



## Ratlarda roziglitazon'un telomer dinamiğine etkisinin moleküler yöntemlerle araştırılması

Research on the effect of rosiglitazon on telomere dynamics with molecular methods in rats

Ali Okuyucu<sup>a\*</sup>, Abdulkemir Bedir<sup>a</sup>, Zeliha Cansel Özmen<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun

<sup>b</sup> Tokat Devlet Hastanesi Biyokimya Kliniği, Tokat

### MAKALE BİLGİLERİ

#### Makale geçmişi

Geliş 06 / 04 / 2011

Kabul 14 / 05 / 2011

#### \* Yazışma Adresi:

Ali Okuyucu

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun

E-posta: okuyucuali@hotmail.com

#### Anahtar Kelimeler:

PPAR-gama

Thiazolidinedion

Roziglitazon

Telomer

Oksidatif stres

Kantitatif PCR

#### Keywords:

PPAR-gamma

Thiazolidinedione

Rosiglitazone

Telomere

Oxidative stress

Quantitative PCR

### ÖZET

Roziglitazon; Tip II diabetes tedavisinde kullanılan tiazolidinedion grubu bir ilaçtır. Bu grup ilaçlar, karbonhidrat ve lipid metabolizmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alan peroksizom proliferatör aktive reseptör-gama (PPAR-gama)'nın ligandı olarak rol oynarlar. Telomer; kromozom uçlarında bulunan özelleşmiş DNA ve protein kompleksinden oluşmaktadır. Omurgalılarda telomerik DNA, TTAGGG gibi, guaninden zengin dizelerden oluşur. Normal hücrelerde, her DNA replikasyon periyodunda, telomer 50–150 baz kısalmır. Tamir edilemeyen oksidatif DNA hasarı da bu telomer kısalmasına katkıda bulunabilir. Literatürde, roziglitazonun telomer uzunluğuna etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda roziglitazonun telomer uzunluğuna etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmada 7–8 haftalık, 248–275 g arasında, 16 tane erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar; her grupta dört tane olacak şekilde dört gruba ayrıldı ve 14 gün boyunca 0, 0,5, 1,0 ve 2,0 mg/kg dozlarında roziglitazon oral yoldan uygulandı. Rat karaciğer, ince bağırsak, pankreas dokuları ve lenfositlerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Numunelerde genom sayısını belirleyebilmek için tek kopya gen olarak 36B4 geni seçildi. 36B4 genine spesifik primerlerin kullanıldığı Q-PCR ile bir rat dokusundaki genom kopya sayısı bulundu. Rat genom standardı olarak kullanılan bu numune tüm numunelerdeki genom sayısını bulmak için kullanıldı. Tüm numunelerde telomer (T) ve 36B4 (S) için kantitatif PCR yapıldı. İki çalışmada elde edilen ürünler birbirine oranlarak her numune için T/S oranı daha sonra da bir kalibratör numune kullanılarak relatif T/S oranı hesaplandı. Ayrıca 10,2 kb telomer standardı kullanarak numunelerin telomer uzunlukları kilobaz olarak da hesaplandı. Farklı roziglitazon dozları verilen numuneleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığımızda telomer uzunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık ( $p>0,05$ ). Bu sonuç, roziglitazonun farklı rat dokularında telomer kısalmasına yol açmadığını göstermektedir.

*J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:162-167*

### ABSTRACT

Rosiglitazone that is a drug for the treatment of type II diabetes mellitus, belong to the class of thiazolidinediones. Drugs of this class act as ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), which is involved in the regulation of genes controlling carbohydrate and lipid metabolism. Telomeres are composed of specialized DNA and protein complexes. Telomeric DNA consist of guanine-rich sequences, such as TTAGGG in vertebrates. In normal cells, telomeres shorten by ~50–150 bp with each round of DNA replication. In addition to this, unrepaired oxidative DNA damage can also contribute to telomere shortening. There is no study that shows the effect of rosiglitazone on telomere length in literature. Because of this, we aimed to research on the effect of rosiglitazone on the telomere length in our study. We used sixteen male Sprague-Dawley rats that at 7-8 weeks of age and weighing 248–275 g in our study. The rats were divided into four groups, four rats in each group, and dosed once a day for 14 days by oral gavage with doses of 0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/kg rosiglitazone. Genomic DNA was extracted from rat liver, small intestine, pancreas tissue and lymphocytes. The 36B4 gene

was chosen as single copy gene for determine the number of genom in the samples. The number of genome copies were found in a rat tissue by qPCR that is used the 36B4 gene-specific primers. This sample, that is used as rat genom standarts, was used for find the number of genome in all samples. The qPCR was performed for telomere (T) and 36B4 (S) in all samples. The T / S ratio was calculated by the ratio of the products derived from two studies to each other, and then the relative T / S ratio was calculated by using a calibrator sample for each sample. In addition, telomere lengths of the samples were also calculated as kilobase by using 10,2 kb long telomere standard. We did not found statistically any significant difference between doses of rosiglitazone and control groups for telomere length ( $p>0.05$ ). This result has showed that rosiglitazone doesn't lead to telomere shortening.

