



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ISIRGAN OTU (URTICA DİOİCA) EKSTRESİNİN
KOLON KANSERİ HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK, ANTİPROLİFERATİF VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fettah KORKMAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr.Oya Sena AYDOS

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ISIRGAN OTU (URTICA DİOİCA) EKSTRESİNİN
KOLON KANSERİ HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK, ANTİPROLİFERATİF VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fettah KORKMAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr.Oya Sena AYDOS

2010- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından


Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 15/10/2010


Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

Gazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Başkanı


Doç. Dr. Aslıhan AVCI

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı


Raportör


Prof. Dr. Asuman SUNGURUĞLU

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı


Yrd. Doç. Dr. O. Sena AYDOS

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Önsöz	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	V
Şekiller	IX
Çizelgeler	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Isırgan otu (<i>Urtica dioica</i>)	1
1.1.1. Genel Bilgi	1
1.1.2. Kimyasal Bileşenleri	1
1.1.3. İçerdiği Bileşenlerin Onkolojik Bakımdan Önemi	5
1.1.4. Isırgan otunun Halk Hekimliğinde Kullanımı	5
1.1.5. Isırgan otunun Medikal Önemi ve Etkileri	6
1.2. Kanser	14
1.2.1. Genel Bilgi	14
1.2.2. Kolorektal Kanserler ve Kolon Karsinogenezinin Moleküler Mekanizması	15
1.2.3. İnflamasyon ve Kolon Kanseri	18
1.2.4. Siklo-oksijenaz-2 (COX-2) ve Kolorektal Kanserler	19
1.2.5. NF-KB ve Kolorektal Kanserler	22
1.3. Apoptoz	24
1.3.1. Apoptoz Yolakları	25
1.3.2. Apoptoz Mekanizmasını Kontrol Eden Yolak ve Proteinler	27
1.3.3. Apoptoz Yolak Modülatörlerini Hedefleyen Ajanlar	29
1.3.4. Kanserli Hücrelerde Apoptoz	30
1.3.5. Tedavide Apoptoz	32
1.4. <i>Urtica dioica</i>'nın Onkoloji Açısından Önemi	33
2. MATERYAL VE YÖNTEM	35

2.1. Materyal	35
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Hücre Serilerinin Kültürü	35
2.2.2. Isırgan otu (<i>Urtica dioica</i>) Ekstresinin Hazırlanışı	35
2.2.3. Hücre Canlılığının Tespiti (Hücre Proliferasyonunun Ölçülmesi)	36
2.2.4. Apoptoz Tayini	36
2.2.5. Antioksidan Enzim Düzeylerinin Ölçülmesi	37
3. BULGULAR	38
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
ÖZET	57
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	71

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında kanser için yeni alternatif tedavilere ışık tutulması amaçlanmaktadır. Türkiye’de halk arasında sağaltıcı etkisine olan inanç nedeniyle yaygın olarak kullanılan antioksidan ve flavonoidler bakımından zengin olan ısırgan otunun, insan kolon kanseri hücre serilerindeki antiproliferatif etkisi ve alternatif tedavi aracı olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasının yapılmasını onaylayan Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetimine ve tez çalışmasının yapıldığı Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının tüm olanaklarının en iyi şekilde kullanılmasını sağlayan çalışmam sırasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU’na sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden faydalanma fırsatı bulduğum, çalışmalarımda bana sabırla yol gösteren tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Oya Sena AYDOS’a teşekkür eder, şükranlarımı arz ederim.

Ayrıca bu tez çalışması sırasında her zaman yanımda olup yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı asistanı Tülin Özkan’a, diğer asistanlar ve çalışanlarına da teşekkür ederim.

Tez verilerinin statiksel değerlendirmesini yapan Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. S. Kenan KÖSE’ye, tez çalışması için gerekli kimyasal analizlerin yapılmasına verdikleri katkılarından ve bilgilerinden dolayı Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalına ve Başkanlığına da sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında bana moral olarak destek olan anneme, babama, eşime, oğlum ve kızıma sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACF	Aberrant crypt foci
ADA	Adenozin Deaminaz
ALP	Alkaline phosphatase, bir karaciğer enzimi
ALT	Alanine aminotransferase, bir karaciğer enzimi
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AST	Aspartate aminotransferase, bir karaciğer enzimi
<i>Apaf-1</i>	<i>Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1 (Apoptotic protease activating factor)</i>
B16	Mouse melanoma tümör hücre serisi
Bak	Bacille Calmette–Guérin
Bax	BCL-2-associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukaemia 2 ailesi proteinleri
BHA	Bütil hidroksianizol (Butylated hydroxyanisole), bir yapay antioksidan
BHT	Bütil hidroksitoluen (Butylated hydroxytoluene) , bir yapay antioksidan
Bid	Proapoptotic Bcl-2 family member
Bim	Proapoptotic Bcl-2 family member
BPH	İyi huylu prostat genişlemesi (Benign prostatic hypertrophy)
CAC	Kolit-temelli kanser (Colitis-associated cancer)
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease
CAT	Katalaz (Catalase)
CCl ₃	Karbon triklorit(Carbon trichloride), reaktif bir serbest radikal
CCl ₄	Karbon tetraklorit (Carbon tetrachloride), hepatotoksik bir kimyasal
COX-1	Siklooksijenaz (Cyclooxygenase) 1
COX-2	Siklooksijenaz 2
Cyt	Sitokrom
Cyt P450	Sitokrom P450, Faz-I enzimi
Cyt b5	Sitokrom b5, Faz-I enzimi

Cyt P450 R	NADPH- sitokrom P450 redüktaz
cyt b5 R	NADH- sitokrom b5 redüktaz
DART TOF-MS	D irect A nalysis in R eal T ime' 'a time-of-flight' - 'mass spectrometer' (Bitki ve ekstrelerdeki kimyasal bileşenleri atmosfer basıncında, sample hazırlamadan veya işlemsiz hızlı ve doğru olarak tanımlamayı sağlayan bir kimyasal karakterizasyon analizi yöntemi, kütle spektrometrisi için iyonizasyon kaynağı) (Roschek ve ark., 2009)
DIABLO	Direct IAP (inhibitors of apoptosis) binding protein with low PI
DISC	Ölüm-başlatan sinyal kompleksi (Death Inducing Signaling Complex)
DTD	DT-diaforaz, bir hepatik biyotransformasyon enzim sistemi
DPPH	1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl serbest radikali
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzimbağımlı immünoabsorbent assayi (Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay)
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESR	Electron Spin Resonance spectroscopy
FADD	Fas-associated death domain protein
FAP	Familial adenomatous polyposis
FAP-1	Fas-bağılantılı fosfataz-1, bir Fas-engelleyici (associated) protein
Fas	(CD95/APO-1) TNF reseptör ailesinden bir hücre yüzeyi "ölüm reseptörü"
FasL	Fas Ligandı
FasR	Fas Reseptörü
FLIP	FLICE (caspases-8)-inhibitory proteini, bir ölüm domeyni proteini
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş (reduced) glutasyon
GSK-β	Glikojen sentaz kinaz-β
GST	Glutasyon S-transferaz
H	Histon
HeLa	Human epithelial carcinoma tümör hücre serisi

HETE	Hidroksieikozatetraenoik asit
HLA	Human hepatoma tümör hücre serisi
HNPCC	Hereditary non-polyposis kolon kanseri
hPCPs	Human primary culture of the prostate stromal compartment
HPGDS	Hematopoitik Prostaglandin D2 Sentaz
HPLC	H igh P erformance L iquid C hromotography
IAP	I nternal A ctivator of P rotease, mitokondriden gelen ikinci kaspaz aktifleyicisi
IBD	Ateşli bağırsak hastalığı (i nflammatory b owel d isease)
IC ₅₀	Enzim aktivitesinin % 50'sini önlemek için gerekli konsantrasyon değeri (i nhibition c oncentration)
ICAD	I nhibitor of the c aspase- a ctivated d eoxyribonuclease
IEC	Intestinal epithelial cells
IFN	Interferon
IKB	Inhibitor of <i>KB</i>
IKK	<i>IKB</i> kinaz
IL	Interleukin
Kaspaz	cysteine aspartyl protease (Caspase)
KB	Human epidermoid carcinoma tümör hücre serisi
KRK	Kolo-rektal kanser
LDH	Laktat dehidrogenaz
LNCaP	Lymph node carcinoma of the prostate
LOX	Lipooksijenaz
ME-20	% 20'lik metanolik ısırgan otu ekstresi
MDA	Malondialdehit
MMP	Matrix metalloproteinase
MNU	N-Metil-N-Nitroso-Ürea
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	<i>3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit</i>
NF- <i>KB</i>	Nükleer faktör-kappa B
NK	Natural killer cells

NSAID	Steroid-olmayan anti-inflamatuvar ilaçların (Non Steroid Anti Inflammatory Drugs)
oxoG	7,8-dihidro-8-oksoguanin
PI3K	Fosfatidilinozitol (phosphatidylinositol) 3 kinaz
PKC	Protein kinaz C
PPAR	Peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör
ROS	ROT
ROT	Reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species (ROS))
RNI	Reactive nitrogen intermediates
RNT	Reaktif nitrojen türleri
SHBG	Sex hormone binding globulin (cinsiyet hormonu bağlanan globulin)
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SOD	Süperoksit dismutaz
TAS	Total antioksidan durumu
TCA	Trikloroasetik asit
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF	Tumor necrosis factor
UDA	<i>Urtica dioica agglutinine</i> , bir çeşit lektin
UDCA	Ursodeoxycholic asit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XO	Ksantin Oksidaz, purin metabolizmasında purin yıkımının bir göstergesidir

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Isırgan otu tüyü toksinlerinin UV spektrası. (Fu ve ark., 2006).	2
Şekil 1.2.	450nm de ısırgan otu yaprağının HPLC karotenoid profili (Guil-Guerrero ve ark., 2003).	4
Şekil 1.3.	Alkilasyon, oksidasyon ve radyasyon ile Guanin modifikasyonları (Watson ve ark., 2008)	10
Şekil 1.4.	Hücre proliferasyonu ve apoptoz dengesi.	14
Şekil 1.5.	Kolon kanseri evreleri (http://www.healthkey.com/healthwise/media/medical/nci/cdr0000415501.jpg)	15
Şekil 1.6.	Kolorektal kanser (KRK)'in mekanizması ve kolit-bağlantılı kanserin gelişimi (Terzic ve ark., 2010).	18
Şekil 1.7.	Ekstrinsik ve intrinsic apoptoz yolları (Ghobrial ve ark., 2005).	25
Şekil 1.8.	p53, NF-KB, yubikütin/proteozom Sistemi, ve PI3K Yolağı ile Ekstrinsik ve İntrinsic Apoptoz Yolları Kontrolü (Ghobrial ve ark., 2005).	28
Şekil 1.9.	Normal ve kanserli kolon epitel hücrelerinde Fas-kontrollü apoptoz. FasL (Fas ligandı), FasR (Fas Reseptörü), (O'Connell ve ark., 2000).	31
Şekil 1.10.	Fas-karşıtağı (O'Connell ve ark., 2000).	31
Şekil 2.1.	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) assayı; MTT 'nin Formazana indirgenmesi.	36
Şekil 3.1	%1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonda ısırgan otu ekstresinin HCT 116 p53 -/- kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi.	40
Şekil 3.2	%1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonda ısırgan otu ekstresinin HCT 116 p53 +/+ kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi.	40

- Şekil 3.3** HCT 116 p53 $+/+$ kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propodium iyodür ile işaretlenmiş hali.(AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans) **41**
- Şekil 3.4** HCT 116 p53 $-/-$ kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propodium iyodür ile işaretlenmiş hali. (AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans) **41**
- Şekil 3.5** HCT 116 p53 $-/-$ kolon kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu ile görünüşü. **42**
- Şekil 3.6** HCT 116 p53 $-/-$ kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propodium iyodür ile işaretlenmiş hali. (AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans) **42**
- Şekil 3.7** HCT 116 p53 $+/+$ kolon kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu ile görünüşü. **43**
- Şekil 3.8** HCT 116 p53 $+/+$ kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propodium iyodür ile işaretlenmiş hali.(AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans). **43**

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Isırgan otunun temel kimyasal içeriğinde bulunan bileşikler listesi (Taylor, 2005).	1
Çizelge 1.2. Isırgan otu yaprak ekstresinde, DART TOF-MS kimyasal karakterizasyon analizi ile belirlenmiş 100 bileşik (Roschek ve ark., 2009).	3
Çizelge 1.3. U. dioica tohumu ve yağındaki yağ asitleri (Kan ve ark., 2009).	4
Çizelge 1.4. Isırgan otunun halk hekimliğinde kullanıldığı rahatsızlıklar (Koç 2002; Şimsek ve ark., 2004; Gülçin ve ark., 2004; Gürhan ve ark., 2004; Kültür, 2007).	5
Çizelge 1.5. Isırgan otu ekstresinde bulunan anti-inflamatuvar ve anti-allerjik bileşikler (Roschek ve ark., 2009).	8
Çizelge 1.6. Isırgan otundaki anti-inflamatuvar /anti-allergen bileşenler ve hedef noktaları (Ayers ve ark., 2008, Roschek ve ark., 2009).	9
Çizelge 1.7. Kolo-rektal karsinogenezde olaylar, temel kimyasal-önleme hedefleri ve ajanları (Das ve ark., 2007).	19
Çizelge 1.8. U. dioica tohumu yağ asitlerinin COX ve LOX inhibitör aktiviteleri (Jia, 2003).	21
Çizelge 3.1. HTC 116 P53 +/+ hücre serilerinde enzim aktiviteleri.	38
Çizelge 3.2. HTC 116 P53 -/- hücre serilerinde enzim aktiviteleri.	39

1. GİRİŞ

1.1. Isırgan otu (*Urtica dioica*)

1.1.1. Genel Bilgi

Isırgan otu *Urtica dioica* L., *Urticaceae* (nettle) ailesinden uzun ömürlü bir ottur. Yaprakları ve gövdesi yakıcı tüylerle kaplanmış, tohumlu, çoğunda sütsü öz bulunmayan, basit yapraklı ve yabancı tozlaşma gösteren, küçük çiçekli, ılıman bölgelerde yetişen yabancı bir bitkidir. Aynı bitki üzerinde yaprak koltuklarında meydana gelen çiçekler ya erkek ya da dişidir. Kök ve tohumdan çoğalır, yavaş yayılır ve yıl boyunca sürekli olarak bulunur. Isırgan otu her iki yarım kürenin tropik ve subtropik bölgelerinde yetişmektedir. *Urtica*, “yakmak” anlamına gelen Latince “*urere*” kelimesinden gelmektedir. *Dioica* kelimesi “iki evli” demektir. Isırgan otunun yakıcı tüyelerine dokunulduğunda asetilkolin, histamin ve 5-hidroksitriptamin (serotonin) salmasından dolayı (Fu ve ark., 2006) yakıcı etki gösterir ve adı da buradan gelmektedir (Ayan ve ark., 2006).

1.1.2. Kimyasal Bileşenleri

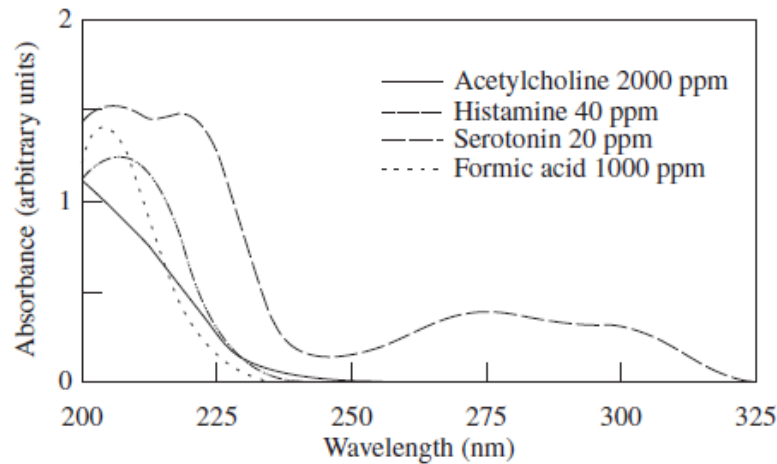
Çizelge 1.1. Isırgan otunun temel kimyasal içeriğinde bulunan bileşikler listesi (Taylor, 2005).

• Alkoloidler,	• Kafeik Asit,	• Neoolilivil,
• Asetilkolin,	• Karbonik Asit,	• Palmitik Asit,
• Asetofenon,	• Klorofil (yüksek oranlarda)	• Pantotenik Asit,
• Astragalin,	• Klorojenik Asit,	• Quersetin,
• Butirik Asit,	• Kolin,	• Quinik Asit,
• Folasin,	• Kopropiridin,	• Skopoletin,
• Formik Asit,	• Ksantofil,	• Serotonin,
• Fridelin,	• Kumarik Asit,	• Stesteroller,
• Histamin,	• Lignanlar,	• Stigmasterol,
• Lesitin,	• Linoleik Asit,	• Suksinik Asit,
• Lektinler, <i>Urtica dioica</i>	• Linolenik Asit,	• Terpenler,
• <i>Agglutinin</i> (UDA)		• Violaksantin,
• Kaemferoller,		

Isırgan otu; potasyum tuzları, vitamin C, polisakkaritler, lignanlar, formik asit, yüksek oranlarda klorofil, flavonoidler, steroller, enzimler, fenilpropanlar, kumarinler, terpenoidler ve köklerinde küçük molekül ağırlıklı bir lektin olan *Urtica dioica aglutinin* (UDA) içermektedir (Gözüm ve ark 2003; Akbay ve ark., 2003; Ayan ve ark., 2006). Isırganın toprak üstü bölümü ‘quercetin-3-O-glucoside’, ‘kaempferol-3-O-rutinoside’ ve ‘isorhamnetin-3-O-glucoside’ içermektedir (Akbay ve ark., 2003). *U. dioica* çiçeği yüksek oranda fenol ve flavonoid içermektedir (Mandal ve ark., 2009).

1.1.2.1. Yaprakların İçerdiği Bileşenler

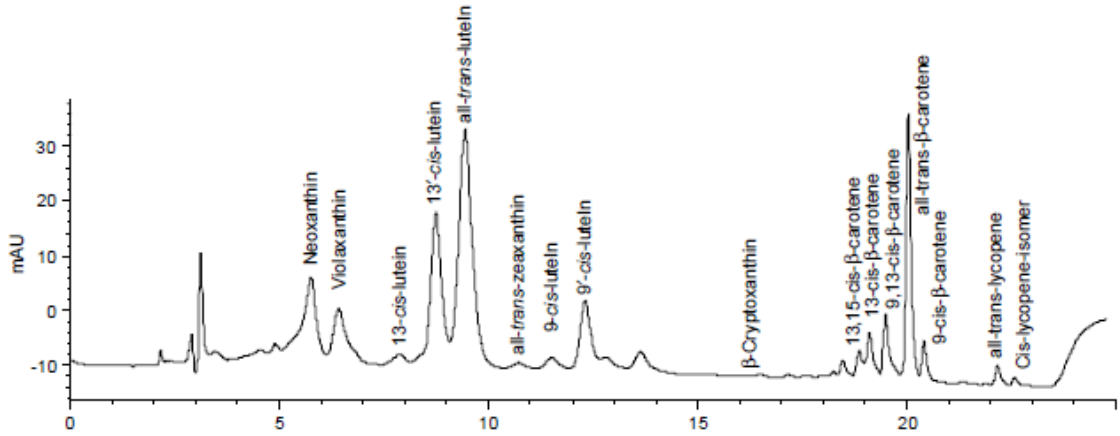
Wetherilt (1989)’ un bildirdiğine göre bitkinin yaprakları 14.4 mg/100g α -tocopherol, 0.23 mg/100g riboflavin, 13 mg/100g demir, 0.95 mg/100g çinko, 873 mg/100g kalsiyum, 75 mg/100g fosfor, ve 532 mg/100g potasyum içermektedir. Ayrıca K, C, B1, B5 vitaminleri ve provitamin A, ürtisin glikozidi, sistosterin, sepi maddeleri ve ksantofil içerir (Koç, 2002). Yaprak yüzeyinde bulunan yakıcı tüylerinde formik asit, histamin, serotonin ve kolin bulunmaktadır (Şekil 1.1) (Fu ve ark., 2006). Isırgan otu yaprakları mineraller, klorofil, amino asitler, lesitin, karetenoidler (Şekil 1.3), flavonoidler, steroller, taninler ve vitaminlerce zengindir (Taylor, 2005).



Şekil 1.1. Isırgan otu tüyü toksinlerinin UV spektrumu. (Fu ve ark., 2006).

Çizelge 1.2. Isırgan otu yaprak ekstresinde, DART TOF-MS kimyasal karakterizasyon analizi ile belirlenmiş 100 bileşik (Roschek ve ark., 2009).

Bileşiğin Adı	Ölçülen Kütle	Nispi Bolluk (%)	Bileşiğin Adı	Ölçülen Kütle	Nispi Bolluk (%)
aminobutyric asit	104.0712	19.4027	1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ene	201.0927	1.7105
1,4-benzoquinone	109.0304	5.6214	4-aminoantipyrine	204.1046	3.3994
2-acetylpyrrole	110.0661	9.1518	4-methyl-7-ethoxykumarin	205.0775	23.7605
resorcinol	111.0536	9.5431	Carvylacetate	209.1562	13.1682
6-azacytosine	113.0467	31.2587	Flavan	211.1169	2.1584
creatinine	114.062	6.2286	Harmine	213.1023	1.9492
proline	116.0706	3.4373	vitamin B5	220.1107	3.1573
levulinic asit	117.0551	38.5861	pantothenic asit	220.1107	3.1573
Indole	118.0597	3.0894	1,2-O-isopropylidene-D-glucoside	221.107	4.382
L-threonine	120.0583	1.3511	Hydrocotarnine	222.1122	6.8038
acetophenone	121.0661	6.5386	Flavones	223.0708	0.9831
vitamin B3 (niacinamide)	123.0582	4.2889	6-benzylaminopurine	226.1141	2.7388
pyrogallol	127.047	19.4107	Carnosine	227.1129	3.3847
leucine	132.1008	4.7604	Kavain	231.1032	1.6417
glutaric asit	133.0504	19.6285	Dihydrokavain	233.1186	1.9648
2-deoxy-D-ribose	135.0566	1.3173	Harmol	235.1107	3.455
adenine	136.0633	49.4889	isopropyl-β-D-thio-galacto-pyranoside	239.0939	0.9677
anisaldehyde	137.0664	10.9016	Phosphatidylcholine	243.1153	2.7201
tyrosol	139.0812	6.4353	6-aminochrysene	244.1076	8.621
histidinol	142.0903	4.2666	Osthole	245.0978	6.9901
3-hydroxy-2,3 dihydromaltol	145.0536	14.7854	4-shogaol	249.126	1.5636
nonanol	145.1654	0.634	Pterostilbene	257.1251	2.8696
galactal	147.0665	7.4541	1,2,5,6-di-O-iso propylidene	261.1266	2.8952
cinnamide	148.082	2.0246	Lotaustralin	262.1355	2.575
hydroxycinnamaldehyde	149.0549	9.1354	abscisic asit	265.137	1.6699
chitosan	150.0821	9.813	Adenosine	268.107	11.7278
ribose	151.0693	4.5401	3,4-dimethoxychalcone	269.124	3.4104
anthranilic asit methyl ester	152.0755	7.5959	podocarpic asit	275.172	3.8764
adonitol/arabitol	153.079	8.4557	Homatropine	276.1514	2.762
4-deoxypyridoxine	154.0905	7.7181	linolenic asit	279.2302	0.974
diphenyl	155.0777	4.8341	Piperine	286.139	2.132
methylkumarin	161.0618	1.0294	Isopilosine	287.1357	2.4398
L-2-aminoadipic asit	162.0799	4.2859	7-shogaol	291.1887	4.1135
levoglucosan	163.0628	100	Pukateine	296.1367	0.7118
eugenol	165.0855	8.4339	Convolvamine	306.1629	1.7648
phenylalanine	166.0922	10.241	Bioallethrin	313.2726	12.8033
synephrine	168.0994	32.6556	8-dehydrogingerdione	319.1892	1.5626
2,3-dimethoxyhydroquione	171.066	0.8038	incensole oxide	323.2634	0.949
shikimic asit	175.062	10.1962	deoxyharringtonine	330.1772	1.1885
DL-a aminopimelic asit	176.0905	5.3511	Carnosol	331.1828	1.885
cinnamyl acetate	177.0838	4.0369	integerrimin	336.1791	0.7261
dimethyl-L-tartrate	179.0593	3.0288	10-gingerdione	349.2333	2.1386
glucosamine	180.0902	35.5968	incensole oxide acetate	365.2665	0.9937
coniferyl alcohol	181.0892	21.0621	9-amino-camptothecin	368.156	0.5496
mannitol	183.0873	6.8052	eleutheroside B	373.1404	0.1661
n-acetyl-L-glutamine	189.0821	2.7638	cholecalciferol	385.3388	3.0758
4-methylmethoxykumarin	191.0687	0.7431	Solanidine	398.3456	4.7657
carvacryl acetate	193.1216	8.4651	mogroside backbone (-3H ₂ O)	423.3612	4.7064
ferulic asit	195.0668	1.1773	alpha-tocotrienol	425.3518	8.6566
DL-a-methyl-m-tyrosine	196.0951	4.9624	hecogenin	431.317	0.9077




Şekil 1.2. 450nm de ısırgan otu yaprağının HPLC karotenoid profili (Guil-Guerrero ve ark., 2003).

