DERLEME REVIEW

DOI: 10.5336/pharmsci.2018-61824

Doksorubisine Bağlı Genotoksik Etkiler ve Fitokimyasalların Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi

A Review on Doxorubicin Related Genotoxicity and Protective Effects of Phytochemicals

Sinem HELVACIOĞLU,[a]
Mohammad CHAREHSAZ,[a]
Ahmet AYDIN[a]

[a]Farmasötik Toksikoloji AD,
Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
İstanbul, TÜRKİYE

Received: 12.06.2018
Received in revised form: 24.09.2018
Accepted: 25.09.2018
Available online: 28.11.2018

Correspondence:
Mohammad CHAREHSAZ
Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji AD, İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
mohammad.saz@yeditepe.edu.tr

ÖZET Antrasiklin sınıfında yer alan geniş spektrumlu bir antineoplastik ajan olan doksorubisin en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Hem çocuk hem erişkin hastalarda birinci basamak tedavide tercih edilmekte ve meme, mide, tiroid, prostat, testis, over, serviks, yumuşak doku ve kemik sarkomları gibi çeşitli kanser türlerinde kullanılmaktadır. Doksorubisinin diğer kemoterapötik ajanlar gibi yan etkileri çoğunlukla normal hücrelere karşı selektif olmayan şekilde sitotoksik etki göstermesiyle bağlantılıdır. Bununla birlikte, kardiyotoksisite ve kemik iliği baskılayıcı etkisi bu ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca, kemoterapi tedavisi sırasında veya sonrasında, birincil tümörlerden farklı olan kötü huylu ikincil tümörlerin tedaviye bağlı olarak gelişebilmesi diğer önemli bir sorunu oluşturmaktadır. Serbest radikal üretimi, doksorubisinin genotoksik etkisinden sorumlu primer mekanizma olarak kabul edilmekte olup, DNA hasarına neden olması ve DNA replikasyonunu etkilemesiyle mutasyonlara ve ikincil kötü huylu tümörlerin gelişmesine sebep olmaktadır. Fitokimyasallar oksidatif hasara karşı korumada, DNA tamir genlerinin ve hücre siklusunu kontrol eden genlerin modülasyonunda, apoptozun uyarılmasında, anjiogenezin engellenmesinde ve tümör hücresinin invazyonunun ve yayılmasının düzenlenmesinde ve epigenetik değişikliklerde rol oynamaktadır. Antioksidan özelliklere sahip birçok doğal bileşik, doksorubisinin antitümör etkisini azaltmadan, toksik etkilerin önlenmesinde veya azaltılmasında ümit vadetmektedir. Bu çalışmada; doksorubisinin etki mekanizmaları, toksisitesi ve bu toksisiteyi azaltmaya yönelik fitokimyasalların koruyucu etkileri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin; genotoksisite; kemopreventif; fitokimyasallar

ABSTRACT Doxorubicin is an anthracycline antibiotic that possesses broad spectrum antineoplastic activity and is one of the most widely used chemotherapeutic agents. Doxorubicin is preferred for first-line treatment in both child and adult patients. It is used in various types of cancer such as breast, stomach, thyroid, prostate, testis, over, cervix, soft tissue and bone sarcoma. Like other chemotherapeutic agents, the side effects of doxorubicin are often linked to cytotoxicity against non-selective, normally proliferating cells. In addition, cardiotoxicity and bone marrow suppression limit the use of this drug. Furthermore, during or after chemotherapy treatment, malignant secondary tumors different from primary tumors can develop due to treatment. Free radical production is regarded as the primary mechanism responsible for the genotoxicity of doxorubicin. It causes DNA damage and effects DNA replication resulting in gene mutations, and secondary malignant neoplasms. Phytochemicals play a role in the protection against oxidative damage, the modulation of DNA repair genes and genes controlling cell cycle, the induction of apoptosis, the inhibition of angiogenesis and the regulation of the invasion and spread of tumor cells and epigenetic changes. Many natural compounds with antioxidant properties promise to prevent or reduce the toxic effects of doxorubicin without decreasing its anticancer effect. In this review, the information on the mechanism of action of doxorubicin, toxicity and the protective effects of phytochemicals for reducing this toxicity are given.

Copyright © 2018 by Türkiye Klinikleri

Keywords: Doxorubicin; genotoxicity; chemopreventive; phytochemicals

Kanser; büyüme ve farklılaşma mekanizmaları bozulmuş olan bir hücrenin sınırsız çoğalması sonucu gelişen bir hastalık türüdür. Tümör hücreleri normal hücrelerde bulunmayan büyüme hızına, lokal yayılma, farklılaşma, anaplazi ve metastaz gibi birtakım farklılıklara sahiptir. Bu farklılıklar, çoğunlukla kişinin genetik materyali ile çevresel etkenlerin etkileşmesi sonucu gelişmektedir. Ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel etkenler, asbest, tütün dumanı bileşenleri, aflatoksin ve arsenik gibi kimyasal maddeler ve bazı virüsler gibi biyolojik faktörler karsinojenler arasında yer almaktadırlar. Yaşlanma kanser gelişiminin diğer bir temel faktörüdür. Kanser insidansı, yaşla birlikte hücresel onarım mekanizmalarının azalmasına bağlı olarak artmaktadır. 2012 yılında yaklaşık 14 milyon yeni vaka ile dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri kanser olmuştur. Yeni vakaların sayısının önümüzdeki 20 yılda yaklaşık %70 oranında artması beklenmektedir.[1]

Dünya Sağlık Örgütü tarafından dünyada, 2015 yılında başta karaciğer, kolorektal, mide ve meme kaynaklı tümörler olmak üzere 8,8 milyon hastanın kanserden öldüğü bildirilmiştir.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğünün 2009 verilerine göre, Türkiye'de ölüm nedenleri sırasında kanser ikinci sırada yer almaktadır. Türkiye'de kanser insidans değerleri göz önüne alındığında yıllık 170 bin yeni vakanın olabileceği öngörülmektedir. Türkiye'de erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri iken, kadınlarda meme kanseridir.

Kanser tedavisinde genellikle cerrahi işlem, radyoterapi ve kemoterapi gibi bir veya birden fazla yöntem birlikte kullanılmaktadır. Ayrıca, immünoterapi, hormon tedavileri, kök hücre nakli ve hedefe yönelik tedaviler daha az sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.[2] Bu süreçte tedavi ve palyatif bakımın hedeflerini belirlemek önemli bir adımdır. Birincil hedef, genellikle kanseri iyileştirmek ya da hastanın ömrünü uzatmaktır. Diğer önemli bir yaklaşım ise hastanın yaşam kalitesini artırmaktır.

Kemoterapi, kanser hücrelerini yok ederek veya bu hücrelerin büyümesini yavaşlatarak etkisini gösteren bir tedavi yöntemidir. Bu tedavi yönteminde, cerrahi veya radyoterapi öncesi tümörün küçülmesini sağlamak için "neoadjuvan kemoterapi"ye ya da cerrahi veya radyoterapi sonrası kalan kanser hücrelerini yok etmek için "adjuvan" kemoterapiye başvurulabilmektedir.[3] Tedavide kullanılan antikanser ilaçlar; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, mikrotübül inhibitörleri, hormon agonistleri ve antagonistleri ve sitotoksik antibiyotikler gibi çeşitli gruplara ayrılmaktadır.[4] Sitotoksik antibiyotikler; farklı etki mekanizmalarına, etkinliklerine ve toksisitelerine rağmen birlikte gruplandırılmaktadır. Kemoterapi ile başlıca hücre bölünmesi durdurulmaktadır. Bu ilaç grubu, solid tümörlerde, akut lösemilerde, lenfomalarda, meme ve over kanserlerinde, metastatik germ hücreli tümörlerde ve Hodgkin-dışı lenfomada kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan ilaçlar antrasiklinler ve antrasiklin olmayanlar şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Daunorubisin, doksorubisin, epirubisin ve idarubisin antrasiklin grubunda yer alır iken; aktinomisin-D, bleomisin, mitomisin C ve mitoksantron antrasiklin olmayanlar grubuna girmektedirler.[3] Antrasiklinler, kırmızı aromatik poliketidlerdir ve aglikondaki yapısal farklılıklar yanında farklı şeker rezidülerinden dolayı çeşitli şekillerde bulunmaktadırlar.[5] Antrasiklinlerin mekanizmaları, DNA interkalasyonunu, hücre için toksik olan reaktif serbest radikallerin oluşmasını ve topoizomeraz inhibisyonunu içermektedir ve bu ilaçların hücre döngüsü üzerine bir etkileri bulunmamaktadır.[6]

