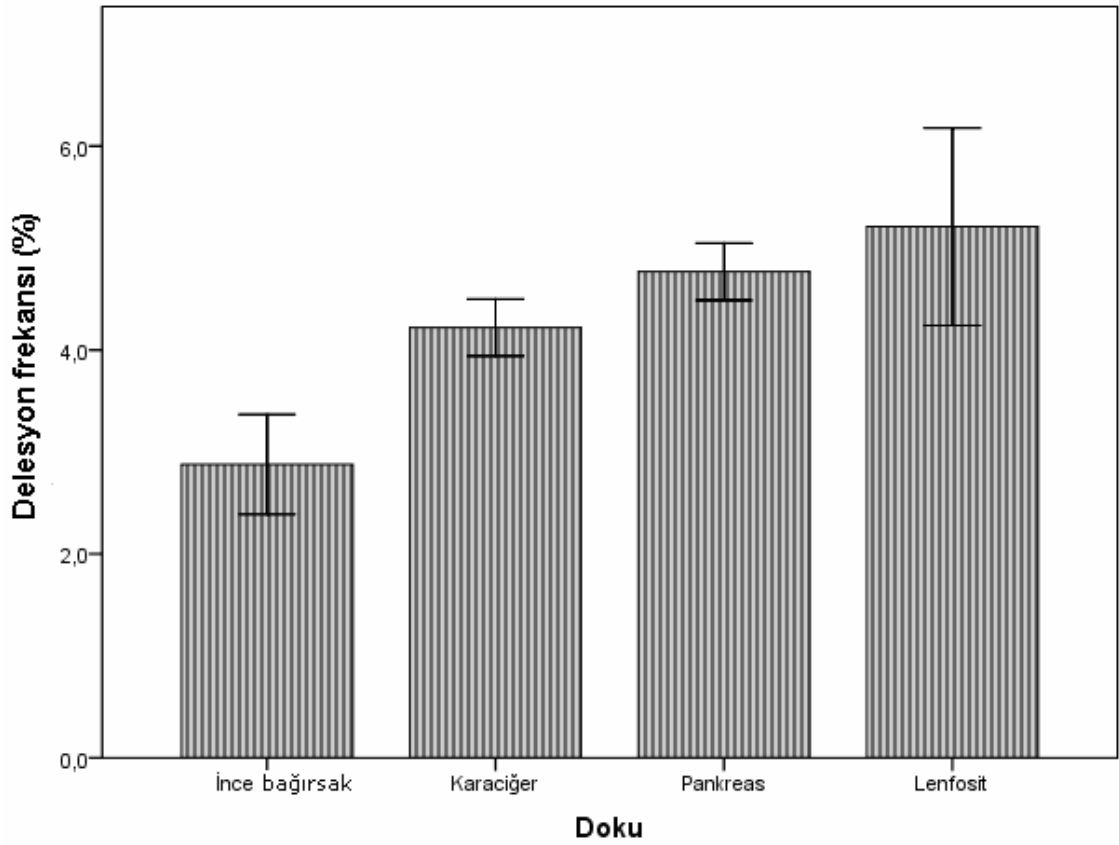


Şekil 19: Kontrol dokularında ve lenfositlerinde mtDNA/ hücre (%95 CI)

Tablo XXXVIII: Kontrol dokuları ve lenfositleride mtDNA/ hücre ortalama, minumum ve maksimum değerleri

Doku	Ortalama	Minimum	Maksimum
Karaciğer	47608,84	35788,47	62307,69
İnce bağırsak	5613,09	2668,81	11583,51
Pankreas	58229,43	30941,29	91285,35
Lenfosit	25454,22	10196,08	37502,32

Kontrol grupları esas alındığında, dokular ve lenfositlerde delesyon frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($P < 0,05$). Şekil 20’de kontrol dokuları ve lenfositlerde delesyon frekansı gösterilmektedir. Tablo XXXIX’de ise kontrol dokuları ve lenfositlerde delesyon frekansının ortalama, minumum ve maksimum değerleri gösterilmektedir.



Şekil 20: Kontrol dokuları ve lenfositlerinde delesyon frekansı (%95 CI)

Tablo XXXIX: Kontrol dokuları ve lenfositlerde delesyon frekansının ortalama, minumum ve maksimum değerleri

Doku	Ortalama	Minimum	Maksimum
Karaciğer	4,22	3,35	4,81
İnce bağırsak	2,88	1,66	4,09
Pankreas	4,77	4,24	5,36
Lenfosit	5,21	1,96	7,61

5. TARTIŞMA

Mitokondri, hücre içine giren oksijenin yaklaşık %90'dan fazlasının tüketildiği önemli bir hücrenel organeldir (341). Normal fizyolojik respirasyon sırasında tüketilen moleküler oksijenin %1-2'si, $(O_2)^{\cdot-}$ radikallerine çevrilir (230). Solunum zinciri komplekslerinden kompleks I ve kompleks III, $(O_2)^{\cdot-}$ radikalinin büyük bir kısmının üretildiği iki temel bölgedir (9, 281). Mitokondride oksijenin suya indirgendiği basamaklarda oluşan ROÜ, protein, lipid, RNA ve DNA'yı içeren makromoleküllerde hasar oluşturmaktadır (270).

mtDNA delesyonu, kapalı sirküler yapıya sahip mtDNA'dan bir veya birkaç gen parçasının yada bir baz çiftinin eksilmesi sonucu ortaya çıkan mutasyondur (232). mtDNA delesyonunun görüldüğü dokularda mitokondriyal solunum fonksiyonlarının azalabileceği (289), ATP üretiminin azalması ile beraber ROÜ'nin artabileceği ve hatta doku hücrelerinin ölümü ile sonuçlanabileceği rapor edilmiştir (198). Oksidatif stresin de mtDNA baz modifikasyonları nedeniyle delesyon veya fonksiyon kaybına neden olduğu gösterilmiştir (303, 304). mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu, rat mitokondriyal genomunda, 8103-8118 (ATP6 geni) ve 12937-12952 (ND5 geni) nükleotidleri arasında lokalize olan, 2 tane 16 bç'lik tekrar bölgesi içeren, 4834 bç'lik bir bölgenin delesyonu olarak tanımlanır (102). Yapılan çalışmalar, mtDNA delesyonlarının OXPHOS kapasitesinin azalmasının bir sonucu olarak yaşlanma ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (39, 67, 76,133). Bununla beraber çoğu çalışmada yaşlanma ile ilişkili mtDNA delesyonlarının düzeyinin genellikle %1'den daha az olduğu rapor edilmiştir (67). mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonunun insandaki görülen şeklinin, yaşlanma, Kearns Sayre sendromu, Pearson sendromu, kronik progresif eksternal oftalmopleji, iskemik kalp hastalığı ve karaciğer sirozu gibi durumlar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (62, 63, 287, 298, 350). Yapılan çalışmalarda Parkinson hastalığında yaş ile ilişkili mtDNA delesyonunun nöronlarda yaklaşık %50 oranında olduğu bulunmuştur (25, 173). mtDNA delesyon birikiminin nedeni tam olarak anlaşılmasına rağmen, respiratuvar zincir anormallikleri ve serbest radikallerin üretilmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (184, 248, 340).

Kompetitif PCR ile yapılan çalışmalarda genç rat dokularına oranla yaşlı rat dokularında mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu artmış olarak bulunmuştur. Yaşlı Fisher 344 rat

kullanılarak yapılan bir çalışmada mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu karaciğerde % 0,0188, beyinde % 0,0022, böbrekte % 0,0040, kalpte % 0,0007 ve akciğerde % 0,0004 olarak belirlenmiştir (67). Benzer olarak yapılan diğer çalışmalarda mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu, beyin farklı bölgelerinde %0,0006- 0,0075 (92) ve karaciğerde % 0,02 (102) olarak bulunmuştur. Yaşlı Wistar ratlarında yapılan başka bir çalışmada mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu karaciğerde %1,17, pankreasta %0,0639 ve intestinal mukozada %0,0152 olarak tespit edilirken (93) Edris ve arkadaşlarının çalışmasında ise karaciğerde mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonu %0,5 olarak bulunmuştur (85). Relatif QPCR metodu ile yapılan bir çalışmada ise mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansını genç Fisher 344 rat karaciğer dokusunda %0,18, yaşlı rat karaciğer dokusunda ise %0,59 olarak tespit etmişlerdir (225). Biz, QPCR ile yaptığımız bu çalışmamızda, RZG verilmeyen genç ratlarda delesyon frekansını, karaciğerde %4,22, ince bağırsakta %2,88, pankreasta %4,77 ve lenfositlerde %5,21 olarak bulduk (p<0,05).

