



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA ESCİNİN SİSPLATİN İLE OLUŞTURULMUŞ
NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Mehmet Ali YÖRÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Asım KART

BURDUR-2022

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA ESCİNİN SİSPLATİN İLE OLUŞTURULMUŞ
NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Mehmet Ali YÖRÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Asım KART

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0686-YL-21 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR 2022

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Mehmet Ali YÖRÜK tarafından *Prof. Dr. Asım KART* yönetiminde hazırlanan “*Ratlarda Escinin Sisplatin ile Oluşturulmuş Nefrotoksisite Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 28/04/2022

Prof. Dr. Asım KART
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Başkan

Prof. Dr. Fatma KOCASARI
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim
Dalı
Jüri

Doç. Dr. Oktay ÖZKAN
Niğde Ömer Halis Demir Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim
Dalı
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her konuda destek veren, yardım, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Asım KART'a, yine bu süreç boyunca bilgi ve destekleri ile fikir ve yön veren Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Firdevs MOR SAVAŞ, Prof. Dr. Fatma KOCASARI, Doç. Dr. Hidayet TUTUN, Dr. Öğr. Üyesi Murat BAYEZİT ve Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e, tezin yazımı süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Doç. Dr. Emre ARSLANBAŞ'a, uygulama ve analizlere katkılarından dolayı Öğr. Gör. Muhammet Mükerrer KAYA, Arş. Gör. Soner TUTUN, Esra ZEYBEK, Simge GARLI ve Melike USLUER'e, tezin yazımı süresince katkılarından dolayı başta ablam Arş. Gör. Mukaddes YÖRÜK ve arkadaşlarım Büşra İrem ŞİMŞEK, Arş. Gör. Deniz TEKİNER ve Ali Can ÖZCAN'a, hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince maddi manevi desteğini esirgemeyen, sevgi ve desteklerini karşılıksız sunan aileme teşekkürü borç bilirim.

ETİK BEYAN

“Ratlarda Escinin Sisplatin ile Oluşturulmuş Nefrotoksisite Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Asım KART danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Mehmet Ali YÖRÜK
28.04.2022

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Böbreğin yapı ve fizyolojisi	4
2.1.1. Nefron	4
2.1.2. Nefrotoksisite	5
2.2. Kanser	6
2.2.1. Kemoterapi	7
2.3. Sisplatin	7
2.3.1. Sisplatinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	8
2.3.2. Sisplatinin terapötik kullanımı ve uygulanması	9
2.3.3. Sisplatinin farmakokinetiği	11
2.3.4. Sisplatinin etki mekanizması	13
2.3.5. Sisplatin toksisitesi ve yan etkileri	17
2.3.6. Sisplatin nefrotoksitesisi	17
2.3.6.1. Sisplatin nefrotoksitesisinde mekanizmalar	18
2.3.6.2. Sisplatin nefrotoksitesisinin biyokimyası ve önlenmesi	19
2.4. Oksidatif stres	21
2.4.1. Serbest radikaller	23
2.4.2. Antioksidanlar	24
2.5. Triterpenler	25
2.6. Escin	26
2.6.1. Kaynakları	27
2.6.2. Fiziksel ve kimyasal özellikleri	28
2.6.3. Farmakokinetik özellikleri	30
2.6.4. Etki mekanizması	31
2.6.5. Biyoaktif ve farmakolojik etkileri	32
2.6.5.1. Antikanser etkisi	32
2.6.5.2. Antioksidan etkisi	33
2.6.5.3. Antiinflatuar etkisi	34
2.6.5.4. Antiviral etkisi	36
2.6.5.5. Diğer etkileri	36
2.6.6. Terapötik kullanım ve uygulanması	37
2.6.7. Toksisitesi	38
3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. Gereç	40
3.1.1. Hayvan materyali	40

3.1.2. Kimyasal maddeler	40
3.1.3. Cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	41
3.2. Deney grupları ve uygulamalar	42
3.3. Yöntem	43
3.3.1. Örneklerin alınması ve hazırlanması	43
3.3.2. Biyokimyasal analizler	43
3.3.3. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite tayini	44
3.3.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivite tayini	46
3.3.5. Malondialdehit (MDA) tayini	48
3.3.6. Histopatolojik yöntem	50
3.3.7. İmmunohistokimya	50
3.4. İstatistiksel analizler	52
4. BULGULAR	53
4.1. SOD, GPx aktivitesi ve MDA seviyeleri	53
4.1.1. Böbrek SOD, GPx aktivitesi ve MDA seviyeleri	53
4.1.2. Karaciğer SOD, GPx aktivitesi ve MDA seviyeleri	55
4.1.3. Beyin SOD, GPx aktivitesi ve MDA seviyeleri	58
4.2. Serum biyokimyasal analiz sonuçları	61
4.3. Histopatolojik bulgular	65
4.4. İmmunohistokimyasal bulgular	69
4.4.1. Kaspaz-3 immunohistokimyasal bulguları	69
4.4.2. İL-1 β immunohistokimyasal bulguları	74
4.4.3. iNOS immunohistokimyasal bulguları	79
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	111
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	128

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Nefronun yapısı.	5
Şekil 2.2. Normal hücre ile kanser hücresinin farkı.	6
Şekil 2.3. Sisplatinin kimyasal ve moleküler yapısı.	9
Şekil 2.4. Sisplatinin reaktif hale gelmesi.	12
Şekil 2.5. Sisplatinin DNA’da oluşturduğu çapraz bağlar.	14
Şekil 2.6. Sisplatinin DNA’da oluşturduğu eklentilerin şematik gösterimi.	16
Şekil 2.7. Başlıca serbest radikaller ve detoksifikasyon yolları.	23
Şekil 2.8. Antioksidanlar ve etkileri.	25
Şekil 2.9. Triterperlerin bazı etkilerinin şematik gösterimi.	26
Şekil 2.10. At kestanesi ağacı ve meyvesi.	28
Şekil 2.11. Escinin kimyasal yapısı.	29
Şekil 3.1. Süperoksit Dismutaz enzim aktivitesi standart grafiği.	45
Şekil 3.2. Glutasyon Peroksidaz enzim aktivitesi standart grafiği.	47
Şekil 3.3. Malondialdehit standart grafiği.	49
Şekil 4.1. Böbrek dokusu SOD seviyeleri.	53
Şekil 4.2. Böbrek dokusu GPx seviyeleri.	54
Şekil 4.3. Böbrek dokusu MDA seviyeleri.	55
Şekil 4.4. Karaciğer dokusu SOD seviyeleri.	56
Şekil 4.5. Karaciğer dokusu GPx seviyeleri.	57
Şekil 4.6. Karaciğer dokusu MDA seviyeleri.	58
Şekil 4.7. Beyin dokusu SOD seviyeleri.	59
Şekil 4.8. Beyin dokusu GPx seviyeleri.	60
Şekil 4.9. Beyin dokusu MDA seviyeleri.	61
Şekil 4.10. Serum (A) BUN ve (B) kreatinin seviyeleri.	62
Şekil 4.11. Serum (A) ALT, (B) AST ve (C) TB seviyeleri.	64
Şekil 4.12. Gruplara göre beyin kortekslerinin histopatolojik görünümü.	65
Şekil 4.13. Hipokampüslerin gruplar arasında mikroskobik görünümleri.	66
Şekil 4.14. Gruplara göre beyinciklerin histopatolojik görünümleri.	67
Şekil 4.15. Grupların böbreklerinin histopatolojik görünümü.	68
Şekil 4.16. Grupların karaciğerlerinin histopatolojik görünümü.	69
Şekil 4.17. Gruplara göre beyinlerde kaspaz-3 ekspresyonları.	70
Şekil 4.18. Hipokampüslerin gruplar arasında kaspaz-3 ekspresyonları.	71
Şekil 4.19. Beyinciklerin gruplar arası kaspaz-3 ekspresyonları.	72
Şekil 4.20. Böbrek kaspaz-3 ekspresyonlarının gruplara göre görünümü.	73
Şekil 4.21. Karaciğer kaspaz-3 ekspresyonlarının gruplara göre görünümü.	74
Şekil 4.22. Gruplara göre beyinlerde İL-1 β ekspresyonlarının görünümü.	75
Şekil 4.23. Hipokampüslerin İL-1 β ekspresyonlarının gruplara göre görünümü.	76
Şekil 4.24. Beyincik İL-1 β ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümü.	77
Şekil 4.25. Böbrek İL-1 β ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümü.	78
Şekil 4.26. Karaciğerlerde İL-1 β ekspresyonlarının gruplara göre görünümü.	79
Şekil 4.27. Beyinde iNOS ekspresyonlarının gruplara göre görünümü.	80
Şekil 4.28. Hipokampüslerin iNOS ekspresyonlarının gruplara göre görünümü.	81
Şekil 4.29. Gruplar arasında beyinciklerin iNOS ekspresyonlarının görünümü.	82
Şekil 4.30. Gruplara göre böbreklerde iNOS ekspresyonlarının görünümü.	83
Şekil 4.31. Karaciğer iNOS ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümleri.	84