DOKSORUBİSİN

Antrasiklin sınıfında yer alan geniş spektrumlu bir antineoplastik ajan olan doksorubisin, 1967 yılında İtalya'da (Farmitalia Araştırma Laboratuvarları) S*treptomyces peucetius* türünden elde edilen mutant bir suştan (*S. peucetius* var. *caesius*) izole edilmiştir. Doksorubisinin ticari ismi adriyamisindir ve kırmızı renginden dolayı kullanan hastalar tarafından "red devil" (kırmızı şeytan) olarak bilinmektedir. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından, "(7S, 9S) -7-[(2R, 4S, 5S, 6S)-4-amino-5-hidroksi-6-metil- loksan-2-il] oksi-6,9,11-trihidroksi-9-(2-hidroksiasetil)-4-metoksi-8,10-dihidro-7H-tetrasen-5,12-dion" şeklinde adlandırılmaktadır. Doksorubisin, gastrointestinal sistemden absorbe edilmediği ve asit ortamda stabil

olmadığından intravenöz yoldan uygulanmaktadır. Karaciğerde metabolize edilmekte ve karaciğer, lenf düğümleri, kas, böbrekler ve kalp de dâhil olmak üzere tüm vücuda dağılmakta, fakat kan-beyin engelini aşamamaktadır. Oluşan metabolitlerden biri olan doksorubisinol aktif sitotoksik özellik göstermektedir. Değişmemiş ilaç ve metabolitleri esas olarak safraya ve az bir kısmı da idrarla itrah edilmektedir.[7,8]

Doksorubisin en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir ve genellikle diğer ilaçlarla kombinasyon hâlinde reçete edilmektedir. Hem çocuk hem erişkin hastalarda birinci basamak tedavide tercih edilmektedir ve meme, mide, tiroid, prostat, testis, over, serviks, yumuşak doku ve kemik sarkomları, Wilms tümörü, Hodgkin ve Hodgkin-dışı lenfoma, akut lenfoblastik ve miyeloid lösemi gibi çeşitli kanser türlerinde kullanılmaktadır.[3]Doksorubisin, antimitotik ve sitotoksik aktiviteye sahiptir. DNA ile baz çiftleri arasında interkalasyon yaparak kompleksler oluşturmakta ve DNA-topoizomeraz II kompleksini stabilize ederek topoizomeraz II aktivitesini inhibe etmektedir. Doksorubisin ayrıca, polimeraz aktivitesini inhibe ederek gen ekspresyonunun düzenlenmesini etkilemekte ve DNA'ya hasar veren serbest radikalleri üretmektedir.[9]

Antikanser ilaçlar tedavi amaçlı kullanılırken beraberinde bazı toksik etkileri de getirmektedir. Tedavi sırasında en çok kemik iliği süpresyonu, immünsüpresif etkiler, embriyotoksisite, teratojenite, ikincil kötü huylu tümör oluşumu, mutajenite, alerjik reaksiyonlar, bulantı ve kusma görülmektedir. Doksorubisinin diğer kemoterapötik ajanlar gibi yan etkileri çoğunlukla seçici olmayan bir şekilde normal hücrelere de sitotoksik etki göstermesiyle bağlantılıdır. Bununla birlikte, kardiyotoksisite ve kemik iliği baskılanması bu ilacın kullanımını kısıtlamaktadır.[10,11]

DOKSORUBİSİNİN ETKİ MEKANİZMASI

Doksorubisin'in hücreler üzerinde çok sayıda etki mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, DNA ve RNA polimerazların fonksiyonlarını engellemesi, DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonuna etki etmesidir. İkincisi, topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA zincir kırılmalarına yol açmasıdır. Topoizomeraz enzimleri DNA zincirlerini kırıp, birbirleri üzerinden geçirip, tekrar birleştirerek DNA'nın topolojik yapısını değiştirmektedirler. Topoizomeraz I tek zincir kırılmasını, topoizomeraz II ise çift zincir kırılmasını katalize etmektedir. Topoizomeraz inhibitörleri, DNA zincirinin kesilmesi ve farklı noktalardan tekrar birleştirilmesi işlemini engellemekte ve DNA zincirinde tamir edilemeyen kırılmalar meydana getirmektedir. Doksorubisin, topoizomerazın DNA'yı kesmesinin ardından meydana gelen topoizomeraz-DNA kompleksini stabilize ederek ve DNA ikili sarmalının tekrar birleşmesini engelleyerek DNA replikasyonunu durdurmaktadır. Böylece, DNA'nın transkripsiyonu engellenmekte ve hücrenin apoptozuna yol açan mekanizmalar devreye girmiş olmaktadır.[12] Topoizomeraz I ve II ile etkileşen ilaçlar, kanser tedavisinde umut vaat vaad ederler. Ancak bu ajanların kendileri de mutasyonlara ve kansere yol açabilmektedirler.[13] Doksorubisinin ikinci antikanser mekanizması ise kinon yapısı ile ilişkili sitotoksik aktivitesidir. Bileşiğin kinon yapısı, ayrıca serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Mikrozomlardaki sitokrom P-450 redüktaz enzimi, doksorubisini serbest radikal ara ürünü olan semikinona indirgemektedir. Bu kararsız metabolit, doksorubisin formuna geri dönerken oksijen molekülünü indirgemekte ve DNA zincir kırıcı süperoksit anyon radikali ile hidrojen peroksit oluşmasına neden olmaktadır. Bu serbest radikallerin DNA hasarına ve oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir.[14-16]

Hücreler oksidatif hasara karşı enzimatik olan antioksidan sistemler ve moleküllerle korunmaktadırlar. Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz [catalase (CAT)], glutatyon peroksidaz [glutathione peroxidase (GSH-Px)] ve glutatyon S-transferaz bulunmaktadır.[17]

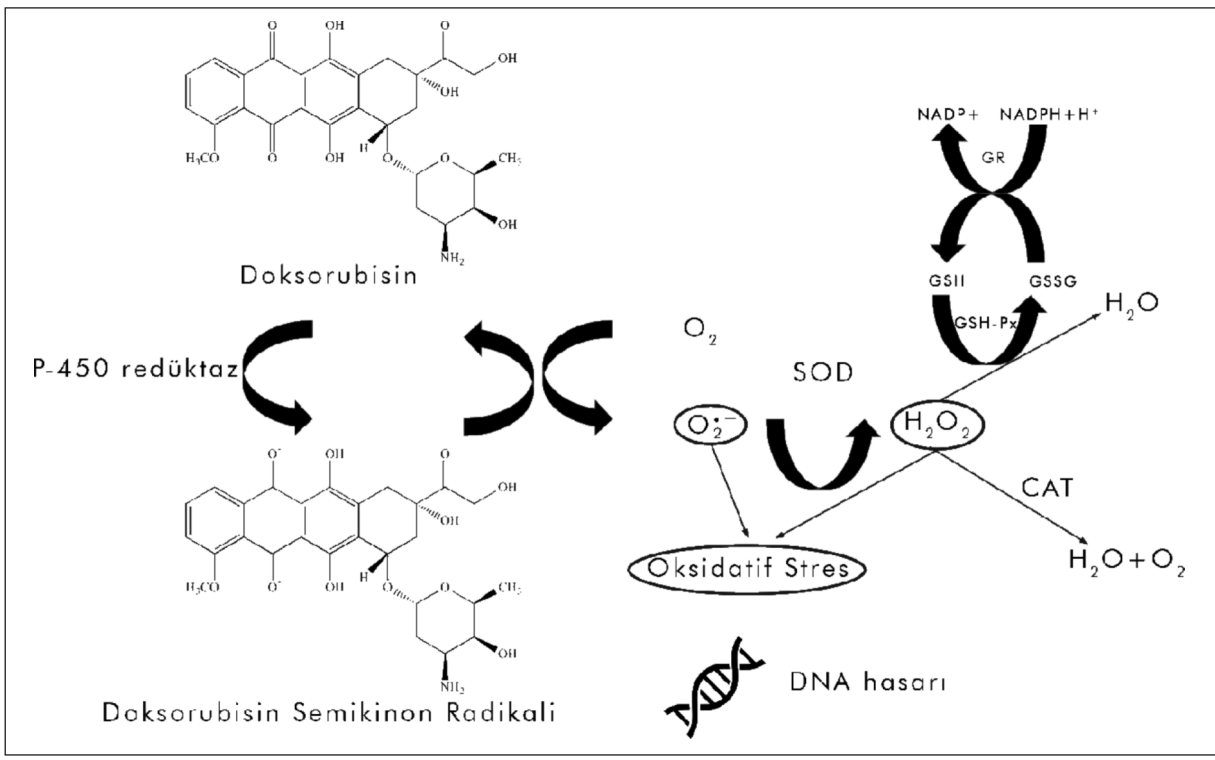
SOD, süperoksit radikalini (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen dismutasyondan sorumlu antioksidan bir enzimdir. CAT, SOD aracılığıyla oluşan H_2O_2'nin H_2O ve O_2'ye dönüşümünü katalize etmektedir. GPx, elektron kaynağı olarak GSH'yi kullanarak

H_2O_2 ve organik hiperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir.[18] Bu sırada GSH, hidrojen verici olarak hareket ettiğinden, H_2O_2 indirgenirken GSH okside olmaktadır. Okside glutatyon, glutatyon disülfittir. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi varlığında okside glutatyon redükte glutatyon hâline geri indirgenmektedir. Bu indirgenme reaksiyonu esnasında GR elektron vericisi olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı kullanmaktadır. SOD veya GPx enzimleri gibi oksidatif strese karşı vücudu koruyan enzimlerin fazla bulunduğu hücreler serbest radikallerin yaratabileceği olumsuz etkilere karşı daha dirençlidirler. Tümör hücrelerinde ve kalpte SOD enzimi düşük miktarda bulunmaktadır. Aynı zamanda kalp dokusunda CAT enziminin de bulunmaması sonucu H_2O_2 parçalanamamaktadır ve bu da doksorubisinin kardiyotoksik etkilerini ortaya çıkarmaktadır (Şekil 1).[19]