*J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:162-167*

© 2011 OMÜ Tüm hakları saklıdır

## 1. Giriş

Roziglitazon Tip II Diabet mellitus tedavisinde insülin duyarlılığını artırmak için kullanılan thiazolidinedion (TZD) grubu bir antidiabetiktir. TZD'lerin birçok metabolik ve anti-inflamatuar etkileri, nükleer reseptör ailesinin bir transkripsiyon faktörü olan Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör-gama (PPAR $\gamma$ ) aktivasyonuna bağlıdır. Bu grubun ilk üyesi olan troglitazon 1997 yılında piyasaya çıkarılmış ama şiddetli karaciğer toksisitesi nedeniyle 2000 yılında kullanımına son verilmiştir (Gale, 2006). Roziglitazon ve pioglitazon ise 1999 yılından beri kullanılmaya devam edilmektedir.

Kromozom uçları telomer olarak isimlendirilen özelleşmiş DNA ve protein kompleksinden oluşmaktadır (Wai, 2004). Omurgalılarda telomerik DNA, TTAGGG gibi, guaninden zengin kısa dizelerin ardışık tekrarlarından oluşur (de Lange ve ark., 1990). Telomer uzunluğu farklı orjinden kaynaklanan hücre veya organizmalar arasında değişir. Örneğin insanda uzunluğu 3-20 kilobaz (kb) arasında değişirken, ratlarda 20-100 kb ve farelerde 150 kb'a kadar uzun olabilir (Moyzis ve ark., 1988; Harley ve ark.,1990). Normal hücrelerde, DNA replikasyonu esnasında, DNA polimeraz kesikli olarak sentezlenen zincirin 3' ucunu tam olarak sentezleyemez. Bu nedenle her replikasyon periyodunda telomer 50-150 baz kadar kısalır (Makarov ve ark., 1997). Bu olay uç replikasyon problemi olarak bilinmektedir. Bu kademeli telomer kısalmasına ilave olarak, bazı tamir edilemeyen DNA hasarı ve epigenetik faktörler hızlı telomer kısalmasına ve yaşlanma oluşumuna katkıda bulunabilir (Rubelj ve Vondracek, 1999). Reaktif oksijen ürünlerinin (ROÜ) oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA tamir mekanizmalarında bozukluk olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açar. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, baz modifikasyonları veya şeker hasarı oluşur (Evans ve Cooke, 2004).

Oksidatif DNA hasarının telomer kaybına katkısı, birçok vakada uç-replikasyon probleminden daha önemli olduğu rapor edilmiştir (Von Zglinicki, 2002). Yüksek guanin içeriğine bağlı olarak telomer, oksidatif stres, alkilasyon veya UV radyasyon hasarına yüksek derecede hassastır (Petersen ve ark., 1998; Oikawa ve ark., 2001; Kawanishi ve Oikawa, 2004). Ayrıca telomer sekansında oksidatif hasarın uyardığı 8-oxodG oluşumunun, nontelomerik sekanstan daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Oikawa ve ark., 2001). Üstelik ROÜ'nün direk etkisine ilaveten oksidatif lezyonların tamiri, telomerik DNA'da, genomun diğer bölgelerine göre daha az etkilidir. ROÜ'nin, özellikle de hidroksil radikalının tek zincir kırığı oluşturduğu ve genomik DNA'nın aksine telomerik DNA'nın tek zincir kırık tamirinde yetersiz olduğu rapor edilmiştir (Petersen ve ark., 1998). Telomer stabilitesi, genetik ve çevre gibi çeşitli faktörlerden etkilendiğinden, telomer

kısalmasının, oksidatif stresin bir belirteci olabileceği ve ortalama ömrü belirleyebileceği öne sürülmüştür (Cawthon ve ark., 2003). Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda, roziglitazonun oksidatif stresin bir belirteci olduğu kabul edilen telomer uzunluğuna etkisini araştırmayı amaçladık.

