Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi
45 (3) 263-270, 2019
DOI: https://doi.org/10.32708/uutfd.613912

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Rosmarinik Asidin Cisplatine Karşı Antisitotoksik ve Antigenotoksik Etkisinin A549 ve Beas-2B Hücre Hatlarında Araştırılması

Özgür VATAN

Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bursa.

ÖZET

Rosmarinik Asit (RA) birçok bitki türünde bulunan önemli bir fenolik bileşiktir. Çalışmada RA'nın, A549 (İnsan Akciğer Kanser Hücre Hattı) ve Beas-2B (İnsan Sağlıklı Bronşial Epitel Hücre Hattı) hücrelerinde, Cisplatin tarafından oluşturulan sitotoksik, genotoksik etki ve oksidatif strese karşın etkinliğinin *in vitro* olarak belirlenmesi ve böylelikle Cisplatin kemoterapisi sırasında hastalar tarafından kullanılabilecek RA içerikli bitkisel ürünlerin Cisplatin tedavisi üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak sitotoksite belirlenmesinde XTT, genotoksite belirlenmesinde Komet ve oksidatif stres değerlerinin belirlenmesinde ise DCFH-DA yöntemleri kullanılmıştır. Yöntemlerde hücreler Cisplatin'in iki farklı dozuna (11, 22 µM) 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Hücreler RA'nın üç farklı konsantrasyonuna (50, 100, 200 µM) hem tek başına hem de Cisplatin'in iki farklı dozu ile beraber uygulanarak 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak Cisplatin dozları tarafından arttırılan; sitotoksik etkiye karşın RA'nın kullanılan konsantrasyonlarının antisitotoksik aktivite, genotoksik etkiye karşın ise antigenotoksik aktivite gösterme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. RA'nın bu aktivitelerinin temelinde de Cisplatin tarafından arttırılan oksidatif stres parametrelerini azaltıcı antioksidan özellik göstermesi olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak RA içeren bitkisel ürünlerin, özellikle Cisplatin kemoterapisi alan hastalarda bilinçsizce tüketiminin önlenmesi gerekliliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rosmarinik asit. Cisplatin. Antisitotoksite. Antigenotoksite.

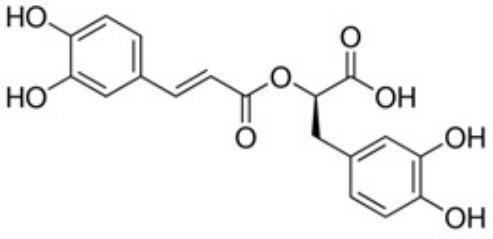
Investigation of Anticytotoxic and Antigenotoxic Effect of Rosmarinic Acid Against Cisplatın In A549 and Beas-2B Cell Lines

ABSTRACT

Rosmarinic Acid (RA) is an important phenolic compound found in many plant species. The aim of this study was to determine the efficacy of RA against Cisplatin-induced cytotoxic, genotoxic effects and oxidative stress in A549 (Human Lung Cancer Cell Line) and Beas-2B (Human Healthy Bronchial Epithelial Cell Line) cells. In this way, it was aimed to determine the possible effects of RA-containing herbal products that can be used by patients, on Cisplatin treatment during Cisplatin chemotherapy. For this purpose, XTT assay was used to determine cytotoxicity, Comet assay was used to determine genotoxicity and, DCFH-DA assay was used to determine oxidative stress values. Cells were exposed to two different doses of Cisplatin (11, 22 µM) for 24 hours. Cells were exposed to three different concentrations of RA (50, 100, 200 µM) both alone and in combination with two different doses of Cisplatin for 24 hours. As a result, it was determined, used RA concentrations have anti cytotoxic activity potential, against the cytotoxic effect increased by Cisplatin and antigenotoxic activity potential, against the genotoxic effect increased by Cisplatin. It was found that these activities of RA were based on antioxidant properties which reduced oxidative stress parameters increased by Cisplatin. In conclusion, the necessity to prevent the unconscious consumption of herbal products containing RA, especially in patients receiving Cisplatin chemotherapy has been shown.

Key Words: Rosmarinic acid. Cisplatin. Anticytotoxicity. Antigenotoxicity.

Kozmetikten gıda sanayisine kadar pek çok alanda kullanımı bulunan Rosmarinik asit (RA), kafeik asit ve 3,4 dihidroksifenillaktikasit'in esteridir[1]. İlk olarak 1958 yılında Scarpati ve Oriente tarafından *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) bitkisinden izole edilmiş olan RA'nın kimyasal yapısı şekil 1 de gösterilmiştir[2].



Şekil 1.
Rosmarinik asidin kimyasal yapısı
([3] nolu kaynaktan alınmıştır).

Geliş Tarihi: 01 Eylül 2019
Kabul Tarihi: 25 Eylül 2019

Dr. Özgür VATAN
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Bursa.
Tel.: 0535 359 70 62 / 0224 294 18 65
E-posta: ovatan@uludag.edu.tr

Daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarla pek çok bitki familyasına ait farklı türlerin de RA içerdiği belirlenmiştir. Lamiaceae ve Boraginaceae dışında RA içeren belli başlı familyalara; Apiaceae[4], Araliaceae[5], Cucurbitaceae[6], Tiliaceae[7], Rubiaceae[8], Sterculiaceae[9], Zosteraceae[10], Blechnaceae[11], Anthocerotaceae[12] familyaları örnek verilebilir.

Chu ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada RA'nın antiinflamatuar etkinliğini farelerde lipopolisakkaritlerle indükledikleri akut akciğer yaralanmalarında *in vivo* olarak göstermişlerdir[13]. Sanchez-Campillo ve ark ise RA'nın UV ışınlarından koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir[14]. Bunların dışında RA'nın antioksidan özelliklerinin gösterildiği birçok çalışma bulunmaktadır[15]. Bununla birlikte farklı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de RA açısından zengin *Rosmarinus officinalis* (biberiye) gibi bitkilerin halk arasında farklı semptomlara karşı geleneksel olarak kullanımı da oldukça yaygındır[16,17].