Doksorubisin diğer bir etki mekanizması ise hücre membranına bağlanarak, membran fonksiyonunu buna bağlı olarak fosfatidilinositol aktivasyonuna kenetli iyon transport mekanizmasını bozmasıdır.[20]

DOKSORUBİSİNE BAĞLI KARSİNOJENİTE

1987 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı [International Agency for Research on Cancer (IARC)]'nın hazırlamış olduğu rapora göre doksorubisin 2A (insanlarda yüksek olasılıkla karsinojen) grubunda yer almaktadır. Deney hayvanlarında yapılan karsinojenite verilerine dayanarak, Amerikan Ulusal Toksikoloji Programı'nın 2016 yılında yayımladığı 14. raporunda, doksorubisinin insan karsinojeni olma potansiyeli taşıdığı belirtilmiştir. Ancak, insanlarda kanser gelişimi ve doksorubisin maruziyeti arasındaki ilişkiyi değerlendiren hiçbir epidemiyolojik çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, alkilleyici ajanlar ve radyoterapi ile birlikte doksorubisin kullanımının bazı hastalarda lösemi ve kemik tümörü gelişimine yol açtığı bildirilmiştir.[21]



ŞEKİL 1: P450 redüktaz enzimi ile reaktif ve sitotoksik doksorubisin semikinon radikalinin oluşumu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller.

O_2^-: Süperoksit anyonu; SOD: Süperoksit dismutaz; H_2O_2: Hidrojen peroksit, CAT: Katalaz; GSH-Px: Glutatyon peroksidaz; GSH: Glutatyon; GSSG: Glutatyon disülfit; GR: Glutatyon redüktaz; NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat.

IARC bileşiğin intravenöz ve subkütan formülasyonlarının sıçanlara karsinojenik olduğu sonucuna varmıştır. Doksorubisinin intravezikal uygulamadan sonra mesanede tümör oluşturduğu gözlenmiştir.[22]

Bertazolli ve ark., Sprague-Dawley sıçanlarında doksorubisinin karsinojenitesini değerlendirmek için tek yüksek doz (8 mg/kg) intravenöz olarak dişi sıçanlara uygulamışlar ve kısa sürede meme tümörü insidansında artış gözlemişlerdir.[23]

Marquardt ve ark., Bertazolli ve ark.nın buldukları meme kanserindeki insidansın artışını doğrulamışlardır. Bu çalışmada, 5 mg/kg doksorubisin içeren tek doz intravenöz enjeksiyon Sprague Dawley sıçanlarına uygulanmıştır ve bir yıllık gözlem sonunda 17 doksorubisin uygulanan sıçanın 16'sında fibroadenom ve üçünde adenokarsinom oluştuğu belirtilmiştir.[24] Bucciarelli erkek ve dişi Sprague-Dawley sıçan gruplarına 5 ve 10 mg/kg doksorubisini intravenöz enjeksiyon olarak uygulamıştır. Başlıca adenokarsinom olmak üzere çok sayıda meme tümörü oluşumu gözlenmiştir.[25]

Jang ve ark., Sprague-Dawley dişi ve erkek sıçanlara 10 mg/kg tek intravenöz enjeksiyon veya 2 mg/kg/gün olarak tekrarlı doz doksorubisin uygulamasının dişi hayvanların %30 ve %41'inde çoğunlukla fibroadenomlar olan çoklu meme tümörleri oluşumunu artırdığını gözlemişlerdir. Tümör insidansı kontrol grubuna göre %8 artış göstermiştir. Düşük doz grubundaki iki erkek sıçanda meme tümörü gelişmiştir. Ayrıca renal hücre tümörleri, tek ve düşük doz uygulanan sıçanların beşinde rastlanmıştır.[26]

Bir diğer çalışmada ise 1 mg/mL intraveziküler yolla doksorubisin uygulanan dişi Fischer F344 sıçanlarında, nodüler hiperplazi ve papilloma insidansı kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış göstermiştir. Aynı çalışmada, seçici bir mesane karsinojeni olan N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin ile ön uygulamaya maruz bırakılan sıçanlarda doksorubisinin mesane kanserine neden olma kapasitesi artış göstermiştir.[27]

DOKSORUBİSİNE BAĞLI GENOTOKSİSİTE

Kemoterapi tedavisi sırasında veya sonrasında, birincil tümörlerden farklı malign ikincil tümörlerin tedaviye bağlı olarak gelişebileceği kabul edilmektedir. Günümüzde ikincil tümörler kanserlerin %16'sını oluşturmaktadır. İkincil kanserler tedavi ile ilişkili ölümlerin en sık nedenleri arasında yer almaktadır. Doksorubisin gibi topoizomeraz II inhibitörleri ile tedavide en sık görülen ikincil tümör akut miyeloid lösemi (AML)'dir. Terapi ile ilişkili miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid lösemi (t-MDS/t-AML) nin kemoterapinin neden olduğu mutasyonların doğrudan sonucu olduğu düşünülmektedir. Topoizomeraz II inhibitörleri uygulanan hastalarda t-AML, kromozom 11q23 veya 21q22'yi içeren bantlardaki translokasyonlar karakterize edilmiştir.[28]

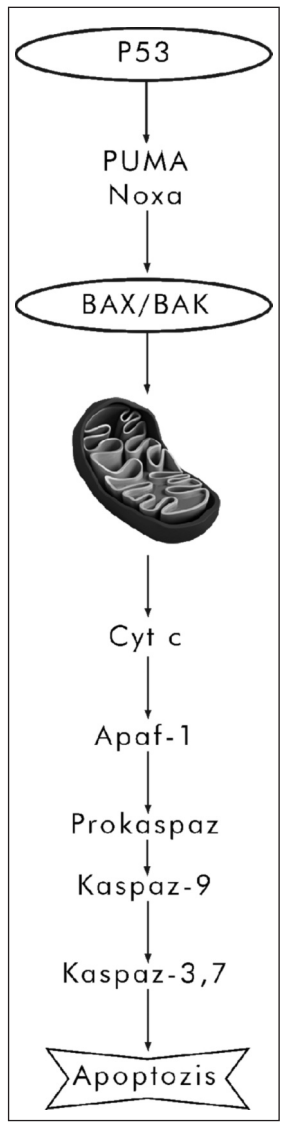
Serbest radikal üretiminin, doksorubisinin genetik toksisitesinden sorumlu primer mekanizma olarak kabul edildiği yukarıda bahsedilmiştir.[29]

Doksorubisin, ilaç dozuna ve hücre tipine bağlı olarak birden fazla DNA hasar mekanizmasına sahiptir. Nükleotid eksizyon onarımı, homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç birleştirme, doksorubisin-DNA addaktlarında ve çift zincir kırıklarının onarımında rol oynamaktadır. Doksorubisin tarafından indüklenen oksidatif DNA lezyonları ve tek zincir kırıkları ise öncelikli olarak baz eksizyon tamiri (BER) ile onarılmaktadır.[30-32]

Araştırmacılar, doksorubisin ile ilişkili toksisitenin p53 proteininin aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir.[33] *p53 geni; p21/waf1, BAX, PUMA* ve *NOXA* dâhil olmak üzere çeşitli genleri düzenleyerek hücresel proliferasyonu veya apoptozu kontrol eden tümör süpresör geni olarak bilinmektedir. PUMA ve Noxa kaspazların ve apoptozun aktivasyonunu ve mitokondriyal membran değişikliklerini ve mitokondriden apoptojenik proteinlerin akışını desteklemektedirler. Bu genler, Bcl-2 aile üyeleri olan apoptoz ile hücre ölümüne aracılık etmek için mitokondriyal dış membranına zarar verebilen BAX ve BAK proteinlerini kodlamaktadır. Sitokrom C'nin mitokondriden salınması üzerine, apoptoz oluşması için apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 ile bağlanmaktadır. Apoptozom, prokaspaz-9'u başlatıcı apoptotik kaspaz olan kaspaz 9'a aktive etmektedir. Kaspaz 9, apoptozdan sorumlu kaspaz 7 ve 3'ün transaktivasyonunu desteklemektedir. *p53* geninin ifadesi olan p53 proteini normal fizyolojik koşullarda düşük seviyelerde bulunmaktadır. Ancak, genotok-

sik stres gibi hücresel stres koşullarında, p53 stabilize olmakta ve birikmektedir. Protein stabilitesine ek olarak, p53 düzenleyici mekanizmalar arasında fosforilasyon, metilasyon ve asetilasyon yer almaktadır (Şekil 2).[34]

AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), katalitik bir alt üniteyi ve düzenleyici β- ve γ-alt birimlerini içeren heterotrimerik bir serin/treonin protein kinaz kompleksidir. AMPK'nin genotoksik yanıt ve apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir.[35] NAD^+ bağımlı sınıf III deasetilaz enzimler olarak bilinen sirtuin (SIRT) ailesinin etki ettiği mekanizmaların başında gen ifadesinin düzenlenmesi gelmektedir. SIRT1; p53 gibi proteinleri hedefleyerek programlı hücre ölümünde önemli bir rol oynamaktadır. SIRT1; p53'ü lizin aminoasit kalıntılarından deasetilize ederek transkripsiyonel etkinliğini azaltmaktadır ve oksidatif strese ve DNA hasarlarına karşı programlı hücre ölümünü baskıladığı bildirilmiştir.[36] AMPK aktivasyonunun, genotoksik stres kaynaklı apoptozdan normal hücreleri koruduğunu, bunu da doğrudan fosforilasyonla p53'ün fonksiyonunu ve stabilitesini düzenleyerek veya SIRT1'e bağlı asetilasyon yoluyla koruduğu bildirilmiştir.[37]



ŞEKİL 2: İntrensek apoptoz sinyal yolu. İntrensek veya mitokondri apoptoz sinyal yolunun şematik diyagramı.