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Sisplatin kombinasyonları ve etkilediği kanser türleri.	11
Tablo 2.2. Sisplatinin DNA’da oluşturduğu eklentiler.	16
Tablo 2.3. Oksidatif stres belirteçleri ve köken aldıkları süreçler.	22
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.	41
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri.	42
Tablo 3.3. Deney grupları.	43
Tablo 3.4. SOD enzim tayini için yapılan işlemler.	45
Tablo 3.5. GPx enzim tayini için yapılan işlemler.	47
Tablo 3.6. MDA kontrasyonu ölçümünde yapılan işlemler.	49
Tablo 4.1. Deney gruplarının böbrek SOD, GPx ve MDA seviyeleri.	55
Tablo 4.2. Deney gruplarının karaciğer SOD, GPx ve MDA seviyeleri.	58
Tablo 4.3. Deney gruplarının beyin SOD, GPx ve MDA seviyeleri.	61
Tablo 4.4. Deney gruplarının serum BUN ve kreatinin seviyeleri.	62
Tablo 4.5. Deney gruplarının serum TB, ALT ve AST seviyeleri.	64
Tablo 4.6. İmmunohistokimyasal ekspresyon skorları.	85

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
5-HT	5-Hidroksitriptamin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Akt	Serin-treonin kinaz
AP-1	Aktive edici protein-1
ATP	Adenozin trifosfat
BAX	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	B-hücre lenfoma 2
BUN	Kan üre nitrojen
c.a.	Canlı ağırlık
Ca ²⁺	Kalsiyum
CAT	Katalaz
cm ³	Santimetreküp
C _{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidine
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent tahlil
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HE	Hematoksilen-eozin
HSV-1	Herpes simpleks virüsü
ICAM-1	Hücre içi adhezyon molekülü-1
IKK	IκB kinaz
i.p.	İntraperitoneal
i.v.	İntravenöz
İL	İnterleukin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentataz
JAK	Janus kinaz
kg	Kilogram
L	Litre
LD	Letal doz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoproteinler
log <i>K_{ow}</i>	Oktan-ol-su ayrıştırma katsayısı
LPO	Lipid peroksidasyonu
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojenle aktiveleşen protein kinaz
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
MPO	Miyeloperoksidaz

MPTP/p	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin/probenesid
NF-κB	Nükleer faktör κB
ng	Nanogram
NO	Nitrik oksit
O₂	Oksijen
OH	Hidroksil
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PBS	Fosfat buffer solüsyonu
PG	Prostaglandin
pH	Potansiyel hidrojen
PI3K	Fosfoinositid-3 kinaz
RNA	Ribonükleik asid
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RSV	Respiratuar sinsityal virüsü
SARS-CoV	Şiddetli akut solunum yolu sendromu korona virüsü
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT3	Transkripsiyon 3'ün sinyal dönüştürücü ve aktivatörü
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
TGF-β1	Dönüştürücü büyüme faktörü-β1
TLR-4	Toll benzeri reseptör 4
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VSV	Veziküler stomatitis virüsü

ÖZET

Ratlarda Escinin Sisplatin ile Oluşturulmuş Nefrotoksisite Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Sisplatin, beşerî ve veteriner hekimlikte kullanılan en etkili antineoplastik ilaçlardan birisidir. Sisplatin, kanser kemoterapisinde önemli bir ilaç olmasına rağmen, klinik kullanımını nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisite gibi yan etkiler sebebi ile sınırlandırılmaktadır. Escin, at kestanesi bitkisinden elde edilen antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser etkileri bulunan bir triterpenoiddir. Çalışmamızda başlıca nefrotoksisite olmak üzere sisplatin toksisitesine karşı escinin koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında 40 adet Wistar albino ırkı rat her grupta 10 adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Gruplar kontrol, sisplatin, escin ve escin+sisplatin şeklinde oluşturuldu. Kontrol grubuna 6 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) salın uygulaması yapıldı. Sisplatin grubuna çalışmanın 4. gününde tek doz 7,5 mg/kg i.p. sisplatin uygulaması yapıldı. Escin grubuna 6 gün boyunca 3,6 mg/kg escin uygulandı. Escin+sisplatin grubuna 6 gün süreyle 3,6 mg/kg escin intraperitoneal olarak ve escin uygulamasının 4. gününde tek doz 7,5 mg/kg sisplatin uygulandı. Çalışma bitiminde ratlardan alınan serum örneklerinde üre, kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve total bilirubin (TB) düzeyleri incelendi. Ayrıca böbrek, karaciğer ve beyin dokularındaki süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri tespit edildi. Böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampus dokuları hematoksilen-eosin boyama ile histopatolojik olarak, interleukin-1 β (İL-1 β), indüklenebilir nitrik oksit sentataz (iNOS) ve kaspaz-3 yönünden immunohistokimyasal olarak incelendi. Çalışma sonucunda sisplatinin üre, kreatinin, AST, ALT ve TB seviyelerini yükselttiği, bu yükselişe MDA'nın eşlik ettiği tespit edilmiştir. Escin ile birlikte sisplatin uygulanmasının sisplatine benzer şekilde üre, kreatinin, AST, ALT ve TB seviyelerini yükselttiği bu duruma MDA'nın eşlik ettiği AST ve ALT seviyelerinde sisplatin uygulanan gruptan daha fazla yükselişe sebep olduğu gözlemlendi. Ancak, SOD ve GPx seviyeleri escin+sisplatin uygulanan grupta sisplatinin tek başına uygulandığı gruba göre daha yüksek düzeylerde tespit edildi. Histopatolojik bulgulara gözlenen organ hasarı, serum biyokimyasal parametreler ve MDA seviyesine uyumlu şekilde, sisplatinle birlikte escin kullanımının belirtilen dokularda sadece sisplatin kullanımından daha fazla hasara sebep olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, İL-1 β , iNOS ve kaspaz-3 immunoreaktivite sisplatin uygulaması ile birlikte artmış, sisplatinle birlikte escin uygulaması sadece sisplatin uygulamasından daha şiddetli immunoreaktiviteye sebep olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, escin uygulamasının sisplatinin sebep olduğu başlıca nefrotoksisite olmak üzere hepatotoksisite ve nörotoksititeyi artırdığı bunun sebebinin de kaspaza bağlı apoptoz ve inflamasyon olduğu gözlenmiştir. Escinin sisplatinle birlikte kullanıldığına sitokin seviyelerini artırdığı buna bağlı olarak iNOS salınımını ve apoptozu teşvik ettiği bu yol üzerinden de koruyucu etki değil sinerjistik toksisite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Escin, Hepatotoksisite, Nefrotoksisite, Nörotoksisite, Sisplatin

ABSTRACT

Research of the Protective Effect of Escin on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats

Cisplatin is one of the most effective antineoplastic drugs used in human and veterinary medicine. Although cisplatin is an important drug in cancer chemotherapy, its side effects such as nephrotoxicity, hepatotoxicity and neurotoxicity limit the use of cisplatin. Escin is a triterpenoid which is obtained from the horse chestnut plant and have antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effect. In our study, it was aimed to examine the protective effect of escin against cisplatin toxicity, mainly nephrotoxicity. Within the scope of the study, 40 Wistar albino rats were divided into 4 groups, 10 in each group. The groups were divided into 4 groups as control, cisplatin, escin, and escin+cisplatin. Intraperitoneal (i.p.) saline administration was applied to the control group for 6 days. A single dose of 7,5 mg/kg cisplatin was administered intraperitoneally to the cisplatin group on the 4th day. Escin group was administered 3,6 mg/kg of escin for 6 days. Escin+cisplatin group was intraperitoneally administered 3,6 mg/kg escin for 6 days and on the 4th day of escin administration, a single dose of 7,5 mg/kg cisplatin. At the end of the study, urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (TB) levels were analyzed in serum samples taken from the rats. Moreover, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) levels were determined spectrophotometrically in kidney, liver and brain tissues. Kidney, liver, brain, cerebellum and hippocampus tissues were examined histopathologically by hematoxylin-eosin staining as well as immunohistochemically for interleukin-1 β (IL-1 β), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and caspase-3 expression. As a result of the study, it was determined that cisplatin increased urea, creatinine, AST, ALT and TB levels, and this increase was accompanied by MDA. It has been observed that the administration of cisplatin with escin increased urea, creatinine, AST, ALT and TB levels similar to cisplatin, this situation accompanied by MDA and even caused a higher increase in AST and ALT levels than the cisplatin administered group. However, SOD and GPx levels were found to be higher in the escin+cisplatin administered group than in the cisplatin administered group alone. Consistent with the organ damage observed in the histopathological findings, serum biochemical parameters and MDA level, the use of escin and cisplatin caused more damage to the specified tissues than the use of cisplatin alone. Similarly, IL-1 β , iNOS, and caspase-3 immunoreactivity increased with cisplatin administration, and escin administration with cisplatin caused more immunoreactivity than cisplatin alone. As a result, it was observed that escin administration increased hepatotoxicity and neurotoxicity, mainly nephrotoxicity caused by cisplatin, and the reason for this was apoptosis and inflammation related to caspase. It was concluded that when escine is used together with cisplatin, it increases cytokine levels, and accordingly, it promotes iNOS release and apoptosis, and it has synergistic toxicity rather than a protective effect through this pathway.

Keywords: Cisplatin, Escin, Hepatotoxicity, Nephrotoxicity, Neurotoxicity

1. GİRİŞ

Böbrek, metabolik atıkların vücuttan uzaklaştırılmasında fonksiyon gören bir boşaltım organıdır. Böbreklerde meydana gelen bozulmalara bağlı olarak çok sayıda hastalık gözlenebilmekte, hayatı tehdit eden semptomlar oluşabilmektedir (Hildebrandt, 2010; Ong ve ark., 2015; Xu ve ark., 2018). Böbrek fonksiyonlarındaki büyük bozukluklar sonucunda ise ölüm meydana gelmektedir (Bucaloiu ve ark., 2012).

Böbrekler yüksek perfüzyon hızına sahip olması, tübül lümeninde birçok maddeyi konsantre etmeleri ve metabolizma hızlarının yüksek olması gibi sebepler nedeniyle ilaçlar, toksinler vb. birçok maddeye karşı oldukça hassastır (Finco, 1997; James ve ark., 2004). Dünya’da 2010 yılı verilerine göre 2,6 milyon kişi böbrek nakli tedavisi ya da diyaliz ile yaşamını sürdürmektedir. Bu sayının tedaviye erişemeyenlerle birlikte çok daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Dünya’da 2030 yılında ise renal replasman tedavisi alan kişi sayısının 5,5 milyona ulaşacağı tedavi maliyetinin 2 trilyon doları bulacağı tahmin edilmektedir (Anonim, 2014; Liyanage ve ark., 2015). Türkiye’de benzer şekilde böbrek hastalıkları sebebiyle tedavi gören kişi sayısı her geçen gün artmaktadır. 2015 verilerine göre Türkiye’de renal replasman tedavisi alan kişi sayısı 73660 olarak saptanmıştır. Bu durumun sebepleri arasında nefrotoksik ilaç kullanımı, böbrek hastalığı için en yüksek risk faktörleri arasındadır (Seyahi ve ark., 2018). Kanser ilaçlarının büyük bir kısmının sitotoksik etkilerinin yüksek olmasına bağlı olarak özellikle karaciğer ve böbrekler üzerinde öncelikli toksik etki oluşturduğu bilinmektedir (Bazmandegan ve ark., 2019; Taghizadeh ve ark., 2021).

Kanser hücrelerin normalden farklı olarak, kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü, çoğaldığı ve vücudun farklı bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır (Ghosh, 2019). Günümüzde kanser en sık gözlenen ölüm nedenlerinden biri olmuştur ve en tehlikeli hastalıklar arasındadır (Anonim, 2021; Weinberg, 1996). Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi işlemler kullanılabilir (Loos ve ark., 2008; Nygren, 2001; Schaeve ve McBride, 2015). Kemoterapi, bir veya birden fazla alkilleyici ya da kemoterapötik maddenin birlikte kullanıldığı etkili bir kanser tedavi yöntemidir (Ghosh, 2019).

Sisplatin kanser tedavisinde kullanılan etkili bir kemoterapötik ajandır. Keşfi 1960'lı yılları bulan sisplatin, günümüzde halen hem beşerî hekimlik hem de veteriner hekimlikte aktif bir şekilde kullanım alanı bulmaktadır (Barabas ve ark., 2008; Dasari ve Tchounwou, 2014). Dünya genelinde kanser hastalarının ortalama yarısı kanser tedavisi sırasında sisplatin tedavisi almaktadır (Ghosh, 2019).

Sisplatin tedavisi her ne kadar sık bir şekilde kullanılıyor olsa da sisplatinin ciddi toksik ve yan etkileri bulunmaktadır (Goodsell, 2006). Sisplatin toksik etkilerinden bazıları nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisitedir (Barabas ve ark., 2008; Chabner ve Longo, 2019; Prestayko, 2013; Schurig ve ark., 1980). Nefrotoksisite sisplatin kullanımında en önemli doz sınırlayıcı etkindir (Choie ve ark., 1980). Yapılan klinik çalışmalara göre 50 mg/m²'lik düşük doz sisplatin uygulamasının hastaların üçte birinde nefrotoksisite oluşturduğu belirtilmektedir (Weiss ve Poster, 1982).

Sisplatin nefrotoksisitesinin engellenmesinde hidrasyon ve diüretik tedavisi, şelat oluşturuca ajan kullanımı gibi çeşitli yöntemler denenmiş ancak etkili bir sonuç alınamamıştır (Ghosh, 2019; Weiss ve Poster, 1982). Sisplatin toksisitesinin önlenmesi için sadece amifostin isimli madde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nden onay almıştır. Ancak, amifostin antitümör etkiyi azaltması ve yan etki göstermesi sebebiyle tam bir tedavi seçeneği sunamamıştır (Manohar ve Leung, 2018).

Günümüzde sisplatin nefrotoksisitesinin önlenmesinde bitkisel ilaçların kullanımına ilgi artmıştır (Afsar ve ark., 2021; Avarave ve ark., 2021; Iqbal ve ark., 2022). Triterpenler bitkilerin başlıca kök ve meyvelerine dağılmış tıp ve tarım gibi çeşitli endüstrilerde kullanım alanı bulan maddelerdir (Ladhari ve Chappell, 2019). Triterpen içeren ve at kestanesi ekstraktında bulunan escin maddesi farmakolojik ve biyoaktif özelliklerinden dolayı son yıllarda araştırma konusu olmuştur (Qiao ve ark., 2022; Raafat ve ark., 2022; Zhao ve ark., 2022). Escin, at kestanesi olarak bilinen *Aesculus hippocastanum* bitkisinin ana aktif bileşeni olan triterpenlerin bir karışımıdır (Wu ve ark., 2012). Escin başlıca antioksidan, antiödem, antiinflamatuvar etkileri ile triterpenler içinde öne çıkmaktadır (Gallelli, 2019; Selvakumar ve ark., 2015; Zhao ve

ark., 2018). Tüm bu etkilerinin yanında escinin antikanser etkisinin de bulunması escini değerli kılmaktadır (Idris ve ark., 2020).