1.1.2.2. Köklerinin İçerdiği Bileşenler

Isırgan otu kökleri izolektin karışımı ($\frac{1}{4}$ UDA=*Urtica dioica agglutinine*) (% 0.2–0.6), polisakaritler (asidik arabinogalaktan, 2 glukolar, 2 glukogalakturonanlar), steroller (3- β -sitosterol, hidroksi-sitosterol ve onların glukozitleri), skopoletin (kumarin), dimerik fenilpropan-lignanlar (neo-olivil, sekoizolarisirezinol ve onların asetil- ve glukozitleri, dehidrodikoniferil alkol, ve izolarisirezinol, 3,4-divanilliltetrahidrofuran), fenilpropanlar (homovanillilalkohol ve onun 4'-O-glukozit'i), fenoller (p-hidroksi-benzaldehit), seramitler, triterpenoik asitler, monoterpdioller ve glukozitleri, ve yağ asitlerini içermektedir (Taylor, 2005; Chrubasik ve ark., 2007).

Çizelge 1.3. *U. dioica* tohumu ve yağındaki yağ asitleri (Kan ve ark., 2009).

	Yağ asitleri	Yağ asitlerinin
	(Fatty acids)	yüzdesi
	Palmitic	12.52±0.24
	Stearic	7.52±0.17
	Oleic	34.93±0.71
	Linoleic	44.29±0.48
	Eicosanoic	1.09±0.07

Kuru ısırgan otu % 18 protein, % 14.5-17 albüminli madde, % 2.5 yağlı madde ve tohumları % 8-10 civarında sabit yağ içerir (Çizelge 1.3). 1 kg taze bitki 130 mg C vitamini, 730 mg karoten ve oksalat içerir. Külü ise % 6.3 demirtrioksit, silisyum, potasyum, kalsiyum içerir (Koç, 2002).

1.1.3. İçerdiği Bileşenlerin Onkolojik Bakımdan Önemi

Isırgan otunun içerdiği bileşenlerden lektin UDA (Jordinson ve ark., 1998; Mody ve ark., 1995; Sames ve ark., 2001; De Mejia ve ark., 2005; Chrubasik ve ark., 2007), genel olarak lignanlar olarak bilinen bifenolik bileşiklerden Sekoizolarisirezinol (Prasad, 2000; Taylor, 2005; Danbara ve ark., 2005; Saarinen ve ark., 2005; Chrubasik ve ark., 2007; Murray ve ark., 2007; Jin ve ark., 2009; Johnsen ve ark., 2010), Eugenol (Kaur ve ark., 2006), benzoquinone (Roschek ve ark., 2009; Martinez ve ark., 2005), 7- β - hydroxysitosterol (Prostate Cancer Fund, 2007; Chaurasia ve ark., 1987; Roussi ve ark., 2005; Hovenkamp ve ark., 2007), bir omega-3 yağ asiti olan Linolenik ve Linoleik Asitler gibi gerekli yağ asitleri (Kelley ve ark., 2007; Prostate Cancer Fund, 2007; Rochfort ve ark., 2008; Kan ve ark., 2009), C, B1, B3, B5, A, K vitaminleri (Habu ve ark., 2004), bütirat gibi kısa zincirli yağ asitleri (Das ve ark., 2007; Tong ve ark., 2005; Hofseth, 2008), bir amino asit türevi olan Betaine (tri-methyl glycine) (Rochfort ve ark., 2008), karotenler (carotene) (Koç, 2002; Guil-Guerrero ve ark., 2003), Likopen (lycopene) (Guil-Guerrero ve ark., 2003; Kune ve ark., 2006; Tang ve ark., 2008; Tang ve ark., 2009), ksantin (xanthin), lutein (Guil-Guerrero ve ark., 2003), Kalsiyum (Das ve ark., 2007) ve Çinko (Prostate Cancer Fund, 2007) potansiyel antikanserojen maddelerdir.

1.1.4. Isırgan otunun Halk Hekimliğinde Kullanımı

Çizelge 1.4. Isırgan otunun halk hekimliğinde kullanıldığı rahatsızlıklar (Koç 2002; Şimsek ve ark., 2004; Gülçin ve ark., 2004; Gürhan ve ark., 2004; Kültür, 2007).

• Kanser,	• Hemorhoid
• Böbrek Rahatsızlığı	• Egzama
• Böbrek taşı düşürme	• Artritlik ağrılar
• İdrar söktürme	• (Gut) Gout
• Öksürük ve Solunum Yolları rahatsızlıkları	• Siyatik
• Tüberküloz	• Nöralgi
• Saç dökülmesini önleme ve kepeğe karşı	• Kadın hastalıkları (Burun ve uterus kanamaları, aşırı menstruasyon)
• Felç	• Tansiyon
• Hazmın kolaylaştırılması	• Şeker hastalığı
• Mide ağrısı	• Müshil olarak
• Romatizma	• Ateş düşürücü
• Kemik erimesi	• Bağırsak parazitlerini düşürücü
• Mantar Enfeksiyonları	• Sarılık
	• Kalbin kuvvetlenmesi

Isırgan otunun kök, gövde, yaprak, çiçek ve tohumları herbal ilaçların yapımında kullanılmaktadır. *U. dioica* halk hekimliğinde yukarıdaki hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

1.1.5. Isırgan otunun Medikal Önemi ve Etkileri

Isırgan otunun literatürde belirlenmiş etkileri aşağıda listelenmiştir:

- Antioksidan (Özen ve ark., 2003; Trouillas ve ark., 2003; Gülçin ve ark., 2004; Mavi ve ark., 2004; Toldy ve ark., 2005; Cetinus ve ark.,2005; Martinez ve ark., 2005; El Haouari ve ark., 2006; Çelik ve ark., 2007; Tello ve ark., 2008; Toldy ve ark., 2009)
- Antiinflamatuvar (Obertreis ve ark.,1996; Riehemann ve ark., 1999; Randall ve ark., 1999; Klingelhofer ve ark., 1999; Randall ve ark., 2000; Trouillas ve ark., 2003; Martinez ve ark., 2005)
- Antiproliferatif (Trouillas ve ark., 2003; Martinez ve ark., 2005; Abu-Dahab ve ark., 2007)
- Antiallerjenik (Roschek ve ark., 2009)
- Antikanser (Martinez ve ark., 2005; Rochfort ve ark., 2008)
- Kanser tedavisinde kemopreventif (Suh ve ark., 1995; Durak ve ark.,2004)
- Bağışıklık sistemi uyarıcısı/modülatörü (immunemodulator) (Klingelhofer ve ark., 1999; Fijalek ve ark., 2003; Galelli ve ark.,1995; Akbay ve ark., 2003; Harput ve ark., 2005)
- Lenfositlerin proliferasyonunu teşvik edici (Wagner ve ark., 1989; Harput ve ark., 2005)
- UDA ile T-hücreleri mitojeni (Galelli ve ark., 1993)
- Antihiperglisemik (antihyperglycemic) (El Haouari ve ark., 2006)
- Anti-mikrobik; Antibakteriyel ve Antifungal (Broekaert ve ark., 1989; Lerner ve ark., 1992; Uzun ve ark., 2004; Aksu ve ark., 2004; Gülçin ve ark., 2004; Martinez ve ark., 2005; Türker ve ark., 2008; Kelet ve ark., 2001; Kan ve ark., 2009)
- Antiviral (Balzarini ve ark., 1992; Ertürk ve ark.,1999; Bedoya ve ark., 2002; Balzarini ve ark., 2005; Manganelli ve ark., 2005; Martinez ve ark., 2005; Turville ve ark 2005; El Haouari ve ark., 2006; Meer ve ark.,2007)
- Antiparamezyum (Chrubasik ve ark., 2007)
- Insektisidal (Lerner ve ark., 1992)

- Hipokolesterolemik (Nassiri ve ark, 2009)
- Antiplatelet/ antitrombojenik (antitrombik) (Martinez ve ark., 2005; El Haouari ve ark., 2006; Rochfort ve ark., 2008)
- Astringent, antianemik (El Haouari ve ark., 2006)
- Antiülser (Gülçin ve ark., 2004; El Haouari ve ark., 2006)
- Kardiyovasküler (Testai ve ark., 2002)
- Diüretik ve natriüretik (Tahri ve ark., 2000; Treasure, 2003; El Haouari ve ark., 2006)
- Tansiyon düşürücü (hipotensif) (Tahri ve ark., 2000; El Haouari ve ark., 2006)
- Antidiyabet (Newall ve ark., 1996; Ziyat ve ark., 1997; Bnouham ve ark., 2003; Farzami ve ark., 2003; Martinez ve ark., 2005)
- Antiromatizmal (Obertreis ve ark., 1996; Riehemann ve ark., 1999; Randall ve ark., 1999)
- Ağrı kesici (analjezik) (Gülçin ve ark., 2004; Yongna ve ark., 2005; El Haouari ve ark., 2006)

U. dioica'nın bu etkileri yapısında bulunan çok sayıda flavanol glikozitleri vasıtasıyla gerçekleştirdiği belirtilmektedir (Fijalek ve ark., 2003; Akbay ve ark., 2003; Martinez ve ark., 2005; Tanakol, 1998).

1.1.5.1. *Anti-İnflamatuvar Etkileri*

Isırgan otu ekstresinde bulunan '4-shogaol', 'piperine', '8-dehydrogingerdione', 'deoxyharringtonine' ve 'carnosol'ün *in vitro* anti-inflamatuvar aktivitelere etki eden temel fonksiyonel biyoaktifler olduğu belirlenmiştir. Bu aktivitelere

1. *Histon (H)1 reseptörünün inaktivasyonu ve önlenmesi*, böylece histamin üretim ve salınımı önlenmiş olur;
2. *Triptazın önlenmesi*, böylece mast hücrelerinin degranülasyonu önlenir ve sonra da allerji semptomlarına da sebep olan pro-inflamatuvar aracılarının, kemokinlerin (chemokines) ve sitokinlerin (cytokines) salınımı engellenmiş olur;
3. *Siklooksijenaz (COX) -1 ve -2'nin önlenmesi*, böylece prostaglandin sentezi engellenmiş olur; '4-shogaol', 'deoxyharringtonine' ve 'carnosol' etki eden temel biyoaktiflerdir.

4. *Hematopoietik Prostaglandin D2 Sentaz (HPGDS)'in önlenmesi*, böylece özellikle Prostaglandin D2 üretimi engellenmiş olur. Prostaglandin D2 allerjik rhinitiste temel bir pro-inflamatuvar araçtır.

Çizelge 1.5. Isırgan otu ekstresinde bulunan anti-inflamatuvar ve anti-allerjik bileşikler
(Roschek ve ark., 2009).

Bileşik Adı	Molekül Ağırlığı (M)	Kimyasal Sınıfı
Resorcinol	110.037	fenol
Levoglucason	162.053	sakkarit
Isopropyl-b-D-thio-galactopyranoside	238.088	sakkarit
Leucine	131.095	amino asit
DL-methyl-m-tyrosine	195.09	amino asit
Proline	115.063	amino asit
Levulinic asit	116.047	fatty asit
Shikimic asit	174.053	fenolic asit
Synephrine	167.095	alkaloid
Adenine	135.055	alkaloid
Threonine	119.058	alkaloid
6-azacytosine	112.039	alkaloid
Piperine	285.137	alkaloid
deoxyharringtonine	329.163	alkaloid
4-shogaol	248.121	fenol
8-dehydrogingerdione	318.183	fenol
carosol	330.183	fenol
Phosphatidylcholine	242.115	fosfolipit
osthole	244.11	kumarin
4-methyl-7-ethoxykumarin	204.079	kumarin
Vitamin B3 (nicotinamide veya niacinamide)	122.048	vitamin
Vitamin B5	219.111	vitamin

Resorcinol ve Vitamin B3 de yukarıdakiler kadar güçlü olmasa da COX-1 ve COX-2'yi engelleyen diğer biyoaktiflerdir. Shikimic asit gibi polifenolikler kadar gingeroller, özellikle 4-shogaol ve 8-dehydrogingerdione da inflamasyon inhibitörleridir. Tyrosine amino asidinin mast hücreleri tarafından salınan özel allerjenleri emdiği ve ektrede bulunan DL-methyl-m-tyrosinin vücuttaki histamine ve Prostaglandin D2 gibi iç (endogenous) allerjenlerin yükünü hafiflettiği gösterilmiştir. 4-methyl-7-ethoxykumarin ve osthole gibi kumarin (coumarin) türevleri de anti-inflamatuvar ve anti-allerji birimlerine katkı sağlamaktadır (Roschek ve ark., 2009).

Isırgan otunun inflamasyondaki etkisi, Nükleer Faktör kappa B (NF-KB) aktivasyonundaki önleyici etkisine bağlıdır (Riehemann ve ark., 1999; Randall ve ark., 2000) ve immünomodülatör olarak etki eder (Klingelhofer ve ark., 1999).

Çizelge 1.6. Isırgan otundaki anti-inflamatuvar /anti-allergen bileşenler ve hedef noktaları (Ayers ve ark., 2008, Roschek ve ark., 2009).

Etken Madde	Hedefi
Nicotinamide (B3 vitamini)	COX-1/COX2/H1-receptor
Synephrine	H1-receptor
Adenine	PGDS
Vitamin B5	PGDS
DL-methyl-m-tyrosine	H1-receptor
Osthole	Tryptase/H1-receptor
4-shogaol	H1-receptor

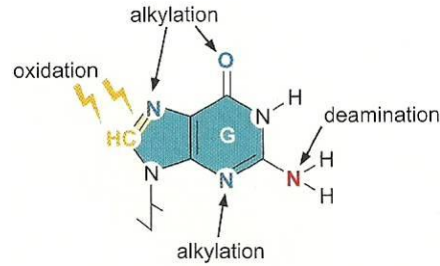
1.1.5.2. *Antioksidan Etkileri*

1.1.5.2.1 Radikaller ve Oksidasyon

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) aktif oksijen ve nitrojeninin çeşitli formlarıdır. Bu formlar superoksit iyonları ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil (OH^{\bullet}) ve nitrik oksit radikalleri (NO^{\bullet}) gibi serbest radikalleri, ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrous asit (HNO_2) gibi serbest olmayan-radikal türlerini içerir. ROT ve RNT canlılarda çeşitli metabolik işlemlerle oluşturulurlar. Normal aerobik solunum, uyarılmış polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar, ve peroksizomlar hücreler tarafından üretilen oksidanların çoğunun temel iç (endogenous) kaynakları olarak belirmektedir. Dış (exogenous) kaynaklar ise sigara, iyonize radyasyon, organik çözücüler ve böcek zehirlerini içermektedir (Mavi ve ark.,2004; Kanter ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2007).

ROT normal fizyolojik konsantrasyonlarda hücrel aktiviter için gerekli iken, yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilir ve oksidatif strese yol açabilir. Gereğinden fazla üretildiğinde, ROT doku hasarına sebep olur, doku hasarı da ROT üretimine sebep olur. Serbest radikaller lipid peroksidasyonuna sebep olur. Oksidasyon sadece lipitlere etki etmez. ROT ve RNT mutasyonlara yol açan DNA hasarına sebep olabilir. Bunlar büyük hücrel birimlerin hasarına neden olabilir ve kanserin birçok formu, kardiyovasküler hastalıklar, kalp hastalıkları, damar sertliği (arteriosclerosis), diabetes melitus, malarya, sonradan kazanılmış bağışıklık bozukluğu sendromu, felç (stroke) ve yaşlanma gibi 100 den fazla hastalık ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Mavi ve ark., 2004; Kanter ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2007; Chrubasik ve ark., 2007).

Guanin'in oksidasyonu ile 7,8-dihidro-8-oksoguanin (oxoG) üretilir (Şekil 1.3). OxoG, adenin ve sitozin ile baz çifti oluşturabilmesinden dolayı oldukça mutajendir. Replikasyonda adenin ile baz çifti oluşturduklarında G:C den T:A transversiyonuna sebep olur. Bu insan kanserlerinde yaygın olarak bulunan bir mutasyondur (Watson ve ark., 2008).



Şekil 1.3. Alkilasyon, oksidasyon ve radyasyon ile Guanin modifikasyonları (Watson ve ark., 2008)

1.1.5.2.2 Antioksidan Savunma Sistemleri

Bütün aerobik organizmalar antioksidan savunma sistemleri ve enzimlerine sahiptir (Kanter ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2007). Antioksidanlar, serbest radikallerin etkisini nötralize edebilmektedirler. Normal sağlıklı durumlarda vücutta üretilen antioksidanlar serbest radikallere karşı vücudu savunmada rol oynarlar. Ancak bu doğal antioksidan mekanizma yeterli olmayabilir. Hastalık durumunda tıbbi bitkiler gibi diğer kaynaklardan gelen antioksidanlar etkili tedavi için gereklidir. Bütile hidroksianizol (BHA) ve bütile hidroksitoluen (BHT) gibi yapay antioksidanların yan etkileri bilinmediğinden, antioksidanlarca zengin besinlerin alınması önemlidir. Bol antioksidanlı besinlerin tüketilmesi ile hastalıkların ortaya çıkma olasılığı ters orantılıdır (Mavi ve ark.,2004; Kanter ve ark., 2005; Kulkarni ve ark., 2006).

Wistar ratları ile yapılan bir çalışmada, ısırgan otu takviyesinin serebellum ve 'frontal loptaki' serbest radikallerin konsantrasyonlarını düşürdüğü belirlenmiştir (Toldy ve ark., 2005). Antioksidan vitaminler (A, C ve E), antioksidan enzimler (katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), ve glutatyon redüktaz (GR)), seruloplazmin gibi antioksidan sistemler hücreleri lipid peroksidasyona karşı korur. *U.*

dioica lipit peroksidasyonu düşürür. *U. dioica* ekstresi antrum (forestomach) da glutasyon S-transferaz (GST), SOD ve CAT aktivitesini, ve akciğerlerde de SOD ve CAT aktivitesini indüklemeye etkilidir (Özen ve ark., 2003; Kanter ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2007).

Bitki kullanımının önleyici potansiyeli aşağıdaki maddelerin miktarını ölçerek hesaplanır:

- Serum markır enzimleri: Aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, kreatin fosfokinaz, asit fosfataz, alkalın fosfataz, laktat dehidrogenaz (LDH)
- Antioksidan savunma sistemleri: İndirgenmiş (reduced) glutasyon (GSH), glutasyon reduktaz (GR), SOD, glutasyon-S-transferaz (GST), CAT
- Lipit peroksidasyon düzeyi: Malondialdehit (MDA)

Faz-I enzimleri (sitokrom P450 (cyt P450), sitokrom b5 (cyt b5), NADPH- sitokrom P450 redüktaz (cyt P450 R) NADH- sitokrom b5 redüktaz (cyt b5 R)) ve **faz-II** enzimleri (GST ve DT-diaforaz (DTD)) hepatic biyotransformasyon enzim sistemleridir. *U. dioica* bazı hepatic biyotransformasyon enzim sistemleri ve antioksidan enzimlerin aktivasyonunu etkili bir şekilde ayarlamaktadır. LDH ve MDA aktivitelerini düşürmesi *U. dioica*'nın hücre düzeyinde herhangi bir hasara yol açmadığını göstermektedir (Özen ve ark., 2003; Çelik ve ark., 2007). cyt P450 karsinogenezle ilgili bir enzimdir (Martinez ve ark., 2005).

Sitokrom (Cyt) P450'nin, çoğu "xenobiotic" bileşiğin salgılanmasını kontrol eden oksidatif aktivitede önemli bir rolü vardır. Cyt P450 sistemini içeren mikrozomlardaki detoksifikasyon reaksiyonunda, elektron NADPH yada NADH'dan bir sitokrom P450 R veya sitokrom b5 R flavoproteini yoluyla cyt P450 ve cyt b5'nin farklı izomorfik faktörlerine akar gider. Kritik bir detoksifikasyon enzimi olan GST çeşitli sitotoksik, mutajenik ve karsinojen kimyasallara karşı korunmayı indüklemektedir. DTD'nin indüklenmesi çoğu antikarsinojen maddenin potansiyelini tanımlamak için bir araçtır. *U. dioica* farelerde karaciğerde GST ve DTD aktivitelerinde önemli yükselmelere sebep

olmakta ve önmide (forestomach) da bu enzimlerin aktivitelerini indüklemektedir. *U. dioica* antioksidan savunma sistemlerini ayarlayarak oksidatif stresin etkisini azaltabilir. Kanserin antioksidan enzimler ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir (Özen ve ark., 2003).

Karsinojen trikloroasetik asit (TCA), MDA konsantrasyonunu yükselterek, serum marker enzimlerini yükselmekte ve oksidatif sistemde iniş çıkışlara neden olmaktadır. *U. dioica* sulu ekstresi TCA'ya maruz bırakılan farelerde önemli bir kimyasal koruyucu etki göstermiştir (Çelik ve ark., 2007).

Bir diğer çalışmada, N-Metil-N-Nitroso-Ürea (MNU) tatbikiyle meme kanseri oluşturulmuş farelerde ısırgan otu, artan MDA düzeyini düşürmekte ve total antioksidan durumu (TAS) düzeyini de yükselterek koruyucu etki göstermektedir (Tello ve ark., 2008).

Nitric oxide (NO) inflamasyonu ortaya çıkaran ve şiddetlendiren bir serbest radikaldir. NO/RNT oranının inflamasyon ve kanserojenizde önemli rolü bulunmaktadır. Kronik seviyede yüksek NO/RNT oranı nitrasyon, nitrozilasyon, nitrozasyon, ve oksidasyon gibi çeşitli kimyasal işlemlere yol açar (Hofseth, 2008). Isırgan otu sulu ekstresi T lenfositlerinin proliferasyonunu seçici olarak uyarmakta ve inflamatuvar makrofajlarda NO üretimini önlemektedir (Harput ve ark., 2005).