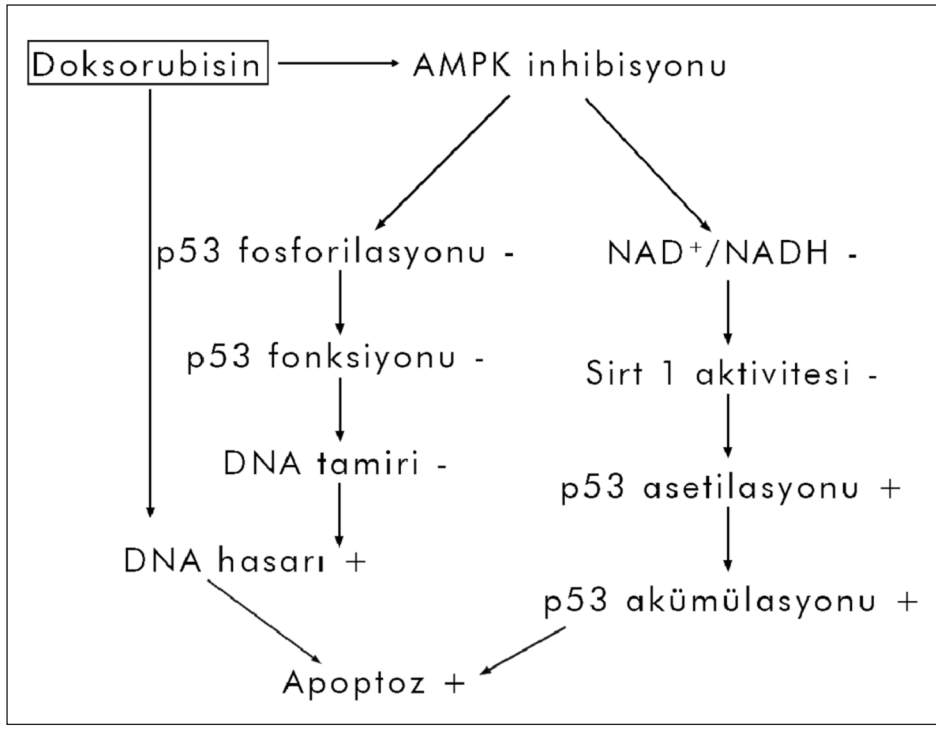
Cyt c: Sitokrom C; Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1.

Doksorubisinin SIRT1 disfonksiyonu ve p53 birikimi ile sonuçlanan AMPK'yi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Şekil 3).[37]

Yapılan bir araştırmada, fare embriyonik fibroblast (MEF) ve kardiyomiyosit hücre (H9C2) hatları farklı dozlarda ve sürelerde doksorubisine maruz bırakılmıştır. Hücre ölümü ve p53, SIRT1 ve AMPK protein düzeyleri "western blot" yöntemiyle incelenmiştir. Doksorubisin, MEF hücre hattında AMPK inhibisyonuna, hücre ölümüne ve p53 birikimine neden olmuştur. Ayrıca, H9C2 hücre hattındaki P53 artışının kaspaz-3 ve poli ADP riboz polimeraz'ın artışına bağlı olduğu saptanmıştır. Ayrıca, AMPK'nin farmakolojik aktivasyonunun, doksorubisinin yan etkilerini hafifletebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, kardiyomiyositlerde artmış p53 ve apoptozun, doksorubisin kaynaklı AMPK inhibisyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, doksorubisin gibi genotoksik stres indükleyici ajanların DNA hasarını indüklediği ve AMPK aktivasyonunu inhibe ettiği görülmektedir.[37]

Doksorubisin ile AMPK inaktivasyonu, p53 disfonksiyonuna ve NAD^+/NADH oranının değişmesine yol açarak, SIRT 1 aktivasyonunun azalmasına ve bunun da p53 ve hücresel apoptozun birikimine yol açtığı bildirilmiştir.[38]

İn vitro kalp hücresi deneyleri ve in vivo çalışmalar, doksorubisin maruziyetinin kalp hücresinde apoptozu tetiklediği ve buna bağlı olarak hücre ölümünün görüldüğünü ortaya koymuştur.[39,40] Doksorubisin kaynaklı hücre ölümünde p53



ŞEKİL 3: Doksorubisinin indüklediği genotoksisitenin AMPK regülasyonuna bağlı mekanizmaları.
AMPK: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz.

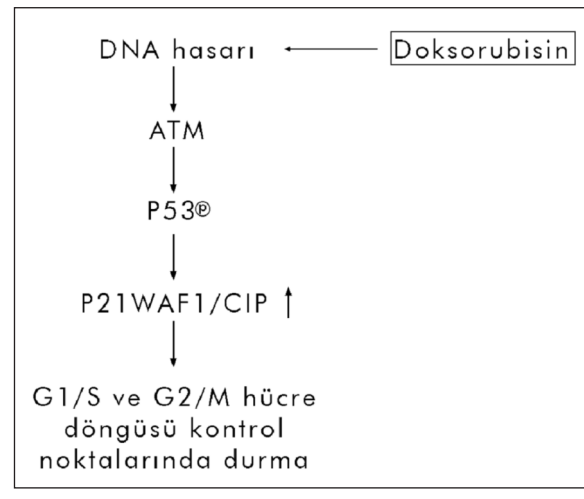
birikiminin önemi diğer araştırmalarda da bildirilmiştir.[41-43]

Ataksi telenjiektazinin defektif (ATM) geni, p53 için önemli bir kinazı kodlamaktadır. ATM'nin aktivasyonu, DNA hasar tanınması ve hücre döngüsü kontrol noktalarının düzenlenmesi ve apoptozu da içeren çok sayıda hücresel olaylarda katkıda bulunmaktadır. Doksorubisinin neden olduğu DNA hasarından dolayı *p53* geni, ATM tarafından fosforillenmektedir. Aktive edilmiş p53, siklin bağımlı kinaz inhibitörü *p21 (waf1/cip)* geninin düzenlenmesini sağlayarak hücre döngüsünü durdurmakta ve/veya apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir (Şekil 4).[44]

Doksorubisin insan lenfoblastoid hücre hatlarına uygulandığında, *p53*'ün fosforilasyonunu indüklediği ve bu fosforilasyonun ATM'ye bağımlı olduğu gösterilmiştir. Doksorubisinin *p53*'ün stabilizasyonunu ve fosforilasyonunun, sadece ATM protein kinaz mevcudiyetinde meydana geldiği bildirilmiştir.[44]

İlaçların güvenlik değerlendirmesi için çeşitli klinik öncesi analizler yapılması gerekmektedir. Bu analizler arasında, genotoksisite ve karsinojenite testleri kimyasalların güvenirliliğini tanımlamak ve öngörmek için son derece önem arz etmektedir.[45]

Matheson ve ark. antineoplastik ilaçların mutajenitesini iki spesifik test olan Ames/*Salmonella* ve TK+/-fare lenfoma testlerini kullanarak değer-



ŞEKİL 4: Doksorubisinin neden olduğu DNA hasarından sonra ATM bağımlı yolaklar ile hücre döngüsünün durmasının şematik gösterimi.
ATM: Ataksi telenjiektazinin defektif geni; P21 WAF1/CIP: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü.

lendirmişlerdir. Bu çalışmada, doksorubisin metabolik aktivasyon yokluğunda T98 suşunda mutajenik bulunmuştur. TK+/-fare lenfoma testinde doksorubisin metabolik aktivasyon yokluğunda mutajenik etki göstererek bakteri ve memeli hücresi sonuçları korelasyon göstermiştir.[46]

Doksorubisinin sitogenetik etkisi Çin hamster yumurtalık hücre hattı kullanılarak kromozomal aberasyon (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, doksorubisin metabolik aktivasyon yokluğunda kullanılan tüm bakteri suşlarında mutajen bulunmuştur. Ayrıca, kromozom kırıklarını ve KKD'yi indüklediği bildirilmiştir.[47]