mtDNA delesyonlarının belirlenmesi için genellikle semi-kantitatif bir metod olan kompetitif PCR kullanılmıştır. Kompetitif PCR ile PCR bitiminde değerlendirme yapıldığı için ürün miktarı başlangıç miktar ile orantılı olmayabilir ve hedef DNA kesin olarak hesaplanamayabilir. Yaşlı dokularda mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon düzeyinin düşük olması nedeniyle Southern Blot gibi uzun zaman alan ve fazla miktarda DNA gerektiren metodlar ile mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonun tespit edilmesinin zor olduğu rapor edilmiştir (256, 306, 357). QPCR'da ise eksponansiyel fazda ölçüm yapıldığından dolayı mtDNA⁴⁸³⁴ delesyonun belirlenmesi ve kantitasyonu daha kolay yapılmaktadır. Ayrıca QPCR çalışmaları az miktarda DNA gerektirir ve daha kısa sürede sonuçlanır (326, 352). Biz de mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon ve mtDNA kopya sayısını belirlemek için QPCR'ı kullandık. Plazmid klonlama çalışmasıyla elde edilen mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standardını kullanarak absölu kantitasyon ile numunelerimizin delesyon frekansını hesapladık. Sonuçlarımızın literatürde bahsedilen çalışmalardan farklı olmasında plazmid klonlama ile elde edilen mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon standardı oluşturarak uyguladığımız PCR metodu ve kullandığımız Sprague-Dawley rat cinsine bağlı olmuş olabilir.

Roziglitazon, Tip II diabetin tedavisi için kullanılan, etkisini PPAR γ reseptörüne bağlanarak gösteren, TZD grubu bir ilaçtır (309). RZG uygulanan rat karaciğer dokusu ve lenfositlerden izole edilen genomik DNA'larda doza bağımlı olarak gözlenen genotoksisite Comet (single cell gel electrophoresis) yöntemi ile gösterilmiştir. Yine

aynı metotla pioglitazonunda rat karaciğer ve lenfositlerinde genotoksik olduğu bulunmuş, FPG ve Endo III DNA tamir enzimlerinin kullanılmasıyla, genomik DNA'daki bu hasarda okside pürin ve pirimidinlerin oluştuğu gösterilmiştir (23,24). Obez farelerde yapılan bir çalışmada RZG'un kompleks I aktivitesini inhibe ederek ROÜ oluşumunu artırdığı ve oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (104). Yine PPAR ligandlarının doku homojenat ve hücre kültürlerinde kompleks I aktivitesini azaltarak oksidatif fosforilasyonun kesintiye uğramasına ve respiratuvar hızın azalmasına neden olduğu bulunmuştur. TZD'ın PPAR γ -bağımsız mekanizma ile kompleks I aktivitesini inhibe etmesi, izole edilen mitokondrielerde kompleks I substratlarının varlığında respiratuvar parametrelerin bozulması ile doğrulanmıştır (40). TZD'ların oksidatif stres üzerindeki etkilerinin anlaşılması oldukça karmaşıktır. Oksidatif fosforilasyonun kesintiye uğramasının serbest radikal üretiminin azalması ile ilişkili olabileceği (95), diğer taraftan kısa vadeli TZD maruziyetinin oksidatif stresi artırabileceği (288) rapor edilmiş ve TZD'ların mitokondriyi birden fazla mekanizma ile etkileyebileceği öne sürülmüştür (91).

Bu çalışmaların aksine yapılan bazı çalışmalarda, TZD'ların hiperglisemiye azaltma özelliklerinden bağımsız bir şekilde oksidatif stresi azaltabileceği gösterilmiştir (66). RZG'un, karaciğer ve kasta hücrel ve sistemik enerji homeostazisin düzenleyicisi olan 5'-AMP aktive protein kinaz'ı (AMPK) aktive ederek NAD(P)H oksidazın inhibisyonuna neden olduğu ve oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir. Bu antioksidan etki, PPAR γ antagonisti verilerek ortadan kaldırılamamıştır (50). TZD grubu ilaçların antioksidan etkilerinin mekanizması kesin olarak belli değildir. RZG'un kimyasal yapısındaki piridin ve fenil halkalarının hidroksilasyonun, hidroksil radikallerinin temizlenmesini kolaylaştırdığı ifade edilmektedir (111). RZG'un rat beyin mikrovasküler endotelial hücrelerde (RBMEC) katalaz enzim aktivitesini doza bağılı olarak artırdığı gösterilmiştir (114). SOD ve katalaz enzim promoterlerinin PPRE içermeleri nedeniyle bu enzimlerin ekspresyonunun RZG ile düzenlendiği ve RZG'un oluşan ROÜ'nin etkisini önlediği rapor edilmiştir (106, 114,241).

RZG'un mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon ile ilişkili olduğuna dair bir çalışma mevcut değildir. Biz de RZG'un mtDNA⁴⁸³⁴ delesyona etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla RZG verilen ratlarda mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansını inceledik. Karaciğer dokusunda, RZG'un tüm dozlarında kontrole göre mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansında

azalma görülürken diğer dokularda bu etkinin olmadığını bulduk ($p<0,05$). Karaciğer dokusunda mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansındaki azalmanın, GPx ve SOD enzim aktivitelerinin karaciğerde yüksek olmasına (93) ve RZG'un da bu antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırmasına (106, 241) bağlı olabileceğini düşündük.

mtDNA kopya sayısı, doku ve hücre tipleri ile hücre büyüme ve farklılaşma evrelerine göre değişiklik göstermektedir (253, 262, 286, 343). Memeli hücreleri birkaç yüz ile birkaç bin arasında mitokondri sayısına sahiptir. Her bir mitokondri ise 2-10 mtDNA kopyası içerir (262). Kompetitif PCR ile yapılan bir çalışmada kalp, beyin ve kas dokusunun, böbrek, akciğer, karaciğer, pankreas, intestinal mukoza ve kemik iliğine göre daha yüksek mtDNA'ya sahip olduğu gösterilmiştir (93). QPCR ile yapılan bir çalışmada ise mtDNA içeriğinin dokular arasında farklı olduğu, genç farelerde karaciğer, beyin ve kalpte yüksek, yaşlanma ile beraber iskelet kası ve kalpte daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yaşla beraber dokular arasındaki mtDNA içeriğindeki farklılığın özellikle beyin, kalp ve kas gibi yüksek oksidatif fosforilasyona ihtiyaç duyan dokularda arttığı rapor edilmiştir (204).

Rat karaciğerinde kompetitif PCR ile mtDNA kopya sayısını Gadaleta ve arkadaşları 860 mtDNA kopya/hücre olarak bulmuşlardır (102). Nicklas ve arkadaşları ise relatif QPCR çalışması ile rat karaciğerinde mtDNA kopya sayısını düşük bulmuşlar (512 kopya/hücre) ve bunun nedenini nükleer genom kopya sayısını bulmak için kullandıkları β -aktin'in psödogen içermesine bağlamışlardır (225). Biz çalışmamızda, mtDNA kopya sayılarının daha doğru hesaplanması için daha uygun olduğunu düşündüğümüz, psödogen içermeyen 36B4 tek kopya genini kullandık. D-loop ve 36B4 external standart ürünlerini spektrofotometre ile ölçerek standart hazırladıktan sonra nükleer ve mitokondriyal genom standardı elde ettik. Bu standartları kullanarak absölu kantitasyon yaptık ve numunelerimizin kopya sayılarını hesapladık. QPCR ile absölu kantitasyon yaptığımız bu çalışmamızda RZG verilmeyen genç rat dokuları ve lenfositlerinde mtDNA kopya sayılarını diğer çalışmalardaki gibi farklı bulduk. Hücre başına düşen mtDNA kopya sayılarını karaciğerde 47 608, ince bağırsakta 5613, pankreasta 58 229 ve lenfositlerde 25 454 olarak belirledik ve dokular arasındaki bu farkı istatistiksel olarak anlamlı bulduk ($p<0,05$). Bulduğumuz mtDNA kopya sayılarının diğer çalışmalardan daha yüksek olmasının nedeni, kullanılan nükleer ve mitokondriyal genom standardına ve QPCR metoduna bağlı olabilir.

mtDNA biyogenezinin hızlanmasının, rat karaciğer, rat hipokampus ve yaşlı dokularda mtDNA kopya sayısının artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (121, 237, 305, 339). Mitokondriyal kopya sayısının, çeşitli fare dokularında mtTFA protein düzeyi ile orantılı olduğunu gösteren çalışmada, böbrek ve beyinde yaşla beraber olan değişikliklerin artmış olan mtTFA mRNA ekspresyonu nedeniyle olduğu ileri sürülmüştür. Yaşlı ratların, karaciğer, kalp ve beyinde adult ratlara göre daha yüksek mtDNA içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir (204). İnsan akciğer dokusunda oksidatif DNA hasarı ile ilişkili olan mtDNA, yaşlanma ile beraber artış göstermiştir (180). Artan oksidatif stresin yaşlanma sırasında mtDNA içeriği ve miktarındaki artışta kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir (181). Yaşla beraber mtDNA içeriğindeki artışın, defektif mitokondrinin mutasyonlu mtDNA'ı kompanse etmesine bağlı olduğu öne sürülmüştür (204). RZG'un da insan yağ dokusu hücre kültüründe mtDNA sayısını artırdığı, diabetik farelerde yapılan diğer bir çalışmada, inguinal yağ dokusunda azalan mtDNA içeriğini doza bağımlı olarak artırdığı bulunmuştur (29, 263).