Çalışmada özellikle Cisplatin kemoterapisi alan hastalarda, RA kullanımının oluşturabileceği etkilerin *in vitro* olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Cisplatin'in sitotoksik ve genotoksik etkilerine karşı RA'nın olası antisitotoksik ve antigenotoksik özellikleri *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada RA'nın (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, CAS: 20283-92-5) Cisplatin (Sigma Aldrich Darmstadt, Germany, CAS: 15663-27-1) tarafından oluşturulan sitotoksik ve genotoksik etkiye karşı antisitotoksik ve antigenotoksik etkinliği A549 (ATCC® CRM-CCL-185™) insan akciğer kanser hücre hattı ve Beas-2B (ATCC® CRL-9609™) insan sağlıklı bronşial epitel hücre hatlarında *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bununla birlikte Cisplatin etki mekanizmasında önemli rol oynayan Hücre içi Reaktif Oksijen Türleri (ROS; "Reactive Oxygen Species") üzerinde Cisplatin'in etkisine karşın RA'nın etkinliği de aynı hücre hatları kullanılarak araştırılmıştır. Sitotoksite-antisitotoksite belirlenmesinde XTT ((2,3-bis[2-metoksi- 4-nitro- 5-sulfofenil]- 2H-tetrazolyum- 5-karboksianilit iç tuzu), genotoksite - antigenotoksite belirlenmesinde Komet, Hücre içi, ROS miktarı belirlenmesinde ise 2', 7' Diklorohidrofloresein diasetat (DCFH-DA, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, CAS: 4091-99-0) yöntemleri kullanılmıştır.

XTT Yöntemi

A549 ve Beas-2B hücreleri 37 ^{o}C ve %5 CO_2 içeren ortama sahip inkübatörlerde havalandırmalı T75 flasklar içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür ortamı olarak kullanılan besiyeri içeriği; RPMI 1640 medyum (PAN Biotech, Aidenbach, Germany), %10 Fetal Calf serum (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) 1mM Sodyum Pürivat (PAN Biotech, Aidenbach, Germany).1 mM L- Glutamin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany), 100U/ml Penisilin- 100 µg/ml Streptomisin (Biochrom AG, Berlin, Germany) ile oluşturulmuştur. Hücreler T75 flaskların %80'ini kapladıktan sonra tripsinize edilerek süspanse hale getirilmiştir. Trypan Blue (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) solüsyonu ile canlılıkları belirlenen hücrelerden 96 kuyucuklu plaklara 8000 canlı hücre / kuyucuk şeklinde ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler deney setlerini oluşturacak şekilde RA ve Cisplatin'in farklı konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Öncelikle RA'nın sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi için hücreler RA'nın 6 farklı konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır (12,5; 25; 50; 100; 200; 400 µM). Buradan seçilen üç farklı RA konsantrasyonu (50; 100; 200 µM) Cisplatin'in daha önceki çalışmalarımızda etkinliğini belirlemiş olduğumuz 22 µM ve 11µM dozları ile birlikte hücrelere uygulanmıştır[18]. Süre sonunda hücrelerin canlılıkları XTT Cell proliferation Kit (BI; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem sarı renkli bir tetrazolium tuzu olan XTT'nin canlı hücrelerin mitokondrial suksinat dehidrogenaz enzim aktiviesi ile elektron eşleştirici reaktif varlığında portakal renkli formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanmaktadır[19]. XTT uygulaması muamele süreleri sonrasında üreticinin önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Ardından her bir kuyucuktaki 450 nm de absorbans değerleri mikroplaka okuyucu (Biotek ELx800, Biotek Instruments Inc. VT. USA) kullanılarak belirlenmiştir. Absorbans değerlerinden aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerin % canlılık değerleri belirlenmiştir[18].

$$\text{Absorbans}_{\text{muamele grubu}} / \text{Absorbans}_{\text{kontrol grubu}} \times 100$$

Komet Yöntemi

Yöntem DNA da meydana gelmiş tek zincir kırıklarının ve yüksek alkali çözelti içerisinde kırıklara dönüşen alkalilenebilecek noktaların belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan önemli bir genotoksite yöntemidir[20]. Temel prensibi tek hücre DNA'sının lam üzerine kaplanmış agaroz jel içerinde elektroforetik alanda göç etmesine dayanmaktadır o nedenle tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis SCGE) olarak ta isimlendirilmektedir, mikroskoptaki görüntü kuyruklu yıldız benzeri olduğu için Komet (comet) ismi daha yaygın kullanılmaktadır.

Hücreler havalandırmalı kapaklı T25 flasklar içerisine 50000 canlı hücre/flask olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler deney setlerini oluşturacak şekilde RA ve Cisplatin'in farklı konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Öncelikle RA'nın genotoksik etkinliğinin belirlenmesi için hücreler RA'nın 3 farklı konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır (50; 100; 200 µM). Bunun