## 2. Araştırma yöntemi

### Rat dokularının DNA izolasyonu

Hayvan çalışması için Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi etik kurulundan onay alındı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cerrahi Araştırmalar Merkezinde standart şartlarda yetiştirilen 7-8 haftalık, 248-275 g arasında, 16 tane erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Her grupta dört tane olacak şekilde dört gruba ayrılan ratlara; oral gavaj ile her sabah aynı saatte, 14 gün boyunca 2,0 mg/kg, 1,0 mg/kg, 0,5 mg/kg roziglitazon (RSG) ve kontrol grubuna ise sadece ilaçların çözülmesi için kullanılan DMSO (Dimetil sülfoksit) verildi. Öndördüncü gün ilaç uygulanmasından 4 saat sonra kısa eter anestesisini takiben öldürülen ratlardan kan alındı ve lenfositler izole edildi. Karaciğer, ince bağırsak ve pankreas dokuları kesilerek çıkarıldı. Tüm dokular ve lenfositler çalışılacağı zamana kadar -70 °C'de saklandı. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) kullanılarak rat lenfosit ve dokularından DNA izolasyonu yapıldı. DNA konsantrasyonları nanofotometre (IMPLEN NanoPhotometer, U.K.) ile  $\mu\text{g/mL}$  olarak ölçüldü.

### Primerlerinin belirlenmesi

Numunelerdeki nükleer genom sayısını belirleyebilmek ve PCR çalışmasını normalize etmek için rat genomu 12. kromozomda bulunan, tek kopya (single copy) olarak ekspres edilen ve pseudogeni olmayan, asidik ribozomal fosfoprotein P0 (36B4) geni (Genbank accession no: NW 047376,1) seçildi. LightCycler Probe Design Software 2,0 programı kullanılarak 36B4 primerleri belirlendi. Telomer için Cawthon (Cawthon, 2002) tarafından tasarlanan primer seti (Tel1b ve Tel2b) kullanıldı. Çalışmada kullanılan primer sekansları Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan primer sekanslar

Primer	Sekans
36B4 Forward primer:	5'-tccgtattgcagagctcttg-3'
36B4 Reverse primer:	5'-gcacatcgcctctaggaa-3'
Tel1b primer:	5'-cggttggttgggttgggttgggttgggttgggtt-3'
Tel2b primer:	5'-gggttgcctacccttacccttacccttacccttaccct-3'

### Kantitatif PCR çalışması

Nükleer genom standardı olarak kullanmak amacıyla bir rat dokusundaki 36B4 kopya sayısı belirlendi. Tüm numunelerin konsantrasyonu 40-50 pg/μL'ye ayarlandı. 65,6–2100 pg/μL arasında altı adet rat nükleer genom standardı hazırlandı. Farklı zamanlarda yapılan 36B4 ve telomer PCR çalışmalarımızda LightCycler PCR cihazı ve floresan boya olarak da SYBR Green I kullanıldı. Numunelerle birlikte 10,2 kilobaz uzunluğa sahip telomer standardının da 36B4 ve telomer PCR çalışmaları yapıldı. PCR çalışmalarında kullanılan mastermix içeriği Tablo 2'de, PCR programları da Tablo 3'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** 36B4 ve Telomer PCR mastermix içeriği

	<b>Telomer PCR</b>	<b>36B4 PCR</b>
Primer	Tel1b ve Tel2b	36B4 forward ve reverse
Primer konsantrasyonu	0,1'er μM	0,25'er μM
SYBR Green	0,3X	0,2X
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	0,5 U	0,5 U
MgCl <sub>2</sub>	3 mM	3 mM

**Tablo 3.** LightCycler 36B4 ve Telomer PCR programı

<b>Evre</b>	<b>36B4</b>	<b>Telomer</b>
Aktivasyon:	95 °C'de 10 dakika	95 °C'de 10 dakika
Denatürasyon:	95 °C'de 5 saniye	95 °C'de 15 saniye
Annealing:	56 °C'de 10 saniye	60 °C'de 10 saniye
Elongasyon:	72 °C'de 6 saniye	72 °C'de 30 saniye
Siklus sayısı:	40	25