Karbon tetraklorit (Carbon tetrachloride (CCl₄)) hepatotoksik bir kimyasal maddedir. CCl₄ toksisitesinin nedeni reaktif serbest radical CCl₃'tür. Bu radikaller hepatik sitokrom (cytochrome) P450 tarafından oluşturulmaktadır. Aktif ara birimler lipit peroksidasyonununa ve hücre zarlarında bozulmalara sebep olur. *U. dioica*, CCl₄-tatbik edilen farelerde lipit peroksidasyonunun ve karaciğer enzimlerinin seviyelerini düşürmüş, ve antioksidan savunma sisteminin aktivitesini yükseltmiştir. Ayrıca CCl₄-tatbikinin indüklediği kilo kaybını da önlemiştir. *U. dioica* polar ekstresi e (+)-neoolivil, (-)-secoisolariciresinol, dehydrodiconiferyl alcohol, isolariciresinol, pinosresinol, ve 3,4-divanillyltetrahydrofuran lignanlarını içermektedir ve anti-inflamatuvar etki

göstermektedir (Kanter ve ark., 2005). Secoisolariciresinol glukozit ürünlerinin anti-oksidadif özellikleri tanımlanmıştır (Prasad, 2000; Jin ve ark., 2009).

Son yıllardaki beslenme ve besin bilimi araştırmaları potansiyel antioksidan etkili bitki ürünleri üzerine dikkati çekmektedir (Trouillas ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda ısırgan otu ekstresinin total antioksidan aktivitesinin, α -tokoferol (Musette ve ark 1996), BHA, BHT ve kuersetin (Gülçin ve ark., 2004) gibi güçlü antioksidandan bile daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Heber ve arkadaşlarının bir çalışmasında (2002) karotenoidler arasındaki sıralamada Likopenin en potansiyel antioksidan olduğu saptanmıştır.

likopen > α -tokoferol > α -karoten > β -criptoksanin > zeaksantin= β -karoten > lutein

Karotenoid karışımının tek bileşikten daha etkili olduğu da saptanmıştır. Likopen yada lutein varlığında bu sinergistik etkinin daha çok güçlü olduğu da belirtilmektedir. Isırgan otu karotenoidlerce de zengindir (Koç, 2002). Guil-Guerrero ve ark. bildirdiğine göre (2003) ısırgan otu değişik lutein, karoten, ksantin ve likopen izomerlerini içermektedir (şekil 1.3).

İnsan diyetindeki ve tıbbi bitkilerdeki antioksidan ve flavonoid kaynakların araştırılması gereken önemli konular arasındadır. Fenolik bileşiklerin ve özellikle flavonoidlerin kanserin görölme sıklığını azalttığı yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Nicodemus ve ark., 2001; Adom ve ark.,2003).

Peroksidasyon radikal olmayan birinden bir elektron çeken bir reaktif radikal ile başlatılan bir zincir reaksiyondur. Böylece bir radikal normale dönerken aynı zamanda yeni bir radikal oluşur ve reaksiyon devam eder. Fenollerin varlığında, fenoller bir elektronlu hidrojen verir ve radikal ortamdaki uzaklaştırılmış olur. Yeni oluşun phenoxy radikal rezonans stabilite nedeniyle önceki radikalden daha kalıcıdır. Bu şekilde zincir reaksiyonlar yavaşlatılabilir. Metanollü (methanolic) ekstreler sulu ekstrelerden daha çok apolar bileşik içerir. Bileşiğin polaritesinde düşüş, peroksidasyonun olduğu apolar

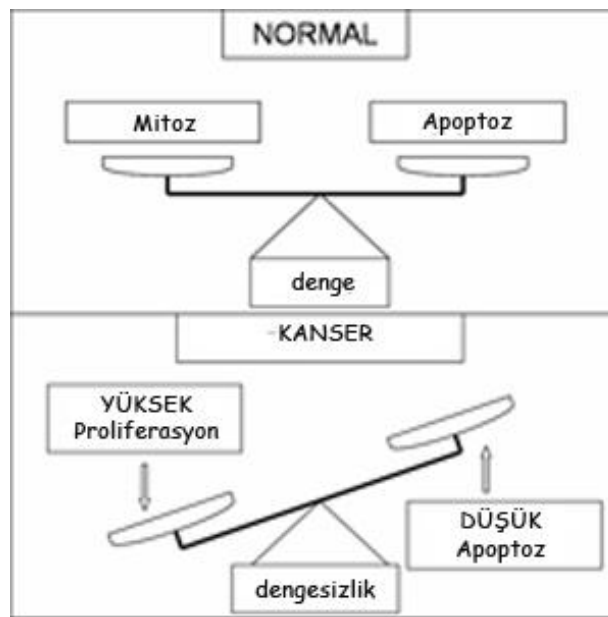
fazda bileşimin solubilitesinde bir yükselmeye sebep olur. Bu nedenle, metanollü ekstraktler sulu ekstraktlerden daha fazla antioksidan etkiye sahiptir (Mavi ve ark.,2004).

1.2. Kanser

1.2.1. Genel Bilgi

Anormal doku kütleleri olarak bilinen ‘tümör’ yada ‘ur’, hücreler olması gerekenden daha çok bölündüğünde veya gerektiği halde ölmediğinde ortaya çıkar. Neoplazm olarak ta bilinen bu tümörler iyi huylu (*benign* = kanser olmayan) veya kötü huylu (*malignant* = kanser) olabilirler. Bu duruma karsinojen kimyasal maddeler, radyasyon, DNA veya RNA tümör virüsleri neden olabilir.

Sağlıklı bir hücrenin büyümesi etrafını saran doku tarafından salınan özel büyüme faktörleri ile yönetilir. Buna rağmen, kanser hücreleri ya bu büyüme faktörleri olmaksızın büyür ya da kendileri bu faktörleri yaparlar. Kanser hücrelerinin çoğu kendilerini besleyecek yeni kan damarlarının oluşumunu tetikleyebilmektedir.

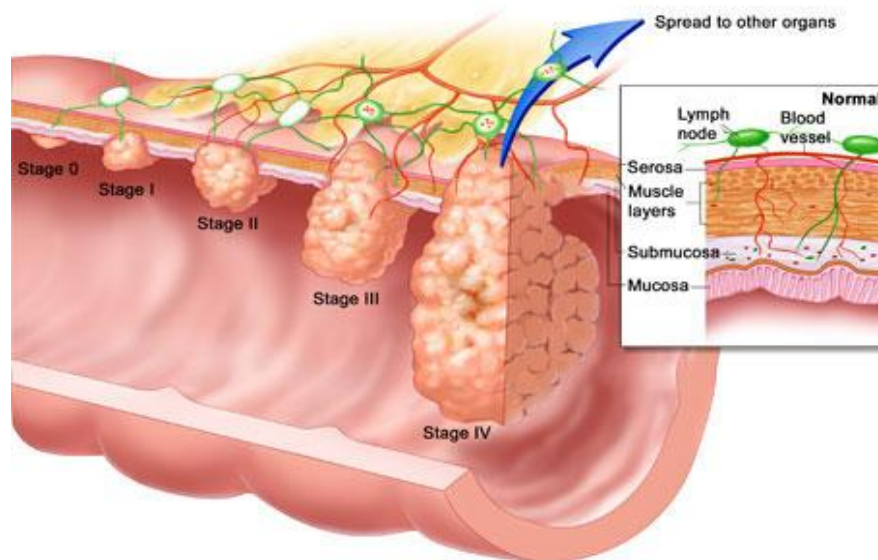


Şekil 1.4. Hücre proliferasyonu ve apoptoz dengesi.

Kanser hücrelerinin proliferasyon hızı çok yüksektir. Kontrol dışı hücre çoğalması ve komşu dokulara invazyon özelliği gösteren kanser hücreleri, kan ve lenf sistemi yoluyla vücudun diğer bölümlerine yayılabilir. Birkaç temel kanser çeşidi vardır. Karsinoma deride veya iç organlar boyunca uzanan veya onları kaplayan dokularda görülen kanserdir. Sarkoma kemik, kıkırdak, yağ, kas, kan damarları, veya diğer bağ veya destek dokuda başlayan kanserdir. Lösemi kan oluşturan kemik iliği gibi dokularda başlar ve yüksek rakamlarda anormal kan hücreleri üretilir ve dolaşıma girer. Lenfoma ve myeloma savunma sistemi hücrelerinde başlayan kanserdir. Merkezi sinir sistemi kanserleri beyin ve omurilik dokularında başlar.

1.2.2. Kolorektal Kanserler ve Kolon Karsinogenezinin Moleküler Mekanizması

Dünya genelinde her sene 1 milyondan fazla yeni kolorektal kanser (KRK) durumu teşhis edilmektedir. KRK dünyada en sık görülen üçüncü kanser ve dördüncü en yaygın kanserden ölüm sebebidir (Terzic ve ark., 2010). KRK özellikle sanayi ülkelerinde yaygın olarak görülen ve kanser ölümlerinde ikinci en büyük sebebi oluşturan kanser türleridir (Magrini, 2002; Terzic ve ark., 2010; Langdon, 2004).



Şekil 1.5. Kolon kanseri evreleri
(<http://www.healthkey.com/healthwise/media/medical/nci/cdr0000415501.jpg>)

Kolon kanseri sporadik, kalıtsal veya “inflamatuvar bowel” hastalığı temellerine bağlı olabilir. Önceden KRK geçmişi olan hastalar da yüksek risk altındadır (Terzic ve ark., 2010; Jasperson ve ark., 2010).

KRK durumlarının sadece % 20’si familial temellere dayanmaktadır. ‘Familial adenomatous polyposis’ (FAP), ‘hereditary non-polyposis kolon kanseri’ (HNPCC) ve diğer daha seyrek görülen sendromlar gibi kalıtsal KRK sendromlarında ya tümör engelleyici genlerde (FAP taki APC geni) ya da DNA yanlışleşme tamir fonksiyonu ile ilgili genlerde (HNPCC’de hMSH gen grubu) kalıtsal genetik mutasyonlar vardır. Kolarektum boyunca geniş bir alanda yayılmış olarak bulunan bu genetiği bozuk hücreler büyüme kontrolünde değişikliğe yol açar ve böylece belirli bir sayıda polip (polyp) gelişir. FAP’da ana kusur tümör baskılayıcı gende olduğu için, yüzlerce polipe yol açan bir çok klonal proliferasyon alanı vardır fakat sıradaki kanser transformasyonu hızlanmaz. Diğer taraftan HNPCC’de, DNA tamir genlerinde bir hata vardır ve bu abnormal gen havuzlu hücre kolonilerinin artarak çoğalması ile sonlanır ve polip formasyonu ile ilgili olmasa bile kanser transformasyonunu hızlandırır (Das ve ark., 2007; Terzic ve ark., 2010).

Bununla birlikte KRK durumlarının büyük bir oranı kalıtılabilir genetik değişikliklerden daha çok çevresel sebeplerle ilgilidir. Risk faktörleri çevresel ve besin kaynaklı mutajenleri, özel bağırsak kommensalleri ve patojenleri, ve tümör gelişiminden önce gelen kronik bağırsak inflamasyonunu içermektedir (Das ve ark., 2007; Terzic ve ark., 2010; Jasperson ve ark., 2010). Bir kaç onkogenin aktivasyonunu ve iki ya da daha fazla kanser baskılayıcı geninin kaybını içeren genetik bozukluklar kanser gelişimi için yeterlidir (Langdon, 2004).

Kolorektal karsinogenez ile ilgili genler fonksiyonlarına göre iki gruba bölünebilir (Langdon, 2004):

1. Hücre sinyal yollarında içerilen genler: APC, K-ras ve DCC gibi
2. Genomik stabiliteyi sürdürmede içerilen genler: p53 ve yanlışleşme tamir genleri gibi

Bir tümör engelleyici gen olan APC'deki mutasyonlar sporadik kolorektal kanserlerdeki ilk olaylardır ve "familial adenomatous polyposis" in temelini oluşturur.

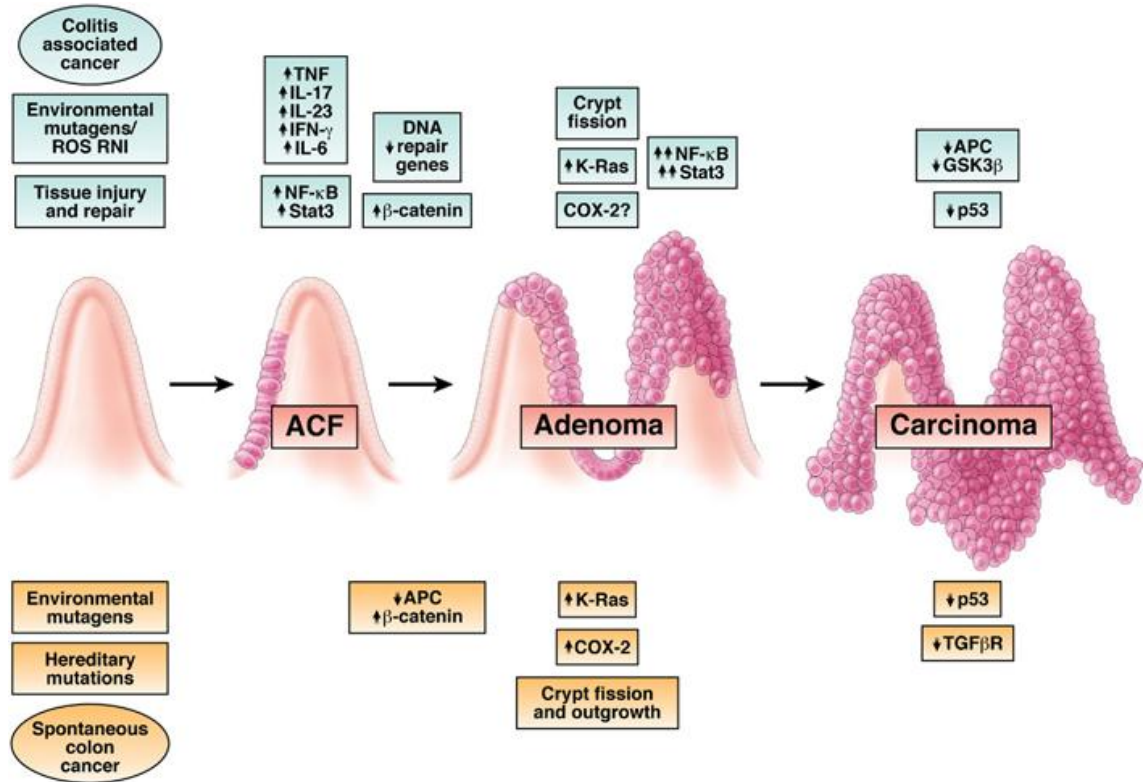
hMSH2, hMLH1, hPMS1,hPMS2, ve hMSH6 gibi yanlışleşme tamir genlerindeki bozulmalar kalıtsal nonpolyposis kolorektal kanser hastaları ve mikrosatelit instabiliteli bazı sporadik kolorektal kanserlerden sorumludur (Jaspersen ve ark., 2010).

Kolorektal tümörlerde KRK'ye yolaçan iki temel genetik yolak belirlenmiştir:

Birinci yolak, sporadik KRK'lerin % 60-70'inde görülür, Adenomatous Polyposis Coli (APC) tümör-suppressor genindeki inaktive edici, K-ras onkojenindeki aktive edici, ve p53 tümör-suppressor genindeki inaktive edici mutasyonları içerir.

İkinci yolak, sporadik KRK'lerin geri kalan % 15-20'sinde görülür, hatalı yanlışleşme tamir sistemini içerir. Bu tamir sisteminin kaybı genomik instabiliteye ve tümör-suppressor genlerinde (Bax gibi) fonksiyon kaybına ve onkojenlerde fonksiyon kazanılmasına (β -catenin'de olduğu gibi) yol açan yüksek sayıda mutasyonların birikmesine sebep olur (Magrini, 2002; Das ve ark., 2007).

Kolit bağımlı kanser (Colitis-Associated Cancer (CAC)) ateşli bağırsak hastalığı (Inflammatory Bowel Disease (IBD)) ile ilgilidir. Tedavisi zor ve ölüm oranı yüksektir. Noninflamatuvar KRK ve CAC benzer kanser gelişim evrelerini içermektedir. IBD-bağımlı kanserin bir inflamasyon-displezya (dysplasia)-karsinoma sırasında gerçekleştiği düşünülmektedir. İnflamasyon kolon epitelindeki değişiklikler kaskadını, bu da epitel hücrelerinin apoptotik ve regeneratif aktivitelerini indüklemektedir. Kolorektal kanser (KRK)'in mekanizması ve kolit-bağımlı kanserin gelişimi Şekil 1.6.'da görülmektedir.



Şekil 1.6. Kolorektal kanser (KRC)'in mekanizması ve kolit-bağlantılı kanserin gelişimi (Terzic ve ark., 2010).

Kolorektal ve kolit bağlantılı tümörler de çeşitli bağışıklık sistemi hücreleri tarafından elimine edilmektedir. Nötrofiller (neutrophil), mast hücreleri, tabii öldürücü (natural killer (NK)) hücreler, dendritik hücreler, ve tümör-bağımlı makrofajlar doğuştan var olan bağışıklık sistemi hücreleridir. Antikanser bağışıklık kadar inflamasyon, kanser gelişimi ve tümör büyümesi için de T hücreleri gerekmektedir (Terzic ve ark., 2010).

1.2.3. İnflamasyon ve Kolon Kanseri

NO ve nitrik oksit sentazlar, NF-KB, ROT ve RNT'ler, COXs, pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler, metaller; antioksidan enzimle, peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör (PPAR) ligandları, kinazlar, büyüme faktörleri, ve tümör engelleyici proteinler, p53 ve retinoblastoma (pRb)' nın hepsi kronik inflamasyon ve kanserin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel hedeflerdir (Hofseth, 2008). Isırganotu katkısının farelerde ROT seviyesini ve NF- κ B'nin DNA'ya bağlanma aktivitesini düşürdüğü saptanmıştır (Toldy ve ark., 2009).

Çizelge 1.7. Kolo-rektal karsinogenezde olaylar, temel kimyasal-önleme hedefleri ve ajanları (Das ve ark., 2007).

Olaylar	Temel hedefler	Kimyasal-önleyici ajanlar
Normal epitel	COX reseptörü	Aspirin, steroid-olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID)
↓	EGFR	COX-2 inhibitörleri
Tipik olmayan (aberrant) crypt foci	Polyamine sentezi	EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) önleyicileri
↓	Oksidatif stres	Ornithine dekarboksilaz 2 inhibitörleri
Adenoma	Safra (Bile) asiti biyolojisi	UDCA (ursodeoxycholic asit)
↓	Siklin-bağımlı kinaz	5-aminosalisilatlar
Dysplastic adenoma	Östrojen reseptörleri	Statinler
↓	Nükleer faktör-κB	Kalsiyum ve D vitamini
KRK	Kaspaz-3	Besin lifleri
	β-Catenin	Selenyum (Selenium)
	Apoptoz	Östrojen reseptörü modülatörleri
	Epigenetik değişiklikler	Folate (folik asit)
	Genetik mutasyonlar	β-Karoten (Carotene)
		Balık yağı (omega-3 yağ asitleri)
		Resveratrol
		PPAR ligandları
		VEGF inhibitörleri

1.2.4. Siklo-oksijenaz-2 (COX-2) ve Kolorektal Kanserler

Siklo-oksijenaz-2 (COX-2) reseptörleri çoğu KRK'de sıkça bahsedilmektedir. Sadece karsinogenez değil oksidatif stres, serbest radikal temelli hasar ve "apoptozun downregulasyonu" gibi bir çok dejeneratif ve inflamatuvar yolak COX-2 reseptör ekspresyonunu yükseltmektedir (Das ve ark., 2007; Terzic ve ark., 2010). Adenomadan karsinomaya geçişte prostaglandin biyosentezinde hız sınırlandırıcı bir enzim olan COX-2 nin ekspresyonunun yükselmesi gerekir (Terzic ve ark., 2010). Bu reseptörlerin uyarılması angiyoenez, hücre proliferasyonu ve apoptozun önlenmesini de içeren fonksiyonların hücre-içi ve hücreler-arası modülasyonuna sebep olmaktadır (Das ve ark., 2007).

COX-2'nin aşırı ekspresyonu insan kolon karsinomalarının % 80'inden fazlasında görülmektedir. HT-29 kolon kanseri hücre serisi üzerinde yapılan bir çalışmada, inflamatuvar sitokin tümör nekroz faktörü (TNF)-α ile COX-2 mRNA ve protein seviyeleri 10-kattan daha fazla aktif hale getirilmiştir. Çeşitli hücre ve dokularda COX-2'nin ekspresyonu indüklemekte etkili olan belirli bir sayıda sitokin, fizyolojik stres, onkojenler, ve mitojenler tanımlanmıştır. İnflamasyon ve kanseri tedavi etmek için COX-2'ye özel inhibitörler geliştirilmiştir (Tong ve ark., 2005). Sentetik COX-2

inhibitörleri ve steroid-olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID)'ın kardiyovasküler riskleri bulunmaktadır. Örneğin, Rofecoxib kardiyovasküler trombotik olaylara sebep olmakta ve Celecoxib kullanımı tatbik edilen doza bağlı olarak kardiyovasküler sebeplerden ölümlere, miyokardiyal enfarktüse, felç veya kalp yetmezliğine sebep olmaktadır (Jia, 2003; Das ve ark., 2007).

Dexamethasone, resveratrol, ve flavonoidleri içeren belirli bir sayıda anti-inflamatuvar ve antineoplastik bileşiğin COX-2 gen ekspresyonunu engellediği gösterilmiştir (Tong ve ark., 2005).

Hayvan ve bitkilerde bulunan bazı doğal maddelerin COX-2'yi önleyici özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Curcumin ve onunla ilgili bileşikler, resveratrol ve balıkta bulunan omega-3 yağ asitleri doğal COX-2 önleyicileridir (Izzo ve ark., 2003; Das ve ark., 2007). Isırgan otunda bir omega-3 yağ asiti olan Linolenik asit bulunmaktadır (Taylor, 2005; Kelley ve ark., 2007; Prostate Cancer Fund, 2007; Rochfort ve ark., 2008; Kan ve ark., 2009; Roschek ve ark., 2009). Doğal COX-2 önleyicileri güvenilir, toksik-olmayan kimyasal-önleyici ajanlardır. Ancak etkili doz ve doz sıklığı üzerinde çalışılması gerekmektedir.

Isırgan otu ekstresinde bulunan '4-shogaol', 'deoxyharringtonine', 'carnosol', 'resorcinol' ve Vitamin B3 ve diğer bazı bileşenler COX-1 ve COX-2'yi engelleyebilen biyoaktiflerdir (Ayers ve ark., 2008; Roschek ve ark., 2009).

Doğal COX ve lipooksijenaz (LOX) 'dual inhibitörlerinin' inflamasyon ve kanserlerin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir rolü bulunmaktadır. İnsanlarda görülen çeşitli kanserlerde COX-2'nun aşırı ekspresyonu görülmektedir. Hayvanlarda deri, göğüs ve safra tümörlerinin tedavisinde COX-2 inhibitörlerinin etkili olduğu gösterilmiştir. COX-2'nun aşırı ekspresyonun prostaglandin E2 ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit (5-HETE)'in fazlaca üretimine sebep olduğu, bunun da apoptozu önlediği ve tümerojenik hücrelerin yayılıcı olmalarını arttırdığı gösterilmiştir. Isırganotu tohumlarında bulunan Linoleik, Oleik ve Palmitik asitler (Kan ve ark., 2009) de 'dual inhibitörlerdir', hem COX hem de LOX inhibitörleridir (Çizelge 1.8.).

Çizelge 1.8. *U. dioica* tohumu yağ asitlerinin COX ve LOX inhibitör aktiviteleri (Jia, 2003).

Yağ asitleri (Fatty acids)	IC ₅₀ (COX-1, µM)	IC ₅₀ (LOX, µM)
Linoleik asit	13.3	27.9
Oleik asit	58.2	36.6
Palmitik asit	67.3	>100

Isırgan otu bileşeni kumarin (coumarin)'lerden Osthole (Roschek ve ark., 2009), flavonler (Roschek ve ark., 2009) ve Kaamferol (Taylor, 2005) gibi flavoneller de potansiyel COX ve LOX 'dual inhibitörü'dür.