dışında aynı üç RA konsantrasyonu Cisplatin'in iki farklı dozu (11 µM ve 22 µM) ile beraber de uygulanmıştır. Süre sonunda hücreler tripsinize edilerek süspansiyon haline getirilmiştir. Hücrelere Sing ve ark. tarafından geliştirilen alkali komet yöntemi küçük modifikasyonlar ile uygulanmıştır[21]. Yöntemde kullanılan tüm kimyasallar Sigma Aldrich, (Darmstadt, Germany)'ten tedarik edilmiştir. Yöntemin uygulanmasında; muamele sonrası hücreler PBS ile yıkanmış ve %0,65 (w/v) lik 'Low Melting Agaroz' ile süspanse edilmiştir. Ardından hücreler önceden agaroz ile kaplanmış lamlara yayılmıştır ve liziz çözeltisi (2,5 M NaCl, 10 mM Na_2EDTA, 10mM Tris, %1 (w/v) TritonX100, %10 (w/v) DMSO, pH=10) içerisinde 4 ^oC bir gece inkübasyon ile liziz edilmiştir. Liziz sonrası alkali çözelti içerisinde (1 mM Na_2EDTA, 300mM NaOH; pH=13) 30 dakika DNA açılması sağlandıktan sonra aynı alkali çözelti içerisinde 30 dakika süre ile 25V, 350 mA akım ile elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrasında lamlar 2 dakika süre ile 20 µg/ml etidyum bromür ile boyanarak floresan mikroskop da (Nikon Eclipse 80i, Nikon Inc, Tokyo, Japan) uygun filtre küpü (518 Excitation- 605 Emission; Nikon CY3(G-2A), Nikon Inc, Tokyo, Japan) kullanılarak incelenmiştir. Her bir grup için en az 100 komet görüntüsünün fotoğrafları çekilmiştir (Kameram 21, Argenit Tic.Ltd,Şti. İstanbul Türkiye). Komet görüntülerinin analizlerinde Komet yazılımı (Mikrosistem, Argenit Tic.Ltd,Şti. İstanbul, Türkiye) kullanılarak Kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA içeriği ve 'Olive Tail Moment (OTM)' parametreleri değerlendirmeye alınmıştır.

DCFH-DA Yöntemi

Hücre içi ROS miktarı 2', 7' Diklorohidrofloresein diasetat (DCFH-DA) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Yöntemin temeli, 2', 7' Diklorohidrofloresein diasetat'ın (DCFH-DA) hücre içerisine girebilmesine dayanmaktadır. Hücre içerisine difüze olan DCFH-DA hücresel esterazlar tarafından deasetillenerek 2', 7' Diklorohidrofloresein'e dönüştürülür. 2', 7' Diklorohidrofloresein ise hücre içindeki Reaktif Oksijen Türleri (ROS) tarafından floresan özellikteki, okside olmuş 2', 7' Diklorohidrofloresein'e (DCF) dönüştürülür. Hücre içerisindeki floresan özellikteki DCF miktarı ROS miktarı ile orantılıdır[22].

Kültürdeki hücreler. 8000 canlı hücre/ kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu siyah plakalara ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler RPMI 1640 medyum içerisinde 50 µM DCFH-DA ile 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde 4 saat inkübe edilmişlerdir. Ardından hücre içerisine giremiş DCFH-DA'nın fazlası seri PBS yıkamaları ile uzaklaştırılmıştır. DCFH-DA yüklenmiş hücrelerde, komet yönteminde belirtilen deney grupları oluşturulmuştur. 24. saatte hücre içerisindeki ROS miktarı, hücre içerisinde oluşan floresan özellikteki 2', 7' Diklorofloresein (DCF) miktarının, flourometrik mikroplaka okuıyucuda (Fluoroskan Ascent FL 2.6 Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finland) 480 nm Excitation / 530 nm Emission dalga boylarında oluşan Relatif Floresans Ünite (RFU) cinsinden belirlenmesiyle araştırılmıştır.

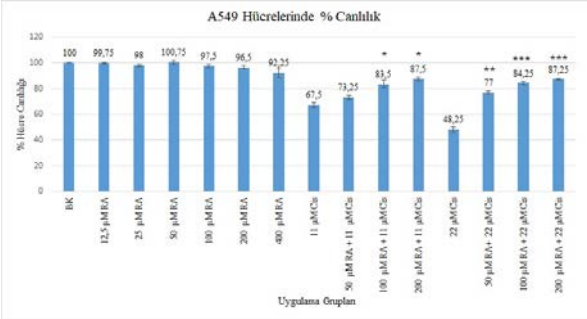
İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bulgularda verilen değerler ortalama değerler ± Standart Sapma değerleri şeklindedir. İstatistiksel analizler SPSS 22.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Verilerin normallik analizleri Kolmogorov-Simirnov Z testi ile gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalarda One Way ANOVA testi, varyansların homojenliğine göre de Tukey veya Tamhane testleri kullanılmıştır. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık değeri $p< 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

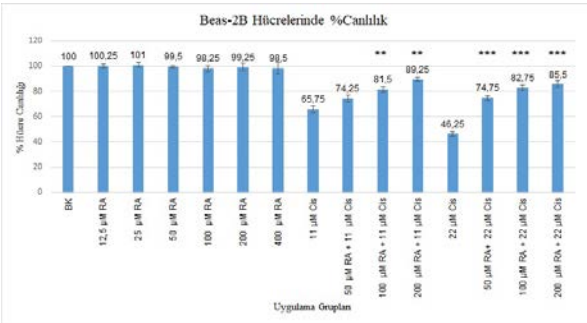
XTT Bulguları

XTT testi sonucunda elde edilen % Canlılık değerleri A549 hücreleri için Şekil 2 de, Beas-2B hücreleri için ise Şekil 3'te grafik olarak verilmiştir. 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM ve 400 µM RA uygulamaları her iki hücre hattında da sitotoksik etki göstermemiştir. Her bir uygulama, kendi hücre hattındaki kontrol grubu olan büyüme kontrol grubu ile % hücre canlılığı açısından karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). İki hücre hattında da iki farklı Cisplatin (11 µM ve 22 µM) dozlarıyla birlikte uygulanan RA konsantrasyonları (50, 100 ve 200 µM) ile oluşturulan grupların % hücre canlılık değerleri, ilgili Cisplatin dozunun tek başına uygulanması ile oluşturulan grup ile karşılaştırılmıştır. A549 hücrelerinde 11 µM Cisplatin dozu % hücre canlılık değerini 67,5 ± 2,081'e indirerek istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etki göstermiştir (Kontrol grubu olan Büyüme kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır; $p= 0,008$). 11 µM Cisplatin dozu ile beraber uygulanan 100 ve 200 µM RA konsantrasyonları Cisplatin'in oluşturduğu sitotoksik etkiyi azaltarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antisitotoksik etki göstermiştir (sırasıyla $p=0,029$; $p=0,02$). Benzer şekilde 22 µM Cisplatin dozu da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etki göstermiştir ($p= 0,002$). 22 µM Cisplatin dozu ile birlikte uygulanan 50 µM, 100 µM ve 200 µM RA konsantrasyonları Cisplatin'in oluşturduğu sitotoksik etkiyi azaltarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antisitotoksik etki göstermiştir (sırasıyla; $p= 0,003$; $p=0,001$; $p< 0,001$).