### Relatif telomer uzunluğunun belirlenmesi

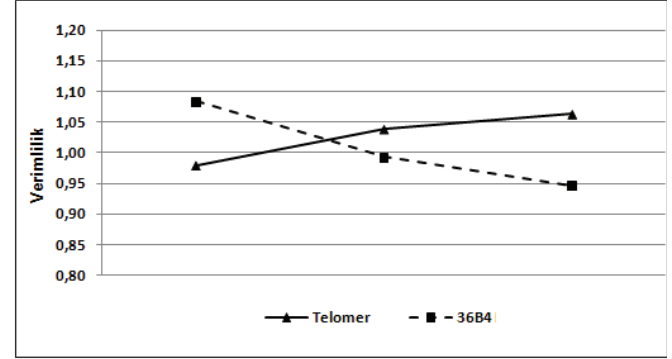
Bunun için karşılaştırmalı CT metodu (ΔΔCt metodu) kullanıldı. İlk önce telomer PCR çalışması sonucunda elde edilen ürün, 36B4 (single copy gene) PCR çalışması sonucunda elde edilen ürüne oranlanarak numuneler ve telomer standardı (10,2 kb) normalize edildi. PCR verimliliği %100 olduğundan her numune için telomer/36B4 (T/S) oranı;  $2^{Ct(\text{telomer})} / 2^{Ct(36B4)} = 2^{[Ct(\text{telomer}) - Ct(36B4)]} = 2^{-\Delta Ct}$  formülü ile hesaplandı. Daha sonra her doku (karaciğer, ince bağırsak, pankreas ve lenfosit) kendi içinde değerlendirildi ve en düşük ΔCt değerine sahip kontrol numunesi kalibratör kabul edilerek  $2\Delta Ct(\text{numune}) / 2\Delta Ct(\text{kalibratör}) = 2\Delta Ct(\text{numune}) - \Delta Ct(\text{kalibratör}) = 2 - \Delta\Delta Ct$  formülü ile relatif T/S oranları hesaplandı. Relatif telomer uzunlukları kalibratörün "n" katı şeklinde ifade edildi. Ayrıca 10,2 kb uzunlukta telomer standartı kalibratör olarak kabul edilerek tüm numunelerin relatif T/S oranları hesaplandı ve kalibratörün telomer uzunluğu bilindiğinden numunelerin telomer uzunluklarını kilobaz olarak belirlendi.

### İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS programı (Statistical Package for the Social sciences, version 16.0, SPSS Inc., ABD) ile yapıldı. Her doku için, RSG alan gruplarla kontrol grubu arasındaki ilişki nonparametrik Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi  $P < 0,05$  olarak kabul edildi.

**Tablo 4.** Telomer ve 36B4 PCR çalışmaları verimlilik sonuçları

	<b>Telomer</b>		<b>36B4</b>	
	<b>Slope</b>	<b>Verimlilik</b>	<b>Slope</b>	<b>Verimlilik</b>
Çalışma 1	-3,372	0,98	-3,137	1,08
Çalışma 2	-3,233	1,04	-3,342	0,99
Çalışma 3	-3,180	1,06	-3,461	0,95
<b>Ortalama</b>	<b>-3,262</b>	<b>1,02</b>	<b>-3,313</b>	<b>1,00</b>



**Şek. 1.** Telomer ve 36B4 PCR verimlilik grafiği

### 3. Sonuçlar

Telomer ve 36B4 için yapılan çalışmaların slope ve ve-

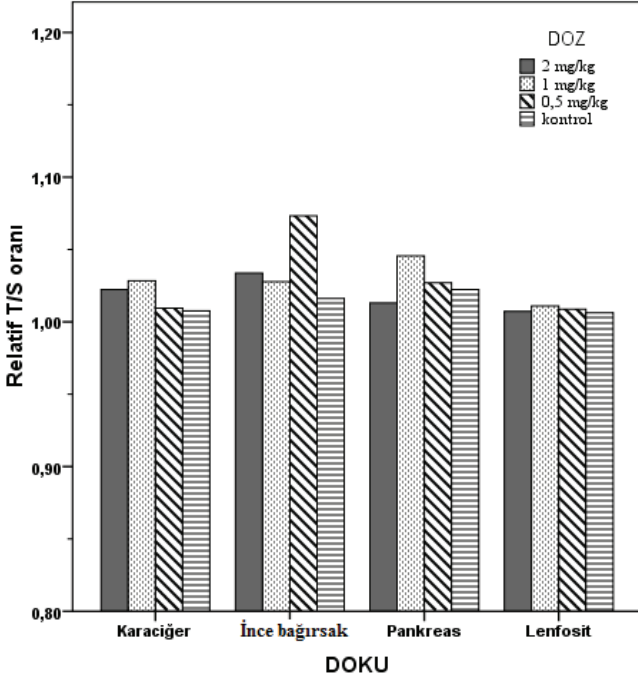
**Tablo 5.** Rat dokularında dozlara göre relatif T/S oranları

	<b>Doz</b>	<b>Ortalama</b>	<b>N</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>
<b>Karaciğer</b>	2 mg/kg	1,02237	4	1,004	1,049
	1 mg/kg	1,02839	4	0,983	1,077
	0,5 mg/kg	1,00952	4	1,004	1,015
	Kontrol	1,00761	4	1,000	1,016
<b>İnce bağırsak</b>	2 mg/kg	1,03374	4	1,010	1,055
	1 mg/kg	1,02781	4	0,992	1,066
	0,5 mg/kg	1,07325	4	1,006	1,126
	Kontrol	1,01611	4	1,000	1,028
<b>Pankreas</b>	2 mg/kg	1,01305	4	0,961	1,039
	1 mg/kg	1,04558	3	1,031	1,066
	0,5 mg/kg	1,02704	4	1,016	1,033
	Kontrol	1,02237	3	1,000	1,048
<b>Lenfosit</b>	2 mg/kg	1,00728	4	0,971	1,028
	1 mg/kg	1,01093	4	0,996	1,018
	0,5 mg/kg	1,00874	4	0,996	1,015
	Kontrol	1,00626	4	1,000	1,012