Urtica dioica L.'deki aktif bileşenlerden bir diğeri olan romatizma (reumatoid arthritis) tedavisinde de kullanılan Klorojenik asitin de IC₅₀ = 83 µM ile 5-LOX ve IC₅₀ = 38 µM ile COX yolağına karşı moderate etki gösterdiği saptanmıştır. Bununla beraber , diğeri bir bileşen Kafeik asitin ise COX yolağına karşı hiç bir etki göstermezken, 5-LOX (IC₅₀ = 200 µM) yolağına karşı zayıf bir inhibitör etki gösterdiği rapor edilmektedir (Jia, 2003).

Bütirat da TNF-α indüklü COX-2 aktivasyonunu engellemektedir. Bütirat, HT-29 hücrelerinde TNF-α indüklü COX-2 aktivasyonunu engellemektedir. Bütirat, exon 1'den 2'ye Polimeraz II elongasyonunu engelleyerek c-myc ve COX-2 genlerinin aktivasyonunu baskılamaktadır. Bütirat ve trikostatın (tricostatin) A gibi histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin COX-2 transkripsiyonunu engelleyebildiği saptanmıştır ve kanser hücrelerinin proliferasyonu önleyebileceği düşünülmektedir (Bordonaro ve ark., 1999; Tong ve ark., 2005). Bütirat NF-KB aktivasyonunu da önlemektedir (Hofseth, 2008).

Isırgan otu gibi besinlerdeki liflerin ve nişastanın kolondaki bakteriler tarafından fermentasyonu ile, kolonositler (colonocytes) için önemli enerji kaynaklarından birisi olan ve antikarsinojen özellik gösterdiği gözlemlenen bütirat gibi kısa zincirli yağ asitleri oluşturulur (Das ve ark., 2007). Butiratın insanda kolon hücrelerinde hidrojen peroksit ve nitrozamitlerin genotoksik aktivitesini önleyebileceği saptanmıştır. Butiratın kolon hücrelerinde glutatyon transferaz II'yi yükselttiği de saptanmıştır (Wollowski ve ark., 2001).

Radyasyon ve kemoterapi COX-2 ve prostaglandin biyosentezini indüklediğinden tümörlerdeki yükselen COX-2 aktivitesinin önlenmesi terapatik açıdan oldukça önemlidir. Isırgan otu bileşenleri bu bakımdan da oldukça faydalı görünmektedir (Aggarwal ve ark., 2006).

Bu bilgiler de göstermektedir ki ısırgan otu kanserin önlenmesi veya tedavisinde etken olma potansiyeline sahip değişik bileşenler içermektedir. Bazıları ‘seçici COX-2 inhibitörü’ ve bazıları da ‘COX ve LOX dual inhibitörleri’ özelliği göstermektedir (Jia, 2003). Bu çalışmada bu bileşenlerin beraber olarak etkinliğini, sulu ekstralarını HCT 116 p53(+/+) ve HCT 116 p53(-/-) hücre serilerine uygulayarak çalıştık.

1.2.5. NF-KB ve Kolorektal Kanserler

Transkripsiyon faktörü NF-KB bir dimerdir; altbirimlerin her kombinasyonu farklı genlerin düzenlenmesinde içerilir. 5 alt birim bulunur: p105/p50, p100/p52, RelA (p65), c-Rel, ve RelB. Bunlar sitoplazmada öncü (precursor) olarak veya özel inhibitörler, KB inhibitor proteinleri (IKB), ile inaktif halde bulunurlar (Terzic ve ark., 2010).

Tümör gelişimine yardımcı olan sitokin (cytokine)’lerin çoğu NF-KB transkripsiyon faktörleri aracılığıyla aktif hale getirilir veya öncü kanser (prealignant) hücrelerde ve immün/inflamatuvar hücrelerinde NF-KB sinyalleşmesini aktif hale getirir. NF-KB’nin kolorektal ve kolitis-bağımlı tümörögenizde belirgin bir rolü vardır. Kolorektal ve kolitis-bağımlı tümörlerin % 50’sinden fazlasında tipik olmayan NF-KB aktivasyonu belirlenmiştir ve fare çalışmaları da CAC gelişiminde NF-KB için bir rol biçmiştir. NF-KB’nin protümörijenik rolü klasik veya alternatif aktivasyon rotası ile başarılabilir. NF-KB’nin aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve angiogenez ile, hücre ölümünün engellenmesiyle, ve hücre istilası (invasion) ve metastazının promot edilmesiyle tümörigenezi destekleyebilir. NF-KB’nin antiapoptotik aktivitesi diğer genler paralelinde Bcl2, Bcl-xL, ve cFLIP’in aktivasyonu yoluyla düzenlenir. NF-KB’leri aktifleştirilmiş kanser hücreleri kemoterapötiklere ve iyonize radyasyona karşı

dirençlidir. NF-KB aktivitelerinin önlenmesi bu ajanlara karşı hücre duyarlılığını oldukça arttırır (Terzic ve ark., 2010).

NF-KB aktivasyonunun klasik mekanizması CAC ve KRK de olmaktadır ve 'pattern' tanıyıcı reseptörler ile ve TNF, IL-1, ve IL-17 gibi tümör-promoting sitokinleri ile sinyalleşmeyi içerir. Bu sinyal transdüksiyon yolları, 1 düzenleyici (IKK γ /NEMO) ve 2 katalitik (IKK α ve IKK β) alt birimden oluşan IKB kinaz (IKK) kompleksini aktif hale getirir. Aktifleştirilen IKK β I α B'leri fosforlaştırır, onları yübikütinasyon ve peşi sıra gelen proteazomda degradasyon için hedef haline getirir, nükleusa gitmesi ve gen transkripsiyonunu düzenlemesi için NF-KB'yi (özellikle p50/p65'yi) serbest bırakır. Alternatif yolak bir IKK α homodimeri ve p52/RelB transkripsiyon faktörlerini içerir. KRK ve CAC da, bu yolak RANKL ve lymphotoxin- β gibi sitokinler ile aktif hale getirilebilir. Uzun süreli NF-KB nükleer retensiyonu kolorektal tümörlerin % 50'sinden fazlasında bazı durumlarda kurallı olarak aktif olan STAT3 ile düzenleniyor olabilir (Terzic ve ark., 2010).

Kolorektal ya da kolitis-bağlantılı tümörlerde NF-KB veya STAT3'te aktive edici hiç bir mutasyon belirlenememiştir. Bu transkripsiyon faktörlerinin parakrin (paracrine) veya otokrin yollarında veya onların sinyal yollarının 'upstream' birimlerinin aktivasyonu üzerinde aktive edildiğini göstermektedir (Terzic ve ark., 2010).

IBD, kolon mukozası epitel ve myeloid hücrelerindeki ısrarlı NF-KB aktivasyonu ile ilişkilidir. Farelerde antisens oligonükleotidler ile RelA ekspresyonunun önlenmesi, bir sürü IBD semptomunu hafifletmektedir. Kronik, T-hücreli güdümlü kolitlerde NF-KB aktivasyonunun epitel hücrelerde değil myeloidde gerekli olduğuna inanılmaktadır, çünkü myeloid hücrelerde IKK β 'nin inaktivasyonu, IL-10-kusurlu farede bağırsak inflamasyonunu düşürmüştür. Bununla birlikte, Dekstran sodyum sülfat aktivasyonu ile indüklenen bağırsak yaralanmasına bağlı kronik kolitlerde, bağırsak epitel hücrelerindeki NF-KB aktivasyonunun koruyucu bir rolü vardır. Kronik IBD'yi tedavi etme ve hafifletme süreci kontrolünde yaygın olarak kullanılan sulfasalazine, mesalamine, glukokortikoidler ve methotraxate içeren ilaçların çoğu NF-KB ya da IKK kinazları önlemektedir. Enterositlerdeki IKK β 'nin koşullu olarak alınması, tümör

boyuna etki etmeden tümör oranını % 80 düşürmektedir, bu da NF-KB aktivasyonunun gelişme veya büyümeden ziyade tümör promasyonunun ilk evrelerinde içerildiğini göstermektedir. Epitel hücrelerdeki NF-KB hiperaktivasyonun tümör oranını arttırdığı sanılmaktadır (Terzic ve ark., 2010).

IKK β 'nin enterositlerin proliferasyonuna etki etmemesine rağmen, myeloid hücrelerde IKK β 'nin çıkarılıp alınması inflamasyon-indüklü enterosit proliferasyonunu ve kolit-bağlantılı tümörlerin inflamasyon-dürtülü büyümelerini önlemektedir. Myeloid hücrelerde (özellikle lamina propria makrofajları ve dendritik hücrelerde) NF-KB aktivasyonu öncü kanser (prealignant) enterositlerin büyüme faktörleri olarak hareket eden sitokinlerin üretimiyle sonuçlanır. TNF- α , IL-6, IL-1 β , ve IL-11 bu sitokinlerin bazılarıdır. Hastaların serum örneklerinde belirlenen TNF- α ve IL-6'nin ekspresyonu, yüksek kolorektal adenoma riski ile bağlantılıdır (Terzic ve ark., 2010).

1.3. Apoptoz

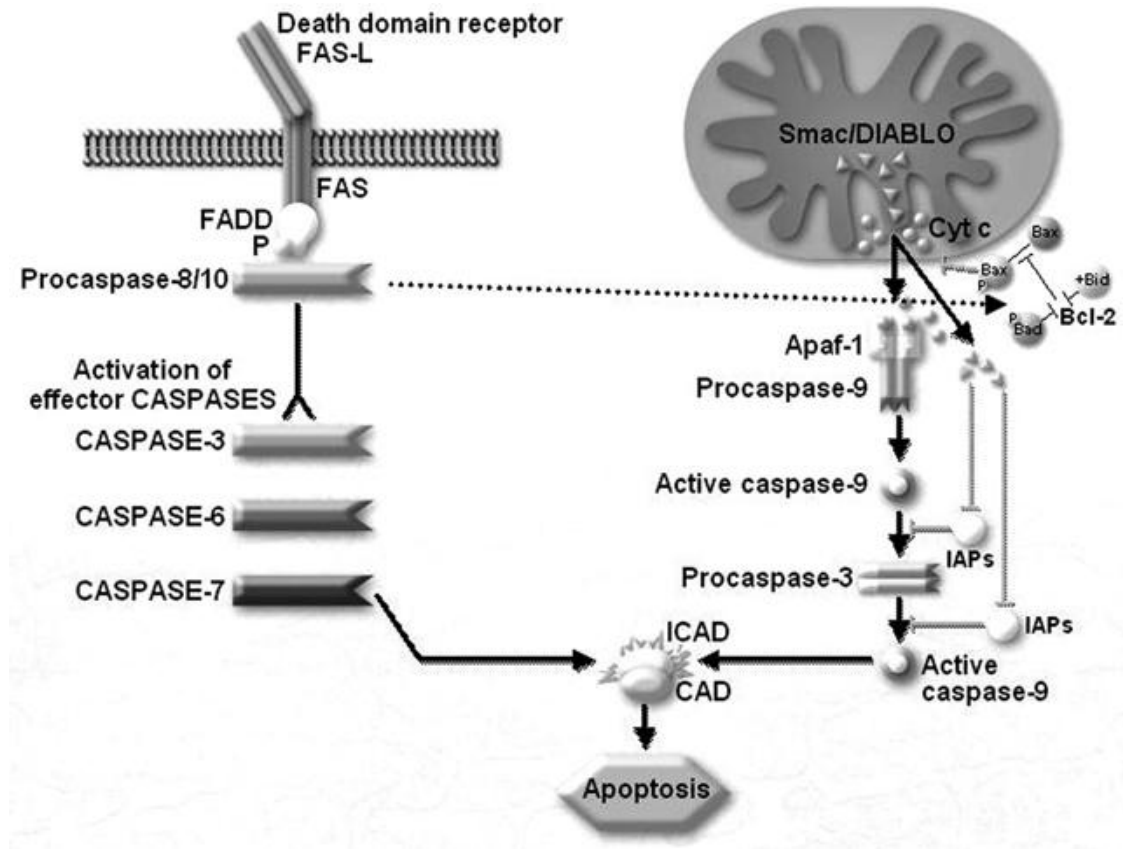
Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın sürdürülmesi, organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalandan çok hücre öldüğü ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (Lowe ve ark., 2000; Mak, 2003).

Hücre ölümünde iki temel mekanizma vardır; nekroz ve apoptoz. Dış etkilerden zarar gören hücreler nekroza, dış veya iç uyarı ile programlı intihara teşebbüse dürtülen hücreler ise apoptoza yönelirler (Ghobrial ve ark., 2005).

Apoptoz, kromozom kondensasyonu, nükleozomal DNA degradesyonu ve fragmentasyonu ile ortaya çıkan bir programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu işlem çeşitli tetikleyicilerle aktif hale getirilen ve peşi sıra gelen sinyal modüllerinde

yerleştirilen belirli bir sayıda kompleks protein tarafından kontrol edilmektedir (Ghobrial ve ark., 2005). Apoptozun bu morfolojik yapısı, Kaspaz (cysteine aspartyl protease (caspase)) protein ailesi üyelerinin aktivasyonu ile gerçekleştirilir. Hücreden arta kalanlar, fagositler veya komşu hücrelerin lizozomları ile uzaklaştırılır (Gözüaçık ve ark., 2004). Programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesi, hücre ölümünü uyarıcı ve hücre sağ kalımını sağlayan birçok farklı sinyal ileti yolağının birlikte aktivitesiyle gerçekleştirilir.

1.3.1. Apoptoz Yolakları



Şekil 1.7. Ekstrinsik ve intrinsic apoptoz yolakları (Ghobrial ve ark., 2005).

Apoptoz iki ana yolak ile gerçekleşir. Birincisi ekstrinsik veya sitoplazmik yolak, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi olan Fas ölüm reseptörü yoluyla tetiklenir. İkinci yolak intrinsic veya mitokondriyal yolak, uyarılınca mitokondriden

sitokrom (cytochrome)-c salınımı ve ölüm sinyalinin aktif hale getirilmesi ile tetiklenir. Her iki yolak da bir noktada birleşerek hücre ölümüyle sonuçlanan, düzenleyici ve yapısal molekülleri bölen kaspazlar olarak bilinen proteazlar serisinin aktivasyonunu içeren son ortak bir yolda birleşir (Şekil 1.7.) (Ghobrial ve ark., 2005).

Ekstrinsik yolağın aktivasyonunu çeşitli yolak ve proteinler düzenler. Transkripsiyonal olarak inaktif bir gen olan FasL genini ayarlayan aktive edici protein 1 ve NF-KB gibi transkripsiyon faktörleri ekstrinsik yolağın düzenleyicileridir.

Apoptozun temel düzenleyicileri olan Bcl-2 ailesi Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, ve Hrk gibi proapoptotik üyeleri ve Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, ve Mcl-1 gibi antiapoptotik üyeleri içermektedir (Antonsson ve ark., 2000). Bcl-2'nin ekspresyonunun azalması antikanser ilaçlara karşı apoptotik tepkiyi yükseltirken, Bcl-2'nin ekspresyonunun artması radyasyon terapisine ve kemoterapötik ilaçlara karşı dirence sebep olur. Ayrıca, yüksek Bcl-2 ekspresyonu hücre döngüsü G₀ fazında hücrelerin yığılmasına sebep olur ve kemorezistansa katkı sağlar.

Proapoptotik Bcl-2 üyeleri apoptoz destekleyici olarak davranırken, antiapoptotik üyeleri sitokrom-c nin salınımı engelleyerek apoptoz önleyicisi olarak davranırlar.

“Eugenol” ün mast hücrelerinde “Ser15 phospho-p53” ün mitokondri içerisine translokasyonunu ve orada Bcl-2 ve Bcl-XL ile etkileşerek apoptozu indükledikleri saptanmıştır (Kaur ve ark., 2006). ‘Eugenol’ ısırgan otu ekstresinde de bulunmaktadır (Roschek ve ark., 2009).

Bcl-2' nin intrinsik yolda gereğinden fazla ifadesi ekstrinsik kontrollü apoptozu engeller; ters olarak ta , TNF α NF-KB'nin ekspresyonunu yükseltir ve Bcl-2 ailesi proteinlerin antiapoptotik üyelerini uyarır (Ghobrial ve ark., 2005).

Isırgan otu yaprağı ekstrelerinin koliti indüklenen farelerde kolit belirtilerini azalttığı saptanması, KRK'ya neden olabilen kronik kolitin önlenmesinde ısırgan otu

ekstrelerinin uzun süreli kullanımının etkili olabileceği düşündürmektedir. Bu ekstrelerin ayrıca 'faecal' IL-1beta ve mukozal TNF-alfa konsantrasyonlarını da düşürdüğü belirlenmiştir (Konrad ve ark., 2005).

1.3.2. Apoptoz Mekanizmasını Kontrol Eden Yolak ve Proteinler

Apoptoz mekanizmasını bir sürü yolak ve protein kontrol etmektedir. p53, NF-KB, fosfatidilinozitol (phosphatidylinositol) 3 kinaz (PI3K)/Akt yolu, ve yubikütün (ubiquitin) / proteozom yolu bunlara örnektir.

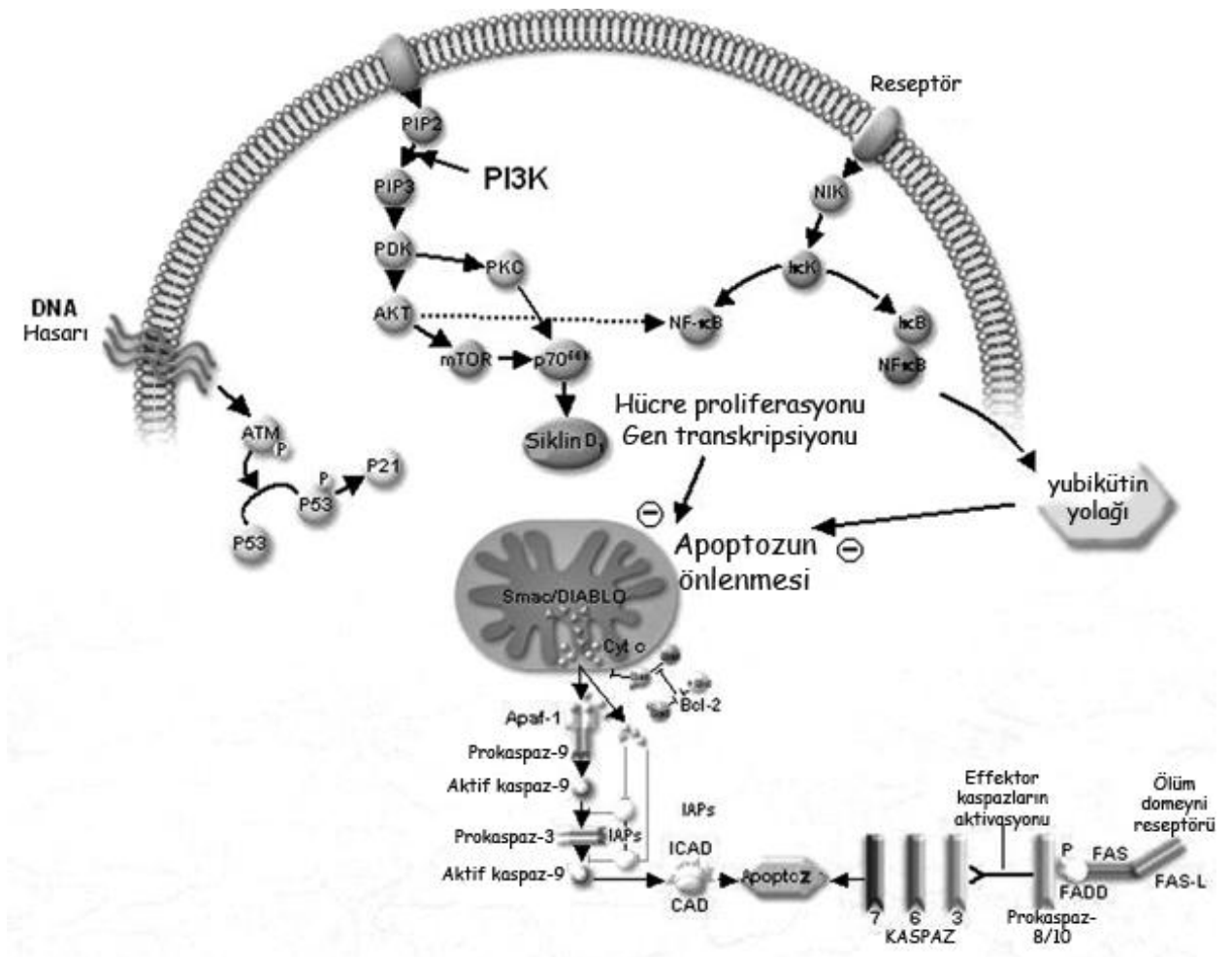
1.3.2.1. p53

p53 çeşitli stres sinyalleri tarafından aktif hale getirilen bir tümör süpresor proteindir. p53, mitokondri bütünlüğü ve geçirgenliğinin temel düzenleyicisi olan bir kaç Bcl-2 ailesi proteini (sadece Bax ve BH3 proteinlerini) ayarlayarak mitokondriyal yolak yoluyla apoptoza neden olmaktadır. Ölüm uyarısının varlığında, sadece BH-3 birimini içeren proteinler proapoptotik proteinlere el koyan ve onların aktivasyonunu engelleyen anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini önleyerek Bax ve Bak'ı aktif hale getirir. Aktif hale getirildiklerinde, Bax/Bak mitokondrinin dış zarına sokulur ve mitokondri içerisinden apoptojenik proteinlerin serbest bırakılmasına yol açan kanalları oluşturur. Kanserin çoğunda görülen p53 kaybı genomik düzensizliğe, hücre döngüsü düzensizliğine, ve apoptozun engellenmesine yol açmaktadır. P53'ün apoptozu destekleme mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Ghobrial ve ark., 2005). p53 ekspresyonu hatalı olan kanser hücreleri kemoterapiye cevap vermemektedir (Cao ve ark., 2005).

1.3.2.2. Nükleer Transkripsiyon Faktörü NF-κB

NF-KB apoptoz, viral replikasyon, tümörigenez, inflamasyon, ve bir sürü otoimmün hastalıkta gerekli bir sürü genin ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. NF-KB büyüme faktörleri, sitokinler, limfokinler, radyasyon, farmakolojik

ajanlar, ve stresi içeren çeşitli uyarılar tarafından aktif hale getirilir. NF-KB inaktif formunda, IKB ailesi inhibitör proteinlerine bağlı olarak, sitoplazmada bulunur. NF-KB aktivasyonuna sebep olan çeşitli uyarı IKB'nin fosforilasyonuna ve de degradasyonuna sebep olur. Bu da NF-KB alt birimleri üzerine nükleer lokalizasyon sinyalleri iletilmesi ve sonra molekülün nükleusa translokasyonu ile sonlanır. NF-KB nükleusta çeşitli genlerin transkripsiyonunu başlatır (Ghobrial ve ark., 2005).



Şekil 1.8. p53, NF-κB, yubikütin/proteozom Sistemi, ve PI3K Yolağı ile Ekstrinsik ve İntrinsik Apoptoz Yolakları Kontrolü (Ghobrial ve ark., 2005).

NF-KB muhtemelen doku orijininin de ölüme uyarısının durumu ile belirlenen anti ve proapoptotik fonksiyonların her ikisini de gösterir. Uygun fizyolojik durumlarda , NF-KB'nin aktivasyonu bir sürü kompleks proteinin aktivasyonu yoluyla apoptotik uyarıya dirence neden olur. Bununla beraber, belirli uyarılara tepki olarak NF-KB

aktivasyonu apoptozun indüklenmesine yol açabilir. Bu kaspaz-1 gibi kaspazlar, interferon-düzenleyicili faktör-1, c-myc, ve p53 gibi bazı proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile açıklanabilir (Ghobrial ve ark., 2005).