Şekil 2.
A549 hücrelerinde % canlılık değerleri.
(RA: rosmarinik asit, Cis: cisplatin).

Beas-2B hücrelerinde de 11 ve 22 µM Cisplatin dozu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etki göstermiştir (sırasıyla; p= 0,011; p<0,001). 11 µM Cisplatin dozu ile beraber uygulanan 100 ve 200 µM RA konsantrasyonları Cisplatin'in oluşturduğu sitotoksik etkiyi azaltarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antisitotoksik etki göstermiştir (sırasıyla p=0,01; p=0,009). 22 µM Cisplatin dozu ile birlikte uygulanan 50,100 ve 200 µM RA konsantrasyonları da Cisplatin'in oluşturduğu sitotoksik etkiyi azaltarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antisitotoksik etki göstermiştir (üç konsantrasyon için de; p<0,001).

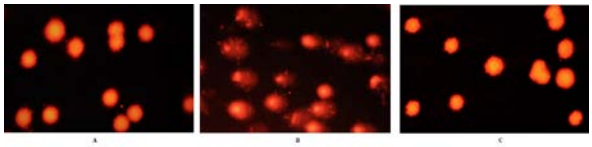


Şekil 3.
Beas-2B hücrelerinde % canlılık değerleri.
(RA: rosmarinik asit, Cis: cisplatin).

Komet Bulguları

Elde edilen mikroskobik komet görüntü örnekleri Şekil 4'te gösterilmiştir.

A549 hücrelerinde elde edilen Komet bulguları Tablo I'de Beas -2B Hücrelerinden elde edilen komet bulguları ise Tablo II'de gösterilmiştir. Uygulanan 50 µM, 100 µM ve 200 µM RA konsantrasyonlarının, hem A549 hem de Beas-2B hücrelerinde değerlendirilen üç komet parametresi olan kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve OTM değerlerini kendi kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmedikleri belirlenmiştir (p> 0,05). A549 ve Beas-2B hücrelerinde Cisplatin'in 11 µM ve 22 µM'lık dozlarının, değerlendirilen komet parametrelerinin her üçünü de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı belirlenmiştir (her biri için p< 0,001). A549 ve Beas-2B hücrelerinde 11 µM ve 22 µM'lık Cisplatin dozları ile arttırılmış olan komet parametrelerinin, ilgili Cisplatin dozu ile beraber uygulanan 50 µM, 100 µM ve 200 µM'lık RA tarafından istatiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltıldığı belirlenmiştir (p<0,001)



Şekil 4.
Komet görüntü örnekleri. A: A549 hücrelerinde BK (büyüme kontrol) grubundan elde edilen mikroskobik (20X) komet görüntüsü örneği. B; A549 hücrelerinde 22 µM Cisplatin grubundan elde edilen mikroskobik (20X) komet görüntüsü örneği C; A549 hücrelerinde 200 µM RA (rosmarinik asit) + 22 µM Cisplatin grubundan elde edilen mikroskobik (20X) komet görüntüsü örneği

Tablo I. A549 Hücrelerinden Elde Edilen Komet Bulguları

	Ortalama ± SS		
	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk %DNA	OTM
BK	13,140 ± 2,605	5,204 ± 1,556	0,242 ± 0,111
50 µM RA	13,400 ± 2,874	5,336 ± 2,155	0,240 ± 0,142
100 µM RA	13,230 ± 3,393	4,809 ± 1,818	0,212 ± 0,121
200 µM RA	13,860 ± 3,207	5,219 ± 2,002	0,230 ± 0,131
11 µM Cis	47,520 ± 7,639	37,766 ± 6,689	12,706 ± 3,120
50 µM RA + 11 µM Cis	32,320 ± 2,069^{a***}	21,795 ± 1,766^{a***}	4,791 ± 0,681^{a***}
100 µM RA + 11 µM Cis	14,700 ± 2,661^{a***}	5,370 ± 1,862^{a***}	0,302 ± 0,429^{a***}
200 µM RA + 11 µM Cis	15,250 ± 1,641^{a***}	6,312 ± 1,081^{a***}	0,298 ± 0,088^{a***}
22 µM Cis	68,880 ± 3,201	53,740 ± 6,683	20,474 ± 3,98
50 µM RA+ 22 µM Cis	43,300 ± 6,144^{b***}	32,402 ± 2,084^{b***}	10,274 ± 1,366^{b***}
100 µM RA + 22 µM Cis	32,480 ± 1,010^{b***}	22,132 ± 2,073^{b***}	4,637 ± 0,664^{b***}
200 µM RA + 22 µM Cis	36,790 ± 5,200^{b***}	32,311 ± 4,219^{b***}	11,227 ± 2,128^{b***}

SS; Standart Sapma, OTM; "Olive Tail Moment", BK; Büyüme Kontrol, RA; Rosmarinik Asit, Cis; Cisplatin. (^{a}; aynı parametrenin 11 µM Cis grubu ile karşılaştırılmıştır, ^{b}; aynı parametrenin 22 µM Cis grubu ile karşılaştırılmıştır, ***; p < 0,001)

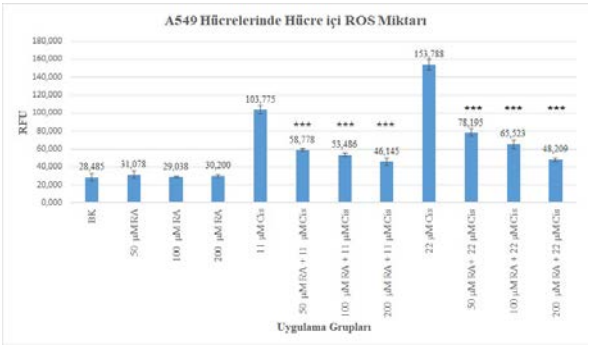
Tablo II. Beas-2B Hücrelerinden Elde Edilen Komet Bulguları