nceki çalışmalarda çeşitli antioksidan maddelerin, sisplatinin oluşturduğu toksik etkilere karşı etkinliği incelenmiştir (Abdel Moneim ve ark., 2014; Kart ve ark., 2010; Yousef ve ark., 2009). Bu maddelerden başarılı sonuçlar alınmış olsa da hem güçlü antikanser etkinlik gösteren hem de antioksidan etkisi ile çeşitli dokularda koruyucu etkisi kanıtlanmış olan escinin nefrotoksisite üzerine etkinliğinin incelenmesinin, kansere yönelik ileri çalışmalara ışık tutması ve oksidatif stres kaynaklı çeşitli böbrek hasarı durumlarında kullanılabilecek potansiyel bir ilaç n maddesi olarak düşünülmesi açısından önemli olabileceği n grlmştir. Bu alışma kapsamında, kansere yönelik etkinliği ve nefrotoksisite oluşturma yeteneği kanıtlanmış olan sisplatine karşı, escinin biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal parametreler incelenerek böbrek üzerinde koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Yapı ve Fizyolojisi

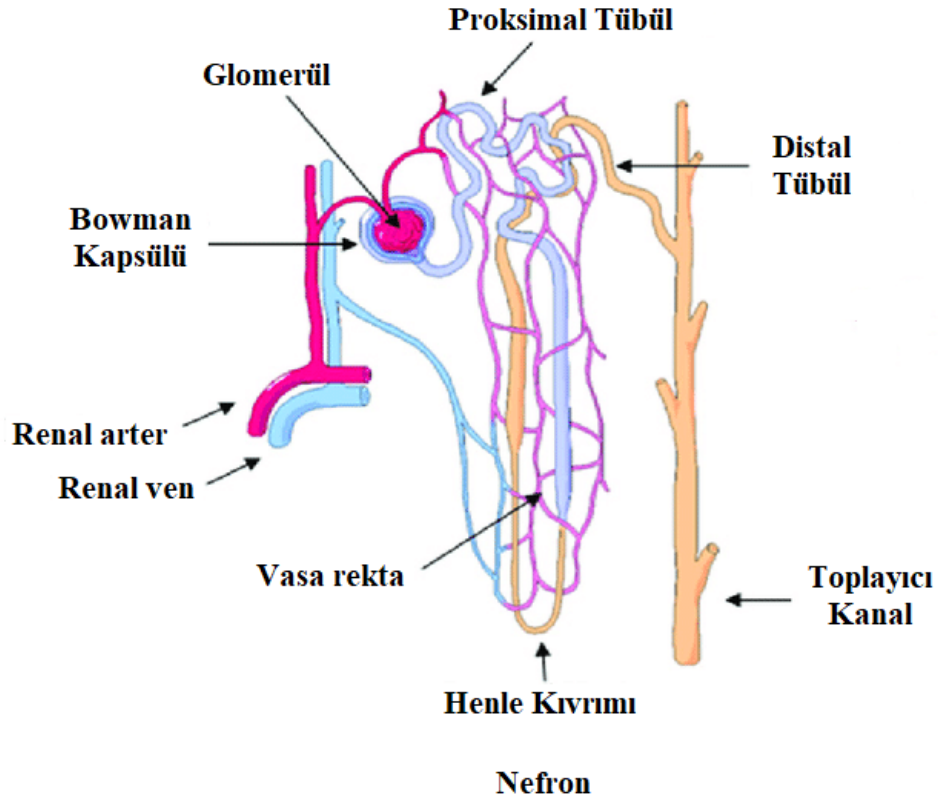
Böbrekler, columna vertebralisin her iki tarafında üst üç lumber vertebra ile aynı seviyede 12. torasik vertebra hizasında karın bölgesinin arka tarafında bulunan bir çift organdır (Mahadevan, 2019). Yetişkin böbreği 5-7 cm genişliğinde, 2,5-3 cm kalınlığında ve 14 cm uzunluğundadır. Sol böbrek sağ böbrekten 1-2 cm daha yüksek seviyede bulunur. Ayrıca sağ böbrek sol böbrekten daha kısa ve dardır (El-Galley ve Keane, 2000).

Renal parankim korteks ve medulladan oluşmaktadır. Medulla kısmında inen ve çıkan Henle halkaları ve renal piramitler bulunur. Renal korteks, piramitlerin tabanları ile renal kapsül arasında kalan kısımdır ve Bertin sütunlarını içerir (El-Galley ve Keane, 2000).

Böbrekler dakikada 1 litreden fazla kan alır. Her böbrek abdominal aorttan ayrılan renal arterler tarafından beslenir. Renal arterler böbreğe yaklaştığında dört segmental dala ayrılır. Renal segmentlerden gelen damarlar renal hilusta birleşerek renal veni oluşturur ve vena cava inferiora açılır. Böbrekte renal kalikslerin birleşmesi sonucu renal pelvis oluşur (Mahadevan, 2019). Böbreğin loblardan oluşan bir yapısı vardır. Her bir renal lob renal tüpler ve nefronlardan oluşur (Wallace, 1998).

2.1.1. Nefron

Böbreğin temel çalışma birimleri nefronlardır. Nefron, renal Bowman kapsülü, proksimal tübül, Henle kulpu ve distal tübülden oluşur. Bir böbrekte yaklaşık 1,2 milyon nefron bulunmaktadır (Wallace, 1998). Nefronun yapısı **Şekil 2.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Nefronun yapısı (Missoum, 2019).

Böbreğin birçok fonksiyonu nefron aktivitelerinin toplamı olarak gerçekleşmektedir. Süzölmek için gelen materyal bir afferent arteriyol tarafından sağlanırken dolaşıma geri dönecek materyal ise efferent arteriyol tarafından toplanmaktadır. Glomerüler kılcal damarların basınçlı kana maruziyeti filtratın kılcal duvarlardan Bowman boşluğuna geçişine neden olur. Daha sonra filtrat, nefronlardaki tübüler sistemden geçer ve bileşimi değişir. Bu geçiş sırasında tübüler hücreler tarafından lümen içeriğinin bir kısmı yeniden emilir. Atılacak materyal ise tübül lümenine taşınır (Finco, 1997).

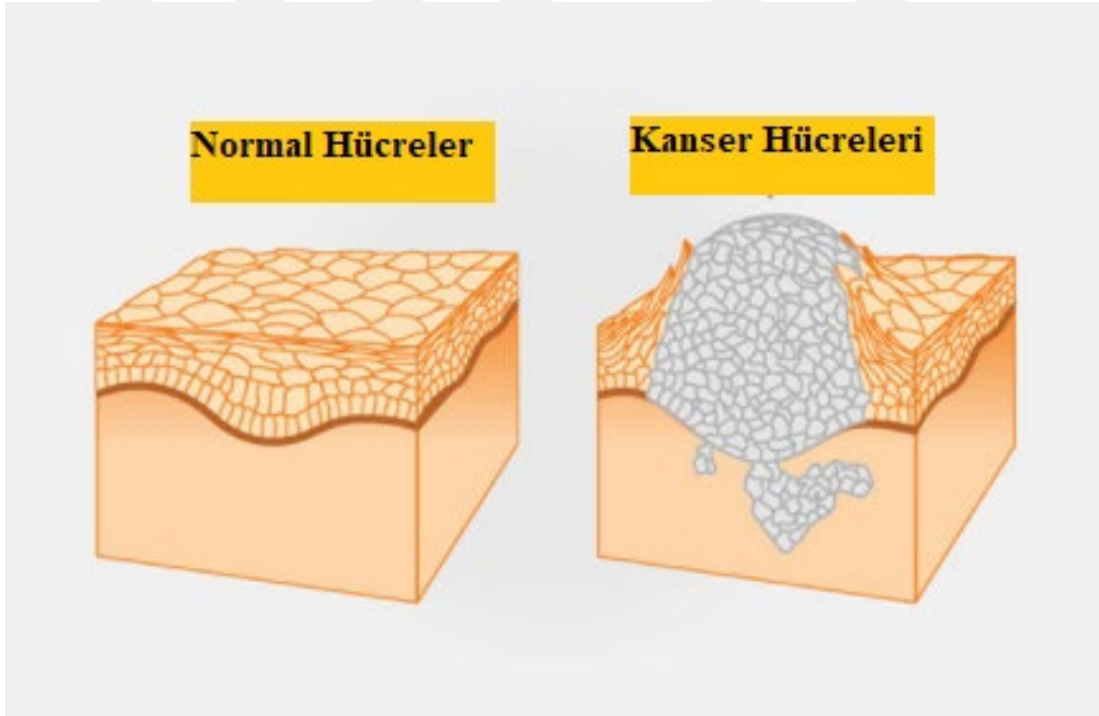
2.1.2. Nefrotoksisite

Böbrekler, zararlı maddelerin etkilerine karşı çok hassastır. Bu durumun sebepleri arasında böbreklerin yüksek perfüzyon hızına sahip olması, tübül lümeninde birçok maddeyi konsantre etmeleri ve metabolizma hızlarının yüksek olması sayılabilir. Birçok materyal böbrekler için nefrotoksiktir. Bu materyaller arasında ilaçlar, ağır