Doksorubisinin genotoksisitesini araştıran başka bir çalışmada, *Salmonella* TA 98 ve TA 100 suşlarında Ames testi gerçekleştirilmiştir. TA 98 suşunda metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda güçlü mutajenik etki görülmüştür. Ancak TA100 suşunda TA 98 suşuna göre bu etki daha az izlenmiştir. Bu sonuç, doksorubisinin baz çifti değişiminden ziyade çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir. Doksorubisinin mutajenik etkisi kimyasal yapısına ilişkilendirilmektedir. Antrasiklin glikozidinde serbest amino grubu bulundurması doksorubisini Ames testinde güçlü bir mutajen yapmıştır. Bu sonuçlar, Umezawa ve ark.nın belirtmiş olduğu antrasiklin glikozitlerinin serbest amino grubu taşımasının bakteriyel mutajeniteye neden olduğu bulgusunu doğrulamaktadır.[48] Aynı çalışmada, doksorubisin V79 hücre hattında kromozom kırıklarına ve KKD'ye yol açmıştır. Ayrıca, yapılan in vivo mikronükleus (MN) testinde, doksorubisin (1,25 mg/kg) MN sayısında önemli ölçüde artışa neden olmuştur.[49]

Bir diğer çalışmada, doksorubisinin mutajenik ve sitotoksik aktivitesi V79 hücre hattında ve *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1538, TA100 ve TA98 bakteri suşlarında değerlendirilmiştir. TA1535 suşunda önemli ölçüde revertant koloni sayısında artış gözlenmemişken, TA1538 suşu üzerinde belirgin olarak koloni sayısı artmıştır. pKM101 plazmidi taşıyan suşlarda ise TA98 suşu, TA100'den daha yüksek bir duyarlılık göstermiştir. Metabolik aktivasyon için S9 karışımının eklenmesi herhangi bir mutajenik yanıtı değiştirmemiştir. V79 hücrelerinde, doksorubisin 0,05-0,5 μg/mL arasında değişen dozlarda yüksek sitotoksik ve zayıf mutajen olarak değerlendirilmiştir.[50]

Doksorubisinin genotoksisitesinin değerlendirilmesi için insan periferik lökosit hücreleri 24 saat süreyle 0,02 μg/mL ya da dört saat süreyle 0,05, 0,10 ve 0,15 μg/mL doksorubisine maruz bırakılmış ve KA test sistemiyle değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda kromozom içi ve kromozomlar arası çeşitli anomaliler gözlenmiştir.[51]

Doksorubisinin hücre canlılığına ve KKD'ye etkisi, Çin-hamster V79 hücre hattında araştırılmıştır. Adriyamisin doz bağımlı (0,2 μM, 0,15 μM, 0,1 μM ve 0,05 μM) olarak V79 hücrelerinde sitotoksisite ve KKD'ye sebep olmuştur.[52]

Drosophila melanogaster (meyve sineği), ökaryotik bir canlı olması nedeni ile kimyasalların genotoksik etkisini araştırmada sıklıkla kullanılmakta ve kimyasalların olası etkileri konusunda güvenilir bilgiler sağlamaktadır. Clements ve ark. (1984) tarafından yapılan bir çalışmada, doksorubisinin *Drosophila* germ hücrelerindeki mutajenik etkileri araştırılmıştır. Doksorubisin, 250 μg/mL-1 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda, cinsiyete bağlı resesif letal mutasyonları indüklemiştir. En yüksek konsantrasyon (1 mg/mL) toksik doz olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, bu deneyde doksorubisinin olgun sperm üzerinde önemli bir mutajenik etkiye sahip olduğunu düşündüren %4,40'lık bir letalite sıklığı gözlenmiştir.[53]

Doksorubisin, 1-100 ng/mL doz aralığında insan periferal lenfosit kültüründe kardeş kromatid sıklığı açısından incelenmiştir. Lenfosit hücrelerine 1 ng/mL doksorubisin uygulandığında hücre başına düşen KKD sıklığı 9,6 olarak bulunmuş iken, bu değer negatif kontrol grubunda 4,8 olarak değerlendirilmiştir. Maksimum KKD sıklığı ve kromozomal kırıkları 48 saat süreyle 100 ng/mL konsantrasyonunda sırasıyla hücre başına 24,5 ve 5,5 olarak saptanmıştır. Doksorubisin 48 saat süreyle 100 ng/mL konsantrasyonunun üzerinde sitotoksisite göstergesi olan mitoz bölünmeyi inhibe etmiştir. Kırk sekiz saat yerine 24 saat uygulanan grupta 100 ng/mL dozunda KKD sıklığı 48 saat uygulanan gruba göre

daha düşük bulunmuştur. Yirmi dört saatte iki parametrenin de en yüksek olduğu doz 200 ng/mL olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada, doksorubisinin genotoksisitesi in vivo olarak daha önce herhangi bir kemoterapi tedavisi uygulanmayan erkek hastalarda araştırılmıştır. Çalışmada, intravenöz olarak 125 mg doksorubisin uygulanan hastalarda KKD sıklığı enjeksiyondan 10 dk sonra 15,5/hücre, altı saat sonra 10/hücre ve bir ay sonra negatif kontrol düzeyine inmiştir. Bu çalışmayla doksorubisinin uygulandıktan sonra hızlı bir şekilde lenfositler tarafından alındığı, çekirdekte yoğunlaştığı ve DNA'ya bağlanarak genotoksisite gösterdiği belirtilmiştir.[54]

Tedavi amaçlı doksorubisin kullanan ve başka kemoterapi ilacı veya radyoterapi almayan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, hastalardan tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere kan örnekleri toplanmıştır. Yapısal kromozomal değişimleri ve KKD, kısa süreli fitohemaglutinin ile uyarılmış lenfositlerde araştırılmıştır. İntravenöz tek doz 800 mg doksorubisin uygulanan hastalarda incelenen her iki parametre sıklığında birbiriyle orantılı olarak artış saptanmıştır. KKD sayısındaki artışın, tedavinin sona ermesinden birkaç ay sonra devam ettiği gözlenmiştir.[55]

Son yıllarda, doksorubisinin kardiyotoksik etkisi ile genotoksite arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Doksorubisin 15 mg/kg dozunda periton içi olarak Wistar sıçanlarına uygulanmış ve kalp, karaciğer ve böbrek doku örneklerinde DNA zincir kırıkları Comet deneyinde değerlendirilmiştir. Kalp, karaciğer ve böbrek dokularında kontrole göre kuyruk ve kuyruk yoğunluğunda önemli bir artış saptanmıştır. Bu sonuçlarla, doksorubisin ile indüklenen kardiyotoksisitenin, kardiyak dokuda DNA zincir kırıkları oluşumu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir.[56]

Benzer bir çalışmada, F344 sıçanlarına intravenöz yolla 1, 2 ve 3 mg/kg dozunda doksorubisin uygulanmış ve çeşitli dokularda DNA hasarı değerlendirilmiştir. Alkali Comet analiziyle incelenen dokuların hiçbirinde önemli bir DNA hasarı gözlenmemiştir. Fakat, glikozilaz enzimleri ile modifiye edilmiş Comet analizinde kardiyak dokudaki oksidatif DNA hasarında doza bağlı olarak önemli bir artış bulunmuştur. Bu hasar sadece karaciğerde en yüksek dozda saptanmıştır. Ayrıca, kalp dokusunda DNA hasar ve onarım genlerinin ifadesinde önemli değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, doksorubisinin kalp dokusunda genotoksik olduğunu ve DNA hasarının öncelikle reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle tetiklendiğini göstermektedir.[57]

DOKSORUBİSİN VE FİTOKİMYASALLAR

Antineoplastik kemoterapinin ana hedefi, hastanın sağlıklı hücrelerine zarar vermeden, tümörün büyümesini ve çoğalmasını durdurmak ya da yok etmektir. Ancak, antineoplastik ilaçların çoğu selektif olmadığından, kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Doksorubisin gibi sistemik toksisite yaratabilen ilaçlar, normal hücrelere zarar vermeden kanserli hücreye etki edecek dozda uygulanamadığından, normal dokulara zarar vermeden ilacın etkili olmasını sağlayacak kombinasyon tedavileri yararlı olabilmektedir.