1.3.2.3. *Yubikütün/Proteozom Sistemi*

Bu sistem geniş bir proteinaz kompleksinden oluşmakta olup, hücre büyümesi ve apoptozu düzenlemeden sorumludur. Protein degradasyonu oldukça koordineli bir işlem olup yubikütün moleküllerine bağlanarak proteinin tanınmasını ve 26S proteozomu ile sindirilmesini içerir. Çoğu hücre döngüsü düzenleyicileri p53, siklinler ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri gibi transkripsiyon faktörleri ve NF-KB yubikütün/proteozom sistemi ile düzenlenir.

Çoğu Bcl-2 ailesi üyesi yubikütün/proteozomun substratıdır. Proteozom inhibitörleri ile apoptozun indüklenmesi p53, p27, proapoptotik Bad veya Bax gibi proteinlerin başlangıçta birikmesine yada sitokrom-c salınımına ve intrinsik apoptoz yolağı aktivasyonuna sebep olan stres kinaz aktivasyonuna yol açar (Ghobrial ve ark., 2005).

Farklı tümörlerde apoptozu kontrol eden farklı sinyal yolaklarının iyi anlaşılması, söz konusu tümöre özel moleküler kusurlara dayalı yeni hedeflenmiş ajanların keşfedilmesine yardımcı olacaktır.

Bunlar CCI-779 ve RAD 001 gibi rapamisin inhibitörleri ve bortezomib gibi özel modülatörler ile hedeflenebilir. Çünkü bu yolaklar tümör hücrelerinde tercihli olarak değiştirilmiş olabilir, ve normal dokuyu az kullanan, tümörlerde ise seçici bir etki için bir potansiyel vardır (Ghobrial ve ark., 2005).

1.3.3. **Apoptoz Yolak Modülatörlerini Hedefleyen Ajanlar**

Proteozom inhibitörleri, mTOR inhibitörleri, ve p53 inhibitörleri apoptoz yolak modülatörlerini hedeflemektedir.

Bu ajanların etkileri kanser hücrelerine seçici olabilir, çünkü proliferere ya da transforme hücrelerde apoptozu dürtülemektedirler. Örneğin, c-myc onkojeninin yüksek oranda ifadesi kanser hücrelerini, proteozom inhibitörü dürtülü apoptoza daha duyarlı yapmaktadır. Proteozom inhibitörleri laktasistin gibi doğal ürünleri, MG132, ALLN, ve MG115 gibi peptit aldehydlerini, ve bortezomib gibi boronik asit inhibitörlerini içermektedir (Ghobrial ve ark., 2005).

NF-KB İnhibitörü (IKB Kinaz İnhibitörü, PS-1,145)

IKB kinaz inhibitörü PS-1,145 multiple myeloma hücrelerinde IKB'nin fosforilasyonunu önler ve ılımlı bir şekilde direk olarak büyümelerini engeller. PS-1,145 NF-KB ile dürtülen adhezyon moleküllerinin upregulasyonunu ve multiple myeloma hücrelerinin adhezyonunu ortadan kaldırır. Özel NF-KB inhibitörleri multiple myeloma ve diğer kanserlerin tedavisinde faydalıdır (Ghobrial ve ark., 2005).

1.3.4. Kanserli Hücrelerde Apoptoz

Kolon kanserleri Fas-kontrollü apoptoza karşı bir direnç kazanmıştır. Normal kolon epitel hücreleri Fas-kontrollü apoptoza oldukça duyarlıdır. FasL'in (Fas Ligand) Fas'a bağlanması apoptozu gerçekleştiren kaspaz (caspase) serisini aktive eder. Uyarılan Fas bir adaptör protein yoluyla, FADD, bir ölüm-başlatan sinyal kompleksi (DISC) oluşturmak için kaspaz-8'i çalıştırır. Kaspaz-8 daha sonra internükleozomal DNA fragmentasyonu ve membran bleblemesi gibi apoptoz işlemlerini başlatan "cellat" kaspazları aktif hale getirir. Fas sinyali FLIP ve FAP-1 gibi proteinler ile DISC seviyesinde engellenebilir. Daha aşağıda, Bcl-2, Fas sinyalini düzenler. p53 normal Fas sinyali için gerekli olabilir.

Fas sinyal iletisindeki hatalardan dolayı, kolon kanseri hücreleri antitümör T ve NK hücrelerinin FasL-kontrollü sitotoksitesine direçlidir. Fas direnci tümör hücrelerinin kendi FasL'lerini belirtmelerini olanaklı hale getirir. Bu da aktif hale gelen T ve NK hücrelerine bir apoptoz ölüm sinyali dayatır. Bu “Fas karşıtağı” FasL-vurgulayan tümörlere lenfosit infiltrasyonunu önlüyor gözükmeğdir (O'Connell ve ark., 2000).

1.3.5. Tedavide Apoptoz

Bugün birçok hastalığın hücre ölümü ya da yaşamı arasındaki dengenin bozulması ile ilgili olduğu bilinmeğdir. Bu nedenle apoptotik sürece müdahale ederek, bunun yeniden düzenlenmesi, önemli tedavi yöntemlerini gündeme getirebilir. Bugüne kadar apoptoz düzeyini değıştirdiğı bilinen, birçok “non-steroidal antiinflamatuvar” ilaçlar vardır. Aslında bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozu başlatır, ancak apoptoza direnç geliştiğinde tedavide başarısızlık gözlenir. Üstelik bu tedaviler, normal hücrelerde de apoptozu başlatır ve kemik iliğı üzerinde olumsuz yan etkileri vardır. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen yeni birçok tedavi denemeleri, preklinikte ümit vericidir (Renehan, 2001; Tomatır, 2003).

Apoptoz, veya programlı hücre ölümü, hücre proliferasyonunu kontrol veya tamir edilemeyen DNA hasarına tepki için hücrelerin ölüme gitmesini sağlayan mekanizmadır. Apoptozun anlaşılması kanser hücrelerinin ölümünü indükleyen veya kanser hücrelerinin sitotoksik ajanlara ve radyasyon terapisine duyarlılığını artıran alışlagelmişin dışındaki yeni hedefli terapiler için bir temel oluşturmaktadır. Bu yeni ajanlar tümör nekroz faktörüne dayalı ‘*apoptozu-indükleyen ligand reseptörü 1*’ gibi “extrinsic” (sitoplazmaya ait) yolağı hedefleyen, ve antisens bcl-2 oligonükleotitleri gibi “intrinsic” (mitokhondriye ait) Bcl-2 ailesi yolağını hedefleyen ajanları içermektedir (Ghobrial ve ark., 2005).

1.4. *Urtica dioica*'nın Onkoloji Açısından Önemi

Kanser tedavisinde tamamlayıcı ve destekleyici olarak ısırgan otu kullanımını ülkemizde oldukça yaygındır (Gözüm ve ark., 2003; Gözüm ve ark., 2007).

Isırgan otunun kanser ile ilgili olarak etkilerini aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür:

- Karsinojenlere karşı, koruyucu etkileri ile kanser oluşumunu engellemektedir (Wollowski ve ark., 2001; Çelik ve ark., 2007; Tello ve ark., 2008).
- Kanser sebebi olma olasılığı söz konusu olan bazı hastalıkları tedavi edici etkileri ile kanser oluşumunu engellemektedir (Konrad ve ark., 2005).
- Antiproliferatif etkisiyle tümör büyümesini yavaşlatıp/durdurup kanseri tedavi etmektedir (Koch, 2001; Durak ve ark., 2004; Abu-Dahab ve ark., 2007; Prostate Cancer Fund, 2007; Jason ve ark, 2008).
- Apoptotik etkisiyle tümörü küçülterek kanseri tedavi etmektedir (Koch, 2001).
- Kanser tedavisinde kemoterapide destekleyici etkileri vardır (Suh ve ark., 1995; Treasure, 2003; Durak ve ark., 2004).
- Kanser tedavisinde radyoterapi yan etkilerini engelleyici etkileri bulunmaktadır (Treasure, 2003; Aksu ve ark., 2008; Li ve ark., 2010).

Son yıllarda tamamlayıcı tedavilerin kanser tedavisinde yaygın olarak yer alması (Ezeome ve ark., 2007; Gözüm ve ark., 2007) ve bazı kanser türlerinde tedavide olumlu etkilerinin tespit edilmesi (Durak ve ark., 2004) bu alanda yeni çalışmaların yapılmasını teşvik etmiştir.

Antioksidan ve flavonoidler bakımından zengin olan Türkiye'de ve dünyada geleneksel tedavide kanserden korunmada, kanser tedavisinde tamamlayıcı ve destekleyici olarak sıkça kullanılan bir bitki olan *Urtica dioica* üzerine literatürde bilimsel olarak *in vivo* ve

in vitro pek çok çalışma olmasına karşın, kolon kanseri üzerine etkilerini araştıran *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların olmadığı gör÷lmektedir.

Bu tez çalışmasında ısırgan otunun, insan kolon kanseri HCT 116 hücre serileri üzerindeki apoptotik, antiproliferatif, antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'da gerçekleştirildi.

2.1. Materyal

Bu çalışmada Temmuz 2010'da Ankara Gölbaşı'ndan toplanan taze ısırgan otu bitkisi ve HCT 116 p53+/+ ve HCT 116 p53-/- insan kolon kanseri hücre serisi kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Serilerinin Kültürü

Hücre serisi olarak HCT 116 p53+/+ ve HCT 116 p53-/- insan kolon kanseri hücre serisi kullanıldı. Apoptotik etkinin p53 yolağı bağımlı ya da bağımsız olduğunun tespit edilmesi için p53 geninden yoksun ve p53 geni var olan hücreler çalışmada kullanıldı. Hücreler % 5 CO₂ içeren 37 °C' lik etüvde inkübe edildi. Kültür için ise % 1 pen/strep ve % 5 L-Glutamin içeren McCoys besiyeri kullanıldı.

2.2.2. Isırgan otu (*Urtica dioica*) Ekstresinin Hazırlanışı

Taze ısırgan otu kök, gövde ve yapraklarıyla beraber bütün olarak blendırda distile su ile homojenize edildi. Elde edilen ekstre 15000 rpm'de 4 °C'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısım kullanım öncesinde filtre edilerek steril edildi.

HCT 116 p53+/+ ve HCT 116 p53-/- hücrelerinin 1x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde 96 ve 6 kuyucuklu plaklara (96-24 well plate) hücre ekimi yapıldı. Daha sonra 48. saatlerde alınan örneklerle aşağıdaki testler uygulandı.

2.2.3. Hücre Canlılığının Tespiti (Hücre Proliferasyonunun Ölçülmesi)

MTT (*3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit*) testi yapılmak üzere ekstre uygulanmış hücreler ve negatif kontrolleri 96 kuyucuklu plaklara (96- well plate) alındı. Kit içeriğine uygun olarak; 10:1 (toplam besiyeri: MTT ajanı) oranında MTT işaretleme ajanı ilave edilerek 4 saat inkübe edildi. Bu inkübasyon süresini takiben 1:1 (besiyeri: solusyon) oranında çözücü solusyon ilave edilerek 1 gece inkübe edildi ve inkübasyonun ardından spektrofotometre ile 550nm-690nm’de ölçüm yapıldı.



Şekil 2.1. *3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) assayı; MTT ‘nin Formazana indirgenmesi.*

MTT ile hücre canlılığı testinin prensibi sarı renkli suda eriyen MTT’yi viyole renkli suda erimeyen Formazana indirgemektir.

2.2.4. Apoptoz Tayini

Apoptozun, hücre zarındaki Anneksin V proteinini ölçerek belirlenebilmesinden yola çıkarak hücreler Annexin V ve propidium iyodür ile işaretlenerek floresan mikroskopunda sayıldı.

Anneksin V, Ca⁺⁺’a ihtiyaç duyan, fosfolipite-bağlanan bir proteindir. Hücre zarındaki fosfatidilserin rezidülerine kuvvetlice bağlanır. Normal bir hücrede bu rezidüler hücre zarının iç yüzeyindedir ve hücre zarı geçirgen (permeable) olmadıkça Anneksin V

buraya ulaşamaz. Apoptozun erken safhalarında fosfatidilserin rezidüleri hücre dışına doğru yer değiştirir.

2.2.5. Antioksidan Enzim Düzeylerinin Ölçülmesi

Çalışmada lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olduğu bilinen malondialdehit (MDA) düzeyleri (Dahle ve ark., 1962), antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) (Durak ve ark., 1998; Durak ve ark., 2005), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) (Aebi ve ark.,1997) aktiviteleri, DNA turnover enzimleri olan ksantin oksidaz (XO) ve ADA (Guisti ve ark., 1974) enzim aktiviteleri hücre kültüründen alınan örneklerde spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Her parametrenin ölçüm prensibi gösterilen referanslara göre yapıldı.

Alınan tüm sonuçlar Kruskal-Wallis varyans analizine ve Mann-Whitney U Testine göre değerlendirildi.

3. BULGULAR

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ve ortanca (minimum-maksimum) değerler şeklinde verilmiştir.

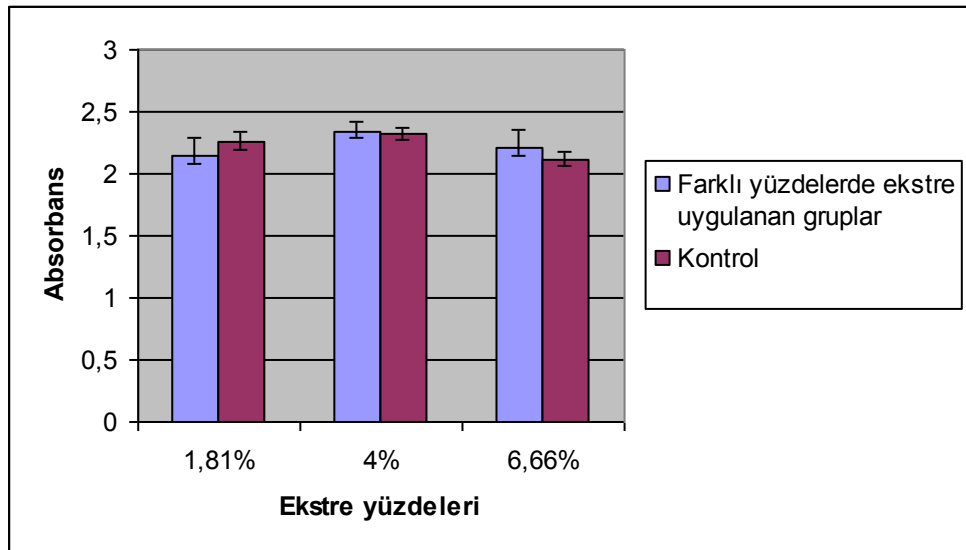
Çizelge 3.1. HTC 116 P53 +/- hücre serilerinde enzim aktiviteleri.

Enzim	Grup	N	Mean	Standard Deviation	Standard Error Mean
CAT % 1.81	Kontrol	3	2.443300	0.4214700	0.2433300
	Ekstre	3	2.686700	0.8429300	0.4866700
SOD % 1.81	Kontrol	3	2.950000	1.0661600	0.6155500
	Ekstre	3	3.450000	1.0612700	0.6127300
MDA % 1.81	Kontrol	3	0.174700	0.0616500	0.0355900
	Ekstre	3	0.188309	0.0236700	0.0136700
ADA % 1.81	Kontrol	3	19.000000	1.0000000	0.5773500
	Ekstre	3	20.333300	1.5275300	0.8819200
XO % 1.81	Kontrol	3	0.013333	0.0040415	0.0023333
	Ekstre	3	0.030667	0.0061101	0.0035277
CAT % 4	Kontrol	3	2.443300	0.4214700	0.2433300
	Ekstre	3	2.926700	1.2701700	0.7333300
SOD % 4	Kontrol	3	3.463300	0.1464000	0.0845200
	Ekstre	3	3.576700	0.6753000	0.3898900
MDA % 4	Kontrol	3	0.174700	0.0236700	0.0136700
	Ekstre	3	0.242000	0.1210000	0.0698600
ADA % 4	Kontrol	3	18.666700	0.5773500	0.3333300
	Ekstre	3	21.000000	1.0000000	0.5773500
XO % 4	Kontrol	3	0.011333	0.0005774	0.0003333
	Ekstre	3	0.014667	0.0032146	0.0018559
CAT % 6.66	Kontrol	3	3.173300	0.4214700	0.2433300
	Ekstre	3	2.200000	0.0000000	0.0000000
SOD % 6.66	Kontrol	3	3.680000	0.2351600	0.1357700
	Ekstre	3	3.036700	0.5541100	0.3199100
MDA % 6.66	Kontrol	3	0.175000	0.0467700	0.0270000
	Ekstre	3	0.215000	0.0615400	0.0355300
ADA % 6.66	Kontrol	3	17.333300	1.1547000	0.6666700
	Ekstre	3	18.333300	0.5773500	0.3333300
XO % 6.66	Kontrol	3	0.014000	0.0017321	0.0010000
	Ekstre	3	0.014333	0.0015275	0.0008819

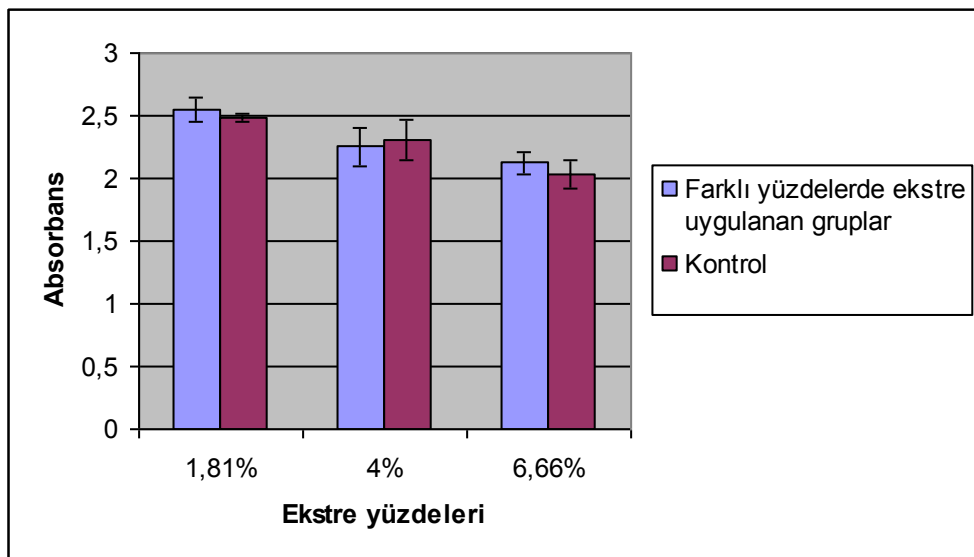
Çizelge 3.2. HTC 116 P53 -/- hücre serilerinde enzim aktiviteleri.

Enzim	Grup	N	Mean	Standard Deviation	Standard Error Mean
CAT % 1.81	Kontrol	3	1.2167000	0.4214700	0.2433300
	Ekstre	3	2.4433000	0.4214700	0.2433300
SOD % 1.81	Kontrol	3	3.1367000	0.1662300	0.0959700
	Ekstre	3	3.8433000	0.0568600	0.0328300
MDA % 1.81	Kontrol	3	0.3497000	0.1231800	0.0711200
	Ekstre	3	0.2420000	0.0400000	0.0230900
ADA % 1.81	Kontrol	3	14.0000000	1.0000000	0.5773500
	Ekstre	3	14.6667000	0.5773500	0.3333300
XO % 1.81	Kontrol	3	0.0230000	0.0086603	0.0050000
	Ekstre	3	0.0140000	0.0070000	0.0040415
CAT % 4	Kontrol	3	2.4433000	0.4214700	0.2433300
	Ekstre	3	2.9300000	0.7300000	0.4214700
SOD % 4	Kontrol	3	3.1867000	0.1692100	0.0977000
	Ekstre	3	4.7700000	1.6695200	0.9639000
MDA % 4	Kontrol	3	0.2283000	0.0616500	0.0355900
	Ekstre	3	0.2957000	0.0616500	0.0355900
ADA % 4	Kontrol	3	13.3333000	0.5773500	0.3333300
	Ekstre	3	12.6667000	2.0816700	1.2018500
XO % 4	Kontrol	3	0.0230000	0.0017321	0.0010000
	Ekstre	3	0.0190000	0.0017321	0.0010000
CAT % 6.66	Kontrol	3	3.9033000	0.4214700	0.2433300
	Ekstre	3	1.7067000	0.4272400	0.2466700
SOD % 6.66	Kontrol	3	3.0267000	1.4479100	0.8359500
	Ekstre	3	2.6900000	0.4464300	0.2577500
MDA % 6.66	Kontrol	3	0.2150000	0.0615400	0.0355300
	Ekstre	3	0.2690000	0.1905500	0.1100100
ADA % 6.66	Kontrol	3	10.3333000	0.5773500	0.3333300
	Ekstre	3	11.0000000	1.0000000	0.5773500
XO % 6.66	Kontrol	3	0.1140000	0.0127671	0.0073711
	Ekstre	3	0.0163330	0.0005774	0.0003333

Bu çalışmada % 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarda hücre serisine uygulanan ısırgan ekstresi gruplarındaki oksidasyonun bir belirteci olan MDA düzeylerindeki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0.05$). Bunun yanında pürin metabolizmasında pürin yıkımının bir göstergesi olan XO enzimi aktivitesinde ekstre uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış gözlemlendi ADA aktivitesinde her iki grup arasında fark gözlemlenmedi. Antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre artış olduğu saptandı.

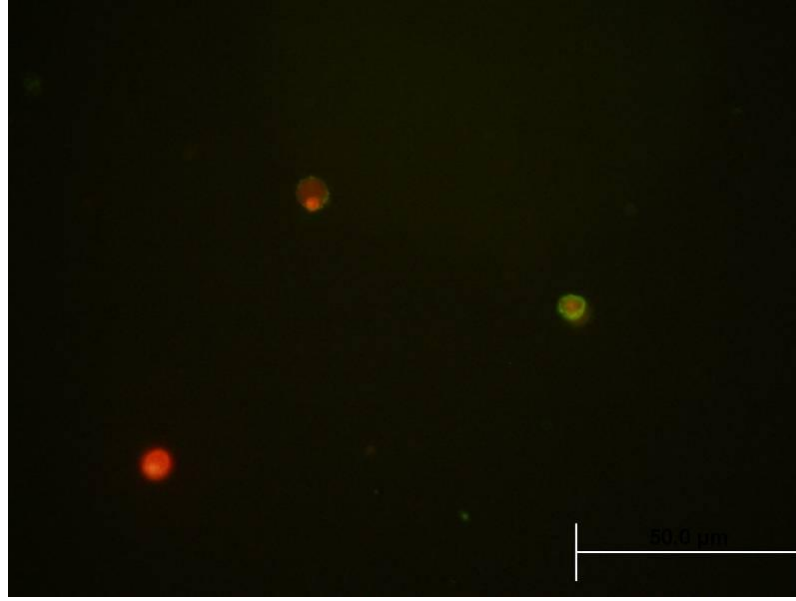


Şekil 3.1 %1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonda ısırgan otu ekstresinin HCT 116 p53 -/- kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi.

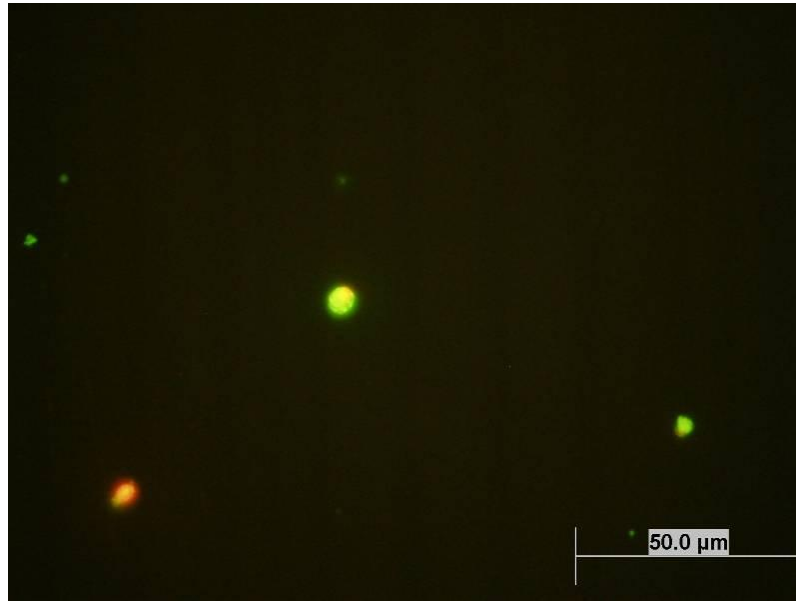


Şekil 3.2 %1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonda ısırgan otu ekstresinin HCT 116 p53 +/- kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi.