metaller, organik kimyasallar, hemoglobin, miyoglobin ve yılan zehiri olabilmekte, nefrotoksisite olguları rapor edilmektedir (Finco, 1997; James ve ark., 2004). Türkiye’de ve Dünya’da böbrek hastalığı olan kişi sayısı her geçen gün artmaktadır ve nefrotoksik ilaç kullanımı, böbrek hastalığı için en yüksek risk faktörleri arasındadır (Anonim, 2014; Liyanage ve ark., 2015; Seyahi ve ark., 2018). Kanser ilaçları sitotoksik etkileri sebebiyle nefrotoksisite oluşturmaktadır. Bu durum kanser tedavisinde büyük problemlere sebep olmakta ve kanser ilaçlarının dozunu sınırlamaktadır (Bazmandegan ve ark., 2019; Choie ve ark., 1980).

2.2. Kanser

Kanser, hücrelerin normalden farklı olarak, kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü, çoğaldığı ve vücudun farklı bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır (Ghosh, 2019). Günümüzde kanser en sık gözlenen ölüm nedenlerinden biri olmuştur ve en tehlikeli hastalıklar arasındadır (Anonim, 2021; Weinberg, 1996). **Şekil 2.2**’de normal hücre ile kanser hücresinin farkı gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Normal hücre ile kanser hücresinin farkı (Anonim, 2021).

Kanserin birçok farklı sebebi olabilmektedir. Bunlar arasında serbest oksijen radikalleri, virüsler, güneş ışığı, tütün, ilaçlar, hormonlar, alkol, parazitler, mantarlar ve bakteriler en sık gözlenenlerinden bir kaçıdır (Blackadar, 2016; Hussain ve ark., 2003). Kanser tedavisi ise başlıca kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleleri içeren oldukça zorlayıcı bir süreçtir (Loos ve ark., 2008; Nygren, 2001; Schaeve ve McBride, 2015).

2.2.1. Kemoterapi

Kemoterapi, bir veya birden fazla alkilleyici ya da kemoterapötik maddenin birlikte kullanıldığı etkili bir kanser tedavi yöntemidir (Ghosh, 2019). Antifolat ilaçların kullanımı 1940'lı yıllarda nitrojen hardalının ilaç olarak kullanımı ile başlamıştır. Zaman içinde çok çeşitli kanser ilaçları çıkmış ve bunların diğer tedavi yöntemleri ile veya birbirleriyle kombinasyonları ilgi çekmiştir (Chabner ve Roberts, 2005). Sisplatinin diğer kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanımı, kemoterapiyle birlikte radyoterapi uygulamaları, kemoterapiyle birlikte cerrahi müdahale uygulamaları bu kombinasyonlar arasındadır (Chabner ve Longo, 2019).

2.3. Sisplatin

Sisplatin, platin içeren ilk metal bazlı kemoterapötik maddelerden bir tanesidir. (Aldossary, 2019; Ghosh, 2019). İlk kez 1844 yılında Michele Peyrone tarafından sentezlenen sisplatin, 1893 yılında Alfred Werner tarafından aydınlatılmış ancak bilimsel araştırmalarda kullanımı 1960'lı yılları bulmuştur (Dasari ve Tchounwou, 2014; Kauffman ve ark., 2010; Rosenberg ve ark., 1965).

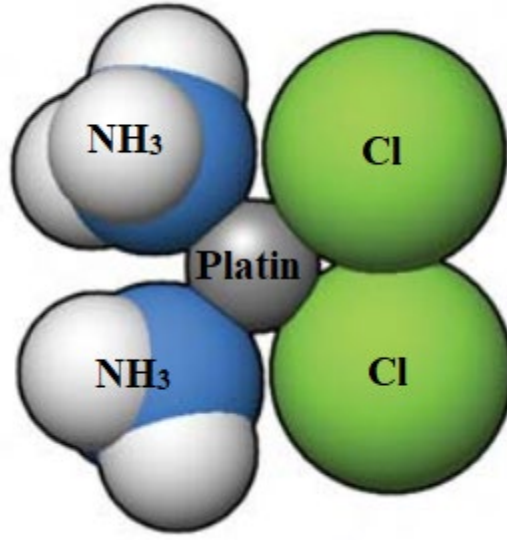
Sisplatinin 1965 yılında Michigan State Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada *Escherichia coli*'de hücre bölünmesini engellediği tespit edilmiştir (Dasari ve Tchounwou, 2014; Rosenberg ve ark., 1965). Buna bağlı olarak ise platin elektroliz ürünlerinin antineoplastik kullanımına ilgi oluşmuştur. Oluşan etkinin cis-diklorodiaminplatin (II) (sisplatin)'den ileri geldiğinin tespit edilmesiyle birlikte kanser tedavisinde platin ve paladyum gibi soy metallerin kullanımına ilgi artmıştır (Dasari ve Tchounwou, 2014). Sonraki 15 yıl içinde ise testis kanseri için FDA tarafından onaylanmıştır (Chabner ve Longo, 2019).

Sisplatin tek başına veya çeşitli antineoplastik ajanlar ile birlikte akciğer, testis, baş, boyun ve mesane gibi çeşitli kanser türlerinde kullanılmaktadır (Aldossary, 2019; Heinemann ve ark., 2006; Schaake-Koning ve ark., 1992). Ancak, sisplatinle tedavi edilen kanser türlerinde ilaç direnci oluşabilmekte ve sisplatinin önemli yan etkileri olabilmektedir (Aldossary, 2019).

2.3.1. Sisplatinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Sisplatin iki değerli inorganik bir komplekstir (Chabner ve Longo, 2019). Kimyasal adı ile cis-diaminodikloroplatin olarak da bilinen sisplatin kare düzlemsel şekle sahiptir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Sisplatin yapısında 2 amin ve 2 klorür bulundurmaktadır. Sisplatinin yapısındaki klorürlerin farmakolojik etkinlik için yan yana olması gerekir, karşılıklı olduğu takdirde etkinliği bulunmamaktadır (Dasari ve Tchounwou, 2014; Goodsell, 2006). Sisplatinin yapısındaki aminler taşıyıcı ligand, klorürler ise ayrılan grup olarak isimlendirilmektedir ve sisplatin analogları ayrılan gruplardaki farklılıklara göre oluşmaktadır (Chabner ve Longo, 2019). Sisplatinin kimyasal ve moleküler yapısı Şekil 2.3’de gösterilmiştir.

Sisplatin, dimetilprimanid veya N,N-dimetilformamid içerisinde çözünebilmektedir. Oda sıcaklığında koyu sarıdan sarı-turuncuya değişen renklerde veya beyaz renktedir. Normal basınç ve sıcaklık altında stabildir, trans izomerlere dönüşümü yavaştır. Metal bir platin bileşiği olan sisplatinin molekül ağırlığı 301.1 g/mol, erime noktası 270 °C, yoğunluğu 3.74 g/cm³, suda çözünürlüğü 25 °C’de 2.53 g/L, oktanol-su ayrıştırma katsayısı, log K_{ow} -2.19’dur (Dasari ve Tchounwou, 2014).



Şekil 2.3. Sisplatinin kimyasal ve moleküler yapısı (Goodsell, 2006).