**Tablo 6.** Rat dokularının telomer standardı ile relatif kantitasyon sonuçları

	<b>Doz</b>	<b>ΔCt</b>	<b>ΔΔCt</b>	<b>Relatif T/S</b>	<b>Telomer uzunluğu (kb)</b>
<b>Karaciğer</b>	2 mg/kg	-16,11	-2,82	7,20	73,44
	1 mg/kg	-16,21	-2,92	8,10	82,64
	0,5 mg/kg	-15,91	-2,62	6,16	62,77
	Kontrol	-15,88	-2,59	6,04	61,59
<b>İnce bağırsak</b>	2 mg/kg	-17,01	-3,72	13,45	137,15
	1 mg/kg	-16,91	-3,62	12,87	131,24
	0,5 mg/kg	-17,66	-4,37	23,04	235,00
	Kontrol	-16,72	-3,43	10,82	110,38
<b>Pankreas</b>	2 mg/kg	-16,30	-3,01	8,47	86,37
	1 mg/kg	-16,82	-3,53	11,74	119,76
	0,5 mg/kg	-16,53	-3,24	9,44	96,29
	Kontrol	-16,45	-3,16	9,16	93,42
<b>Lenfosit</b>	2 mg/kg	-17,29	-4,00	16,49	168,21
	1 mg/kg	-17,35	-4,06	16,74	170,73
	0,5 mg/kg	-17,31	-4,02	16,29	166,11
	Kontrol	-17,27	-3,98	15,78	160,96
<b>Telomer Std.</b>		-13,29	0	1,00	10,20

rimlilik değerleri Tablo 4 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şek. 2. Tüm dokulardaki dozlara göre relatif T/S oranları

Tablo 5'de tüm dokulardaki dozlara göre relatif T/S oranları ortalama, minimum ve maksimum değerleri ile birlikte verilmiştir. Farklı RSG dozları ve kontrol grubu arasında relatif T/S oranları karşılaştırıldığında hiçbir rat dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0,05$ ). Şekil 2'de tüm dokularda dozlara göre relatif T/S oranları grafiksel olarak gösterilmiştir. Tüm örneklerin 10,2 kb telomer standardı ile relatif kantitasyonu sonucu elde edilen relatif T/S oranları ve kb olarak telomer uzunlukları Tablo 6'da gösterilmiştir.

#### 4. Tartışma

Her DNA replikasyon periyodunda oluşan telomer kısalmasına ilave olarak, bazı tamir edilemeyen DNA hasarı ve epigenetik faktörler hızlı telomer kısalmasına ve yaşlanma oluşumuna katkıda bulunabilir (Rubelj ve Vondracek, 1999). Kronik hiperoksi (Von Zglinicki, 1995), düşük doz tert-butylhydroperoxide (Dumont, 2000) veya  $H_2O_2$  (Von Zglinicki, 2000a) gibi stres durumlarında, telomer kısalma hızında artış bulunmuştur. Telomer kaybında benzer bir şekilde artma oksidatif stresin arttığı bir durum olan Fankoni anemili hastalardan alınan fibroblastlarda da görülmüştür (Adelfalk, 2001). Oksidatif stresin neden olduğu vasküler demans (Von Zglinicki, 2000b), ateroskleroz (Samani, 2001) ve aplastik anemili (Brummendorf, 2001) hastaların lenfositlerinde de telomer kısalmasının gözlenmesi, oksidatif stres ile telomer kısalmasının bağlantılı olduğunu göstermektedir.

Bugüne kadar, roziglitazon veya diğer TZD'lerin telomer dinamiğine etkisini inceleyen bir çalışma yayımlanmamıştır. Bununla birlikte, çeşitli PPAR $\gamma$  ligandlarının oksidan üretimini uyardığı ve troglitazononun rat hepatoma hücrelerine toksik etkisinde de bu oksidanların rolünün olabileceği düşünülmüştür (Narayanan ve ark., 2003). Roziglitazon uygulanan rat karaciğer dokusu ve lenfositlerden izole edilen genomik DNA'larda doza bağımlı olarak gözlenen genotoksisite Co-