Bu çalışmaların aksine, insan iskelet kasında yapılan bir çalışmada yaşlanmaya bağlı olarak mitokondriyal fonksiyon ve ATP üretiminde azalma ile birlikte mtDNA kopya sayısında azalma rapor edilmiştir. Mitokondri tarafından oluşturulan ROÜ'nin mtDNA'da oksidatif hasara ve yaşlanma ile beraber mitokondriyal fonksiyonlarda azalmaya yol açtığı öne sürülmüştür (210, 292). İnsan pankreas adacık hücrelerinde yapılan bir çalışmada, izole edilen adacık hücre mtDNA kopya sayılarında yaşlanmaya bağlı olarak azalma tespit edilmiştir. Bu azalmanın mtDNA'da delesyon ile ilişkili olmadığı bulunmuştur. Delesyon tespit edilememesinin nedeni olarak insan pankreas adacık hücrelerinin hasara daha dayanıklı olduğu ya da adacık hücrelerinin yüksek delesyon düzeyi ile selektif olarak uzaklaştırıldığı düşünülmüştür (194).

Biz çalışmamızda, rat pankreas ve ince bağırsak dokularında, RZG'un tüm dozlarında mtDNA kopya sayılarının kontrole göre azaldığını bulduk ($p<0,05$). Karaciğer ve lenfositlerde ise mtDNA kopya sayılarını değişmemiş olarak belirledik. Yapılan çalışmalarda GPx ve SOD enzim aktivitelerinin pankreas ve ince bağırsakta düşük olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle bu hücrelerin ROÜ'ne karşı hassas olabileceği ileri sürülmüştür (93, 183, 212, 294, 315). Biz de bu çalışmamızda, RZG verilen rat pankreas ve ince bağırsak dokularında, mtDNA kopya sayılarındaki

azalmanın, GPx ve SOD enzim aktivitelerinin pankreas ve ince bağırsakta düşük olması ile ilişkili olabileceğini düşündük.

Mitokondri matriksinde lokalize olan sitrat sentaz aktivitesinin, yağ ve kas dokusunda mitokondriyal fonksiyon değişikliğini belirlemede referans olduğu belirtilmiştir (293). İnsan teratokarsinoma hücre kültüründe sitrat sentaz aktivitesinin, yüksek doz uygulanan pioglitazon ile azaldığı ve bu durumun mitokondriyal bütünlüğün bozulması ya da oksidatif stres aracılı enzim inhibisyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (110). Bizim çalışmamızda da ince bağırsak ve pankreas dokusundaki mtDNA kopya sayılarının azalmış olması, yüksek doz RZG kullanmamıza bağlı olmuş olabilir.

Apopitoz, sıklıkla, hücre ölümüne yol açan oksidanların oluşumu ile beraberdir (200). PPAR γ ligandlarının pro-apopitotik ya da antiapopitotik olabileceği yönünde deneysel çalışmalar mevcuttur (45, 57, 90, 99, 129, 167, 186, 222, 233, 330). Apopitozdaki etkilerin uygulanan hücre tipine, ligandın özelliğine ve uygulama süresine bağlı olduğu düşünülmektedir. Troglitazonun oksidan üretime sebep olarak mitokondriyal disfonksiyon ile beraber mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı, mitokondriyal permeabilityyi (mitochondrial permeability transition, MPT) artırarak hepatositlerde sitotoksositeye neden olduğu gösterilmiştir (15, 132, 290, 351, 218). Troglitazona bağlı hepatotoksitede, sitokrom c'nin sitozole sızması ve apopitozu tetiklemesinin rol oynadığı düşünülmektedir (203). Yapılan bir çalışmada, troglitazonun PPAR γ -bağımsız mekanizma ile mitokondriyal bütünlüğün değişmesine yol açtığı ve kanser hücrelerinin apopitozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (288). RZG'un yüksek dozda PPAR γ -bağımsız mekanizma ile rat vasküler düz kas hücre kültüründe apopitozu artırdığı (118), insan böbrek karsinoma hücrelerinde apopitozu uyardığı (165), kolorektal ve kolon kanser hücre kültüründe doza bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiği ve apopitoza neden olduğu gösterilmiştir (188, 358).

Bu çalışmaların aksine RZG'un oksidanları artırmadığını ve hücre canlılığını azaltmadığını gösteren çalışmalar da vardır (203, 218). Troglitazonun toksik metabolitlerinin oksidasyon alanı olan kroman halkasına sahip olması nedeniyle hepatotoksositeyi (159, 311) ve MPT'ü artırdığı öne sürülürken piridin halkasına sahip olan RZG ve pioglitazonun ise MPT'ü artırmadığı ve hepatotoksitede rolünün olmadığı belirtilmiştir (15, 132, 203, 218, 290, 351). Troglitazon ve RZG'un, insan HepG2

hücrelerinin büyüme hızı üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada, RZG'un troglitazona göre PPAR γ 'ya daha kuvvetli bağlandığı ancak büyüme inhibisyonuna ve apoptoza daha az neden olduğu gösterilmiştir (15). HepG2 hücrelerinde troglitazonun indüklediği apoptozun, TZD'ların PPAR γ 'ya bağlanma affiniteleri ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır (351).

Shishido ve arkadaşlarının çalışmasında hepatosit hücre kültüründe troglitazonun pioglitazona göre önemli derecede H₂O₂ ve mitokondriyal volüm artışına neden olduğu saptanmıştır (290). H₂O₂'nin mitokondride aşırı üretiminin, membran fosfolipitlerinin oksidasyonu yoluyla mitokondriyal membranlarda hasara neden olduğu kabul edilmektedir (19) Bunun sonucu olarak membran geçirgenliğinin bozulmasıyla beraber mitokondriyal şişme meydana gelmektedir (290). Mitokondriyal volüm artışının mitokondride belirgin büyüme ile beraber olduğu ve megamitokondri (MG) olarak tanımlanan bu büyümüş mitokondrinin, sitopatik bir belirti olabileceği rapor edilmiştir (158, 329). Oksidatif strese bağlı olarak oluşan MG, respirasyon hızının azalması sonucu ROÜ'ni düşük miktarda üretebilir. MG'de ATP üretiminin azalması daha sonra hücrelerin büyümesinin durması ile sonuçlanmaktadır. Eğer oksidatif stres ortadan kaldırılırsa MG'ler normal fonksiyon ve yapılarına dönmektedir. Daha fazla strese maruz kaldığında ise membran potansiyeli ve ATP azalmakta, MG'den sitokrom c salınmasıyla beraber apoptotik değişiklikler meydana gelmektedir (158).

Biz çalışmamızda, RZG verilen ratlarda, ince bağırsak ve pankreasta mtDNA kopya sayılarının azaldığını bulduk. Oksidatif stres nedeniyle oluştuğu düşünülen MG veya apoptoz, numunelerimizdeki mtDNA kopya sayılarının azalmasının bir nedeni olabilir. RZG'un mitokondriyal aktiviteyi artırarak ROÜ'nin oluşumuna neden olduğu bir yandan da antioksidan enzimlerin ekspresyonu hızlandırarak aşırı ROÜ'ni azalttığı gösterilmiştir (187, 301). Ancak GPx ve SOD enzim aktivitelerinin ince bağırsakta ve pankreasta düşük olması (93) nedeniyle RZG bu dokularda oluşan ROÜ'ni azaltamıyor olabilir. Diğer taraftan, GPx ve SOD enzim aktivitelerinin karaciğerde yüksek olması ve RZG'un bu enzimlerin ekspresyonunu artırıyor olması (93, 106, 241), bu çalışmada karaciğer dokusundaki mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansının azalmasının nedeni olabileceğini düşündürdü.