Antigenotoksik veya antimutajenik etkilere sahip ajanlar, kemoprofilaksi amaçlı kullanılabilmektedirler. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nün verilerine göre, kemoprofilaksi amaçlı 400 madde bulunmaktadır. Bu maddeler doğal ya da sentetik olup; karsinogenez sürecini önlemekte, erteler ya da yavaşlatmaktadır. Kemoprofilaksi; primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Tersiyer kemoprofilaksi grubundaki maddeler kanser hastalarının ikincil kanserden korunmalarını sağlamaktadır.[58]

Bitkisel ürünler ve bunlardan elde edilen işlenmiş gıdalarda doğal olarak bulunan fitokimyasallar kemoprofilaksi amaçlı kullanabilmektedir. Fitokimyasallar fenolik bileşikler, flavonoidler, alkaloidler, karotenoidler, azot içeren bileşikler ve organosülfür bileşikleri şeklinde sınıflandırılabilmektedir. Fitokimyasallar oksidatif hasara karşı korumada, DNA tamir genlerinin ve hücre siklusunu kontrol eden genlerin modülasyonunda, apoptozun uyarılmasında, anjiyogenezin engellenmesinde ve tümör hücresinin invazyonunun ve yayılmasının düzenlenmesinde ve epigenetik değişikliklerde rol oynamaktadır. Ayrıca, mutajen bir madde ile doğrudan etkileşerek DNA ile bu maddenin etkileşimini engelleyebilmektedir.[59,60]

Copaifera lansdorffii Desf. "copaiba" veya "copaiva" olarak bilinen ve Brezilya'nın bir kısmında yetişen ağaç türüdür. Bu ağacın yapraklarının hidroalkolik ekstresinin (CLE) genotoksik ve antigenotoksik potansiyeli, doksorubisin tarafından indüklenen fare periferik kan MN testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Genotoksisite değerlendirmesi için, CLE 10, 20, 40 ve 80 mg/kg dozlarında 20 gün süreyle deney hayvanlarına oral olarak uygulanmıştır. Periferik kan numuneleri, tedavinin başlangıcından 24, 48 saat; 7, 15 ve 21 gün sonra toplanmıştır. Antigenotoksisite değerlendirmesi için, farklı CLE konsantrasyonları uygulanan hayvanlara uygulamanın 20. gününde 15 mg/kg doksorubisin periton içi olarak enjekte edilmiştir. Periferik kan numuneleri doksorubisin maruziyetinden 24 ve 48 saat sonra toplanmıştır. Sonuçlar, CLE'nin fare MN analizinde genotoksik olmadığını göstermiştir. CLE ve doksorubisin ile tedavi edilen hayvanlarda, tek başına doksorubisin alan hayvanlara kıyasla MN sayısı önemli ölçüde azalmıştır. Bir veya daha fazla CLE aktif bileşiğinin antioksidan aktivitesi, bu bitkinin doksorubisinin oluşturduğu genotoksisite üzerindeki koruyucu etkisinde rol oynadığı düşünülmüştür.[61]

Biksin, annatto ağacının (*Bixa Orellana L.)* tohumunda bulunan doğal bir kırmızı boyadır. Gıdada renklendirici bir madde olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Biksinin, HL60 promiyelositik lösemi hücre hattında doksorubisin tarafından indüklenen sitotoksisite ve genotoksisite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Biksin 0,3 mg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda, HL60 hücrelerinde sitotoksik etkiler gösterirken, mutajenik veya genotoksik etkileri bulunmamıştır. Ayrıca, biksin doksorubisin tarafından indüklenen DNA hasarını azaltmıştır. Biksin ve doksorubisin HL60 hücrelerinde apoptotik etki göstermemiştir, ancak eş zamanlı kombine tedavileri apoptotik hücrelerin yüzdesinde bir artış göstermiştir.[62]

Rosaceae ailesine üye olan *Rubus niveus Thunb.* bitkisinin toprak üstü organlarının metanol ekstresi (ME) deney hayvanlarına 500, 1.000 ve 2.000 mg/kg dozlarında tek başına ve ayrıca periton içi enjeksiyonla uygulanan doksorubisin (30 mg/kg) ile birlikte verilmiştir. Comet analizi, fare kemik iliğinde KA ve MN testleri yapılmıştır. ME periferik kan lökositlerinde ve kemik iliği hücrelerinde genotoksik bulunmamıştır, ancak anojenik ve klastojenik etkileri 2.000 mg/kg dozunda MN testi ile belirlenmiştir. Öte yandan, sadece doksorubisin verilen grupla ME ve doksorubisin birlikte verilen grup kıyaslandığında tüm dozlarda DNA hasarı ve KA'da önemli bir düşüş belirtilmiştir. *Rubus niveus* ekstresinin doksorubisin tarafından indüklenen genotoksisitenin inhibe edilmesinde rol oynadığı gözlenmiştir.[63]

Styrax camporum ile yapılan çalışmada, *S. camporum*'un hidroalkolik ekstresinin genotoksik potansiyeli ve doksorubisinin neden olduğu genotoksisite üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Farelere ekstraktın farklı dozları (250, 500 ve 1.000 mg/kg) gavaj ile uygulanmıştır. Antigenotoksisite değerlendirilmesi için, *S. camporum* ekstraktının farklı dozları, 15 mg/kg doksorubisin ile eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak, *S. camporum* ekstresinin, in vivo fare MN tayininde genotoksik olmadığı saptanmıştır. MN'li polikromatik eritrositlerin sayısı, sadece doksorubisin ile tedavi edilen hayvanlara kıyasla *S. camporum* ekstresi ve doksorubisin ile tedavi edilen hayvanlarda önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Bu çalışmada araştırmacılar, *S. camporum* ekstresinin içerdiği flavonoidler doksorubisinin antitümör aktivitesini zayıflatmadan olumsuz etkilerini engellediği üzerinde durmuşlardır. *S. camporum* ekstresinde bulunan flavonoidlerin P-glikoprotein üzerindeki uyarıcı etkisi, antigenotoksik etkisiyle ilgili bir mekanizma olabileceğini düşündürmüştür. [64]

Yapılan bir araştırmada, fare kemik iliğinde *Handroanthus impetiginosus* kabuğunun liyofilize tentürünün olası genotoksik ve antigenotoksik etkileri in vivo MN test sisteminde değerlendirilmiştir. *H. impetiginosus*'un 0,5-2 g/kg dozlarında, 24-48 saat zaman aralığında klastojenik ve anojenik etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, 0,5 g/kg *H. impetiginosus* ve 5 mg/kg doksorubisin ile kombinasyon tedavisi, antiklastojenite ve antianojenitede önemli bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.[65]

Apigenin en iyi bilinen flavonoidlerden biridir. Nane (*Mentha var.*), kekik (*Origanum vulgare*), tıbbi kekik (*Thymus vulgaris*), gül (*Rosmarinus of-*

ficinalis) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) gibi tıbbi bitki ve baharatlardaki ana flavonoiddir. Apigenin, antioksidan ve antimutajenik özelliklerinin bir sonucu olarak ümit verici bir kemopreventif ajan olarak tanımlanmıştır. Bu özelliklerinden dolayı doksorubisinin yarattığı genotoksisiteye karşı apigeninin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bakteriyel ters mutasyon testinde TA98 ve TA100 *Salmonella typhimurium* suşlarında apigenin 10-400 µg/plak konsantrasyon aralığında 0,2 µg/plak doksorubisin ile indüklenen mutasyona karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Ancak, apigenin ve doksorubisin ile muamele edilen hayvanlarda, muhtemelen bireyler arası değişkenliğe bağlı olarak MN sıklığında anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir.[66]

Çilek (*Fragaria ananassa Duch.*), vitaminler, polifenoller, özellikle antosiyaninler, flavanoller ve kondanse tanenler gibi zengin antioksidan bileşikler kaynağıdır. Yapılan bir araştırmada, çilek tüketiminin sıçanlarda doksorubisin tarafından indüklenen oksidatif strese karşı koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Hayvanlar iki ay boyunca çilek bakımından zenginleştirilmiş diyetle beslenmişlerdir ve deney periyodunun sonunda doksorubisin 10 mg/kg dozunda periton içi enjekte edilmiştir. Çilek tüketimi, plazma ve karaciğer dokusunda reaktif oksijen türleri üretimini ve oksidatif hasar biyobelirteçleri birikimini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ayrıca, doksorubisin ile tedavi edilen sıçanların karaciğerlerinde histopatolojik değişiklikleri hafifletmiştir. Antioksidan enzim aktivitesindeki düşüş, çilek tüketiminden sonra önemli ölçüde azalmıştır. Çalışmanın sonucu olarak çilek alımı, doksorubisin tarafından tetiklenen toksisiteye karşı, biyoaktif bileşenlerin yüksek içeriği sayesinde koruyucu bir rol oynamıştır. Çilek tüketimi, doksorubisinin oluşturduğu oksidatif stresi önlediğinden, serbest radikallerin neden olabileceği DNA hasarını da önleyebileceği düşünülmektedir.[67]

Üzüm ve üzüm ürünleri, flavonoid kaynağı olmasından ve antioksidan özelliği taşımasından dolayı araştırma konusu olmuştur. Üzüm çekirdeği ekstresi (ÜÇE) kateşin, epikateşin ve bunların gallat türevlerini içeren kompleks bir polifenol karışımıdır. ÜÇE'nin, doksorubisin ile indüklenen kardiyotoksisite ve genotoksisiteye karşı koruyucu rolü MN ve KA testleri ile farelerde araştırılmıştır. Kalp dokusunda lipit peroksidasyon göstergesi olan malondialdehid (MDA) ve GSH seviyeleri ölçülmüştür. Doksorubisin, kalp histolojisinde belirgin bir değişiklikten kaynaklanan kalp hasarına neden olmuştur. Doksorubisin ile tedavi edilen grupta, kalp dokusunda MDA seviyesinde belirgin bir artış ve GSH düzeyinde anlamlı olarak azalma saptanmıştır. Doksorubisin, MN ve yapısal KA'ları artırarak genotoksisiteyi indüklemiş ve hücrelerin mitotik indeksi üzerinde azaltıcı etki göstermiştir. Doksorubisin ile tedavi öncesinde ÜÇE uygulanmış grupta kalp dokusu önemli ölçüde korunmuştur ve bu korunmanın ÜÇE'nin antioksidan aktivitesi sayesinde kalp dokusunun MDA düzeyini anlamlı olarak azalttığı ve GSH düzeyini artırdığı düşünülmüştür. Ayrıca, ÜÇE, yapısal KA'ların sıklığını azaltarak doksorubisin ile tetiklenen genotoksisiteyi önemli ölçüde korumuştur. ÜÇE tedavisi ayrıca, MN'lerin sıklığını azaltmış ve mitotik indeks değerini artırmıştır. ÜÇE'nin antioksidan aktivitesinin, doksorubisin ile indüklenen kardiyotoksisite ve genotoksisiteye karşı korumadan sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.[68]