Ortalama ± SS			
	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk %DNA	OTM
BK	10,520 ± 2,642	4,761 ± 0,982	0,157 ± 0,075
50 µM RA	9,703 ± 2,984	4,940 ± 0,981	0,178 ± 0,082
100 µM RA	8,860 ± 3,638	4,768 ± 1,044	0,132 ± 0,070
200 µM RA	9,820 ± 3,937	5,031 ± 0,895	0,134 ± 0049
11 µM Cis	44,300 ± 6,597	33,789 ± 2,618	10,544 ± 1,229
50 µM RA + 11 µM Cis	28,870 ± 4,640^{a***}	17,918 ± 3,802^{a***}	2,470 ± 0,980^{a***}
100 µM RA + 11 µM Cis	14,570 ± 1,305^{a***}	5,742 ± 1,312^{a***}	0,235 ± 0,071^{a***}
200 µM RA + 11 µM Cis	12,410 ± 2,590^{a***}	4,952 ± 1,224^{a***}	0,186 ± 0,065^{a***}
22 µM Cis	67,850 ± 3,937	54,183 ± 7,303	20,928 ± 3,937
50 µM RA+ 22 µM Cis	48,000 ± 7,517^{b***}	37,103 ± 6,211^{b***}	12,663 ± 3,081^{b***}
100 µM RA + 22 µM Cis	32,730 ± 2,382^{b***}	21,680 ± 3,501^{b***}	4,483 ± 0,759^{b***}
200 µM RA + 22 µM Cis	16,930 ± 1,492^{b***}	6,387 ± 1,224^{b***}	0,337 ± 0,097^{b***}

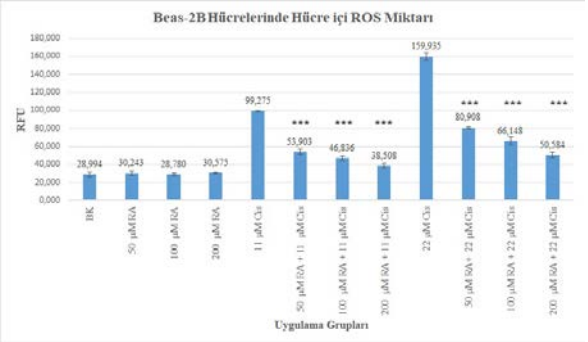
SS; Standart Sapma, OTM; "Olive Tail Moment", BK; Büyüme Kontrol, RA; Rosmarinik Asit, Cis; Cisplatin. (^{a}; aynı parametrenin 11 µM Cis grubu ile karşılaştırılmıştır, ^{b}; aynı parametrenin 22 µM Cis grubu ile karşılaştırılmıştır, ***; $p < 0,001$)

DCFH-DA Bulguları

A549 hücrelerindeki ROS miktarı RFU (Relatif Floresan Unit) cinsinden grafik olarak Şekil 5'te Beas-2B Hücrelerindeki ise yine RFU cinsinden grafik olarak Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 5.
A549 hücrelerinde hücre içi ROS miktarı. (ROS: "reactive oxygen species" reaktif oksijen türleri, RFU: relatif floresan ünite, RA: rosmarinik asit, Cis: cisplatin).



Şekil 6.
Beas-2B Hücrelerinde Hücre içi ROS miktarı. (ROS: "reactive oxygen species" reaktif oksijen türleri, RFU: relatif floresan ünite, RA: rosmarinik asit, Cis: cisplatin).

Hem A549 hem de Beas-2B hücrelerinde Büyüme Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 50 µM, 100 µM ve 200 µM'lık RA uygulamalarının hücre içi ROS miktarını istatiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği belirlenmiştir ($p>0,05$). 11 µM ve 22 µM'lık Cisplatin dozlarının büyüme kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki hücre hattında da hücre içi ROS miktarını anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,001$ her biri için). Bununla birlikte yine her iki hücre hattında iki farklı Cisplatin uygulaması tarafından arttırılmış olan hücre içi ROS miktarının RA'nın üç konsantrasyonu tarafından da anlamlı bir şekilde düşürüldüğü belirlenmiştir ($p<0,001$).

Tartışma ve Sonuç

Eukaryotik hücrelerde, kusursuz çalışan mitokondrial solunum zinciri ve düzenli mitokondrial membran bütünlüğü hücre canlılığı için temel oluşturmaktadır. Mosmann gerçekleştirdiği çalışmalar ile hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunu belirlemede mitokondrial solunum zinciri ve düzenli mitokondrial membran bütünlüğüne dayanan kantitatif kolorimetrik MTT yöntemini geliştirmiştir[23]. Yöntem mitokondrial dehidrogenez enzimlerinin bir tetrazolium tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromit)nin canlı hücre mitokondrial dehidrogenazları tarafından mavi renkli formazan ürünlerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan formazan miktarı kolorimetrik olarak ölçülebilmektedir ve mitokondrial faaliyetlerini yerine getirebilen, yani kültürdeki canlı hücre sayısı ile orantılıdır[23,24]. Bu çalışmada kullanılan XTT yöntemi benzer temele dayanan, yine bir tetrazolium tuzu olan XTT ((2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolium-5-carboksianilit iç tuzu)'nin kullanıldığı yöntemdir. XTT'nin canlı hücreler tarafından dönüştürüldüğü formazan ürünlerinin çözünürlüğü MTT den daha iyi olduğu için uygulamada canlı hücreleri belirlemek daha hızlı şekilde gerçekle-