Çalışmamızın sonuçlarına göre RZG, karaciğer, ince bağırsak ve pankreasta farklı etkiler göstermektedir. Karaciğer dokusundaki mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansındaki azalma nedeniyle RZG'un bu dokuda oksidan bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz. Pankreas ve ince bağırsakta mtDNA kopya sayılarının düşük olmasında ise oksidan bir hasarın sonucu olarak MG veya apoptoz etkili olmuş olabilir. Bu durumun daha iyi aydınlatılması için ileri çalışmalar yapılmasına gereksinim olduğu açıktır. Bu amaçla RZG'un her dokuda farklı olan etkilerinin hücre kültürü çalışmaları ile araştırılmasını planlamaktayız.

6. SONUÇLAR

1. QPCR ile mtDNA ve mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon kopya sayılarının belirlenmesinde referans gen olarak psödogeni bulunmayan 36B4 tek kopya geni kullanılabilir.
2. mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansının belirlenmesi için relatif kantitasyonun yanında absölü kantitasyon da kullanılabilir.
3. QPCR çalışmalarında absölü kantitasyon için gerekli standartlar ilgili gen bölgesinin plazmide aktarılmasıyla elde edilebilir.
4. PCR'da SYBR Green I boyası kullanılacaksa, dimer oluşturmayacak primerler seçilmeli ve kontaminasyona dikkat edilmelidir.
5. Q-PCR, mtDNA ve mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon kopya sayılarının belirlenmesinde daha hızlı, hassas ve kolay bir yöntemdir.
6. Sağlıklı rat dokularında hücre başına düşen mtDNA kopya sayısı ve mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansı farklıdır.
7. Rozigitazon, karaciğer dokusunda mtDNA⁴⁸³⁴ delesyon frekansını azaltmıştır.
8. Rozigitazon, ince bağırsak ve pankreasta hücre başına düşen mtDNA kopya sayılarını azaltmıştır.
9. RZG, farklı rat dokularında farklı etkiler göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 2001; 306:1-17.
2. Adamczak M, Wiecek A, Funahashi T, Chudek J, Kokot F, Matsuzawa Y. Decreased Plasma Adiponectin Concentration in Patients With Essential Hypertension. *Am J Hypertens*. 2003; 16:72-75.
3. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 2005, 7:1140-9.
4. Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, Ooie T, Baba Y, Shinohara Y. Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70:481-6.
5. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları. 1995:42-112.
6. Akkuş İ. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım. 1995:1-15.
7. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*, Third Edition, Garland Publishing Inc, USA. 1994; 653-720.
8. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290:457-65.
9. Andreyev AY, Kushnareva YE. and Starkov AA. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. 2005; 70:200-214.
10. Antunes F, Han D, and Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1260-7.
11. Arıcıoğlu A. Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. 1994; 2:139-242.

12. Asayama K, Yokota S, Dobashi K, Hayashibe H, Kawaoi A, Nakazawa S. Purification and immunoelectron microscopic localization of cellular glutathione peroxidase in rat hepatocytes: quantitative analysis by postembedding method. *Histochemistry*. 1994;102:213-9.
13. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:289-333.
14. Attwood J, Richardson B. Relative quantitation of DNA methyltransferase mRNA by real time RT-PCR assay. *Methods Mol Biol*. 2004;287:273-83.
15. Bae MA, Rhee H, Song BJ. Troglitazone but not rosiglitazone induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in human and rat hepatoma cell lines. *Toxicol. Lett*. 2003; 139:67–75.
16. Bahçeli M. Oral antidiyabetik ilaçlar ve yeni uygulamalar, Diabetes mellitusun modern tedavisi, Yılmaz MT, Bahçeci M, Büyükbeşe MA, 1. Baskı, Türk Diyabet Vakfı, İstanbul. 2003; 2: 35-54.
17. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005;120:483-95.
18. Baldwin SJ, Clarke SE. & Chenery RJ. Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. *J Clin Pharmacol*. 1999; 48: 424–432.
19. Barja G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 854:224-238.
20. Basu A, Jensen MD, McCann F, Mukhopadhyay D, Joyner MJ, Rizza RA. Effects of pioglitazone versus glipizide on body fat distribution, body water content, and hemodynamics in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:510-4.
21. Baumforth KRN, Nelson PN, Digby JE, O’Neil JD, Murray PG. The polymerase chain reaction. *J Clin Pathol Mol Pathol*. 1999;52:1–10.
22. Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:463-78.

23. Bedir A, Aliyazicioğlu Y, Bilgici B, Yurdakul Z, Uysal M, Suvaci DE, Okuyucu A, Kahraman H, Hökelek M, Alvur M. Assessment of genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, pioglitazone. *Environ Mol Mutagen*. 2008;49:185-91.
24. Bedir A, Aliyazicioğlu Y, Kahraman H, Yurdakul Z, Uysal M, Suvaci DE, Okuyucu A, Hökelek M, Alvur M. Genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, rosiglitazone *Environ Mol Mutagen*. 2006;47:718-24.
25. Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet*. 2006;38, 515–517.
26. Berger J. and Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med*. 2002; 53:409–35.
27. Berger A. Resistin: a new hormone that links obesity with type 2 diabetes. *BMJ*. 2001;322: 193.
28. Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol*. 1998;153:1055-61.
29. Bogacka I, Ukropcova B, McNeil M, Gimble JM, Smith SR. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:6650-6.
30. Bogenhagen DF, Pinz KG, Perez-Jannotti RM. Enzymology of mitochondrial base excision repair. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*. 2001;68:257–271.
31. Bogenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. *J Biol Chem*. 1974;249:7991–7995.
32. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med*. 2002;32:804–812.
33. Bohr V. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis*. 1995;16:2885-2892.
34. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*. 1973;134:707–716.
35. Boveris A, Costa LE, Cadenas E. The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging. In: Cadenas E, Packer L, eds. *Understanding the process of aging:*

the roles of mitochondria, free radicals, and antioxidants. New York: Marcel Dekker, Inc; 1999:1–16.

36. Boyle PJ, King AB, Olansky L. Effects of pioglitazone and rosiglitazone on blood lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective review of randomly selected medical records. *Clin Ther.* 2002; 24:378-96.
37. Branda RF, Brooks EM, Chen Z, Naudc SJ, Nicklas J.A. Dietary modulation of mitochondrial DNA deletions and copy number after chemotherapy in rats. *Mutation Research.* 2002; 501: 29–36.
38. Brandt U, Trumpower B. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1994;29:165-97.
39. Bravo-Nuevo A, Williams NK, Valter K, Stone J. Relationship between mitochondrial DNA damage and photoreceptor death in developing and adult retina, assessed in normal and degenerative rat strains. *Mitochondrion.* 2007;7:340–346.
40. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I. *Diabetes.* 2004;53:1052-1059.
41. Bustin SA, Nolanb T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques.* 2004;15:155–166.
42. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29:23-39.
43. Byung PY. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Review.* 1994; 74:139-172.
44. Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med.* 2004;25:17-26.
45. Campbell IW, Mariz S. Beta-cell preservation with thiazolidinediones. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76:163-76.
46. Cantin MA, North SL, Hubberd RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol.* 1987; 63:152-157.
47. Capaldi RA, Sweetland J, Merli A. Polypeptides in the succinate-coenzyme Q reductase segment of the respiratory chain. *Biochemistry.* 1977;16:5707-10.
48. Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem.* 2006;281:32724-7.

49. Cassano P, Lezza AM, Leeuwenburgh C, Cantatore P, Gadaleta MN. Measurement of the 4,834-bp mitochondrial DNA deletion level in aging rat liver and brain subjected or not to caloric restriction diet. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1019:269-73.
50. Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, Franco L, Murphy E, Iori E, Pagnin E, Fadini GP, Albiero M, Semplicini A, Avogaro A. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2627-33.
51. Champe PC, Harvey RA. Çev. Ed. Ulukaya E, Dirican M, Tokullugil A. *Biyokimya Nobel Tıp.* 1997, 438.
52. Chan KA, Truman A, Gurwitz JH. A cohort study of the incidence of serious acute liver injury in diabetic patients treated with hypoglycemic agents. *Arch Intern Med.* 2003;163:728-34.
53. Chang DD, Clayton DA. Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell.* 1984;36:635-43.
54. Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A, Ingole D. Reduced glutathione: importance of specimen collection. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2005;20:150-152.
55. Chen J, Germer S, Higuchi R, Berkowitz G, Godbold J, Wetmur JG. Kinetic polymerase chain reaction on pooled DNA: a high-throughput, high-efficiency alternative in genetic epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:131-6.
56. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine.* 2005;39: 841 – 852.
57. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol.Chem.* 1998;273:25573– 25580.
58. Chretien D, Gallego J, Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Munnich A, Rötig A, Rustin P. Biochemical parameters for the diagnosis of mitochondrial respiratory chain deficiency in humans, and their lack of age-related changes. *Biochem J.* 1998;15:249-54.