met (single cell gel electrophoresis) yöntemi ile gösterilmiştir (Bedir ve ark. 2006). Yine aynı metodla pioglitazonun da, rat lenfosit ve karaciğerinde genotoksik olduğu bulunmuş, Formamidopirimidin DNA Glikozilaz ve Endonükleaz III DNA tamir enzimlerinin kullanılmasıyla da, genomik DNA'da oluşan okside pürin ve primidinler gösterilmiştir (Bedir ve ark., 2008). Özellikle yapısal olarak farklı PPAR $\gamma$  agonistlerin benzer oksidan düzeyini uyarması, oksidan üretiminde PPAR $\gamma$ 'nın rolünü düşündürmektedir (Elisa ve James, 2004). TZD'lerin birçok metabolik ve antiinflamatuvar etkileri PPAR $\gamma$  aktivasyonuna bağlı olmakla birlikte, PPAR $\gamma$ 'dan bağımsız antiproliferatif ve apoptotik etkileri de olduğu öne sürülmüştür (Grommes ve ark., 2004; Feinstein ve ark., 2005). Ciglitazon ve roziglitazonun astroglial hücre canlılığını azalttığı bir çalışmada, bu etkinin PPAR $\gamma$  aracılı olmadığı, bir kaynaktan ROÜ'nin akut üretimi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Perez-Ortiz ve ark., 2004). Astroglioma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da TZD'lerin ROÜ'ni doza bağımlı olarak artırdığı, ama bu artışın ciglitazonda, roziglitazon ve pioglitazondan daha fazla olduğu gözlenmiştir (José ve ark., 2007). Obez farelerde yapılan bir çalışmada, roziglitazonun bir oksidatif stres markırı olan tiobarbiturik asid-reaktif madde miktarını artırdığı ve mitokondriyal glutatyon miktarını azalttığı gözlenmiştir. Artmış ROÜ oluşumu ve oksidatif stres roziglitazonun kompleks I üzerine inhibitör etkisi ile açıklanmıştır (Inmaculada ve ark., 2007).

TZD'lere maruz bırakılan glioma hücrelerinin, protonları iç mitokondri membranına taşıyarak ROÜ üretiminde azalmaya neden olan triflorometoksi karbonil siyanid fenil hidrazon ile inkübasyonu ROÜ oluşumunu tamamen inhibe etmiştir (José ve ark., 2007). Bu gözlem, TZD'lere bağlı ROÜ'nin kaynağının mitokondri elektron transport zinciri olduğunu göstermektedir. TZD'lerin lipofilik yapısı, mitokondri membranında birikmelerine izin vermektedir (Brunmair ve ark., 2004). Mitokondriyal solunum zincir aktivitesindeki bozulma, zincir içerisinde elektron akımını engelleyecek ve elektronlar oksijen ile direk reaksiyona girerek süperoksit radikal oluşumunu artıracaktır (Young ve ark., 2002).

Yukarıda bahsedilen çalışmaların ışığında roziglitazonun da oksidatif stresi artırarak telomer kısalmasına neden olabileceğini düşünebiliriz. Bununla birlikte, TZD'lerin ROÜ oluşumunu artırdığını gösteren bu çalışmaların aksine PPAR $\gamma$  agonistlerinin antioksidan etkili olduğunu düşündüren çalışmalar da yapılmıştır. Hayvan modellerindeki çalışmalar, TZD'lerin oksidatif stresi azaltabileceğini göstermiştir (Da Ros ve ark., 2004). Troglitazonun bir antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferolle yapısal olarak ilişkili olması ve roziglitazonun kimyasal yapısındaki fenil ve piridin halkalarının hidroksilasyonun, hidroksil radikallerinin temizlenmesini kolaylaştırabileceği ifade edilmektedir (Manning ve ark., 2008). Ayrıca RSG'nin endotel hücrelerinde Cu/Zn-SOD ve katalaz aktivitesini ve protein ekspresyonunu artırarak oksidatif stresi azaltabildiği gösterilmiştir (Bagi ve ark., 2004; Howarth ve ark., 2006).

Endotel hücrelerinde glukozun uyardığı oksidatif stresin RSG'nin 5' AMP aktive protein kinazı (AMPK) aktive etmesiyle önlediği gösterilmiştir. AMPK aktivasyonu, membrana bağlı NAD(P)H oksidazı inhibe ederek ROÜ oluşumunu azaltır. Bunu teyid etmek için PPAR $\gamma$  antagonisti kullanıldığında, RSG'nin PPAR $\gamma$  aktivasyonu önlenmiş ama antioksidan etkisi azaltılamamıştır (Ceolotto ve ark., 2007). Hiper-tansif rat (Iglarz ve ark., 2003) ve diabetik fare (Bagi ve ark.,



2004) modellerinde de RSG, NAD(P)H oksidaz aktivitesini azaltarak ROÜ oluşumunu inhibe etmiştir. PPAR $\gamma$  agonistleri birçok kardiovasküler hastalıkta da bu etkiyle oksidatif stresi azaltarak endotel fonksiyonlarını düzeltmiştir (Caballero ve ark., 2003; Howarth ve ark., 2006). Benzer olarak diabetik hayvan modellerinde pioglitazonun hiperglisemi ve hiperlipideminin uyardığı oksidatif stresi önlediği gösterilmiştir (Makino ve ark., 2006).