2.3.2. Sisplatinin Terapötik Kullanımı ve Uygulanması

Sisplatin hem beşerî hekimlikte hem veteriner hekimlikte aktif bir şekilde kullanım alanı bulmaktadır (Barabas ve ark., 2008). Çağımızın en büyük sorunlarından biri olan kanser hastalığının tedavisinde sisplatin günümüzde önemli bir antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır (Dasari ve Tchounwou, 2014). Dünya genelinde yaklaşık 2 milyar Amerika Birleşik Devletleri (ABD) doları tutarında platin bazlı antikanser ilaçları satılmaktadır ve hastaların ortalama yarısı sisplatin ile tedavi görmektedir (Ghosh, 2019). Antikanser ilaç olarak diğer metal ve platin içeren bileşiklerin keşfedilmesinde öncüdür ve FDA onaylı ilk platin bileşiğidir (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Sisplatin pediatrik nöroblastom, beyin tümörleri, germ hücreli tümörler, osteosarkom ve hepatoblastom tedavisinde en etkili antineoplastik ajanlardan birisidir (Chabner ve Longo, 2019). Sisplatin, baş ve boyundaki tümörler, sarkomlar, kemik, kas ve kan damarı kanserleri, mesane, akciğer ve rahim ağzı kanseri, melanom başlıca olmak üzere çeşitli tümörlerde ve kanser türlerinde etkinlik göstermektedir ve etkisi klinik olarak kanıtlanmıştır (Dasari ve Tchounwou, 2014; Ghosh, 2019).

Sisplatinin kanserde tek başına kullanımı nadirdir (Chabner ve Longo, 2019). İlaç direnci ve yan etkiler sebebiyle sisplatinin diğer kemoterapötiklerle kombine kullanımı yeni terapötik stratejiler olarak kabul edilmektedir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Ancak, ne kadar kombine kullanımı ilgi çekici olsa da atılım mekanizması renal eliminasyona bağlı olan ilaçlarla birlikte kullanımına dikkat edilmeli, doz ayarlamasının çok iyi yapılması gerekmektedir. Sisplatin ve pemetreksed kombine kullanımı mezotelyoma tedavisi için onaylanmıştır (Chabner ve Longo, 2019). Bazı sisplatin kombinasyonlarının çeşitli kanserlerde kullanımı **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir (Ghosh, 2019).

Sisplatin kullanımı radyoterapi ile sinerjizma göstermektedir. Sisplatinin boyun kanseri ve serviks kanserinde radyoterapi ile birlikte kullanımı sadece radyoterapi uygulanmasından daha iyi sonuçlar vermiştir. Sisplatin, florourasil ve radyasyon kombinasyonu baş, boyun, mesane, endometriyal ve rahim ağzı kanserinde sinerjizma göstermektedir (Chabner ve Longo, 2019).

Sisplatin klorür içermeyen solüsyonlarda daha toksik olabileceği için genellikle salin ile seyreltilerek uygulanır. Bunun sebebi bileşiğin stabil olmamasından kaynaklı nötr yapısının bozulmasıdır (Loehrer ve Einhorn, 1984). İntraarteriyel sisplatin uygulamalarında intravenöz (i.v.) uygulamaya kıyasla lokal tümör sisplatin konsantrasyonlarında 2-3 kat artış olmaktadır. Kusma durumunda verilen dozda kayıp olacağı için oral yolla sisplatin uygulanmasında kusma durumuna dikkat edilmelidir (Chabner ve Longo, 2019). Sıklıkla her 3-4 haftada bir kez olacak şekilde i.v. uygulamaları tercih edilir. İntraperitoneal (i.p.) uygulamalarında serum seviyeleri i.v. uygulamaya kıyasla daha düşük gözlenmektedir (Loehrer ve Einhorn, 1984).

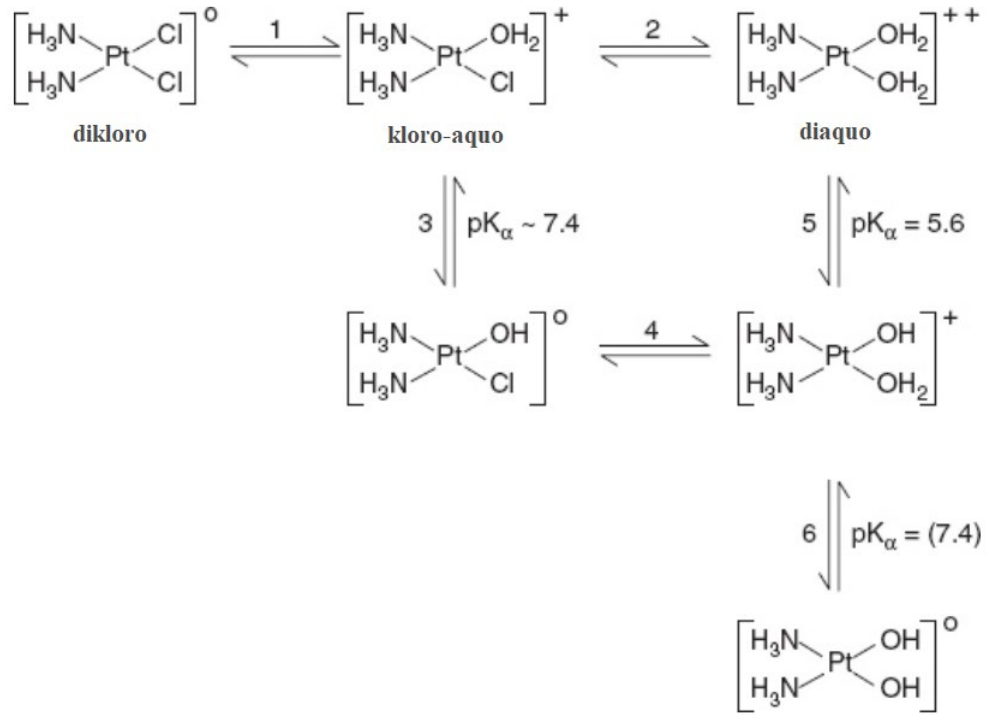
Tek bir doz şeklinde veya bölünmüş dozlar halinde sisplatin uygulamaları mevcuttur. Doz genellikle 50-120 mg/m² aralığında tercih edilir. Genellikle dozunun yükseltilmesi etkisini artırmaktadır ancak doz artışı beraberinde toksik etkilerde artış da getirmektedir (Loehrer ve Einhorn, 1984).

Tablo 2.1. Sisplatin kombinasyonları ve etkilediği kanser türleri (Ghosh, 2019).

Sıra No	Kombinasyon	Etkilediği Kanser Türü
1	Sisplatin+UFT (tegafur+urasil kombinasyonu)	Akciğer kanseri
2	Sisplatin+Doksorubisin	Pleural mezotelyoma
3	Sisplatin+Siklofosfamid+Doksorubisin	Tükürük bezi karsinomu
4	Sisplatin+Gemsitabin	Safra kanseri
5	Sisplatin+Bal arısı zehiri	Yumurtalık kanseri
6	Sisplatin+Osthole	Akciğer kanseri
7	Sisplatin+Bleomisin+Metotreksat	Skumöz hücreli karsinom
8	Sisplatin+Anvirzel	Melanom, Akciğer kanseri
9	Sisplatin+Everolimus	Mesane kanseri
10	Sisplatin+Doksorubisin+Florourasil+siklofosfamid	Tükürük bezi karsinomu
11	Sisplatin+Oksaliplatin+Quercetin+Timokinon	Yumurtalık kanseri
12	Sisplatin+Tetraarsenik oksit	Rahim ağzı kanseri
13	Sisplatin+Vindesine	Akciğer kanseri
14	Sisplatin+Paklitaksel	Meme kanseri

2.3.3. Sisplatinin Farmakokinetiği

Sisplatin kimyasal halinin basitliği sebebiyle hücre zarlarını kolaylıkla geçebilmektedir. Uygun pH (7,4) koşulları oluştuğunda sisplatin klorür iyonlarını bırakır. Klorür iyonlarının yerine hidroksil (OH) molekülleri bağlanır ve bu şekilde sisplatinin basit difüzyon ile hücreye geçişi gerçekleşir. Basit difüzyondan farklı olarak sisplatin adenosin trifosfat (ATP)'ase taşıyıcıları 7A ve 7B, bakır taşıyıcı 1, organik katyon taşıyıcı 1, 2 ve 3 gibi membran taşıma proteinleri ile de hücreye girebilmekte ve çıkabilmektedir (Chabner ve Longo, 2019). Tümör hücrelerine sisplatin taşınması ise pasif difüzyonla gerçekleşmektedir (Ghosh, 2019). Sisplatin hücreye girdikten sonra aktif taşıma proteinleri tarafından hücreden atılabilmekte, ribonükleik asit (RNA) ve deoksiribonükleik asit (DNA) ile spesifik olmayan bir şekilde reaksiyona girebilmekte ya da klorür gruplarındaki değişimle reaktif hale gelebilmektedir. Sisplatinin reaktif hale gelmesi **Şekil 2.4'**de gösterilmiştir. Reaktif hale gelen sisplatin ise glutatyon (GSH), sülfhidril gruplar veya proteinler üzerinde metionin veya sistein ile kovalent bağlarla bağlanmaktadır (Chabner ve Longo, 2019).