59. Clayton DA. Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. *Trends Biochem Sci.* 1991;16:107-11.
60. Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974;71:2777–2781.
61. Cooper GM, Hausman RE. *Cell.* Üçüncü Baskı çevirisi. Çeviri Editörleri: Sakızlı M, Atabay N. *Hücre Moleküler Yaklaşım.* 2006; 399-416.
62. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat. Res.* 1992;275:169–180.
63. Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. () A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1992;89:7370–7374.
64. Cowley AW, Liang M, Roman RJ, Greene AS, Jacob HJ. Consomic rat model systems for physiological genomics. *Acta Physiol Scand.* 2004;181:585-592.
65. Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1997;272:25409-12.
66. Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance. *Diabet Med.* 2004;21:1249-52.
67. David LY, Bruce NA. Quantitation of age-related mitochondrial DNA deletions in rat tissues shows that their pattern of accumulation differs from that of humans. *Gene.* 1998;209:23–30.
68. Davis M, Whitely T, Turnbull DM, Mendelow AD. Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage. *Acta Neurochir Suppl.* 1997;70:56-8.
69. Desjardins P, deMuys J. M, Morais R. An established avian fibroblast cell line without mitochondrial DNA. *Somatic Cell Mol Genet.* 1986;12:133–139.
70. Devchand PR, Keller P, Peters JM. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* 1996;384:39- 43.
71. Dianov GL, Souza-Pinto N, Nyaga SG, Thybo T, Stevnsner T, Bohr VA. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2001;68:285–297.

72. Diaz F, Bayona-Bafaluy MP, Rana M, Mora M, Hao H, Moraes CT. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:4626–33.
73. Dietmaier W, Hofstadter F. Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab Invest.* 2001;81:1453-6.
74. Dimaura S, Wallace DC. *Mitochondrial DNA in Human Pathology.* New York, Raven Pres Ltd. 1993: 1-37.
75. DiMauro S, and Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med.* 2003;348:2656-2668.
76. Dizdaroğlu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med.* 1991;10:225-42.
77. Dormandy TL. An approach to free radicals. *Lancet.* 1983;322:1010-1013.
78. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer.* 1996; 32:30-38.
79. Driggers WJ, Ledoux SP, Wilson GL. Repair of oxidative damage within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:22042–22045.
80. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000;62:649-71.
81. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82):47-95.
82. Dündar Y, Aslan R. Hücre moleküler statüsünün araştırılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar. *Cerrahi Tıp Bilim Dergisi.*1999;2:134-42. (O20.50).
83. Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J.* 1996;320:345-57.
84. Eberhardt NL. A shell program for the design of PCR primers using genetics computer group (GCG) software (7.1) on VAX/VMS systems. *Biotechniques.* 1992;13:914-7.
85. Edris W, Burgett B, Stine OC, Filburn CR. Detection and quantitation by competitive PCR of an age-associated increase in a 4.8kb deletion in rat mitochondrial DNA. *Mutat Res.* 1994;316:69 –78.
86. Elpeleg O, Mandel H, Saada A. Depletion of the other genome-mitochondrial DNA depletion syndromes in humans. *J Mol Med.* 2002;80:389–396.

87. Elson JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF. Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am J Hum Genet.* 2001;68:802–6.
88. Esposito LA, Kokoszka JE, Waymire KG, Cottrell B, MacGregor GR, Wallace DC. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:754-66.
89. Esworthy RS, Ho YS, Chu FF. The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 1997;340:59-63.
90. Fajas L, Egler V, Reiter R, Miard S, Lefebvre AM, Auwerx J. PPAR γ controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner. *Oncogene.* 2003;22:4186–93.
91. Feinstein DL, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, Gavrilyuk V, and Dello Russo C. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key? *Biochem Pharmacol.* 2005;70:177–188.
92. Filburn CR, Edris W, Tamatani M, Hogue B, Kudryashova I, Hansford RG. Mitochondrial electron transport chain activities and DNA deletions in regions of the rat brain. *Mechan. Ageing Dev.* 1996;87, 35–46.
93. Filser N, Margue C, and Richter C. Quantification of Wild-Type Mitochondrial DNA and Its 4.8-kb Deletion in Rat Organs. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997;233:102–107.
94. Fisher RP, Lisowsky T, Bren GAM, Clayton DA. A rapid, efficient method for purifying DNA-binding proteins. Denaturation-renaturation chromatography of human and yeast mitochondrial extracts. *J Biol Chem.* 1991;266:9153-60.
95. Fiskum G, Rosenthal RE, Vereczki V, Martin E, Hoffman GE, Chinopoulos C, Kowaltowski A. Protection against ischemic brain injury by inhibition of mitochondrial oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36:347–352.
96. Fonseca VA, Valiquett TR, Huang SM, Ghazzi MN, Whitcomb RW. (). The Troglitazone Study Group. Troglitazone monotherapy improves glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomised, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83: 3169-3176.
97. Fonseca VA, Foyt HL, Whitcomb R. Longterm effects of troglitazone: open-label extension studies in type 2 diabetes patients. *Diabetes Care.* 2000;23:354-359.

98. Fridovich I. Oxidative Stres. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. 2001.
99. Fuenzalida K, Quintanilla R, Ramos P, Piderit D, Fuentealba RA, Martinez G, Inestrosa NC, Bronfman M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282:37006-15.
100. Fullert S, Schneider F, Haak E. Effects of pioglitazone in nondiabetic patients with arterial hypertension: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5503-6.
101. Gadaleta MN, Cormio A, Pesce V, Lezza AM, Cantatore P. Aging and mitochondria. *Biochimie.* 1998;80:863– 870.
102. Gadaleta MN, Rainaldi G, Lezza AM, Milella F, Fracasso F, Cantatore P. Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. *Mutat Res.* 1992; 275:181–193.
103. Gale EA. Troglitazone: the lesson that nobody learned? *Diabetologia.* 2006;49:1-6.
104. García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuán T, Martínez MA, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzol JA. Effects of Rosiglitazone on the Liver Histology and Mitochondrial Function in ob/ob Mice *Hepatology.* 2007;46:414-423.
105. Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, White CW. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1995;270:13399-405.
106. Garg R, Kumbkarni Y, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W. Troglitazone reduces reactive oxygen species generation by leukocytes and lipid peroxidation and improves flow-mediated vasodilatation in obese subjects. *Hypertension.* 2000;36:430–5.
107. Garrido C, Kroemer G. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004;16:639–646.
108. Garstka HL, Fäcke M, Ramos Escribano J, Wiesner RJ. Biochem. Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;200:619-26.

109. Gegick CG, Altheimer MD. Comparison of effects of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors: observation from clinical practice. *Endocr Pract.* 2001; 7:162-9.
110. Ghosh S, Patel N, Rahn D, McAllister J, Sadeghi S, Horwitz G, Berry D, Wang KX, Swerdlow RH. The thiazolidinedione pioglitazone alters mitochondrial function in human neuron-like cells. *Mol Pharmacol.* 2007;71:1695-702.
111. Giannini S, Serio M, Galli A. Pleiotropic effects of thiazolidinediones: taking a look beyond antidiabetic activity. *J Endocrinol Invest.* 2004;27:982-91.
112. Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. *Genome Res.* 1996;6:995–1001.
113. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology.* 2002;30:503-512.
114. Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol.* 2002;16:2793-801.
115. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25:386-401.
116. Gocke CD, Benko FA, Rogan PK. Transmission of mitochondrial DNA heteroplasmy in normal pedigrees. *Hum Genet.* 1998;102:182-6.
117. Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med.* 1993;15:435-45.
118. Gouni-Berthold I, Berthold HK, Weber AA, Ko Y, Seul C, Vetter H, Sachinidis A. Troglitazone and rosiglitazone induce apoptosis of vascular smooth muscle cells through an extracellular signal-regulated kinase-independent pathway. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch. Pharmacol.* 2001;363:215– 221.
119. Griffith OW, Meister A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82:4668-72.
120. Grohmann K, Amairic F, Crews S, Attardi G. Failure to detect "cap" structures in mitochondrial DNA-coded poly(A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 1978;5:637-51.