Bu çalışmamızda real-time Q-PCR ile relatif telomer uzunluğu ölçüldü ve rosiglitazon verilen ratlar ile verilmeyen ratlar arasında relatif telomer uzunluğu açısından anlamlı bir

fark bulunamadı. Elde ettiğimiz bu sonuç, rosiglitazonun telomer kısalmasına neden olmadığını göstermektedir. Bunun nedeni, rosiglitazonun telomer kısalmasına neden olabilecek bir oksidan hasar oluşturmaması veya bazı çalışmalarda ifade edildiği gibi antioksidan etki göstermesi olabilir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan sağlıklı ratların antioksidan savunma sistemleri de telomer hasarını önlemiş olabilir. Sonuç olarak, bu zamana kadar yapılan çalışmalar rosiglitazon ve diğer TZD'lerin net etkileri hakkında tam bir fikir vermediğinden yeni çalışmaların yapılması gerekli gibi görülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adelfalk, C., 2001. Accelerated telomere shortening in Fanconi anemia fibroblasts a longitudinal study. *FEBS Lett.* 506, 22-26
- Bagi, Z., Koller, A., Kaley, G., 2004. PPAR $\gamma$  activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, 742-748.
- Bedir, A., Aliyazicioglu, Y., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Uysal, M., Suvaci, D.E., Okuyucu, A., Kahraman, H., Hökelek, M., Alvur, M., 2008. Assessment of genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, pioglitazone. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 185-191.
- Bedir, A., Aliyazicioglu, Y., Kahraman, H., Yurdakul, Z., Uysal, M., Suvaci, D.E., Okuyucu, A., Hökelek, M., Alvur, M., 2006. Genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, rosiglitazone. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 718-724.
- Brummendorf, T.H., 2001. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood.* 97, 895-900.
- Brunmair, B., Staniek, K., Gras, F., Scharf, N., Althaym, A., Clara, R., 2004. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I. *Diabetes.* 53, 1052-1059.
- Caballero, A.E., Saouaf, R., Lim, S.C., Hamdy, O., Abou-Elenin, K., O'Connor, C., Logerfo, F.W., Horton, E.S., Veves, A., 2003. The effects of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the endothelial function in early and late type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Metabolism.* 52, 173-180.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I., Stoppani, A.O., 1997. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 248-257.
- Cawthon, R.M., 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, 47.
- Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., Kerber, R.A., 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 361, 393-395.
- Ceolotto, G., Gallo, A., Papparella, I., Franco, L., Murphy, E., Iori, E., Pagnin, E., Fadini, G.P., Albiero, M., Semplicini, A., Avogaro, A., 2007. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2627-2633.
- Cherif, H., Tarry, J.L., Ozanne, S.E., Hales, C.N., 2003. Ageing and telomeres: A study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res.* 31, 1576-1583.
- Da Ros, R., Assaloni, R., Ceriello, A., 2004. The preventive antioxidant action of thiazolidinediones: A new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance. *Diab. Med.* 21, 1249-1252.
- De Lange, T., Shiue, L., Myers, R.M., Cox, D.R., Naylor, S.L., Killery, A.M., Varmus, H.E., 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10, 518-527.
- Dumortier, P., 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 361-373.
- Elsa, B.A., James, P.K., 2004. Dissociation of oxidant production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands from cell death in human cell lines. *Radical Biol. Med.* 37, 36-47.
- Evans, M.D., Cooke, M.S., 2004. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bio. Essays.* 26, 533-542.
- Feinstein, D.L., Spagnolo, A., Akar, C., Weinberg, G., Murphy, P., Gavriluyk, V., Dello, R.C., 2005. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochem. Pharmacol.* 70, 77-188.
- Gale, E.A., 2006. Troglitazone: The lesson that nobody learned? *Diabetologia.* 49, 1-6.
- Golubovskaya, V.M., Filatov, L.V., Behe, C.I., Presnell, S., Hooth, M.J., Smith, G.J., Kaufmann, W.K., 1999. Telomere shortening, telomerase expression and chromosome instability in rat hepatic epithelial stem-like cells. *Mol. Carcinog.* 24, 209-217.
- Grommes, C., Landreth, G.E., Heneka, M.T., 2004. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol.* 5, 419-429.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W., 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345, 458-460.
- Hastings, R., Li, N., Lacy, P.S., Patel, H., Herbert, K.E., Stanley, A.G., Williams, B., 2004. Rapid telomere attrition in cardiac tissue of the ageing wistar rat. *Exp. Gerontol.* 39, 855-857.
- Howarth, A.G., Wiehler, W.B., Pannirselvam, M., Jiang, Y., Berger, J.P., Severson, D., Anderson, T.J., Triggle, C.R., 2006. A nonthiazolidinedione peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist reverses endothelial dysfunction in diabetic (db/db/-) mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 364-370.
- Iglarz, M., Touyz, R.M., Amiri, F., Lavoie, M.F., Diep, Q.N., Schiffrin, E.L., 2003. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelium-dependent hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 45-51.
- Inmaculada, G.R., Rodriguez-Juan, C., Diaz-Sanjuan, T., Martinez, M.A., Munoz-Yague, T., Solis-Herruzo, J.A., 2007. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob Mice. *Hepatology.* 46, 414-423.
- Jennings, B.J., Ozanne, S.E., Dorling, M.W., Hales, C.N., 1999. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *FEBS Lett.* 448, 4-8
- José, M.P., Tranque, P., Burgos, M., Vaquero, C.F., Llopis, J., 2007. Glitazones induce astroglia cell death by releasing reactive oxygen species from mitochondria: Modulation of cytotoxicity by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 72, 407-417.