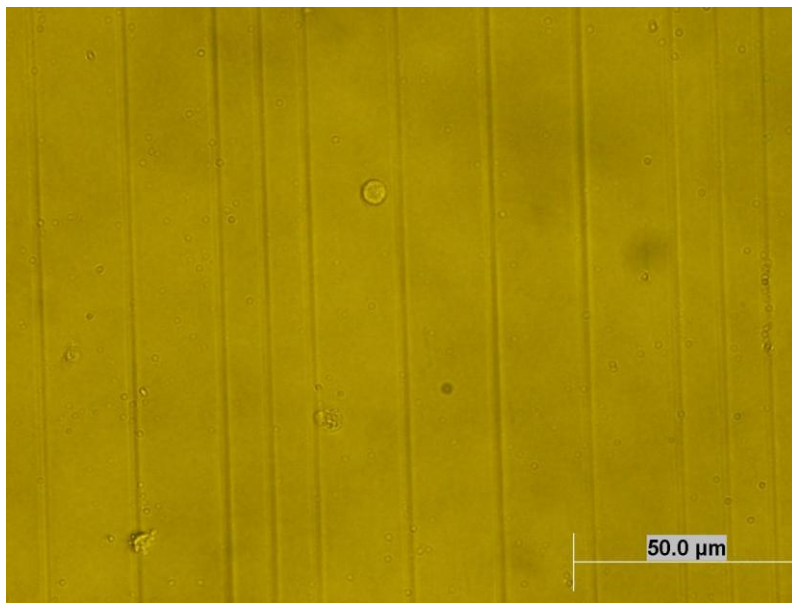
% 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarındaki ısırgan otu ekstresinin HCT116 P53-/- ve HCT116 P53+/+ hücre hattında canlılık üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızda ısırgan otunun anlamlı derecede apoptotik ve antiproliferatif bir etkisi saptanmadı (Şekil 3.1; Şekil 3.2; Şekil 3.3; Şekil 3.4; Şekil 3.5; Şekil 3.6; Şekil 3.7; Şekil 3.8).



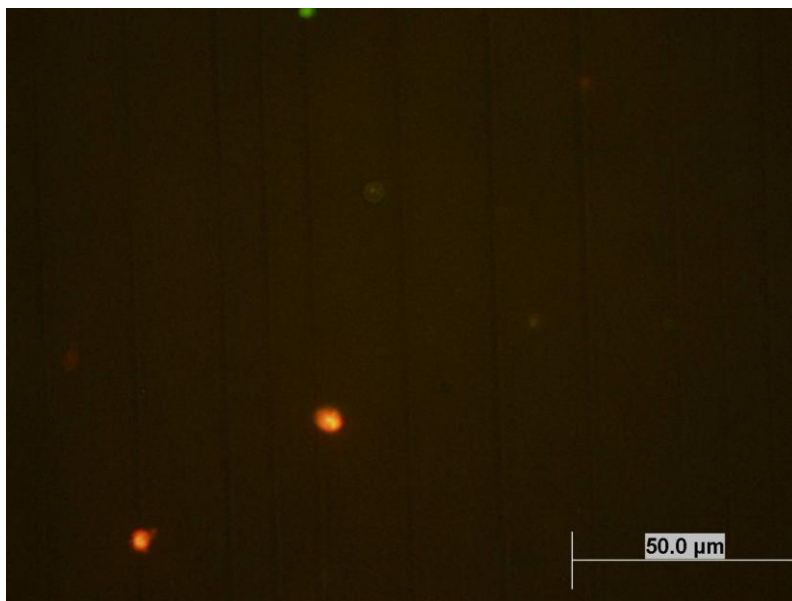
Şekil 3.3 HCT 116 p53 +/+ kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propodium iyodür ile işaretlenmiş hali.(AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans)



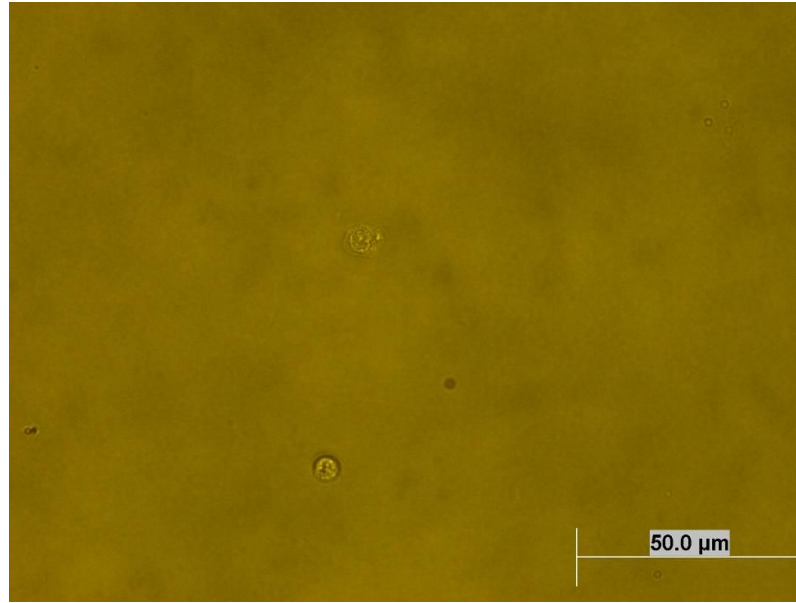
Şekil 3.4 HCT 116 p53 -/- kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propodium iyodür ile işaretlenmiş hali. (AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans)



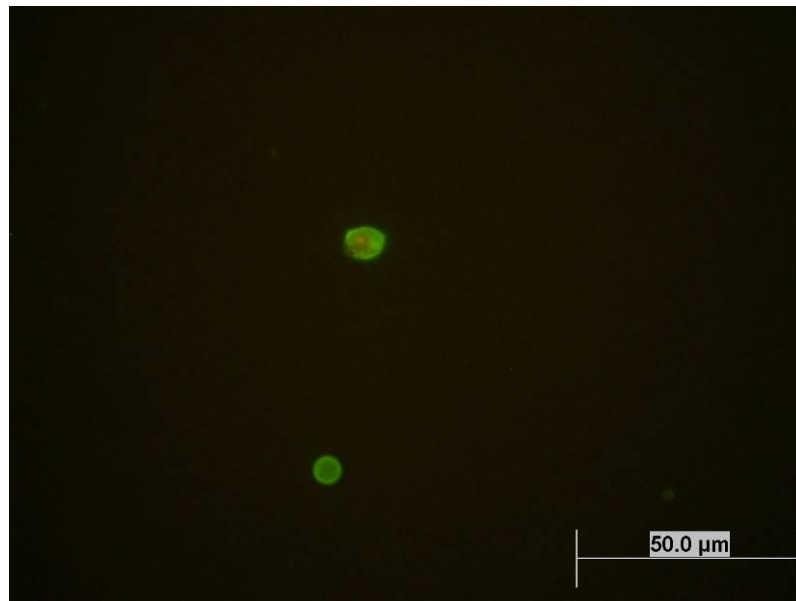
Şekil 3.5 HCT 116 p53 -/- kolon kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu ile görünüşü.



Şekil 3.6 HCT 116 p53 -/- kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propidium iyodür ile işaretlenmiş hali. (AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans)



Şekil 3.7 HCT 116 p53 +/+ kolon kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu ile görünüşü.



Şekil 3.8 HCT 116 p53 +/+ kolon kanseri hücrelerinin AnnexinV ve propidium iyodür ile işaretlenmiş hali.(AnnexinV:yeşil propodium iyodür:kırmızı floresans).

4. TARTIŞMA

Ülkemizde ve dünyada geleneksel tedavide kanserden korunmada, kanser tedavisinde tamamlayıcı ve destekleyici olarak sıkça kullanılan bir bitki olan *Urtica dioica* üzerine literatürde bilimsel olarak *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışma olmasına karşın, kolon kanseri üzerine etkilerini araştıran *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların olmadığı görülmektedir.

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) canlılarda çeşitli metabolik işlemlerle oluşturulurlar. Normal aerobik solunum, uyarılmış polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar, ve peroksizomlar hücreler tarafından üretilen oksidanların çoğunun temel endojen kaynaklarını oluşturmaktadır.

ROT normal fizyolojik konsantrasyonlarda hücrel aktiviter için gerekli iken, yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilir ve oksidatif strese yol açabilir. Gereğinden fazla üretildiğinde, ROT doku hasarına sebep olur, doku hasarı da ROT üretimine sebep olur. Serbest radikaller lipid peroksidasyonuna sebep olur. Oksidasyon sadece lipitlere etki etmez. ROT ve RNT mutasyonlara yol açan DNA hasarına sebep olabilir. Bunlar büyük hücre birimlerinin hasarına neden olabilir ve kanserin birçok formu, kardiyovasküler hastalıklar, kalp hastalıkları, damar sertliği (arteriosclerosis), diyabet (diabetes mellitus), malarya, sonradan kazanılmış bağışıklık bozukluğu sendromu, felç (stroke) ve yaşlanma gibi 100 den fazla hastalık ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Mavi ve ark.,2004; Kanter ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2007).

Bütün aerobik organizmalar antioksidan savunma sistemleri ve enzimlerine sahiptir (Kanter ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2007). Antioksidanlar, serbest radikallerin etkisini nötralize edebilmektedirler. Normal sağlıklı durumlarda vücutta üretilen antioksidanlar serbest radikallere karşı vücudu savunmada rol oynarlar. Ancak bu doğal antioksidan mekanizma yeterli olmayabilir. Hastalık durumunda tıbbi bitkiler gibi diğer kaynaklardan gelen antioksidanlar etkili tedavi için gereklidir. Bütile hidroksitoluen (BHT) ve bütile hidroksianizol (BHA) gibi yapay antioksidanların yan etkileri

bilinmediğinden, antioksidanlarca zengin besinlerin alınması önemlidir. Bol antioksidanlı besinlerin tüketilmesi ile hastalıkların ortaya çıkma olasılığı ters orantılıdır (Mavi ve ark.,2004; Kanter ve ark., 2005; Kulkarni ve ark., 2006).

İnsan diyetindeki ve tıbbi bitkilerdeki antioksidan ve flavonoid kaynaklar araştırılması gereken önemli konular arasındadır. Fenolik bileşiklerin ve özellikle flavonoidlerin kanserin görülme sıklığını azalttığı ve kanserin tedavisinde, özellikle tamamlayıcı tedavide önemli yeri olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (Nicodemus ve ark., 2001; Adom ve ark.,2003; Aksu ve ark., 2008).

Son yıllardaki beslenme ve besin bilimi araştırmaları potansiyel antioksidan etkili bitki ürünleri üzerine dikkati çekmektedir (Trouillas ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda ısırgan otu ekstresinin total antioksidan aktivitesinin, α -tokoferol (Musette ve ark 1996), BHA, BHT ve quersetin (Gülçin ve ark., 2004) gibi güçlü antioksidanlardan bile daha fazla olduğu gösterilmiştir. Karotenoidler arasındaki sıralamada likopenin en potansiyel antioksidan olduğu (*likopen* > α -tokoferol > α -karoten > β -criptoksantin > zeaksantin= β -karoten > lutein), ayrıca karotenoid karışımının tek bileşikten daha etkili olduğu, likopen yada lutein varlığında bu sinerjistik etkinin daha güçlü olduğu (Heber ve ark., 2002), ısırgan otunun karotenoidlerce de zengin olduğu (Koç, 2002), lutein, karoten, ksantin ve likopen izomerlerini içerdiği (Guil-Guerrero ve ark., 2003) (Şekil 1.3.) belirtilmiştir. Bu bilgiler ışığında ısırgan otu ekstresinin total antioksidan aktivitesinin yüksekliğinin içerdiği antioksidan bileşenlerin zenginliği ve sinerjik etkisinden kaynaklandığını düşünülebilir (Şekil 1.3.).

Bu tez çalışmasında taze ısırgan otunun yaprak ve gövde gibi toprak üstü birimleriyle birlikte köklerini de içeren sulu ekstresinin kolon kanseri epitel hücreleri HCT 116 hücre serileri üzerindeki, antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkileri incelendi.

Çalışmamızda, ısırgan otunun suda hazırlanması ile elde edilen % 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarındaki ısırgan otu ekstresi kullanıldı. Sulu ekstre kullanılmasının nedeni, literatürde sulu ekstre ile yapılmış çalışmaların olmasının yanı sıra (Gülçin ve ark., 2004; Durak ve ark., 2004; Lichius ve ark., 1999; Lichius ve ark., 1997; Harpu ve

ark 2005) bir besin maddesi olan ısırgan otunun doğal yolla tüketilmesinin barsak hücreleri üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesine sulu ekstrenin daha uygun olacağı, etanol ve/veya metanolün normal hücreler üzerindeki toksik etkilerinin olabileceğinin düşünülmesidir.

Diğer taraftan metanolik ekstrelerin sulu ekstrelerden daha çok apolar bileşik içerdiği belirtilmiştir. Bileşiğin polaritesindeki düşüşün, peroksidasyonun olduğu apolar fazda bileşiğin solubilitesinde bir yükselmeye sebep olduğu, bu nedenle, metanollü ekstrelerin sulu ekstrelerden daha fazla antioksidan etkiye sahip olduğu (Mavi ve ark., 2004) belirtilmektedir.

Bu çalışmada % 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarda hücre serisine uygulanan ısırgan ekstresi gruplarındaki oksidasyonun bir belirteci olan MDA düzeylerindeki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0.05$). Bunun yanında pürin metabolizmasında pürin yıkımının bir göstergesi olan XO enzimi aktivitesinde ekstre uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış gözlemlendi. XO aktivitesindeki bu artışın, radikal üretimini tetikleyerek bir oksidasyon oluşturduğu, buna yanıt olarak antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre artış olduğu saptandı.

% 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarındaki ısırgan otu ekstresinin HCT116 P53^{-/-} ve HCT116 P53^{+/+} hücre hattında canlılık üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızda ısırgan otunun anlamlı derecede apoptotik ve antiproliferatif bir etkisinin olmadığı saptandı.

Pürin metabolizmasında pürin yıkımının bir göstergesi olan XO enzimi aktivitesinde anlamlı olmasa da artışın olması ama apoptoz ve antiproliferatif etkinin henüz başlamadığının saptanması, antioksidan enzimlerde de hafif artışın olması, kültür süresinin uzatılması halinde bu etkilerin daha belirginleşebileceğini de düşündürmektedir. Nitekim Konrad ve ark. yaptıkları çalışmada (2000) prostat epitel

hücre serilerinde 7 gün boyunca ekstre ile kültüre edilen hücrelerde maksimum antiproliferatif etkinin 5. gün görüldüğü saptanmıştır.

Sonuçlarımız bu haliyle, literatürde *U. dioica*'nın sulu ekstreleri ile farklı hücre serilerinde aynı kültür süresi uygulanılarak yapılan bazı *in vitro* çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Trouilllas ve ark., 2003; Harput ve ark., 2005).

Trouilllas ve ark yaptıkları (2003), Fransa'nın Limousin bölgesi civarında bulunan *U. dioica*'nın da aralarında bulunduğu 16 bitki ekstresinin antioksidan, anti-inflamatuvar ve B16 fare melonama hücre serisi üzerindeki antiproliferatif kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışma ile kısmen uyum göstermektedir. Bu çalışmada, bitki ekstrelerinin antioksidan etkilerinin ekstrelerdeki fenolik bileşiklerin toplam miktarı ile doğru orantılı olduğu saptanmıştır. *U. dioica* ekstresinin antioksidan aktivitesinin zayıf olduğu, düşük konsantrasyonlarda (<0.25 mg/ml) B16 fare melonama hücre serisi üzerinde yüksek proliferasyona sebep olurken yüksek konsantrasyonlarda (>0.5 mg/ml) önemli bir antiproliferatif etki göstermediği gözlenmiştir (Trouilllas ve ark., 2003).

Bizim çalışmamızda da antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre artış olduğu saptandı. Isırgan otunun sulu ekstresinin uygulandığı hücre grupları ve kontrol grupları (ekstrenin hazırlandığı çözücünün aynı miktarda eklendiği hücre grupları) arasında apoptoz ve canlılık açısından herhangi bir anlamlı fark bulunamadı. Bu çalışmada da, bizim çalışmamızda olduğu gibi 48 saatlik hücre kültürleri yapılarak, bu süreler içindeki antioksidan enzim seviyeleri ve hücre serilerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkiler incelenmiştir.

Harput ve arkadaşlarının (2005) bir çalışmasında ise *U. dioica* sulu ekstrelerinin KB (human epidermoid carcinoma), B16 (mouse melanoma), HeLa (human epithelial carcinoma) ve HLA (human hepatoma) tümör hücre serileri üzerine etkileri araştırılmış olup, hücreler 800 µg/mL konsantrasyonlarında ekstrelerle bizim çalışmamızda olduğu gibi 48 saat inkübe edilmiş ve MTT assayi ile sitotoksosite tayini yapılmıştır. Bu

çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla uyumlu olup, bu sulu ekstrelerin test edilen konsantrasyonlarda ve dozlarda hücre yaşamına etki etmediği gözlemlenmiştir.

Gülçin ve arkadaşlarının 2004'te yayınladıkları bir çalışmada ısırgan otu sulu ekstrelerinin antioksidan özellikleri araştırılmış olup, ısırgan otu sulu ekstrelerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. Oysa bizim çalışmamızda, *U. dioica*'nın uygulandığı hücre serilerinde zayıf antioksidan etki gözlemlendi. Antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre artış tespit edildi.

U. dioica'nın bazı hepatik biyotransformasyon enzim sistemleri ve antioksidan enzimlerin aktivasyonunu etkili bir şekilde ayarladığı, LDH ve MDA aktivitelerini düşürdüğü, hücre düzeyinde herhangi bir hasara yol açmadığı gösterilmiştir (Özen ve ark., 2003; Çelik ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda ise MDA aktivitesinin kontrol ve ekstre uygulanan grupta farklı olmadığı saptandı.

U. dioica'nın etanolik ve/veya metanolik ekstrelerinin hücre serileri üzerine etkilerini inceleyen *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır (Konrad ve ark. 2000; Goun ve ark., 2002; Abu Dahab ve ark., 2007; Mazzio ve ark., 2009; Turan ve ark., 2010).

Konrad ve arkadaşlarının (2000) ısırgan otu kökü % 20' lik metanolik ekstresinin insan prostat epiteli 'Lymph node carcinoma of the prostate' (LNCaP) ve stromal 'human primary culture of the prostate stromal compartment' (hPCPs) hücrelerine antiproliferatif etkilerini araştırdıkları *in vitro* çalışmada, doz ve zamana bağlı olarak sadece LNCaP de 7 gün boyunca antiproliferatif etki ($p < 0.05$) gözlemlenmiştir. Ayrıca sitotoksik etki de belirlenmemiştir. Proliferasyondaki maksimum düşüş % 30 ile 1.0E-6mg/ml konsantrasyonda 5'inci günde gerçekleşmiştir. Minimum etkili doz 4 ve 6'ncı günlerde 1.0E-9 mg/ml olarak belirlenmiştir (Konrad ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda ise *U. dioica*'nın sulu ekstresi HCT 116 hücre serisi ile 48 saat kültüre edildi. Ekstre ile kültüre edilen hücre serilerinde ve kontrol hücre serilerinde proliferasyon açısından fark gözlemlenmedi. Sonuçlarımızın farklılığının, metanolik ısırgan ekstresi yerine çalışmamızda sulu ekstre kullanmamız ilgili olabileceği gibi,

hücre kültür süresinin uzunluğu, (bizim kültür süremizin 2 gün, onların 7 gün olması ki, maksimum antiproliferatif etkinin 5. günde olduğu saptanmış) ve hücre serilerinin, (prostat epitel kanser hücreleri ile kolon kanser epitel hücrelerinin) özelliklerinden, kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Rusya'dan *Urtica dioica* ile beraber 45 bitkinin metilen klorit ve metanol ekstralarının fare lösemi hücre serileri (L1210) üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, 10 µg/kuyucuk konsantrasyonunda uygulanan *Urtica dioica L* metilen klorit ve metanol ekstralarının her ikisinin de ancak % 3 sitotoksik etki gösterdikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca ilerideki çalışmaların metilen klorit gibi nekroza sebep olmayan metanol ekstraları üzerine yoğunlaşması önerilmiştir (Goun ve ark., 2002).

Abu Dahab ve arkadaşlarının 76 bitkinin etanolik ekstralarının insan meme adenokarsinoma (MCF7) hücre serileri üzerindeki antiproliferatif etkilerini araştırdıkları çalışmada ısırgan otunun yaprak ve gövde ekstraları kullanılmıştır. 50 µg/ml lik etanolik *Urtica dioica* ekstralarının 72 saatlik uygulanmasından sonra MCF7 hücrelerinin canlılık yüzdesi % 93.12 ve standart sapma da ± 8.88 olarak saptanmıştır. *Urtica urens* yaprak ekstralarının aynı konsantrasyon ve süre ile uygulanmasıyla MCF7 hücrelerinin canlılık yüzdesi % 103.94 ve standart sapması da ± 5.2 olarak belirlenmiştir. Sitotoksik aktivite çalışmalarında, kloroform ve sulu ekstralardan genellikle kloroform ve/ ya da etanolik ekstraların aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Mazzio ve arkadaşları (2009) da destekleyici tedavide kullanılan 374 ot, tohum, kök, plankton ve fungi etanolik ekstresinin (10 µg/mL–5 mg/mL) N-2A (Neuro-2a) murine nöroblastoma hücre serileri üzerindeki doza bağlı antikanser (tumoricidal) etkilerini değerlendirmiştir. *Urtica dioica* kök ekstraları ve yaprak ekstralarının antitümoral etkisinin zayıf olduğu gözlemlenmiştir ($LC_{50} > 5.0$ mg/ml).

Turan ve arkadaşları (2010) in vitro sitotoksikite çalışmaları sonucunda MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre serilerine karşı *Urtica dioica*'da umut vaadedecek antineoplastik sonuçlara ulaşmıştır. Bu gibi bitkiler üzerinde ileri düzeyde çalışmalardan sonra elde edilecek sonuçlara göre seçilecek ajanların, kanser hastalarının

tedavilerinde ve/veya kansere karşı kemoprotektif olarak yer alabileceğini düşünmektedir. Deneyde bitkiler genelde metanol ile özütlenmiş ve daha sonra suda çözünen (polar, water-soluble) ve suda çözünmeyen (non-polar, water-insoluble) olarak fraksiyonlanmıştır. Hücrelerin 48 saat plak tabanına yerleşmeleri beklendikten sonra tedavi grubunda 5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL derişimlerinde bitki özütleri her bir kültür kabına yerleştirilmiştir. Kontrol grubunda ise bitki özütü yerine herhangi bir tedavi materyali içermeyen besi yeri eklenmiştir. Daha sonra bu hücre kültürleri her seri ve derişim için 72 saat 37 °C ve % 5 CO₂ destekli etüvde inkübasyona tabii tutulmuşlardır. Bu sürenin sonunda her bir kültür kabındaki hücreler sayılmıştır. *Urtica dioica* ekstrelerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre serilerine karşı sitotoksosite değeri 14±4 µg/mL ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre serilerine karşı sitotoksosite değeri 17±4 µg/mL olarak saptanmıştır.