121. Gutsaeva DR, Suliman HB, Carraway MS, Demchenko IT, Piantadosi CA. Oxygen-induced mitochondrial biogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 2006;137:493-504.
122. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J Clin Chem*. 1995; 42:18-19.
123. Gürgey A, Rötig A, Gümrük F, Cemeroglu P, Sarialioğlu F, Altay C. Pearson's marrow-pancreas syndrome in 2 Turkish children. *Acta Haematol*. 1992;87:206-9.
124. Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*. 1986;18:331-68.
125. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2002;106:679-84.
126. Halliwell B. Mechanism involved in the generation of free radicals. *Path Biol*. 1996; 44:6-13.
127. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres. 1989;125.
128. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219:1-14.
129. Han S, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent signal pathways. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:430-7.
130. Hardy E, Jabbour S, *Thiazolidinedionlar*, *Textbook of Type 2 Diabetes 2003*, Goldstein B, Müller-Wieland D 1. baskı çevirisi, *Tip 2 Diyabet*, Akman A ve Danışmanlık, Eğitim Yayıncılık ve Organizasyon Ltd.Şti. İstanbul 2004;117-130.
131. Harman D. Free radical theory of ageing: dietary implications. *Am J Clin Nutr*. 1972;25:839-843.
132. Haskins JR, Rowse P, Rahbari R, de la Iglesia F.A. Thiazolidinedione toxicity to isolated hepatocytes revealed by coherent multiprobe fluorescence microscopy and correlated with multiparameter flow cytometry of peripheral leukocytes. *Arch. Toxicol*. 2001;75: 425-438.

133. Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179:1023-9.
134. He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:68.
135. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-94.
136. Hess JF, Parisi MA, Bennett JL, Clayton DA. Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 1991;351:236-9.
137. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993;11:1026:30.
138. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem.* 2004;279:32804-12.
139. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
140. <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/nucleosome.gif>
141. Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal Biochem.* 1995;229:207–213.
142. Islam A, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J Virol Methods.* 2006;132:127-34.
143. Isseman I, Gren S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 645-50.
144. Jackson RM, Veal CF. Effect of hypoxia and reoxygenation on lung glutathione system. *Am J Physiol.* 1990; 259:518-524.
145. Jacob HJ, Kwitek AE. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet.* 2002;3:33-42.
146. Jenkinson SG, Black RD, Lawrence RA. Glutathione concentrations in rat lung bronchoalveolar lavage fluid: Effects of hyperoxia. *J Lab Clin Med.* 1998;112:345-351.

147. Jensen SJK. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure Theochem*. 2003;666:387-392.
148. Jessie BC, Sun CQ, Irons HR, Marshall FF, Wallace DC, Petros JA. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages. *Exp Gerontol*. 2001;37:169-74.
149. Johansen OE, Jørgensen AP. Glitazone treatment of type 2 diabetes mellitus. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2006;126:1928-30.
150. Johns DR. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med*. 1995;333:638-44.
151. Jones JB, Song JJ, Hempen PM, Parmigiani G, Hruban RH, Kern SE. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a “mass”-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Res*. 2001;61:1299–1304.
152. Kadenbach B, Münscher C, Frank V, Müller-Höcker J, Napiwotzki J. Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mutat Res*. 1995;338:161-72.
153. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod*. 1997;3:523-8.
154. Kang CM, Kristal BS, Yu BP. Age-related mitochondrial DNA deletions: effect of dietary restriction. *Free Radic Biol Med*. 1998;24: 148–154.
155. Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1281-8.
156. Kang D, Hamasaki N. Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr Genet*. 2002;41:311-22.
157. Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci*. 2008;13:1813-26.
158. Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, Ostrowski M, Teranishi M, Nishizawa Y, Usukura J. Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:396-409.
159. Kassahun K, Pearson PG, Tang W, McIntosh I, Leung K, Elmore C, Dean D, Wang R, Doss G, Baillie TA. Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates in vitro and in vivo. Evidence for novel biotransformation pathways

- involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. *Che Res Toxicol.* 2001;14:62–70.
160. Kaynak K. Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. *Solunum.* 2002;4:468-473.
161. Kelner MJ, Montoya MA. Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269:366-8.
162. Khaidakov M, Heflich RH, Manjanatha MG, Myers MB, Aidoo A. Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutat Res.* 2003;526:1–7.
163. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2002;33:110-118.
164. Kim UK, Kim HS, Oh BH, Lee MM, Kim SH, Chae JJ, Choi HS, Choe SC, Lee CC, Park YB. Analysis of mitochondrial DNA deletions in four chambers of failing human heart: hemodynamic stress, age, and disease are important factors. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:163-71.
165. Kim YH, Jung EM, Lee TJ, Kim SH, Choi YH, Park JW, Park JW, Choi KS, Kwon TK. Rosiglitazone promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced apoptosis by reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptor 5 and down-regulation of c-FLIP. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:1055-68.
166. Kirkinetzos IG, Moraes CT . Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12:449-57.
167. Kitamura S, Miyazaki Y, Hiraoka S, Nagasawa Y, Toyota M, Takakura R, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. PPAR γ agonists inhibit cell growth and suppress the expression of cyclin D1 and EGF-like growth factor in Ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Int. J. Cancer.* 2001;94:335– 342.
168. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:4318-23.
169. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *J. Biochem.* 1994; 298:249-58.
170. Kohroser J, Mathai J, Reichheld J, Banner BF, Bonkovsky HL. Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:272-6.

171. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins L. W, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML. Appearance of superoxideanion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.* 1985;57:142–151.
172. Korshunov SS, Krasnikov BF, Pereverzev MO, Skulachev VP. The antioxidant functions of cytochrome c. *FEBS Lett.* 1999;462:192-8.
173. Kraytberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat. Genet.* 2006;38:518–520.
174. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27:95-125.
175. Kuenzli S, Saurat JH. Peroxisome proliferator-activated receptors as new molecular targets in psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004;3:205-11.
176. Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınç M. Serbest Radikaller. *Arşiv.* 2004; 13:120-13.
177. Lancaster CR, Kröger A. Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1459:422-31.
178. Ledoux SP, Wilson GL. Base excision repair of mitochondrial DNA damage in mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;68:273–284.
179. LeDoux SP, Wilson GL, Beecham EJ, Stevnsner T, Wassermann K, Bohr VA. Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis.* 1992;13:1967–1973.
180. Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YH. Aging- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett.* 1998;441:292-296.
181. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:822-34.
182. Lee HC, Yin PH, Yu TN, Chang YD, Hsu WC, Kao SY, Chi CW, Liu TY, Wei YH. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues -- effects of betel quid chewing and oral cancer. *Mutat Res.* 2001;493:67-74.
183. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;20: 463–466.

184. Lezza AM, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P, Gadaleta MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:772–9.
185. Lim PS, Cheng YM, Wei YH. Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:454-63.
186. Lin CY, Gurlo T, Haataja L, Hsueh WA, Butler PC. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6678-86.
187. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005;1:361–370.
188. Lin MS, Chen WC, Bai X, Wang YD. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits cell growth via apoptosis and arrest of the cell cycle in human colorectal cancer. *J Dig Dis.* 2007;8:82-8.
189. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet.* 1989;1:642– 645.
190. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia* 2001;15:1033-7.
191. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods.* 2001; 25: 402-8.
192. Logan DC. The mitochondrial compartment. *Journal of Experimental Botany.* 2006;57:1225–1243.
193. Luna B, Feinglos MN. Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician.* 2001;63:1747-56.
194. Lynn S, Borthwick GM, Charnley RM, Walker M, Turnbull DM. Heteroplasmic ratio of the A3243G mitochondrial DNA mutation in single pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 2003;46:296–299.
195. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001;50:2094-2099.

196. Maggs DG, Buchanan TA, Burant CF. Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 1998;128:176-185.
197. Mailer K. Superoxide radical as electron donor for oxidative phosphorylation of ADP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170:59-64.
198. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res.* 2002;509:127-51.
199. Mårtensson J, Lai JC, Meister A. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:7185-9.
200. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 2002;192:1–15.
201. Maruszak A, Gaweda-Walerych K, Softyszewski I, Zekanowski C. Mitochondrial DNA in pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2006;66:153-76.
202. Mason PA, Lightowers RN. Why do mammalian mitochondria possess a mismatch repair activity? *FEBS Lett* 2003;554: 6-9.
203. Masubuchi Y, Kano S, Horie T. Mitochondrial permeability transition as a potential determinant of hepatotoxicity of antidiabetic thiazolidinediones. *Toxicology.* 2006;222:233–239.
204. Masuyama M, Iida R, Takatsuka H, Yasuda T, Matsuki T. Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2005;1723:302– 308.
205. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem.* 1970;245:1374-7.
206. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension. *Hypertension.* 1999;34:539–545.
207. Mead J. Free radical mechanism in lipid peroxidation and prostaglandins. Free radical in molecular biology. *J. Aging and disease.* 1984;65:53-66.
208. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func.* 2003;21:291-296.