- Kawanishi, S., Oikawa, S., 2004. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1019, 278-284.
- Kipling, D., Cooke, H.J., 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature.* 347, 400-402.
- Makarov, V.L., Hirose, Y., Langmore, J.P., 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell.* 88, 657-666.
- Makino, H., Miyamoto, Y., Sawai, K., 2006. Altered gene expression related to glomerulogenesis and podocyte structure in early diabetic nephropathy of db/db mice and its restoration by pioglitazone. *Diabetes.* 55, 2747-2756.
- Manning, P.J., Sutherland, W.H., Walker, R.J., Williams, S.M., de Jong, S.A., Berry, E.A., 2008. The effect of rosiglitazone on oxidative stress and insulin resistance in overweight individuals. *Diabetes Res. Clin. Pr.* 81, 209-215.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R., 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6622-6626.
- Narayanan, P.K., Hart, T., Elcock, F., Zhang, C., Hahn, L., McFarland, D., Schwartz, L., Morgan, D.G., Bugelski, P., 2003. Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: A flow cytometric assessment. *Cytometry A.* 52, 28-35.
- Oikawa, S., Kawanishi, S., 1999. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* 453, 365-368.
- Oikawa, S., Tada-Oikawa, S., Kawanishi, S., 2001. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry.* 40, 4763-4768.
- Perez-Ortiz, J.M., Tranque, P., Vaquero, C.F., Domingo, B., Molina, F., Calvo, S., Jordan, J., Cena, V., Llopis, J., 2004. Glitazones differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Biol. Chem.* 279, 8976-8985.
- Petersen, S., Saretzki, G., Von Zglinicki, T., 1998. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 239, 152-160.
- Prowse, K.R., Greider, C.W., 1995. Developmental and tissue-specific regulation of fare telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4818-4822.
- Rubelj, I., Vondracek, Z., 1999. Stochastic mechanism of cellular aging – abrupt telomere shortening as a model for stochastic nature of cellular aging. *J. Theor. Biol.* 197, 425-438.
- Samani, N.J., 2001. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet.* 358, 472-473
- Son, N.H., Murray, S., Yanovski, J., Hodes, R.J., Weng, N., 2000. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity fortelomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J. Immunol.* 165, 1191-1196.
- Suzui, N., Yoshimi, N., Kawabata, K., Mori, H., 1999. The telomerase activities in several organs and strains of rats with ageing. *Lab. Animals.* 33, 149-154.
- Von Zglinicki, T., 1995. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: A model for senescence? *Exp. Cell Res.* 220, 186-193.
- Von Zglinicki, T., 2000. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 64-74.
- Von Zglinicki, T., 2000. Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab. Invest.* 80, 1739-47
- Von Zglinicki, T., 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27, 339-344.
- Wai, L.K., 2004. Telomeres, telomerase, and tumorigenesis. *Med.Gen.Med.* 6, 19.
- Yamaguchi, Y., Nozawa, K., Savoysky, E., Hayakawa, N., Nimura, Y., Yoshida, S., 1998. Change in telomerase activity of rat organs during growth and aging. *Exp. Cell Res.* 242, 120-127.
- Young, T., Cunningham, C.C., Bailey, S.M., 2002. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: Studies using myxothiazol. *Arch. Biochem. Biophys.* 405, 65-72.
- Zijlmans, J.M., Martens, U.M., Poon, S.S., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ward, R.K., Lansdorp, P.M., 1997. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of TA2AG3 repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 742.