Ekstre hazırlarken çözcü olarak su kullanıldığımız çalışmamızda çözülme sınırları dikkate alındığında bitkide bulunan bütün potansiyel antikanser ve antioksidan kimyasalların hepsinin ekstrede çözünemeyebileceği üzerinde düşünülmesi gereken bir noktadır. Yapılan (Lage ve ark., 2009) çalışmalar da göstermektedir ki duruma göre metanol ekstreleri gibi diğer ekstrelerden de yararlanılması terpenoitler, steroller gibi antikanser maddelerin daha iyi çözümlerine fırsat sağlayabilecektir. Asetileasyon gibi kimyasal yöntemlerin de gerektiğinde düşünülmesi önerilmektedir.

Isırgan otu ekstreleri ile ilgili literatürdeki tüm çalışmalar ya yaprak, ya gövde ya da kök ile ilgilidir. Ayrıca kök WHO, ESCOP ve 'Commission E' tarafından ve yaprak/gövde ise ESCOP ve 'Commission E' tarafından monograflanmıştır. Tohumları ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Treasure, 2003). Bununla beraber bitkinin tüm bölümlerinin içerildiği ekstreler ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bilgilerimize göre bu çalışma, ısırgan otu ekstrelerinin insan kolon kanseri hücre serilerine karşı antioksidan ve antiproliferatif etkinliğinin ölçüldüğü ilk çalışmadır. Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada sulu ekstrenin hazırlanmasında taze ısırgan otu kök, gövde ve yapraklarıyla beraber bütün olarak kullanılmıştır.

Literatürde *U. dioica*'nın *in vivo* uygulandığı insan ve hayvan çalışmaları ve doku çalışmaları da bulunmaktadır (Aksu ve ark. 2008; Kanter ve ark. 2005; Toldy ve ark., 2005; Tello ve ark., 2008; Aydın ve ark., 2006; Durak ve ark., 2004; Lichius ve ark., 1997, Lichius ve ark., 1999; Lindemann ve ark., 1999; Koch, 2001).

Aksu ve arkadaşlarının bir çalışmasında (2008) tamamlayıcı alternatif tedavi olarak ısırgan otu kullanan radyoterapi uygulanan hastalarda, ısırgan otunun gastrointestinal ve genitoüriner organlarda radyoterapi toksisitesini düşürdüğü gözlenmiştir.

Kanter ve arkadaşları (2005) Wistar fareleri ile yaptıkları *in vivo* bir çalışmada 60 gün boyunca haftada iki kez 153.82 g/mol ve vücut ağırlığının 0.8 mL/kg oranında verilen Karbon tetraklorit (Carbon tetrachloride (CCl₄))'in, lipit peroksidasyonunu (MDA) ve karaciğer enzimlerinin seviyelerini yükselttiğini (P<0.05) ve antioksidan enzim seviyelerini de düşürdüğünü (P<0.05) gözlemlenmiştir. 60 gün boyunca her gün i.p. enjeksiyonu olarak verilen 2 mL/kg *Urtica dioica* tohumu yağının ise yükselen lipit peroksidasyonunu (P<0.05) ve karaciğer enzimlerinin seviyelerini (P<0.05) düşürdüğünü, antioksidan savunma sistemi aktivitesini de (P<0.05) yükselttiğini saptamışlardır.

Wistar ratları ile yapılan bir başka çalışmada, ısırgan otunun serebellum ve frontal lobtaki serbest radikallerin konsantrasyonlarını düşürdüğü belirlenmiştir (Toldy ve ark., 2005). Antioksidan vitaminler (A, C, ve E), antioksidan enzimler (katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), ve glutatyon redüktaz (GR)), ceruloplasmin gibi antioksidan sistemler hücreleri lipit peroksidasyona karşı korur. *U. dioica* lipit peroksidasyonu düşürür. *U. dioica* ekstresinin mide girişinde (forestomach) glutathione S-transferaz, SOD ve katalaz aktivitesini, ve akciğerde de SOD ve katalaz aktivitesini indüklemeye etkili olduğu gösterilmiştir (Özen ve ark., 2003; Kanter ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2007).

N-Metil-N-Nitroso-Ürea (MNU) tatbikiyle meme kanseri oluşturulmuş farelerde ısırgan otunun, artan MDA düzeyini düşürdüğü ve total antioksidan durumu (TAS) düzeyini de yükselterek koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Bitkinin toplam antioksidan

kapasitesi ile toplam fenolik bileşenleri arasında Trouillas ve ark., (2003)'nın da bildirdiği gibi pozitif bir ilişki tespit edilmiş ve fenolik içeriğin antioksidan etkiyi oluşturan temel yapı olduğu vurgulanmıştır (Tello ve ark., 2008). Mandal ve arkadaşlarının (2009) çalışması da bu tespiti destekler durumdadır.

Urtica dioica yapraklarının sulu ekstresinin, prostat kanserli dokularda DNA turn-over ve nükleotid metabolizmasında önemli bir enzim olan ADA aktivitesini inhibe ettiği bu etkinin bu ekstrenin antitümöral potansiyeli için bir mekanizma oluşturabileceği belirtilmiştir (Durak ve ark., 2004).

Hayvan modeller üzerindeki *in vivo* çalışmalarda antiülseratif (Gülçin ve ark., 2004) etkilerinin belirlenmesi, yemek borusu kanserine karşı anti-proliferatif ve apoptozu indükleyici etkisinin bir insanda gözlenmesi (Aydın ve ark., 2006), anti-enflamatuvar etkileri ve dekstran sodyum sülfat ile koliti indüklenen farelerde ısırgan otu yaprağı ekstrelerinin kolit belirtilerini azaltması (Konrad ve ark., 2005), ısırgan otu bileşenlerinden bazılarının anti-tümör etkilerinin rapor edilmesi, bu bitkinin kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni fitoterapik ilaçların arasında yer alabileceğini düşündürmektedir.

Lichius ve arkadaşlarının *in vivo* bir çalışmada ısırgan otunun köklerinden elde edilen sikloheksan, etil asetat, 1-butanol, % 20 metanol ve sulu ekstrelerinin ölümcül bir uregenital sinüsün prostat bezine direk olarak aşılandığı farelerde benign prostat hiperplazisi (BPH) tedavisinde etkinliği araştırıldı. Çalışmada % 20'lik metanolik ekstrenin prostat büyümesini % 51.4, sulu ekstrenin % 26.5, etil asetatlı ekstrenin % 5.0, 1-butanollü ekstrenin % 1.3 ve sikloheksanlı ekstrenin % 23.5 oranında önlediği saptanmıştır. Diğer benzeri çalışmalarda da ısırgan otu kökünden elde edilen % 20'lik metanolik ekstrelerin prostat epitel hücre ve stromal hücrelerin proliferasyonunu yavaşlattığı gözlenmiştir (Lichius ve ark., 1999; Lindemann ve ark., 1999).

Bir diğer benzeri *in vivo* çalışmada da yine ölümcül urogenital sinüs dokusunun yetişkin farelerin ventral prostat bezlerine aşılması, manipule edilen prostat lobu ağırlığının 4-kat artmasına sebep olmuştur. İndüklenen büyüme Lichius ve arkadaşlarının 1997'de

yapmış olduğu çalışmada olduğu gibi yine ısırgan otu kökünden elde edilen % 20'lik metanolik ekstre ile % 33.8 oranında düşürülebilmıştır (Koch, 2001).

Lichius ve arkadaşlarının bir başka *in vivo* çalışmasında (1997) ısırgan otunun köklerinden elde edilen sulu ekstrelerinin farelerde prostat büyümesini % 26.5 oranında önlediği saptanmıştır. Az miktarda skopoletin (12.32 ppm), β -sitosterin (% 0.035), yüksek oranda protein (% 38), UDA (% 0.06) ve şekerin (% 6.27) sulu ekstrenin etken maddeleri olduğu belirtilmiştir (Lichius ve ark., 1997).

Ayrıca ısırgan otu sulu ekstresinin (Harput ve ark., 2005) ve özellikle köklerindeki UDA'nın (Wagner ve ark., 1989; Galelli ve ark., 1993) T lenfositlerinin proliferasyonunu seçici olarak uyardığı ve inflamatuvar makrofajlarda NO üretimini önlediği (Harput ve ark., 2005) de rapor edilmektedir. Flavonoidlerin insan bağırsak kanseri hücre serilerine karşı potansiyel doğal bir anti-kanser madde olarak sitotoksik etkileri de rapor edilmektedir (Imai ve ark., 2009). Bu bakımdan UDA gibi oldukça özel bileşenleri içeren ısırgan otunun sindirim sistemi kanserleri üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

In vivo çalışmaların *in vitro* çalışmalardan farklı sonuçlar verebileceği, verilen maddelerin oluşan metabolitlerinin de etkili olabileceği, vücut içinde farklı reaksiyonların, aynı anda gerçekleşmesi ve bunların birbirleriyle etkileşimlerinin olması gibi nedenlerle, , *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuç farklılıklarının bunlardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Urtica dioica ile ilgili literatürde yapılan *in vivo* ve *in vitro* tüm çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde ısırgan otunun yüksek kapasiteli antioksidan etkisiyle, karsinojenlere karşı koruyucu olduğu, kanser oluşumunu önlemede, tümör büyümesini yavaşlatıcı/durdurucu antiproliferatif etkileri, bazı apoptotik yolları indükleyerek, tümörü küçültücü etkileri nedeniyle kanser tedavisinde, kemoterapide ve radyoterapide destekleyici ve yan etkileri azaltıcı etkileri nedeniyle tamamlayıcı tedavide önemli bir yeri olabileceği düşünülmektedir.

Bir çok malign hastalığın bağımsıklık sistemi hücrelerinin sayı ya da fonksiyonlarının düşmesiyle ilgili olduğu düşünöldüğünde, özellikle ileri derece kolon kanserlerinde FasL kontrollü apoptoz sinyalinin kanser hücresinden tekrar T lenfositlerine gönderilmesi sonucu T lenfositlerinin apoptozuna sebep olabileceği (Şekil 1.10.) var sayıldığında, bağımsıklık sistemi hücrelerinin proliferasyonunu sağlayacak, etkiye sahip ekstre ya da ajanların önemi daha iyi anlaşılır. Bu nedenle biz de Harput ve ark. yayınlarında belirttikleri gibi *Urtica dioica*'nın kansere karşı kullanımında, bizim çalışmamızda olduğu gibi kolon kanseri hücre serilerinde direkt antiproliferatif, apoptotik etkileri saptanmasa bile, *Urtica dioica* ekstrelerinin bağımsıklık sistemini düzenleyici (immunomodulator) aktivitelerinin (Klingelhoefer ve ark., 1999; Fijalek ve ark., 2003; Galelli ve ark.,1995; Akbay ve ark., 2003; Harput ve ark., 2005) olabileceği üzerinde durulmalıdır. Bu konuda yapılacak, daha fazla sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara ihtiyaç olduğunu, alınacak sonuçlar doğrultusunda *Urtica dioica*'nın kanser tedavisinde tamamlayıcı olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada % 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarda hücre serisine uygulanan ısırgan ekstresi gruplarındaki oksidasyonun bir belirteci olan MDA düzeylerindeki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0.05$). Bunun yanında pürin metabolizmasında pürin yıkımının bir göstergesi olan XO enzimi aktivitesinde ekstre uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış gözlemlendi ADA aktivitesinde her iki grup arasında fark gözlemlenmedi. Antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre artış olduğu saptandı.

Öneriler

- Kurutulmuş *Urtica dioica*'nın sulu ekstrelerini farklı dozlarda, konsantrasyonlarda ve hücre kültür süresini uzatarak antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin gözlemlenmesi.
- Antioksidanların daha iyi çözünebileceği düşüncesinden hareketle, ısırgan otundan hazırlanan etanolik/metanolik ekstrelerinin aynı hücre serilerine uygulanarak antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin yeniden gözlemlenmesi.
- *Urtica dioica*'nın tohumlarından hazırlanan alkol ve suda çözünen ekstrelerinin HCT 116 ve diğer kanser hücre serilerinde denenmesi.
- Bağırsak hücrelerinin fizyolojik ortamı göz önünde bulundurularak, yağlı maddelerin barsak hücreleri tarafından daha iyi absorbe edilebileceği düşüncesinden hareketle, ısırgan otundan elde edilen yağın HCT 116 hücre serilerindeki etkilerinin gözlemlenmesi.
- Lipozom gibi aracı moleküller aracılığı ile *Urtica dioica* ekstresinin HCT 116 hücre serilerindeki hücrelerin içine aktarımının sağlanması.

- Hayvan modellerinde kolon kanseri oluşturup, *Urtica dioica*'nın tümör üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi.
- Başka hücre kanser serileri üzerinde *Urtica dioica* ekstralarının antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin gözlemlenmesi.

ÖZET

Isırgan Otu (*Urtica dioica*) Ekstresinin Kolon Kanseri Hücre Serileri Üzerindeki Apoptotik, Antiproliferatif ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması.

Antioksidan ve flavonoidler bakımından zengin olan Türkiye’de ve dünyada geleneksel tedavide, kanserden korunmada, kanser tedavisinde tamamlayıcı ve destekleyici olarak sıkça kullanılan bir bitki olan *Urtica dioica* üzerine literatürde bilimsel olarak *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışma olmasına karşın, kolon kanseri üzerine etkilerini araştıran *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların olmadığı görülmektedir.

Bu tez çalışmasında ısırgan otunun, insan kolon kanseri HCT 116 hücre serileri üzerindeki apoptotik, antiproliferatif, antioksidan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada % 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarda hücre serisine uygulanan ısırgan ekstresi gruplarındaki oksidasyonun bir belirteci olan MDA düzeylerindeki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p < 0.05$). Bunun yanında pürin metabolizmasında pürin yıkımının bir göstergesi olan XO enzimi aktivitesinde ekstre uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış gözlemlendi ADA aktivitesinde her iki grup arasında fark gözlemlenmedi. Antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubuna göre artış olduğu saptandı.

% 1.81, % 4 ve % 6.66 (w/v) konsantrasyonlarındaki ısırgan otu ekstresinin HCT116 P53-/- ve HCT116 P53+/+ hücre hattında canlılık üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmamızda ısırgan otunun anlamlı derecede apoptotik ve antiproliferatif bir etkisi saptanmadı.

Anahtar Kelimeler: *Urtica dioica*, apoptozis, antiproliferatif etki, antioksidan enzim aktivitesi, HCT 116 hücre serisi

SUMMARY

The Apoptotic, Antiproliferative and Antioxidant Effects of *Urtica dioica* Extract on the Colon Cancer Cell Lines.

Although there are a lot of in vivo and in vitro research on *Urtica dioica*, a plant which is rich in antioxidants and flavonoids, and is widely used in Turkey and in the world in traditional medicine as a complementary and supportive protection from cancer and cancer therapy, there is no in vivo and in vitro work investigating its effect on colon cancers.

In this thesis research, it was aimed to investigate the apoptotic, antiproliferative and antioxidant effects of stinging nettle on HCT 116 human colon cancer cell lines.

In this research, a statistically significant ($p < 0.05$) increase in the level of MDA - an indicator of the oxidation - was observed in the groups where nettle extract was applied in 1.81 %, 4 % and 6.66 % (w/v) concentrations compared to those in the control group. Moreover, although statistically not significant, an increase in the activity of the enzyme XO - which is an indicator of purine breakdown in the purine metabolism - was observed in the groups where the extract was applied compared to the control group. There was no difference in ADA activities between each two groups. Although it was statistically not significant, there was an increase in the activities of the antioxidant enzymes SOD and CAT, as compared with the control group.

In our research, in which the effect of *Urtica dioica* extract on the viability of HCT116 P53^{-/-} and HCT116 P53^{+/+} cell lines was investigated, a significant apoptotic and antiproliferative effect of *Urtica dioica* extract was not observed in 1.81 %, 4 % and 6.66 % (w/v) concentrations.

Key Words: *Urtica dioica*, apoptosis, antiproliferative effect, antioxidant enzyme activity, HCT 116 cell line

KAYNAKLAR

- AEBİ, S., FİNK, D., GORDON, R. (1997). Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res.* **3**:1763–1767.
- AGGARWAL, B. B., ICHIKAWA, H., GARODIA, P., WEERASINGHE, P., SETHI, G., BHATT, I. D., PANDEY, M., SHISHODIA, S., NAIR, M. G. (2006). From traditional ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **10**(1): 87-118.
- AKBAY, P., BAŞARAN, A., UNDEGER, U., BAŞARAN, N. (2003). *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytother Res.* **17**: 34–37.
- ABU-DAHAB, R., AFIFI, F. (2007). Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica.* **75**: 121-136.
- ADOM, K.K., SORRELLS, M.E., LIU, R.H. (2003). Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7825-7834.
- AKSU, M. G., BOZCUK, H. S., KORCUM, A. F. (2008). Effect of complementary and alternative medicine during radiotherapy on radiation toxicity. *Support Care Cancer.* **16**: 415–419.
- ANTONSSON, B., MARTİNOU, J.C. (2000). The Bcl-2 Protein Family. *Experimental Cell Research.* **256**: 50–57.
- AYAN, A. K., ÇALIŞKAN, Ö., ÇIRAK, C.T (2006). Isırgan otu (*Urtica* Spp.)’nun Ekonomik Önemi ve Tarımı. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi.* **21**(3): 357-363.
- AYDIN, M., ASLANER, A., ZENGİN, A. (2006). Using *Urtica Dioica* In Esophageal Cancer: A Report of a Case. *The Internet Journal of Surgery.* **7**(2). Erişim:[<http://www.ispub.com/>] . Erişim Tarihi: 08.08.2009
- AYERS, S., ROSCHEK, B. J.R., WILLIAMS, J.M., ALBERTE, R.S. (2008). Pharmacokinetic analysis of anti-allergy and anti-inflammation bioactives in a nettle (*Urtica dioica*) extract. *OJPK* **5**: 6-21.
- BALZARINI, J., NEYTS, J., SCHOLS, D., HOSOYA, M., VAN DAMME, E., PEUMANS, W., DE CLERCQ, E. (1992). The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **18**: 191-207.
- BALZARINI, J., VAN LAETHEM, K., HATSE, S., FROEYEN, M., PEUMANS, W., VAN DAMME, E., SCHOLS, D. (2005). Carbohydrate-binding agents cause deletions of highly conserved glycosylation sites in HIV GP120: a new therapeutic concept to hit the Achilles heel of HIV. *J. Biol. Chem.* **280**(4): 1005-14.

- BEDOYA, L.M., PALOMINO, S.S., ABAD, M.J., BERMEJO, P., ALCAMI, J. (2002). Screening of selected plant extracts for *in vitro* inhibitory activity on human immunodeficiency virus. *Phytother. Res.* **16**: 550-4.
- BNOUHAM, M., MERHFOUR, F.M., ZIYYAT, A., MEKHFI, H., AZIZ, M., LEGSSYER, A. (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia.* **74**: 677-681.
- BOLAND, C.R., SINICROPE, F.A., BRENNER, D.E., CARETHERS, J.M. (2000). Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology.* **118**: 115-28.
- BORDONARO, M., MARIADASON, J.M., ASLAM, F., HEERDT, B.G., AUGENLICHT, L.H. (1999). Butyrate-induced Apoptotic Cascade in Colonic Carcinoma Cells: Modulation of the β -Catenin-Tcf Pathway and Concordance with Effects of Sulindac and Trichostatin A but not Curcumin. *Cell Growth & Differentiation.* **10**: 713-720.
- BROEKAERT, W.F., PARIJS, J.V., LEYNS, F., JOOS, H., PEUMANS, W.J., (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science* **245**: 1100-2.
- CAO, W., CHI, W.H., WANG, J., TANG, J.J., LU, Y.J. (2005). TNF- α promotes Doxorubicin-induced cell apoptosis and anti-cancer effect through downregulation of p21 in p53-deficient tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **330**: 1034-1040.
- CETINUS, E., KILINÇ, M., İNANÇ, F., KURUTAŞ, E.B., BUZKAN, N. (2005). The role of *urtica dioica* (*urticaceae*) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats. *Tohoku J Exp Med.* **205**: 215-221.
- CHAURASIA, N., WICHTL, M. (1987). Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *J Nat Prod.* **50**: 881-5.
- CHRUBASIK, J. E., ROUFOGALIS, B. D., WAGNER, H., CHRUBASIK, S. (2007). A comprehensive review on nettle effect and efficacy profiles, Part I: Herba urticae. *Phytomedicine.* **14**: 423-435.
- CHRUBASIK, J. E., ROUFOGALIS, B. D., WAGNER, H., CHRUBASIK, S. (2007). A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. Part II: Urticae radix, *Phytomedicine.* **14**: 568-579.
- ÇELİK, I., TULUCE, Y. (2007). Elevation protective role of *Camellia sinensis* and *Urtica dioica* infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Phytother Res.* **21(11)**: 1039-1044.
- DAHLE, T. (1962). Mass examinations and cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen.* **82**: 1060.
- DANBARA, N., YURI, T., TSUJITA-KYUTOKU, M., TSUKAMOTO, R., UEHARA, N., TSUBURA, A. (2005). Enterolactone induces apoptosis and inhibits growth of Colo 201 human colon cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res.* **25**: 2269-2276.
- DAS, D., ARBER, N., JANKOWSKI, J. A. (2007). Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Digestion.* **76**: 51-67.

- DE MEJIA, E. G., VALENTIN, I. (2005). Priscaru Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **45**: 425–445.
- DURAK, İ., CANBOLAT, O., KAÇMAZ, M., ÖZGEN, G., ÖZTÜRK, H.S. (1998). Antioxidant Interferences in Superoxide Dismutase Activity Methods Using Superoxide Radical as Substrate. *Clin Chem Lab Med*. **36(6)**:407–408.
- DURAK, İ., BİRİ, H., DEVRİM, E., SÖZEN, S., AVCI, A. (2004). Aqueous Extract Of *Urtica Dioica* Makes Significant Inhibition on Adenosine Deaminase Activity In Prostate Tissue From Patients with Prostate Cancer. *Cancer Biology & Therapy*. **3(9)**: 855-857.
- DURAK, İ., ÇETİN, R., DEVRİM, E., ERGÜDER, I.B. (2005). Effects of black grape extract on activities of dna turn-over enzymes in cancerous and non cancerous human colon tissues. *Life Sciences*. **76** : 2995–3000.
- EL HAOUARI, M., BNOUHAM, M., BENDAHO, M., AZLZ, M., ZLYYAT, A., LEGSSYER, A. AND MEKHFI, H. (2006). Inhibition of Rat Platelet Aggregation by *Urtica dioica* Leaves Extracts. *Phytotherapy Research*. **20**: 568–572.
- EMEA COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS (HMPC). (2009). Assessment Report on *Urtica dioica L.*, *Urtica urens L.*, their Hybrids or their Mixtures, Radix. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use.
- ERTÜRK, ÖMER VE ARK. (1999). The Effect of Some Plant Extracts on The Replication of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virüs In Spodoptera frugiperda Cell Culture. *Ekoloji Çevre Dergisi*. **9(33)**: 15-17.
- EZEOME, E.R., ANARADO, A.N. (2007). Use of complementary and alternative medicine by cancer patients at the University of Nigeria Teaching Hospital, Enugu, Nigeria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **7**:28
- FARZAMI, B., AHMADVAND, D., VARDASBI, S., MAJIN, F.J., KHAGHANI, S. (2003). Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its *in vivo* effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **89**: 47-53.
- FETROW, C. W., AND AVILA EDS., J.R. (1999). Professional's Handbook of Complementary and Alternative Medicines. *Springhouse Corporation*, Springhouse, Pennsylvania, USA. 103-107.
- FIJALEK, Z., SOLTYK, K., LOZAK, A., KOMINEK, A., OSTAPCZUK, P. (2003). Determination of some micro- and macroelements in preparations made from peppermint and nettle leaves. *Pharmazie*. **58**: 480–482.
- FU, H.Y., , S.J. CHEN, CHEN R.F., DING, W. H., KUO-HUANG, L. L, HUANG, R. N. (2006). Identification of Oxalic Asit and Tartaric Asit as Major Persistent Pain-inducing Toxins in the Stinging Hairs of the Nettle, *Urtica thunbergiana*. *Annals of Botany*. **98**: 57–65.