209. Memişoğulları R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2004;18:193–197.
210. Menshikova EV, Ritov VB, Fairfull L, Ferrell RE, Kelley DE, Goodpaster BH. Effects of exercise on mitochondrial content function in aging human skeletal muscle. *J Gerontol*. 2006;61:534–540.
211. Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C. Effect of rosiglitazone on glucose and nonesterified fatty acid metabolism in Type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2001;44:2210-2219.
212. Moghadasian MH, Godin DV. Gender-related regional antioxidant profiles in the gastrointestinal tract of the rat. *Mol Cell Biochem*. 1996;155:43–49.
213. Moran LA, Scrimgeour KG, Horton HR, Ochs RS, Rawn JD. *Biochemistry, Second Edition*, Neil Paterson Publishers/Prentice Hall Inc. 1994;18:1-28.
214. Mudaliar S, Henry RR. New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: the glitazones or insulin sensitizers. *Annu. Rev. Med*. 2001;52:239–257.
215. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51:263-73.
216. Nagley P, Zhang C, Lim ML, Merhi M, Needham BE, Khalil Z. Mitochondrial DNA deletions parallel age-linked decline in rat sensory nerve function. *Neurobiol Aging*. 2001;22:635– 643.
217. Nakase H, Moraes CT, Rizzuto R, Lombes A, DiMauro S, Schon EA. Transcription and translation of deleted mitochondrial genomes in Kearns-Sayre syndrome: implications for pathogenesis. *Am J Hum Genet*. 1990;46:418-27.
218. Narayanan PK, Hart T, Elcock F, Zhang C, Hahn L, McFarland D, Schwartz L, Morgan DG, Bugelski P. Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment. *Cytometry*, 2003;52A:28–35.
219. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia*. 2006;49:434-41.
220. Naviaux RK. Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr*. 2000;159:219-26.

221. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principle of Biochemistry. Üçüncü baskı çevirisi. Çeviri Editörü: Kılıç N. Lehninger Biyokimyanın ilkeleri. Palme yayıncılık, 2005, 659-690.
222. Nemenoff RA, Winn RA. Role of nuclear receptors in lung tumorigenesis. *Eur J Cancer*. 2005;41:2561-8.
223. Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, Le Winter M, Porte D, Semenkovich CF, Smith S, Young LH, Kahn R. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*. 2003;108:2941–2948.
224. Nicholls DG, Ferguson SJ. Bioenergetics 3. Academic Pres, London. 2004;69:818-819.
225. Nicklas JA, Brooks EM, Hunter TC, Single R, Branda RF. Development of a Quantitative PCR (TaqMan) Assay for Relative Mitochondrial DNA Copy Number and the Common Mitochondrial DNA Deletion in the Rat. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2004;44:313–320.
226. Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Chem*. 1999;45:1932-7.
227. Nohl H, Gille L, Staniek K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:719-23.
228. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31:1287-1317.
229. Oruç Özcan E. 2,4-Diamin ve Azinfosmetilin *Tilapia Nilotica*'da Karaciğerde Antioksidan Enzim Aktivitelerine ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1998.
230. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12:913-22.
231. Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1271:177-89.
232. Öztaş S, Yakan B. Mitokondriyon&Mitokondriyal DNA patolojileri. A.Ü.K.K.E.F. Ofset tesisleri, 2000.

233. Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA. Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor α and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res.* 2001;61:6213–6218.
234. Pallotti F, Chen X, Bonilla E, Schon EA. Evidence that specific mtDNA point mutations may not accumulate in skeletal muscle during normal human aging. *Am J Hum Genet.* 1996;59:591-602.
235. Panfili E, Sandri G, Ernster L. Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.* 1991;290:35-7.
236. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 2003;333:19-39.
237. Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Vecchiet J, Felzani G, Lezza AM, Cantatore P, Gadaleta MN. Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:1223–33.
238. Peters JM, Lee SS, Li W. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the Mouse peroxisome proliferator-activated receptor β . *Mol Cell Biol.* 2000;20:5119-28.
239. Pettepher CC, Ledoux SP, Bohr VA, Wilson G.L. Repair of alkali-labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin. *J. Biol. Chem.* 1991;266:3113–3117.
240. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:2002-7.
241. Pistrosch F, Passauer J, Fisher S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P. In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. *Diabetes Care.* 2004;27:484–90.
242. Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ.* 2004;28:44-50.
243. Praticò D: Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis.* 2005;181: 215–224.
244. Prescott M, Devenish RJ, Nagley P. Assembly of multisubunit complexes in mitochondria. *Advances in Molecular and Cell Biology.* 1996;17:299-339.

245. Prieto-Alamo MJ, Cabrera-Luque JM, Pueyo C. Absolute quantitation of normal and ROS induced patterns of gene expression: an in vivo real-time PCR study in mice. *Gene Expr.* 2003;11:23-34.
246. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 1991;266:22028-34.
247. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:856-62.
248. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2000;25:502–8.
249. Rajagopalan R, Iyer S, Perez A. Comparison of pioglitazone with other antidiabetic drugs for associated incidence of liver failure: no evidence of increased risk of liver failure with pioglitazone. *Diabetes Obes Metab.* 2005;7:161-9.
250. Raskin P, Rendell M, Riddle MC. A randomized trial of rosiglitazone therapy in patients with inadequately controlled insulin-treated type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24:1226-32.
251. Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:626-35.
252. Reddy VS, Sahay RK, Bhadada SK, Agrawal JK, Agrawal NK. *Indian Academy of Clinical Medicine.* 2000;1:245-251.
253. Renis M, Cantatore P, Polosa PL, Fracasso F, Gadaleta MN. Content of mitochondrial DNA and of three mitochondrial RNAs in developing and adult cerebellum. *J. Neurochem.* 1989;52:750-754.
254. Rennings AJ, Smits P, Stewart MW, Tack CJ. Fluid retention and vascular effects of rosiglitazone in obese, insulin-resistant, nondiabetic subjects. *Diabetes Care.* 2006;29:581-7.
255. Reubset FAG, Veerkamp JH, Tirjbels JMF, Monnens CA. Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acids in rat liver, heart. *Lipids.* 1992;24:11-16.
256. Reynier P, Malthiery Y. Accumulation of deletions in mtDNA during tissue aging: analysis by long PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217: 59–67.

257. Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*. 2003; 58:175-182.
258. Rich PR, Bonner WD. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1978;188:206-13.
259. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85: 6465–6467.
260. Riddle M.C. Oral pharmacologic management of type 2 diabetes. *Am Fam Physician*. 1999;60:2613-2620.
261. Robert WT, Doug MT. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6:389-402.
262. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cell. Physiol*. 1988;136:507-513.
263. Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, Okamoto Y, Mattie MD, Higashiyama H, Asano S, Strum JC, Ryan TE. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes*. 2007;56:1751-60.
264. Rooney PH. Multiplex quantitative real-time PCR of laser microdissected tissue. *Methods Mol Biol*. 2005;293:27-37.
265. Rys PN, Persing DH. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol*. 1993;31:2356-60.
266. Sacks DB. Diabetes Mellitus. In: Burtis CA, Ashwood ER, (Ed). *Tietz Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Co. 1999;766-776.
267. Sakai Y, Iwamura Y, Hayashi J-I, Yamamoto N, Ohkoshi N, Nagata H. Acute exercise causes mitochondrial DNA deletion in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 1999; 22:258 –261.
268. Salazar JJ, Van Houten B. Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator for hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mutat. Res*. 1997;385:139–149.
269. Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65:43–81.
270. Santos JH, Mandavilli BS, Van Houten B. Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2002;197:159-76.

271. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. 1999;283:1488-93.
272. Savlı H, Hatırnaz Ö. Sayımsal Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu ve Hematolojik Gen Anlatım Analizleri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2004;24:653-660.
273. Sawyer DE, Van Houten B. Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat. Res*. 1999;434:161–176.
274. Scandalios JG. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 2002; 27:483-486.
275. Schatz G. Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1271:123-6.
276. Scheffler IE. Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliver Rev*. 2001;49:3-26.
277. Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*. 2001;1:3-31.
278. Schlick NE, Jensen-Seaman MI, Orlebeke K, Kwitek AE, Jacob HJ and Lazar J. Sequence analysis of the complete mitochondrial DNA in 10 commonly used inbred rat Strains. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:1183-92.
279. Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*. 1989;244:346 –349.
280. Schultz BE, Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2001;30:23-65.
281. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007;18:567-79.
282. Semple RK, Chatterjee VK, O’Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*. 2006;116:581-9.
283. Shadel G.S. Insights From Model Systems Yeast as a Model for Human mtDNA Replication. *Am. J. Hum. Genet*. 1999;65:1230–1237.
284. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:409-35.