şebilmektedir[19,25]. Bu nedenle çalışmada, sitotoksik - antisitotoksik etkinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntem olan XTT yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılan kemoterapötik ilaç olan Cisplatin akciğer kanserinin de aralarında bulunduğu pek çok kanser türünün tedavisinde kullanılan bir ilaçtır[26]. Manojkumar ve ark gerçekleştirdikleri çalışmada A549 hücrelerinde, 24 saatlik uygulama sonrasında Cisplatin'in IC_{50} ("Half maximal inhibitory concentration") değerini 61±1,5 µM olarak belirlemişlerdir[27]. Liu ve ark ise gerçekleştirdikleri çalışmada aynı parametreyi 13,56±0,88 olarak belirlemiştir[28]. Beas-2B hücrelerinde Cisplatin'in IC_{50} değerini Zi ve ark (2018) 12,86±0,25 µM olarak belirlerken[29], Apohan ve ark. tarafından ise 10,56 µM olarak belirlemiştir[30]. Escola ve ark. ise 72 saatlik Cisplatin uygulaması sonrasında Beas-2B hücrelerindeki IC_{50} değerini 11.7±0,5 olarak belirlemiştir[31]. Çeşitli çalışmalarda A549 ve Beas-2B hücrelerinde Cisplatin'in belirlenen IC_{50} değerleri arasındaki farklılıklar göze çarpmaktadır. Aynı hücre hatları kullanılsa da farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen IC_{50} değerleri arasında deneysel koşullar nedeniyle farklılıklar görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan Cisplatin konsantrasyonları olan 11 µM ve 22 µM'lık dozlar önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz IC_{50} değerlerini yansıtan konsantrasyonlar olduğu için tercih edilmiştir[18]. Bunun sonucunda da XTT testi sonrasında beklenildiği üzere Cisplatin'in iki dozu da her iki hücre hattında da anlamlı düzeyde sitotoksik etki göstermiştir. %100 olan hücre canlılığı Cisplatin'in 11 µM ve 22 µM'lık dozları tarafından A549 hücrelerinde sırasıyla; %67,5 ve %48,25 değerlerine indirilirken aynı değerler Beas-2B hücrelerinde %65,75 ve %46,25 olarak belirlenmiştir.

RA'nın çalışmada kullanılan konsantrasyonları (12,5 – 400 µM) her iki hücre hattında da sitotoksik etki göstermemiştir. Bahri ve ark.. farklı hücre hatlarında RA ve karnosik asit'in apoptotik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında A549 hücrelerinde WST-1 [2- (4-iodofenil)- 3- (4-nitrofenil)- 5 -(2, 4-disülfofenil)- 2H-tterazolyum] yöntemi ile RA sitotoksitesini değerlendirmişler ancak kullandıkları en yüksek konsantrasyon olan 100 µM'lık konsantrasyonda dahi her hangi bir sitotoksik etki gözlemlememişlerdir[32]. Fialova ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada A549 hücrelerinde RA'nın IC_{50} değerini >300 µM olarak belirlemişlerdir[33]. Benzer şekilde Junming ve ark. Beas-2B hücrelerinde RA'nın sitotoksik etki göstermeye başladığı değerin 330 µM'ın üzerinde olduğunu belirtmişlerdir[34].

Bu çalışmada da hem A549 hem de Beas-2B hücrelerinde 24 saatlik RA uygulaması 400 µM'lık konsantrasyonda dahi sitotoksik etki göstermemiştir. Yine bu çalışmada RA'nın 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonları, her iki hücre hattında da Cisplatin'in her iki dozu tarafından arttırılmış olan sitotoksik etkiyi anlamlı düzeyde indirgemiştir. Bu indirgeme; RA'nın, Cisplatin'in sitotoksik etkisine karşın bir antisitotoksik etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Cisplatin akciğer kanserlerini de içermekte olan pek çok kanser türüne karşın kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır. Hücre içerisine girince aktive olan Cisplatin'in sahip olduğu klor atomları sitoplazmada hidroliz edilir. Oluşan bu hidrolize ürün, kazandığı elektrofil özelliği ile hücresel proteinlerin sülfidril gruplarına ve DNA'daki azot atomlarına saldırarak hücre bölünmesini durdurarak apoptotik hücre ölümünü tetikler. Bu nedenle Cisplatin, temelde DNA hasarına yol açarak sitotoksik etkinliğini göstermektedir[26]. Çalışmada A549 ve Beas 2B hücrelerinde Cisplatin'in neden olduğu DNA hasarı komet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen komet parametreleri değerlendirildiğinde Cisplatin'in her iki dozu ile de DNA hasarını anlamlı düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. RA'nın Cisplatin ile birlikte uygulandığı gruplarda uygulama konsantrasyonlarının her üçü de (50 µM, 100 µM, 200 µM) Cisplatin tarafından arttırılmış olan DNA hasarını anlamlı düzeyde azaltmıştır. Dolayısıyla RA Cisplatin'in genotoksik etkinliğine karşın antigenotoksik aktivite sergilemiştir.

Oksidatif stres, Cisplatin toksisitesinin temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Mitokondriler Cisplatin kaynaklı oksidatif stresin önemli hedeflerindendir ve Mitokondrial proteinlerin sülfidril grubu kaybı, kalsiyum alımının inhibisyonu ve midokondrial memran potansiyelinin azalmasına neden olarak hücreleri ölüme sürüklemektedir[35]. Cisplatin maruziyeti ile hücre içerisinde oluşan oksidatif stres ile artan Reaktif Oksijen Türleri de DNA'ya saldırarak DNA hasarına yol açmakta ve hücreleri ölüme sürüklemektedir[35-38].