- GALELLI, A., TRUFFA-BACHI, P. (1993). *Urtica dioica agglutinin*. A superantigenic lectin from stinging nettle rhizome. *J Immunol.* **151**: 1821-1831.
- GHOBRIAL, I. M., WITZIG, T. E., ADJEI, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin.* **55**: 178-194. Erişim: [http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/55/3/178]. Erişim Tarihi: 05.02.2010
- GOUN, E.A., PETRICHENKO, V.M., SOLODNIKOV, S.U., SUHININA, T.V., KLINE, M. A., CUNNINGHAM, G., NGUYEN, C., MILES, H. (2002). Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *Journal of Ethnopharmacology.* **81**: 337-342.
- GÖZÜAÇIK, D., KİMCHİ, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* **23(16)**:2891-2906.
- GÖZÜM, S., TEZEL, A., KOÇ, M., (2003). Complementary Alternative Treatments Used by Patients With Cancer in Eastern Turkey. *Cancer Nursing.* **26 (3)**: 230-236.
- GÖZÜM, S., ARIKAN, D., M. BÜYÜKAVCI, M. (2007). Complementary and Alternative Medicine Use in Pediatric Oncology Patients in Eastern Turkey. *Cancer Nursing.* **30(1)**: 38-44.
- GUIL-GUERREROA, J.L., REBOLLOSO-FUENTESA, M.M., ISASA, M.E.T. (2003). Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica L.*). *Journal of Food Composition and Analysis.* **16**: 111-119.
- GIUSTI, G. (1974). Adenosine deaminase. IN : H.U. BERGMAYER (ED), *Methods of enzymatic analysis*, 2nd edition, Verlag chemie, Weinheim and Academic Press, New York. pp. 1092-1099.
- GÜRHAN, G., EZER, N. (2004). Halk Arasında Hemeroid Tedavisinde Kullanılan Bitkiler -I. *Hacettepe Üniv. Ecz. Fak. Dergisi.* **24**: 37-55.
- GÜLÇİN, I., KÜFREYOĞLU, Ö.I., OKTAY, M., BÜYÜKOKUROĞLU, M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*). *Journal of Ethnopharmacology.* **90**: 205-215.
- HABU, D., SHIOMI, S., TAMORI, A., ET AL. (2004). Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA.* **292**: 358-361.
- HARPUT, U. S., SARACOĞLU, I., OGIHARA, Y. (2005). Stimulation of Lymphocyte Proliferation and Inhibition of Nitric Oxide Production by Aqueous *Urtica dioica* Extract. *Phytotherapy Research.* **19**: 346-348.
- HEBER, D., LU, Q.-Y. (2002). Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Experimental Biology and Medicine.* **227**: 920-923.
- HIRAMO, T., HOMMA, M., OKA, K., (1994). Effect of stinging nettle extracts and their steroidal components on the Na⁺, K⁺-ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Medica.* **60**: 30-33.

- HOFSETH, L. J. (2008). Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Letters*. **268**: 10–30.
- HOGAN, F. S., KRISHNEGOWDA, N.K., MIKHAILOVA, M., KAHLENBERG, M.S. (2007). Flavonoid, Silibinin, Inhibits Proliferation and Promotes Cell-Cycle Arrest of Human Colon Cancer. *J. of Surgical Research*. **143**: 58–65.
- HOVENKAMP, E., DEMONTY, I., PLAT, J., LUTJOHANN, D., MENSINK, R.P., TRAUTWEIN, E. A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Res*. **47**: 37–49.
- IMAI, M., KIKUCHI H., DENDA, T., OHYAMA, K., HIROBE, C., TOYODA, H. (2009). Cytotoxic effects of flavonoids against a human colon cancer derived cell line, COLO 201: A potential natural anti-cancer substance. *Cancer Letters*. **276**: 74–80.
- ITANI, W. S., EL-BANNA, S. H., HASSAN, S.B., LARSSON, R.L., BAZARBACHI, A., GALI-MUHTASIB, H.U. (2008). Anti colon cancer components from Lebanese sage (*Salvia ibanotica*) essential oil. Mechanistic basis. *Cancer Biology & Therapy*. **7(11)**: 1765-1773.
- IZZO, A. A., CAPASSO, F. (2003). Herbal medicine, cancer prevention and cyclooxygenase 2 inhibition. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. **24 (5)**.
- JASON, E. B. (2008). Testosterone: Elevating Levels for Increased Energy and Overall Health. *Vitamin Research News*. **22 (6)**.
- JASPERSON, K. W., TUOHY, T.M., NEKLASON, D. W., BURT, R.W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*. **138**: 2044–2058.
- JIA, Q. (2003). Generating and Screening a Natural Product Library For Cyclooxygenase and Lipoxygenase Dual Inhibitors. *Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry*. **29**: 643-718.
- JIN, J.S., HATTORI, M. (2009). Further Studies on a Human Intestinal Bacterium *Ruminococcus* sp. END-1 for Transformation of Plant Lignans to Mammalian Lignans. *J. Agric. Food Chem*. **57**: 7537–7542.
- JOHNSEN, N.F., OLSEN, A., THOMSEN, B. L. R., CHRISTENSEN, J., EGEBERG, R., KNUDSEN, K. E. B., LOFT, S., OVERVAD, K., TJONNELAND, A. (2010). Plasma enterolactone and risk of colon and rectal cancer in a case-cohort study of Danish men and women. *Cancer Causes Control*. **21**: 153–162.
- JORDINSON, M., CALAM, J., PIGNATELLI, M. (1998). Lectins: from basic science to clinical application in cancer prevention. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. **7(9)**: 1389-1403.
- KAN, Y., ORHAN, İ., KOCA, U., ÖZCELİK, B., ASLAN, S., KARTAL, M., KÜSMENOĞLU, Ş. (2009). Fatty Acid Profile And Antimicrobial Effect Of The Seed Oils Of *Urtica Dioica* And *U. Pilulifera*. *Turk J.Pharm. Sci*. **6 (1)**: 21-30.

- KANTER, M., COSKUN, O., BUDANCAMANAK, M. (2005). Hepatoprotective effects of *Nigella sativa L* and *Urtica dioica L* on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J Gastroenterol.* **11(42)**: 6684-6688.
- KAUR, M., AGARWAL, R., AGARWAL, C. (2006). Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells: possible role of ataxia telangiectasia mutated-p53 activation. *Mol Cancer Ther.* **5(5)**.
- KELET, O., BAKIREL, T., AK S., ALPMAR, A. (2001). The antibacterial activity of some plants used for medicinal purposes against pathogens of veterinary importance. *Folia Veterinaria.* **45**: 243-246.
- KELLEY, N. S., HUBBARD, N. E., ERICKSON, K. L. (2007). Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer. *The Journal of Nutrition.* **137**: 2599-2607
- KHALİL, Z., LIU, T., HELWE, R.D., (1999). Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain.* **79**: 31-37.
- KLINGELHOEFER, S., OBERTREIS, B., QUAST, S., BEHNKE, B. (1999). Antirheumatic effect of IDS 23, a stinging nettle leaf extract, on *in vitro* expression of T helper cytokines. *J Rheumatol.* **26(12)**: 2517-2522.
- KOCH, E. (2001). Extracts from Fruits of Saw Palmetto (*Sabal serrulata*) and Roots of Stinging Nettle (*Urtica dioica*): Viable Alternatives in the Medical Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia and Associated Lower Urinary Tracts Symptoms. *Planta Med.* **67**: 489-500.
- KOÇ, H. (2002). Bitkilerle Sağlıklı Yaşama. *GOP Üniversitesi Tokat. Ümit Ofset B.* Ankara. 388.
- KONRAD, L., MULLER, H.H., LENZ, C., LAUBINGER, H., AUMULLER, G., LICHJUS J.J. (2000). Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Med.* **66(1)**: 44-47.
- KONRAD, A., MÖHLER, M., ARNI, S., FLOGERZI, B., KLINGELHÖFER, S., SEIBOLD, F. (2005). Ameliorative effect of IDS30, a stinging nettle leaf extract, on chronic colitis. *Int J Colorectal Dis.* **20(1)**: 9-17.
- KRZESKI, T., KAZON, M., BORKOWSKI, A., KUCZERA, J. (1993). Combined extracts of *Urtica dioica* and *Pygeum africanum* in the treatment of benign hyperplasia: double-blind comparison of two doses. *Clinical Therapy.* **6**: 1011-1020.
- KULKARNI, S.D., TILAK, J.C., ACHARYA, R., RAJURKAR, N.S., DEVASAGAYAM, T.P.A., REDDY, A.V.R. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum L.*) as a function of growth under different conditions. *Phytotherapy Research.* **20(3)**: 218-227.
- KUNE, G., WATSON, L. (2006). Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. *Nutr Cancer.* **56**: 11-21.

- KÜLTÜR, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. **111**: 341–364.
- LAAN, L. V. D., KAPITEIN, P.J., OYEN, W.J., VERHOFSTAD, A.A., HENDRIKS, T., GORIS, R.J. (1997). A novel animal model to evaluate oxygen derived free radical damage in soft tissue. *F. Radical Res.* **26**: 363–372.
- LAGE, H., DUARTE, N., COBURGER, C., HILGEROTH A., FERREIRA M.J.U. (2009). Antitumor activity of terpenoids against classical ve atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*.
- LANGDON, S. P. (2004). *Methods in Molecular Medicine*. v **88**: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- LERNER, D. R., RAIKHEL, N. (1992). The Gene for Stinging Nettle Lectin (*Urtica Dioica Agglutinin*) Encodes Both A Lectin And A Chitinase. *The Journal Of Biological Chemistry*. **267(16)**: 11085-11091.
- Li, F., SETHI, G. (2010). Targeting transcription factor NF-κB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1805**: 167–180.
- LICHIOUS, J.J., MUTH, C. (1997). The inhibiting effects of *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. *Planta Medica*. **63**: 307-310.
- LICHIOUS, J.J., LENZ, C., LINDEMANN, P., MÜLLER, H.H., AUMÜLLER, G., KONRAD, L. (1999). Antiproliferative effect of a polysaccharide fraction of a 20% methanolic extract of stinging nettle roots upon epithelial cells of the human prostate (LNCaP). *Pharmazie*. **54(10)**: 768-771.
- LICHIOUS, J.J., RENNEBERG, H., BLASCHEK, W., AUMÜLLER, G., MUTH, G. (1999). The inhibiting effects of components of stinging nettle roots on experimentally induced prostatic hyperplasia in mice. *Planta Med*. **65(7)**: 666-668.
- LINDEMANN, P., MULLER, H.H., AUMULLER, G., KONRAD, L. (1999). Antiproliferative effect of a polysaccharide fraction of a 20% methanolic extract of stinging nettle roots upon epithelial cells of the human prostate (LNCaP). *Pharmazie*. **54**: 768–771.
- LOWE, S.W., LIN, A.W. (2000). Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*. **21(3)**: 485-495.
- MAGRINI, V. VON R. (2002). Aus der Abteilung für Gastroenterologie des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin. Effect of p53 or hMLH1 status on the mechanisms of cytotoxicity of 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) or irinotecan (CPT-11) in colorectal cancer cell lines. *Dissertation*
- MAK, T. (2003). Apoptotic signaling in cancer. *Program and abstracts of the 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*. Washington, DC.
- MANDAL, P., MISRA, T.K., SINGH, I.D., DAS, J.K., BHUNIA, M. (2009). Free-radical-scavenging activity in the inflorescence of European Nettle/Sisnu (*Urtica dioica* L.). *J Young Pharmacists* **1(2)**: 129—135.

- MANGANELLI, R.E.U., ZACCARO, L., TOMEI, P.E. (2005). Antiviral activity *in vitro* of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology*. **98**: 323-327.
- MARTINEZ, M.J.A., BENITO, P.B. (2005). Biological Activity of Quinones. Atta-Ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*. **30**: 303-366.
- MAVI, A., VE ARK. (2004). Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum subsp. verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol. Pharm. Bull.* **27(5)**: 702—705.
- MAZZIO, E. A., SOLIMAN, K. F. A. (2009). *In Vitro* Screening for the Tumoricidal Properties of International Medicinal Herbs. *Phytother. Res.* **23**: 385–398.
- MEER, F.J. V. D., DE HAAN, C.A., SCHURMAN, N.M., HAJJEMA, B.J., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., DELPUTTE, P.L., BALZARINI, J., EGBERINK, H.F. (2007). Antiviral activity of carbohydrate-binding agents against Nidovirales in cell culture. *Antiviral Res.* **76(1)**: 21-9.
- MODY, R., JOSHI, S.H.A., CHANEY, W. (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **33(1)**: 1-10.
- MURRAY, T., KANG, J., .ASTHEIMER, L., PRICE, W.E. (2007). Tissue Distribution of Lignans in Rats in Response to Diet, Dose-Response, and Competition with Isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4907-4912.
- MUSETTE, P., GALELLI, A., CHABRE, H., CALLARD, P., PEUMANS, W., TRUFFA-BACHI, P., KOURILSKY, P., GACHELIN, G. (1996). *Urtica dioica* agglutinin, a V beta 8,3-specific superantigen, prevents the development of the systemic lupus erythematosus-like pathology of MRL lpr/lpr mice. *Eur J Immunol.* **26**:1707–1711.
- NASSIRI-ASL, M., ZAMANSOLTANI, F., ABBASI, E., DANESHI, M.M., ZANGIVAND, A.A. (2009). Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine.* **7(5)**: 428-433.
- NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D. (1996). Herbal medicines: a guide for health-care professionals. *The Pharmaceutical press*. 201.
- NICODEMUS, K.K., JACOBS JR, D.R., FOLSOM, A.R. (2001) Whole and refined grain intake and risk of incident postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes and Control.* **12**: 917–925.
- O'CONNELL, J., BENNETT, M. W., NALLY, K., HOUSTON, A., O'SULLIVAN, G. C., SHANAHAN, F. (2000). Altered Mechanisms of Apoptosis in Colon Cancer: Fas Resistance and Counterattack in the Tumor-Immune Conflict. *Annals New York Academy of Sciences.* **910 (1)**: 178-195.
- OBERTREIS, B., GILLER, K., TEUCHER, T. (1996). Antiphlogistic effects of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. *Arzneimittelforschung.* **46**: 52-56.

- ÖZEN, T., KORKMAZ, H. (2003). Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine*. **10**: 405–415.
- PARK, J., SHIN, D. W., AHN, T. Y. (2008). Complementary and alternative medicine in men's health.
- PRASAD, K. (2000). Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *Int J Angiol* **9**: 220–225.
- PROSTATE CANCER FUND (a special program of Project Cure Foundation). Treatment of Prostate Cancer with Natural Therapeutics, Edition 5, Jan. (2007) Washington, D.C. ML252FP-REP.
- RANDALL, C., MCCTHAN, K., RANDALL, H., DOBBS, F. (1999). Nettle sting of *Urtica dioica* for joint pain: an exploratory study of this complementary therapy. *Complement Ther Med*. **7(3)**: 126-31.
- RANDALL, C., RANDALL, H., DOBBS, F. (2000). The randomised controlled trial of nettle sting for treatment of base of thumb pain. *J. R. Soc. Med.* **93**: 305–309.
- RENEHAN, A.G., BACH, S., POTTEN, C. (2001). The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol*. **15(3)**: 166-76.
- RENEHAN, A.G., BOOTH, C., POTTEN, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*. **322(7301)**: 1536-15388.
- RIEHMANN, K., VE ARK. (1999). Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett*. **442(1)**: 89-94.
- ROCHFORT, S., PARKER, A. J., DUNSHEA, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. **69**: 299–322.
- ROSCHEK, J.R. B., FINK, R. C., MCMICHAEL, M., ALBERTE, R. S. (2009). Nettle Extract (*Urtica dioica*) Affects Key Receptors and Enzymes Associated with Allergic Rhinitis. *Phytotherapy Research*. **23**: 920–926. Erişim: [www.interscience.wiley.com]. Erişim Tarihi: 15.08.2009
- ROUSSI, S., WINTER, A., GOSSE, F., WERNER, D., ZHANG, X., MARCHIONI, E., ET AL. (2005). Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7-beta-hydroxystosterol and 7-beta-hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ*. **12**: 128–35.
- SAARINEN, N.M., PENTTINEN, P.E., SMEDS, A.I., HURMERINTA, T.T., MAKELA, S.I. (2005). Structural determinants of plant lignans for growth of mammary tumors and hormonal responses *in vivo*. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. **93**: 209–219.

- SAMES, K., SCHUMACHER, U., HALATA, Z., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., ASMUS, B., MOLL, R., AND MOLL, I. (2001). Lectin and proteoglycan histochemistry of Merkel cell carcinomas. *Exp. Dermatol.* **10(2)**:100–109.
- SAUL, F.A., ROVIRA, P., BOULOT, G., VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., TRUFFA-BACHI, P., BENTLEY, G.A. (2000). Crystal structure of *Urtica dioica agglutinin*, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II, *Structure* **8**: 593-603.
- SUH, N., LUYENGI, L., FONG, H.H., KINGHORN, A.D., PEZZUTO, J.M. (1995). Discovery of natural product chemopreventive agents utilizing HL-60 cell differentiation as a model. *Anticancer Res.* **15**: 233-9.
- ŞİMSEK, I., AYTEKİN, F., YESİLADA, E., YILDIRIMLI, S.(2004). An ethnobotanical study of the Beypazarı, Ayas, and Gudul district towns of Ankara province (Turkey). *Economic Botany*. **58**: 705-720.
- TAHRI, A., YAMANI, S., LEGSSYER, A., AZIZ, M., MEKHFI, H., BNOUHAM, M., ZIYYAT, A. (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology.* **73**: 95–100.
- TANAKOL, R.. (1998). Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik gelişim.* **11**: 347–356.
- TANG, F.-Y., SHIH, C.-J., CHENG, L.-H., HO, H.-J., CHEN, H.-J. (2008). Lycopene inhibits growth of human colon cancer cells via suppression of the Akt signaling pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**: 646 – 654.
- TANG, F.-Y., CHO, H.-J., PAI, M.-H., CHEN, Y.-H. (2009). Concomitant supplementation of lycopene and eicosapentaenoic acid inhibits the proliferation of human colon cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **20**: 426–434.
- TAYLOR, L., (2005). The Healing Power of Rainforest Herbs. New York. ISBN: 0-7570-0144-0 Erişim: [www.raintreenutrition.com/nettles.htm]. Erişim Tarihi: 12.09.2009
- TELLO, S., HALİFEOĞLU, I., BOZKURT, M., BULMUŞ, Ö. (2008). Meme Kanseri Oluşturulmuş Ratlarda Isırgan Otunun Total Antioksidan Durumu Üzerine Etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi.* **22(4)**: 179-183.
- TERZİC, J., GRİVENNIKOV, S., KARİN, E., KARİN, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology.* **138**: 2101–2114.
- TESTAI, L., CHERICONI, S., CALDERONE, V., NENCIONI, G., NIERI, P., MORELLI, I., MARTINOTTI, E. (2002). Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) roots extracts: *in vitro* and *in vivo* pharmacological studies. *Journal of Ethnopharmacology.* **81**: 105-109.
- TOLDY, A., STADLER, K., SASVARI, M., JAKUS, J., JUNG, K.J., CHUNG, H.Y. (2005). The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res Bull.* **65(6)**: 487-93.

- TOLDY, A., ATALAY, M., STADLER, K., SASVÁRI, M., JAKUS, J., JUNG, K.J., CHUNG, H.Y., NYAKAS, C., RADÁK, Z. (2009). The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. *J of Nutritional Biochemistry*. **20**: 974–981.
- TOMATIR, A.G.(2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin J Med Sci*. **23**:499-508.
- TONG, X., YIN, L., JOSHI, S., ROSENBERG, D. W., & GIARDINA, C. (2005). Cyclooxygenase-2 Regulation in Colon Cancer Cells. Modulation of RNA Polymerase II Elongation By Histone Deacetylase Inhibitors. *The Journal Of Biological Chemistry*. **280 (16)**: 15503–15509.
- TREASURE, J. (2003). Urtica semen reduces serum creatinine levels. *The Journal of the American Herbalists Guild*. **4(2)**: 22-25.
- TROUILLAS, P., CALLISTE, C. A., ALLAIS, D. P., SIMON, A., MARFAK, A., DELA, C., ET AL. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*. **80**: 399–407.
- TURAN, M., SÖKMEN, A., KARADAYI, K., POLAT, Z.A., ŞEN, M. (2010). Sivas yöresine özgü bazı bitki özütlerinin anti neoplastik etkileri. *Cumhuriyet Tıp Derg*. **32**: 9-18.
- TURVILLE, S.G., VERMEIRE, K., BALZARINI, J., SCHOLS, D. (2005). Sugar-binding proteins potently inhibit dendritic cell human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and dendriticcell-directed HIV-1 transfer. *J Virol*. **79**: 13519-27.
- TÜRKER, A.U., USTA, C. (2008). Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Nat Prod Res*. **22(2)**: 136-46.
- UZUN, E., SARIYAR, G., ADSERSEN, A., KARAKOC, B., ÖTÜK, G., OKTAYOGLU, E., PİRİLDAR, S. (2004). Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Journal of Ethnopharmacology*. **95**: 287-296.
- WAGNER, H., WILLER, F., KREHER, B. (1989). Biologically active compounds from the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Planta Medica*. **55**: 452–454.
- WETHERILT, H., (1989). Isırganotu Yaprak ve Tohumlarının Besleyici Özellikleri ve Antitümörel Etkileri. *Doktora tezi*. Hacettepe Univ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- WATSON, BAKER, BELL, GANN, LEVINE, LOSICK. (2008). *Molecular Biology of the Gene*. s.267 *Pearson Int*.
- WHITEHOUSE, A., MEREDITH, D.M., MARKHAM, A.F. (1998). DNA mismatch repair genes and their association with colorectal cancer. *Int J Mol Med*. **1**: 469-74.
- WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G., POOL-ZOBEL, B.L. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*. **73(suppl)**: 451S–5S.

- YONGNA, Z., WANTANA, R., PISIT, B., ZHONGKUN, L., RONGPING, Z. (2005). Analgesic and antipyretic activities of the aqueous extract of *Urtica macrorrhiza* in experimental animals. *Fitoterapia*. **76**: 91-95.
- ZIYYAT, A., LEGSSYER, A., MEKHFİ, H., DASSOULİ, A., SERHROUCHNİ, M., BENJELLOUN, W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*. **58**: 45-54.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Fettah

Soyadı : Korkmaz

Uyruğu : T.C.

Doğum yeri ve tarihi : Tatlıpınar 01.09.1965

Medeni durumu : Evli

Askerlik durumu : Yaptı

İletişim adresi : Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim
Dalı Başkanlığı 06100 Sıhhiye/ ANKARA

Telefonu : 3123103010-400

E-Mail : fettah.korkmaz@gmail.com

II- Eğitimi

2009-2010 : Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisansı,
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

2007-2008 : M.Sc. Information Technology (Software Engineering),
Heriot-Watt University, Department of Mathematics and Computer
Sciences, Edinburgh, UK

Tez Çalışması: *Performance Analysis of Genetic and Immune Inspired Algorithms for Pattern Classification and Medical (Cancer) Diagnosis.*

1983-1989 : Biyoloji Eğitim, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Yabancı Dili : İngilizce

III- Ünvanları

1991 : Bilgisayar Formatörü

1990 : Biyoloji Öğretmeni

IV- Bilimsel Etkinlikleri

Verdiği Seminerler

Ekim 2009 İsrırgan Otunun (*U. dioica*) Bileşimi, Tıbbi Ve Onkolojik Önemi
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2009 Postranslasyonel Modifikasyonlar
Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2008 Ant Systems (Artificial Intelligence Optimisation Algorithms)
Heriot-Watt University, Department of Mathematics and
Computer Sciences