Antioksidan ve antimutajenik etkisi olan timokinon (TQ), izole edilmiş insan lenfosit kültüründe 0,15 µg/mL doksorubisin ile indüklenen kromozomal hasar üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Antigenotoksik ve antioksidan etkisi iyi bilinen L-karnosin ve kurkumin [curcumin (CMN)] ile TQ'nun olası antigenotoksik etkisi kıyaslanmıştır. Yetmiş iki saatlik lenfosit kültürünün sonunda, KA, MI, GSH, MDA ve oksidatif genotoksisite biyogöstergeci olan 8- hidroksideoksiguanosin (8-OH-dG) ölçülmüştür. Doksorubisin, yapısal KA'lara, MDA ve 8-OH-dG düzeylerinde anlamlı artışa sebep olmuştur. Ayrıca, doksorubisine maruz bırakılan lenfosit hücrelerinde MI ve GSH düzeylerinde anlamlı azalma meydana gelmiştir. DOX kaynaklı toksisiteye karşı sırasıyla TQ, L-Car ve CMN en yüksek korumayı sağlamıştır.[69]

Silimarinin (*Silybum marianum* ekstresi) doksorubisin ile kombinasyon hâlinde, östrojen bağımlı

meme karsinomu hücre hattına (MCF-7) uygulanarak hücre canlılığı ve apoptoz incelenmiştir. MCF-7 hücre kültürü sekiz gruba ayrılmıştır ve birinci gruba 75 µg silimarin verilmiştir, grup iki, üç ve dört sırasıyla 10, 25 ve 50 nM doksorubisine maruz bırakılmış ve gruplara beş, altı ve yedi sırasıyla 10, 25 ve 50 nM doksorubisin ve 75 µg silimarin uygulanmıştır. Canlılık yüzdesi ve hücrelerin apoptozu, 16, 24 ve 48 saat sonra tripan mavisi boyaması ile değerlendirilmiştir. Silimarinin doksorubisinin terapötik potansiyeli üzerinde sinerjik bir etkiye sahip olduğu ve doksorubisinin terapötik potansiyeli üzerinde daha etkili olabiliceği ve doz sınırlayıcı yan etkilerini azaltabileceği vurgulanmıştır.[70]

Rosmarinik asit (RA), kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenil laktik asidin bir esteridir. RA, perilla (*Perilla frutescens* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), adaçayı *(Salvia officinalis* L.), nane (*Mentha arvense* L.) ve fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) gibi bitkilerde bulunan polifenolik maddelerden biridir. RA antioksidan, antimutajenik ve kemoprotektif aktiviteye sahiptir. Yapılan bir çalışmada, RA'nın doksorubisin kaynaklı kromozom kırıklarını ve DNA hasarını önleme yeteneği araştırılmıştır. Bunun için V79 hücre hattında MN ve Comet analizi yapılmıştır. Hücre kültürüne, RA tek başına veya 0,5 µg/mL konsantrasyonunda doksorubisin ile kombinasyon hâlinde 0,28-1,12 mM konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Sonuçlar, RA'nın genotoksik etkisi olmadığını göstermiştir. Test edilen üç konsantrasyonda mikronükleus sıklığını ve doksorubisinin neden olduğu DNA hasarını önemli derecede azalttığı görülmüştür. RA'nın antioksidan aktivitesinin, doksorubisin ile indüklenen DNA hasarının azalmasında rol oynadığı düşünülmüştür.[71]

SONUÇ

Birçok kemoterapötik ajan, toksisiteleri ile ilgili endişe yaratmaktadır. Doksorubisin, çeşitli kanser türlerinde yaygın kullanılan etkili ilaçlardan biridir. Bununla birlikte, doksorubisin ile ilişkili toksisite ciddi bir sorundur. Bu toksisite, esas olarak kalp, böbrek ve karaciğerde ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni, DNA hasarına ve serbest radikal üretimindeki artışa bağlanmaktadır. Bitkisel ilaçlar ile modern ilaçların kombinasyonları daha etkili tedavi ve daha az toksisite oluşturabilmektedir. Antioksidan özelliklere sahip birçok doğal bileşik, doksorubisinin antitümör etkisini azaltmadan, bu tür toksik etkilerin önlenmesinde veya azaltılmasında ümit vadetmektedir. Bu bağlamda, onkogenik faktörleri veya kanser eğilimi üzerinde inhibitör etki gösteren bitkisel kaynaklı bileşikler üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Alternatif olarak güçlü antikanser etkileri ve daha az toksisiteleri ile bitkisel terapötik bileşiklerin kullanılması önerilebilmektedir. Kanser oluşumu riskini azaltmakla birlikte, ayrıca kemoterapi ile tedavinin neden olduğu sekonder kanserlere karşı korunmak ve genotoksik ajanlara karşı koruma sağlayan bitkileri tanımlamak gerekmektedir. Yakın gelecekte kemoterapötik tedavinin yan etkilerini azaltmak için bir "toksisite sınırlayıcı madde" olarak bitkisel kaynaklı bileşiklerin hayata geçmesi öngörülmektedir. Bu nedenle; farklı fitokimyasallar, kombinasyon kemoterapisinin potansiyel adayları olarak antitümöral etkileri sayesinde kullanılırken dikkat edilmesi gereken bir diğer önemli nokta ise bitkisel ürünlerin güvenliliğinin değerlendirilmesidir. Bitkisel ürünlerin toksik etki gösterebileceği ve genetik toksisiteyi artırarak oluşturabileceği kanser riski de göz önüne alınmalıdır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: *Mohammad Charehsaz, Sinem Helvacıoğlu;* ***Tasarım:*** *Sinem Helvacıoğlu;* ***Denetleme/Danışmanlık:*** *Ahmet Aydın;* ***Veri toplama ve/veya işleme:*** *Sinem Helvacıoğlu, Mohammad Charehsaz;* ***Analiz ve/veya Yorum:*** *Sinem Helvacıoğlu, Mohammad Charehsaz;* ***Kaynak Taraması:*** *Sinem Helvacıoğlu****; Makalenin Yazımı:*** *Sinem Helvacıoğlu, Mohammad Charehsaz****; Eleştirel İnceleme:*** *Ahmet Aydın.*