Bu çalışmada Cisplatin'in neden olduğu oksidatif stres her iki hücre hattında da DCFH-DA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Cisplatin uygulamasının her iki dozu da hücre içi ROS miktarını anlamlı düzeyde arttırmış buna karşın Cisplatin ile birlikte uygulanan RA konsantrasyonlarının üçü de (50 µM, 100 µM, 200 µM) Cisplatin tarafından indüklenmiş olan ROS miktarını anlamlı düzeyde azaltmıştır. De Oliveira ve ark. Gerçekleştirdikleri çalışmada etanolün neden olduğu ROS artışı üzerine RA'nın etkilerini fare periferal kan hücrelerinde DCFH-DA yöntemini kullanarak araştırmışlar ancak RA'nın etanolün neden olduğu ROS artışını anlamlı bir şekilde düşürmediğini belirtmişlerdir[39]. Söz konusu çalışmanın aksine, bu çalışmada RA'nın, Cisplatin'in neden olduğu ROS artışını anlamlı düzeyde azalttığı belirlenmiştir. Bu indirgemeye RA'nın sahip olduğu güçlü antioksidan etkinin neden olduğu düşünülmektedir. Kim ve Lee., gerçekleştirdikleri çalışmalarında *Perilla frutescens* bitkisinden izole ettikleri RA'nın sahip olduğu güçlü antioksidan etkiyi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidazil) ve ABTS (2,2′-azino-bis (3-etilbenztiazolin-6-sulfonik asit) radikal süpürücü aktiviteleri üzerinden göstermişlerdir[40]. Benzer yöntemleri kullanarak Vergine ve ark.

Salvia türlerinden izole ettikleri RA'nın güçlü antioksidan etkinliğini göstermeşlerdir[41]. Erkan ve ark. gerçekleştirdikleri çalışma ile RA'nın antioksidan özelliğini ortaya koymuşlardır[42]. Bunların dışında pek çok çalışmada da RA'nın güçlü bir antioksidan olduğu vurgulanmaktadır[1,15].

RA sahip olduğu güçlü antioksidan etki ile Cisplatin toksisitesinin temel mekanizmasını oluşturan oksidatif stres sonucu hücre içerisinde oluşan aşırı ROS birikimini engellemiştir. Çalışmada elde edilen DCFH-DA bulguları bu engellemeyi açıkça ortaya koymaktadır. Bu engelleme sonucunda RA yine Cisplatin'in neden olduğu DNA hasarlarını ve dolaysıyla da hücre ölümlerini azaltarak antigenotoksik ve antisitotoksik özellik göstermiştir. Bu özellikleri ile RA Kimyasal engelleme[43] stratejisi çerçevesinde genotoksik ajanların etkilerini indirgemede kullanılabilecek önemli bir antigenotoksik ajan olarak görülmektedir. Bu bağlamda Venkatachalam ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada sıçanlarda 1,2-dimetilhidrazin ile indüklenen kolon karsinogenezine karşın RA'nın iyi bir kimyasal engelleme ajanı olduğunu ortaya koymuşlardır[44]. Bu özellikleri ile Ülkemizde de çeşitli medya organlarında RA veya RA içeren bitkisel ürünlerle ilgili kansere iyi geldiği yönünde haberler zaman zaman yer almaktadır[45]. Bu gibi haberler, çeşitli bitkisel ürünlerin halk arasında bilinçsizce tüketilmesine neden olmaktadır. Pek çok çalışma RA ve veya RA içeren; *Rosmarinus officinalis* (Biberiye), *Calendula officinalis* (Sarıpat) *Salvia officinalis* (Adaçayı), *Melissa officinalis* (Oğulotu)[39] gibi bitkilerden elde edilen çeşitli ürünler kimyasal engelleme stratejisi çerçevesinde genotoksik ajanların etkilerinden korunmak amaçlı kullanılabileceğine yönelik bulgular sunmaktadır. Bu çalışma da RA'nın sahip olduğu antigenotoksik aktivite nedeniyle kimyasal engelleme stratejisi çerçevesinde özellikle DNA hasarlarına karşı korunmak amacı ile kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu çalışmamız özellikle Cisplatin kemoterapisi sırasında RA'nın bilinçsizce tüketiminin Cisplatin'in etkinliğinde indirgenmeye neden olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle özellikle kemoterapi uygulamalarında hastaların bu konularda bilinçlendirilmesine yönelik yaklaşımların arttırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. Phytochemistry 2003; 62: 121–125.
2. Scarpati ML, Oriente G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). La Ricerca Scientifica 1958; 28, 2329–2333.
3. Rosmarinic acid, https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich /536954?lang=en&region=TR&gclid=EAIaIQobChMIzNGusaXF3wIVz5IYCh3OWgwFEAAYASAAEgLBD_D_BwE (Erişim Tarihi 29.12.2018)
4. Hiller K. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoidae. 1. Mitteilung: Sanicula europaea L.—Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen-und Rosmarinsaure. Pharmazie 1965;20, 574–579.
5. Trute A, Nahrstedt A. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in Hedera helix L. Phytochem. Anal. 1986; 7, 204–208.
6. De Tommasi N, De Simone, F, De Feo V, Pizza C. Phenylpropanoid Glycosides and Rosmarinic Acid from Momordica balsamina. Planta Med. 1991; 57, 201.
7. Lasure A, Van Poel B, Pieters L, Claeys M, Gupta M, Vanden Berghe D, Vlietinck, AJ. Complement-inhibiting properties of Apeiba tibourbou. Planta Med. 1994; 60, 276–277.
8. Aquino R, Ciavatta ML, De Simone F, Pizza C. A flavanone glycoside from Hamelia patens. Phytochemistry 1990; 29, 2358–2360.
9. Satake T, Kamiya K., Saiki Y, Hama T, Fujimoto Y, Kitanaka S, Kimura Y, Uzawa J, Endang H, Umar M. Studies on the constituents of fruits of Helicteres isora L. Chem. Pharm. Bull. 1999; 47, 1444–1447.
10. Ravn H, Pedersen MF, Andary J, Borum C, Anthoni U, Christophersen C, Nielsen PH. Seasonal variation and distribution of two phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid, in leaves and roots-rhizomes of eelgrass (Zostera marina L.). Ophelia 1994; 40, 51–61.
11. Hausler E, Petersen M, Alfermann AW. Rosmarinsaure in Blechnum-Spezies. In: Haschke, H.P., Schnarrenberger, C. (Eds.), Botanikertagung. Berlin. Akademie Verlag, Berlin, p. 507. 1992.
12. Takeda R, Hasegawa J, Sinozaki M. The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from nonvascular plants, Anthocerotae (hornworts). Tetrahedron Lett. 1990; 31, 4159–4162.
13. Chu X, Ci X, He J, Jiang L, Wei M, Cao Q, et al. Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Molecules. 2012;17:3586-98.
14. Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Del Baño MJ, Alcaraz M, et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. Food Chem Toxicol. 2009; 47:386-92.
15. Al-Dhabi N A, Arasu M V, Park CH, Park SU. Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities.Excli Journal 2014;13:1192-1195.
16. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radical Research 2006. 40(2): 223-231.
17. Saltan FZ, Canbay HS. Eskişehir'de Halk Arasında Kullanılan Bazı Bitkilerdeki Ağır Metal ve Besin Elementlerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2015. 19(1); 83-90
18. İnci ve ark. New water-soluble copper (II) complexes including 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline and L-tyrosine: Synthesis, characterization, DNA interactions and cytotoxicities. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2015; 136 ; 761–770.
19. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods 1991;13:142(2):257-65.
20. Piperakis SM. Comet assay: A brief history. Cell Biol. Toxicol. 2009; 25:1–3.
21. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988; 175(1):184-91.

22. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. J Immunol. 1983; 130:1910-1917.
23. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 1983; 65: 55-63.
24. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods. 1989; 12;119(2): 203-210.
25. Jost LM, Kirkwood JM, Whiteside TL. Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. J Immunol Methods. 1992; 4;147(2):153-65.
26. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol. 2014; 5, 0: 364–378.
27. Manojkumar Y, Ambika S, Arulkumar R, Gowdhami B, Balaji P, Vignesh G, Arunachalam S, Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, Doetsch PW. Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. Plos One 2013; 8(11), e81162.
28. Liu Y, Song XQ, Li X, Liu X, Tian JL, Xu JY, Yan SP. Three pairs of enantiomers bearing mitochondria-targetedTPP+groups as potential anti-cancer agents. Appl. Organometal Chem. 2019; 33;e4920
29. Zi CT, Yang L, Xu FQ, Dong FW, Yang D, Li Y, Ding ZT, Zhou J, Jiang ZH, Hu JM. Synthesis and anticancer activity of dimeric podophyllotoxin derivatives.Drug Desig, Development and Therapy. 2018; 12, 3393-3406.
30. Apohan E, Yilmaz U, Yilmaz, Serindag A, Küçükbay H, Yesilada O, Baran Y. Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives. Journal of Organometalic Chemistry.2017; 828, 52-58.
31. Escola A, Crespo M, Lopez C, Quirante J, Jayaraman A, Polat IH, Badia J, Baldoma L, Cascante M. On teh stability and biological behavior of cyclometallated Pt(IV) complexes with hlido and aryl ligands in the axial positions. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2016; 24, 5804-5815.
32. Bahri S, Miles F, Ali BR, Mlika M, Jameleddine S, Mc Entee K, Shlyonsky V. Rosmarinic acid potentiates carnosic acid induced apoptosis in lung fibroblasts. Plos ONE. 2017; 12(9); e0184368.
33. Fialova SB, kello M, Coma M, Slobodnikova L, Drobna E, Holkova I, Garajova M, Mrva M, Zachar V, Lukac M. Derivatization of Rosmarinic Acid Enhances its in vitro Antitumor, Antimicrobial and Antiprotozoal Properties. Molecules 2019; 24(6), 1078.
34. Juming L, Li Z, Xinyi Z, Yingying L, Fang Z, Chunsong Y, Wei Z. Protective effects and active ingredients of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extractson airway responsiveness, inflammation and remodeling in mice withovalbumin-induced allergic asthma. Phytomedicine. 2019. 52; 168-177.
35. Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats.Clin. Exp. Pharmacol.Physiol. 2004; 31, 862-867.
36. Dehne N, Lautermann J, Petrat F, Rauen U, de Groot H. Cisplatin Ototoxicity: Involvement of Iron and Enhanced Formation of Superoxide Anion Radicals. Toxicol Appl Pharmacol. 2001; 174, 27-34.
37. Santos NA, Catão CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. Arch Toxicol. 2007; 81, 495-504.
38. Jiang Y, Guo C, Vasko MR, Kelley MR. Implications of Apurinic/ Apyrimidinic Endonuclease in Reactive Oxygen Signaling Response after Cisplatin Treatment of Dorsal Root Ganglion Neurons. Cancer Res 2008; 68, 6425-6434.
39. De Oliveira NCD, Sarmento MS, Nunes EA, Porto CM, Rosa DP, Bona SR, Rodrigues G, Marroni NP, Pereira P, Picada JN, Ferraz ABF, Thiesen FV, Da Silva J. Rosmarinic acit as a protective agents against genotoxicity of ethanol in mice. Food and Chemical Toxicology 2012; 50, 1208-1214.
40. Kim DH, Lee JH. Comparative evaluation of phenolic phytochemicals from perilla seedsof diverse species and screening for their tyrosinase inhibitory andantioxidant properties. South African Journal of Botany 2019; 123, 341-350.
41. Vergine M, Nicoli F, Negro C, Luvisi A, Nutricati E, Accogli RA, Sabena E, Miceli A. Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Salvia species from Southern Italy. Records of Natural Products 2019; 13(3), 205-215.
42. Erkan N, Ayranci G, Ayranc, E. Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry 2008; 110, 76-82.
43. Ferguson LR, bronzetti G, De Flora S. Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer. Mutat. Res. 2005; 591, 3-7.
44. Venkatachalam K, Gunasekaran S, Jesudoss VAS, Namasivayam N. The Effect of rosmarinic acid on 1,2- dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. Experimental and Toxicologic Pathology 2013; 65, 409-418.
45. https://www.sabah.com.tr/webtv/sifali-bitkiler/biberiye-rosmarinus-officinalis-nelere iyi-gelir-biberiyenin-rosmarinus-officinalis-faydalari-nelerdir (Erişim Tarihi; 05.05.2018)