285. Shang J, Clayton D.A. Human mitochondrial transcription termination exhibits RNA polymerase independence and biased bipolarity in vitro. *J Biol Chem.* 1994;269:29112-20.
286. Shay JW, Pierce DJ, Werbin H. Mitochondrial DNA copy number is proportional to total cell DNA under a variety of growth conditions. *J. Biol. Chem.* 1990;265:14802-14807.
287. Sherratt EJ, Thomas AW, Alcolado JC. Mitochondrial DNA defects: a widening clinical spectrum of disorders. *Clin. Sci.* 1997;92:225–235.
288. Shiau CW, Yang CC, Kulp SK, Chen KF, Chen CS, Huang JW. Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPAR γ . *Cancer Res.* 2005;65:1561–1569.
289. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:10771-8.
290. Shishido S, Koga H, Harada M, Kumemura H, Hanada S, Taniguchi E, Kumashiro R, Ohira H, Sato Y, Namba M, Ueno T, Sata M. Hydrogen peroxide overproduction in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes. *Hepatology.* 2003;37:136–147.
291. Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am J Hum Genet.* 1992;51:1179-86.
292. Short KR, Bigelow ML, Kahl J. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:5618–5623.
293. Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen-Schimke JM, Nair KS. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes.* 2003;52:1888 –1896.
294. Siegers CP, Bartels L, Riemann D. Effects of fasting and glutathione depletors on the GSH-dependent enzyme system in the gastrointestinal mucosa of the rat. *Pharmacology.* 1989;38:121–128.
295. Sies H, De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. *J. Toxicology.* 1992;64:547-51.
296. Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis.* 2000; 5;6:178-83.

297. Solak M, Bağcı H, Şengil A.Z, Öztaş S. Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2000: 30-46.
298. Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat. Genet.* 1992;2:318–323.
299. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 1998;63:381-388.
300. Sözmen EY. Yaşlanma Biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara pp: 2002;665-674.
301. St. Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem.* 2003;278:26597–26603.
302. Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2002;13:18-23.
303. Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation.* 2003;107:1418–23.
304. Suliman HB, Caraway MS, Velsor LW, Day BJ, Ghio AJ, Piantadosi CA. Rapid mtDNA deletion by oxidants in rat liver mitochondria after hemin exposure. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:246–56.
305. Suliman HB, Caraway MS, Welty-Wolf KE, Whorton AR, Piantadosi CA. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. *J Biol Chem.* 2003;278:41510–8.
306. Suomalainen A. PCR in the analysis of mutations in mitochondrial DNA. *Ann Med.* 1992;24:201-5.
307. Suter SL, Nolan JJ, Wallece P, Gumbiner B, Olefsky JM. Metabolic effect of new oral hypoglycemic agent cs –045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care.* 1992;15:193-203.
308. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999;1410:103-123.

309. Tack CJ, Smits P. Thiazolidinedione derivatives in type 2 diabetes mellitus. *Neth J Med.* 2006;64:166-174.
310. Tang Y, Schon EA, Wilichowski E, Vazquez-Memije ME, Davidson E, King MP. Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): new insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression. *Mol Biol Cell.* 2000;11:1471–1485.
311. Tettey JN, Maggs JL, Rapeport WG, Pirmohamed M, Park BK. Enzyme-induction dependent bioactivation of troglitazone and troglitazone quinone in vivo. *Chem Res. Toxicol.* 2001;14:965–974.
312. Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:3752-61.
313. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Genetics in Medicine.* 5th Ed. Philadelphia: WB Saunders Comp, 1991: 89-91.
314. Thyagarajan B, Padua RA, Campbell C. Mammalian mitochondrial possess homologous DNA recombination activity. *J Biol Chem.* 1996;271:27536–27543.
315. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* 1997;46:1733–1742.
316. Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med.* 2008;263:167-78.
317. Tuğrul A. Yeni oral Antidiyabetikler-Thiazolidinedionlar, *Türk Diyabet Yıllığı. Türk Diabet Cemiyeti ve Türkiye Diyabet Vakfı.*2003;97-102.
318. Urso ML, Clarkson MP. Oxidative stres, exercise, and antioxidant supplemetation. *Toxicology.* 2003;189:41-54.
319. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005;29:151-9.
320. Van den Bogert C, De Vries H, Holtrop M, Muus P, Dekker H.L, Van Galen MJM, Bolhuis PA, Taanman JW. Regulation of the expression of mitochondrial proteins: relationship between mtDNA copy number and cytochrome-c oxidase activity in human cells and tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1144:177-83.

321. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003;17:1013-34.
322. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair*. 2006;5:145–152.
323. Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch Biochem Biophys*. 1999;363:91-7.
324. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3:0034.
325. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*. 2004;25:612–628.
326. von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech AP, Elfstroem C, Meissner C, Oehmichen M, Cortopassi GA. Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic Sci Int*. 2002;126:34-9.
327. Wagstaff AJ, Goa KL. Rosiglitazone: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2002;62:1805-1837.
328. Wahlländer A, Soboll S, Sies H, Linke I, Müller M. Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett*. 1979;97:138-40.
329. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol*. 1999;46:223-237.
330. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor α ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1-S transition in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem*. 2000;275:22435–22441.
331. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999;283:1482-8.
332. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:1175-212.
333. Wallace DC. Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends Genet*. 1993;9:128-33.

334. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:8739-46.
335. Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science.* 1992;256:628-32.
336. Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, Horton T, Jun AS, Lott MT. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1271:141-51.
337. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 1988;242:1427-30.
338. Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem.* 2006;281:25791-802.
339. Wei YH, Lee CF, Lee HC, Ma YS, Wang CW, Lu CY, Pang CY. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 bp-deleted mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:97-112.
340. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med.* 2002;227:671-82.
341. Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol.* 2001;128:379-91
342. Wiesner RJ, Zsurka G, Kunz WS. Mitochondrial DNA damage and the aging process: facts and imaginations. *Free Radic Res.* 2006;40:1284-94.
343. Williams RS, Salmons S, Newsholme EA, Kaufman RE, Mellor J. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1986;261:376-380.
344. Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:403-409.
345. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 1997;22:1-8.
346. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005;39:75-85.

347. Wrobel J, Li Z, Dietrich A, Mccaleb M, Mihan B, Sredy J, Sullivan D. Novel 5-(3-aryl-2-propynyl)-5-(arylsulfonyl) thiazolidine-2,4-diones as antihyperglycemic agents. *J. Med. Chem.* 1998;41:1084-1091.
348. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94:514–519.
349. Yakubovskaya E, Chen Z, Carrodeguas JA, Kisker C, Bogenhagen DF. Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *J. Biol. Chem.* 2006;281:374–382.
350. Yamamoto H, Tanaka M, Katayama M, Obayashi T, Nimura Y, Ozawa T. Significant existence of deleted mitochondrial DNA in a cirrhotic liver surrounding hepatic tumor. *Biochem. Biophys. Res.* 1992;182:913–920.
351. Yamamoto Y, Nakajima M, Yamazaki H, Yokoi T. Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. *Life Sci.* 2001;70:471–482.
352. Yin S, Yu Z, Sockalingam R, Bance M, Sun G, Wang J. The role of mitochondrial DNA large deletion for the development of presbycusis in Fischer 344 rats. *Neurobiology of Disease.* 2007;27:370-377.
353. Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res.* 1995;209:723-9.
354. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001;54:176-186.
355. Yu CA, Xia D, Kim H, Deisenhofer J, Zhang L, Kachurin AM, Yu L. Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1365:151-8.
356. Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine.* 1998;77:59-72.
357. Zhang C, Peters L. E, Linnane A. W and Nagley P. Comparison of different quantitative PCR procedures in the analysis of the 4977-bp deletion in human mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res.* 1996;223: 450-5.

358. Zhang YQ, Tang XQ, Sun L, Dong L, Qin Y, Liu HQ, Xia H, Cao JG. Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *World J Gastroenterol.* 2007;13:1534-40.
359. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res.* 1999;259:523-6.
360. Zimmerman B.J, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sc.*1994; 307:284–292.
361. Zinman B. PPAR gamma agonists in type 2 diabetes: how far have we come in 'preventing the inevitable'? A review of the metabolic effects of rosiglitazone. *Diabetes Obesity Metab.* 2001;3(suppl 1):S34-43.
362. Zwart De LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicin.* 1999;26:202-226.