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. Int J Cancer 2015;136(5):E359-86.
2. Temel MK. [The development of cytotoxic chemotherapeutics in the twentieth century]. Türk Onkoloji Dergisi 2015;30(2):96-108.
3. Türker A, Kayaalp SO. [Principles of cancer chemotherapy and antineoplastic drugs]. Kayaalp SO, editör. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş; 2005. p.317-41.
4. Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. Medicine 2008;36(1):24-8.
5. Grynkiewicz G, Szeja W. Synthesis of the sugar moieties. In: Krohn K, ed. Anthracycline Chemistry and Biology I: Biological Occurence and Biosynthesis, Synthesis and Chemistry. Berlin: Springer; 2008. p.249-84.
6. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol Rev 2004;56(2):185-229.
7. Robert J, Gianni L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. Cancer Surv 1993;(17):219-52.
8. Woo MH, Evans WE, Relling MV. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. In: Pui CH, ed. Childhood Leukemias. 1st ed. Cambridge: Cambridge University; 1999. p.275-6.
9. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Giardina B, Minotti G. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. IUBMB Life 2001;52(1-2):83-8.
10. Cortés-Funes H, Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. Cardiovasc Toxicol 2007;7(2):56-60.
11. Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. J Biol Chem 2004;279(24):25535-43.
12. Chu E, Sartorelli AC. Cancer chemotherapy. In: Katzung BG, ed. Basic & Clinical Pharmacology. 12th ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. p.965.
13. Anderson RD, Berger NA. International Commission for Protection Against Environmental Mutagenes and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. Mutat Res 1994;309(1):109-42.
14. Agapito MT, Antolín Y, del Brio MT, Lȯpez-Burillo S, Pablos MI, Recio JM. Protective effect of melatonin against adriamycin toxicity in the rat. J Pineal Res 2001;31(1):23-30.
15. Karagoz B, Suleymanoglu S, Uzun G, Bilgi O, Aydinoz S, Haholu A, et al. [Hyperbaric oxygen therapy does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats.] Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008;102(3):287-92.
16. Büyükokuroğlu ME, Gülçin I, Oktay M, Küfrevioğlu OI. [In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium.] Pharmacol Res 2001;44(6):491-4.
17. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 1999;32(8):595-603.
18. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. J Dent Allied Sci 2012;1(2):63-6.
19. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. [Anticancer drugs]. Oktay Ş, Berkman K, Onat F, Gören Z, editörler. Farmakoloji. 2. Baskı. İstanbul: Tayf Ofset-Savaş Cilt Evi; 1998. p.385-6.
20. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. Crit Rev Oncol Hematol 1991;11(1):43-64.
21. IARC. Adriamycin. Chemicals, Industrial Processes and Industries Associated with Cancer in Humans, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1982. p.29-31.
22. IARC. Adriamycin (Group 2A). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 7th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1987. p.82-83.
23. Bertazzoli C, Chieli T, Solcia E. Different incidence of breast carcinomas or fibroadenomas in daunomycin or adriamycin treated rats. Experientia 1971;27(10):1209-10.
24. Marquardt H, Philips FS, Sternberg SS. Tumorigenicity in vivo and induction of malignant transformation and mutagenesis in cell cultures by adriamycin and daunomycin. Cancer Res 1976;36(6):2065-9.
25. Bucclarelli E. Mammary tumour induction in male and female Sprague-Dawley rats by adriamycin and daunomycin. J Natl Cancer Inst 1981;66(1):81-4.
26. Jang JJ, Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, et al. Mammary and renal tumor induction by low doses of adriamycin in Sprague-Dawley rats. Carcinogenesis 1987;8(8):1149-53.
27. Ohtani M, Fukushima S, Okamura T, Sakata T, Ito N, Koiso K, et al. Effects of intravesical instillation of antitumor chemotherapeutic agents on bladder carcinogenesis in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. Cancer 1984;54(8):1525-9.
28. Olney HJ, Mitelman F, Johansson B, Mrózek K, Berger R, Rowley JD. Unique balanced chromosome abnormalities in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: report from an international workshop. Genes Chromosomes Cancer 2002;33(4):413-23.
29. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. Toxicology 2002;180 (1):79-95.
30. Müller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D, Halliwell B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage. Biochem Biophys Res Commun 1997;230(2):254-7.
31. Spencer DM, Bilardi RA, Koch TH, Post GC, Nafie JW, Kimura K, et al. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. Mutat Res 2008;638(1-2):110-21.
32. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 2009;461(7267):1071-8.
33. Borrás C, Gómez-Cabrera MC, Viña J. The dual role of p53: DNA protection and antioxidant. Free Radic Res 2011;45(6):643-52.
34. Dai C, Gu W. P53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. Trends Mol Med 2010;16(11):528-36.
35. Russell RR 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, et al. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. J Clin Invest 2004;114(4):495-503.
36. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. Cell 2001;107:(2)149-59.
37. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, da Silva R, Lucchinetti E, Schaub MC, Wallimann T, et al. Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289(1):H37-47.
38. Wang S, Song P, Zou MH. Inhibition of AMP-activated protein kinase α (AMPKα) by doxorubicin accentuates genotoxic stress and cell death in mouse embryonic fibroblasts and cardiomyocytes: role of p53 and SIRT1. J Biol Chem 2012;287(11):8001-12.

39. Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. Circ Res 1999;84(3):257-65.
40. Kumar D, Kirshenbaum LA, Li T, Danelisen I, Singal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. Antioxid Redox Signal 2001;3(1):135-45.
41. Shizukuda Y, Matoba S, Mian OY, Nguyen T, Hwang PM. Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice. Mol Cell Biochem 2005;273(1-2):25-32.
42. Lorenzo E, Ruiz-Ruiz C, Quesada AJ, Hernández G, Rodríguez A, López-Rivas A, et al. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. J Biol Chem 2002;277(13):10883-92.
43. Liem AA, Appleyard MV, O'Neill MA, Hupp TR, Chamberlain MP, Thompson AM. Doxorubicin and vinorelbine act independently via p53 expression and p38 activation respectively in breast cancer cell lines. Br J Cancer 2003;88(8):1281-4.
44. Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. J Biol Chem 2004;279(51):53272-81.
45. Bridges BA. Short term screening tests for carcinogens. Nature 1976;261(5557):195-200.
46. Matheson D, Brusick D, Carrano R. Comparison of the relative mutagenic activity for eight antineoplastic drugs in the Ames Salmonella/microsome and TK+/- mouse lymphoma assays. Drug Chem Toxicol 1978;1(3):277-304.
47. Au WW, Butler MA, Matney TS, Loo TL. Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin. Cancer Res 1981;41(2):376-9.
48. Umezawa K, Sawamura M, Matsushima T, Sugimura T. Mutagenicity of acclacinomycm A and daunomycin derivatives. Cancer Res 1978;38(6):1782-4.
49. Bhuyan BK, Zimmer DM, Mazurek JH, Trzos RJ, Harbach PR, Shu VS, et al. Comparative genotoxicity of adriamycin and menogarol, two anthracycline antitumor agents. Cancer Res 1983;43(11):5293-7.
50. Babudri N, Pani B, Tamaro M, Monti-Bragadin C, Zunino F. Mutagenic and cytotoxic activity of doxorubicin and daunorubicin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. Br J Cancer 1984;50(1):91-6.
51. Vig BK. Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. Cancer Res 1971;31(1):32-7.
52. West C, Stratford IJ, Barrass N, Smith E. A comparison of adriamycin and mAMSA in vitro: cell lethality and SCE studies. Br J Cancer 1981;44(6):798-809.
53. Clements J, Phillips M, Todd N. Mutagenicity of adriamycin in Drosophila melanogaster. Mutat Res 1984;135(3):175-9.
54. Nevstad NP. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by the cytostatic drug adriamycin in vivo and in vitro. Mutat Res 1978;57(2):253-8.
55. Musilová J, Michalová K, Urban J. Sister-chromatid exchanges and chromosal breakage in patients treated with cytostatics. Mutat Res 1979;67(3):289-94.
56. Martins RA, Minari AL, Chaves MD, dos Santos RW, Barbisan LF, Ribeiro DA. Exercise preconditioning modulates genotoxicity induced by doxorubicin in multiple organs of rats. Cell Biochem Funct 2012;30(4):293-6.
57. Manjanatha MG, Bishop ME, Pearce MG, Kulkarni R, Lyn-Cook LE, Ding W. Genotoxicity of doxorubicin in F344 rats by combining the comet assay, flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, and pathway-focused gene expression profiling. Environ Mol Mutagen 2014;55(1):24-34.
58. Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary polyphenolic phytochemicals--promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. Int J Cancer 2007;120(3):451-8.
59. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. Epigenomics 2011;3(4):503-18.
60. Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. Mutat Res 1994;307(1):395-410.
61. Alves JM, Munari CC, de Azevedo Bentes Monteiro Neto M, Furtado RA, Senedese JM, Bastos JK, et al. In vivo protective effect of Copaifera langsdorffii hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. J Appl Toxicol 2013;33(8):854-60.
62. Santos GC, Almeida MR, Antunes L, Bianchi M. Effect of bixin on DNA damage and cell death induced by doxorubicin in HL60 cell line. Hum Exp Toxicol 2016;35(12):1319-27.
63. Tolentino F, Araújo PA, Marques Ede S, Petreanu M, Andrade SF, Niero R, et al. In vivo evaluation of the genetic toxicity of Rubus niveus Thunb. (Rosaceae) extract and initial screening of its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. J Ethnopharmacol 2015;164:89-95.
64. Francielli de Oliveira P, Furtado RA, Acésio NO, Leandro LF, Montanheiro G, de Pádua FC, et al. In vivo protective activity of Styrax camporum hydroalcoholic extract against genotoxicity induced by doxorubicin and methyl methanesulfonate in the micronucleus and comet assays. Planta Med 2012;78(18): 1899-905.
65. Boriollo MFG, Silva TA, Rodrigues-Netto MF, Silva JJ, Marques MB, Dias CTS, et al. Reduction of doxorubicin-induced genotoxicity by Handroanthus impetiginosus in mouse bone marrow revealed by micronucleus assay. Braz J Biol 2018;78(1):1-12.
66. Bokulić A, Garaj-Vrhovac V, Brajsa K, Ethurić K, Glojnarić I, Situm K. The effect of apigenin on cyclophosphamide and doxorubicin genotoxicity in vitro and in vivo. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2011;46(5):526-33.
67. Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Afrin S, Bompadre S, et al. Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. Food Chem Toxicol 2016;94: 128-37.
68. Yalçin E, Oruç E, Cavuşoğlu K, Yapar K. Protective role of grape seed extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity in albino mice. J Med Food 2010;13(4): 917-25.
69. Naga MA, El-Aziz MAA, Zeid SM, Daba MHY, El-Gamal NK. Amelioration of doxorubicin-induced genotoxicity in isolated cultured human lymphocytes by thymoquinone. App Sci Report 2013;4(2):210-8.
70. Rastegar H, Ahmadi Ashtiani H, Anjarani S, Bokaee S, Khaki A, Javadi L. The role of milk thistle extract in breast carcinoma cell line (MCF-7) apoptosis with doxorubicin. Acta Med Iran 2013;51(9):591-8.
71. Furtado RA, de Araújo FR, Resende FA, Cunha WR, Tavares DC. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. J Appl Toxicol 2010;30(3):254-9.