Şekil 2.4. Sisplatinin reaktif hale gelmesi. 3. ve 6. reaksiyonlar fizyolojik pH'da gerçekleşmektedir ve bu reaksiyonlar sonucunda vücut zarlarını kolayca geçen nötr yapılar elde edilir (Chabner ve Longo, 2019).

Uygulama sonrası sisplatin ilk bir saatte böbrek, karaciğer, kas ve deride birikim gösterme eğilimindedir. Ancak sisplatinin tüm dokulara dağılım gösterdiği bilinmektedir (Barabas ve ark., 2008). Sisplatin uygulaması sonrası 30. günde bile ratların böbreklerinde platin tespit edilebilmektedir (Weiss ve Poster, 1982). Sisplatin böbrekte karaciğerden daha yüksek bir yarılanma ömrüne sahiptir (Choie ve ark., 1980). İntravenöz uygulamasını takiben beyin omurilik sıvısında düşük miktarda bulunabilmektedir (Loehrer ve Einhorn, 1984).

Sisplatinin dolaşımında yüksek oranda proteinlere bağlı olduğu bilinmektedir (Barabas ve ark., 2008). İntravenöz uygulama sonrası sisplatin serbest, proteinlere bağlı veya eritrositlere bağlı halde görülebilmektedir (Loehrer ve Einhorn, 1984). Bağlı haldeki sisplatinin terapötik olarak önemi yoktur ve aktif olmayan formdadır. Vücuda girişinden sonraki ortalama 24 saatte sisplatinin %65-95'i plazma proteinlerine bağlanabilmektedir (Ghosh, 2019). Hücrelere geçmiş sisplatin molekülleri ise yüksek oranda sitozolde bulunmakta, proteinlere bağlı halde

bulunmamaktadır (Barabas ve ark., 2008). Sisplatinin *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada köpek plazmasına ve sığır albüminine 37 °C’de 48 saat boyunca artan bir oranda bağlandığı tespit edilmiştir (Litterst ve ark., 1976).

Sisplatinin i.v. uygulanmasından sonraki ilk 4 saatte plazma seviyeleri %90 oranında düşmektedir ancak uygulanan dozun %60-70’i idrardan geri kazanılmaktadır (Litterst ve ark., 1976). İdrardan geri kazanılan platin miktarının %90 olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Weiss ve Poster, 1982). Sisplatinin plazma konsantrasyonları uygulamadan sonraki 12. günde bile saptanabilir durumdadır ve 4. ve 12. günler arasında plazma konsantrasyonlarında pek bir değişiklik olmamaktadır (Litterst ve ark., 1976).

Sisplatin başlıca böbrekler yolu ile atılmakta, bu yol toplam atılımın %90’ını oluşturmaktadır (Ghosh, 2019; Jacobs ve ark., 1980). Sisplatinin 24 saatlik renal atılımı %23-70 arasında değişmektedir (Loehrer ve Einhorn, 1984). Yirmi dört saatlik sisplatin atılımı yaklaşık %50’dir (Ghosh, 2019). Sisplatinin plazma klirensi oldukça hızlıdır ve uygulama sonrası birkaç gün içinde ilacın çoğu atılmaktadır (Loehrer ve Einhorn, 1984).

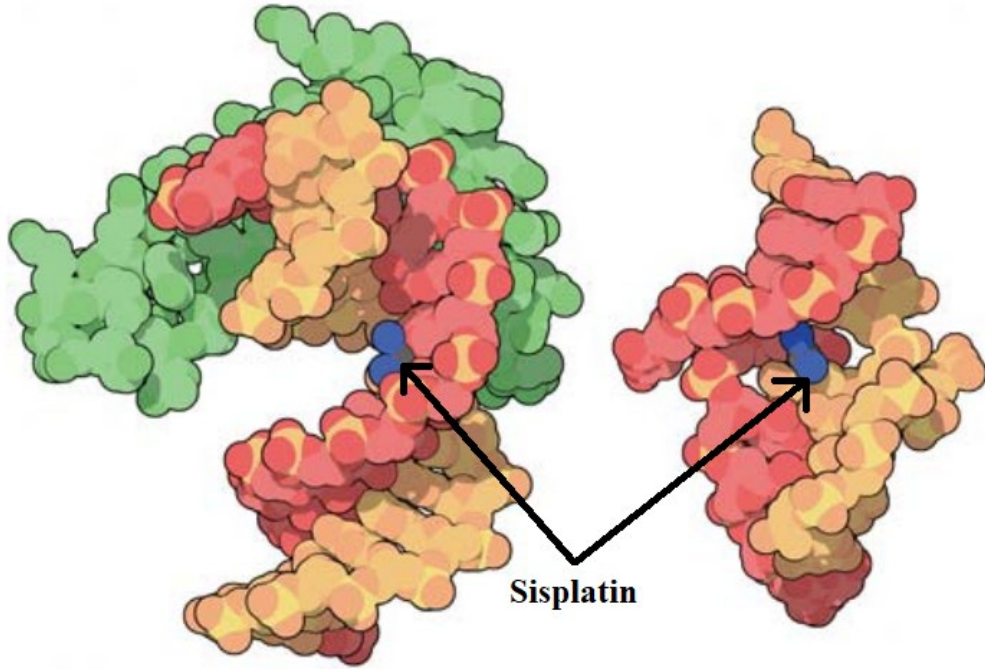
2.3.4. Sisplatinin Etki Mekanizması

Sisplatin sitotoksik etkisi bulunan bir ajandır ve çoklu mekanizmalar yoluyla antikanser aktivite sergiler (Ghosh, 2019). Sitotoksik etkiyi oluşturma mekanizması üzerindeki genel görüş; pürin DNA bazlarına kovalent bağlanarak hücresel DNA’nın normal fonksiyonlarını bozması ve G2M fazını bloke ederek onarım mekanizmalarını indüklemesinden ileri gelmesidir (Chabner ve Longo, 2019).

Sisplatinin, anti-tümör etkisinin, ilacın DNA’ya doğrudan bağlanmasından ve DNA sentezini seçici olarak inhibe etmesinden ileri geldiğine inanılmaktadır (Harder ve Rosenberg, 1970; Welters ve ark., 1999). Oluşturduğu etki iplikler arası ve zincir içi DNA eklentilerinin oluşumu yoluyla DNA replikasyonunun inhibisyonudur (Chabner ve Longo, 2019). Sisplatin hücre içine girerek klorür iyonlarını kaybeder, DNA bazlarıyla çapraz bağlar oluşturur (Goodsell, 2006). Platin çekirdeğinin bağ

açıları sabittir. Bu yüzden DNA ilacın yapısına uyum sağlamak için bükülür (Chabner ve Longo, 2019). Amin ligandları platin iyonu ile güçlü bir şekilde bağlıdır ve DNA ile çapraz bağ oluştuğunda bağlı kalır (Goodsell, 2006).

Sisplatinin DNA ile oluşturduğu reaksiyonlar sisplatinin antiproliferatif etkisiyle bağlantılıdır (Chabner ve Longo, 2019). Çapraz bağlar genellikle guanin ve adeninin yan yana, aynı zincirde olduğu yerlerde, nadir olarak da iki zincir arasında oluşur (Goodsell, 2006). **Şekil 2.5**'de sisplatinin DNA'da oluşturduğu çapraz bağlar gösterilmiştir.

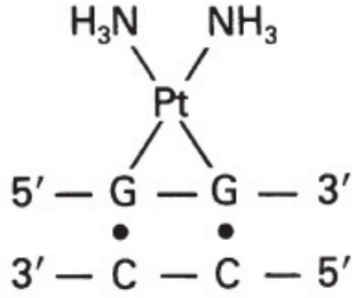


Şekil 2.5. Sisplatinin DNA'da oluşturduğu çapraz bağlar. Solda iki komşu guanin bazı arasındaki sisplatin çapraz bağı. Sağda karşı zincirlerdeki guanin bazları arasındaki sisplatin çapraz bağı (Goodsell, 2006).

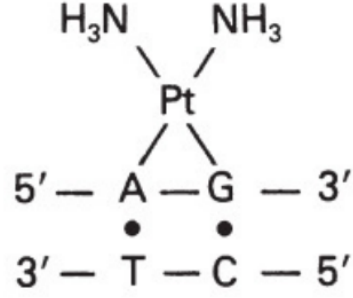
Bağlanma sonucunda platin-DNA eklentileri ve çeşitli iki fonksiyonlu eklentiler oluşmaktadır (Welters ve ark., 1999). Platin-DNA eklentilerinin oluşumunda zincir içi çapraz bağlar için genellikle DNA üzerinde deoksiguanozinin N7 nitrojeni tercih edilir (Chabner ve Longo, 2019). Ana eklenti olan cis-platin-diamin-d (platin-GG), iki bitişik guanine bağlı platindir. Diğer bir iplik içi ana çapraz bağ cis-platin diamin-d (platin-AG), platinin guanin ve komşu bir adenine

bağlanmasıdan meydana gelmektedir (Welters ve ark., 1999). Bahsedilen bu iki eklenti olan N7-d(GPG) ve N7-d(APG) doku kültürü çalışmaları, klinik ortamda izole edilmiş DNA veya primer hücre kültürü çalışmalarında sisplatin kaynaklı oluşan platin-DNA hasarının %80'inden fazlasını oluşturmaktadır. N7-d(GPG) ve N7-d(APG) aynı zamanda hücre ölümü ve DNA çift sarmalının şiddetli şekilde bükülmesi ile ilişkilidir. (Chabner ve Longo, 2019). İki fonksiyonlu eklentiler cis-platin-diamin (G-platin-G), platinin başka bir nükleotit ile ayrılmış iki guanine bağlandığı çapraz bağlar ve eklentilerdir (Chabner ve Longo, 2019; Welters ve ark., 1999). Sisplatinin oluşturduğu DNA hasarının ve hücre öldürme etkisinin bu iki fonksiyonlu eklentilerden ileri geldiğine inanılmaktadır. Sisplatinin oluşturduğu bir diğer çapraz bağ ise zincirler arası çapraz bağdır (d(X)-d(X)) ve biyolojik önemi tam olarak bilinmemektedir (Chabner ve Longo, 2019). Sisplatinin oluşturduğu eklentilerin şematik gösterimi **Şekil 2.6**'da gösterilmiştir. Sisplatinin oluşturduğu eklentiler, DNA'da oluşturduğu hasarın oranları ve önemleri ise **Tablo 2.2**'de gösterilmiştir. Bu eklentiler ve bağlar hücre proliferasyonunu inhibe edebilmekte, hücre ölümüne yol açabilmekte, DNA'nın okunması ve kopyalanmasında ciddi sorunlara neden olabilmektedir (Goodsell, 2006; Welters ve ark., 1999).

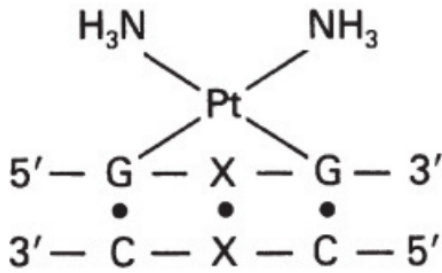
d(GpG) Zincir İçi Eklentisi



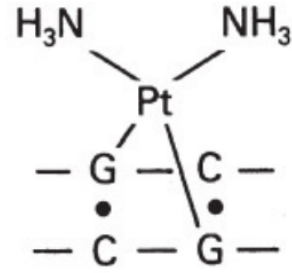
d(ApG) Zincir İçi Eklentisi



d(GpXpG) Zincir İçi Eklentisi



Zincirler Arası Çapraz Bağ



Şekil 2.6. Sisplatinin DNA’da oluşturduğu eklentilerin şematik gösterimi (Chabner ve Longo, 2019).

Tablo 2.2. Sisplatinin DNA’da oluşturduğu eklentiler (Seviyeler hücresel toksisiteye göre verilmiştir) (Chabner ve Longo, 2019).

Eklenti	Toplam DNA hasarının %’si	Önemi
N7-d(GpG)-iplik içi eklentisi	~60	Muhtemel hücre öldürücüsü
N7-d(ApG)- iplik içi eklentisi	~30	Muhtemel hücre öldürücüsü
N7-d(GpXpG)- iplik içi eklentisi	~10	Potansiyel öldürücülüğü belirsiz
N7-d(X)-d(X)-iplikler arası çapraz bağı	<2	Biyolojik önemi belirsiz

Sisplatin, hücre içine girdiğinde ve hücre içi-dışı farka bağlı olarak ortamdaki klorür konsantrasyonu düştüğünde; klorür iyonları kaybedilir, yerlerini gevşek bir şekilde bağlanmış su molekülleri alır. Gevşek şekilde bağlanmış su molekülleri kolayca dökülerek platinin DNA benzeri bir şekilde diğer moleküllere saldırmasına olanak tanır. Ancak, bu şekilde etki gösteren her 10 sisplatin molekülünden yalnızca

1'i çekirdeğe ulaşabilmekte, kalan 9'u plazma proteinlerine bağlanmaktadır (Goodsell, 2006).

Sisplatinin oluşturduğu etkiye karşılık ise kanser hücrelerinin direnç oluşturmaları önemli bir sorundur. Hücrelerin bakır seviyesini ayarlayan mekanizmalar yoluyla çekirdeğe ulaşan sisplatin miktarını azaltılabileceği düşünülmektedir. Platin iyonu DNA ile etkileşime geçtiğinde ise nükleotid eksizyon onarım sistemleri devreye girebilmektedir. Ayrıca hasara bağlı olarak hücreleri apoptoza yönlendiren proteinler hücreler tarafından değiştirilebilmektedir (Goodsell, 2006).

2.3.5. Sisplatin Toksisitesi ve Yan Etkileri

Sisplatin tedavisinin kanser türlerindeki etki spektrumu nispeten dardır ve ciddi yan etkileri bulunmaktadır (Goodsell, 2006). Bu yan etkilerden bazıları nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisitedir (Barabas ve ark., 2008; Chabner ve Longo, 2019; Prestayko, 2013; Schurig ve ark., 1980). Ayrıca sisplatinin mide bulantısı, kusma, myelosupresyon, yüksek tonlu işitme kaybı ve ototoksisiteye sebep verebildiği tespit edilmiştir (Ellerby ve ark., 1974; Schurig ve ark., 1980). Sisplatin kullanımında en önemli doz sınırlayıcı faktör nefrotoksisitedir (Choie ve ark., 1980). Başlıca toksik etkisi olan nefrotoksisite, mannitol diürezisi veya 24 saatlik infüzyonla azaltılabilmektedir ancak böbrek fonksiyonlarındaki azalmadan dolayı ilacın uzun süreli kullanımı sakıncalı olabilmektedir (Jacobs ve ark., 1980).

2.3.6. Sisplatin Nefrotoksisitesi

Sisplatinin prelinik toksikolojik değerlendirmesi böbrek hasarını göstermektedir. Sisplatinin nefrotoksisitesi yalnızca içeriğinde bulunan platine bağlı değil aynı zamanda dizilime de bağlıdır. Platin iyonunun sadece cis izomeri nefrotoksik iken trans izomeri nefrotoksik değildir (Weiss ve Poster, 1982). Ancak trans izomerin tümörler üzerinde etkisi bulunmamaktadır (Chabner ve Longo, 2019). Buna bağlı olarak tümör ve renal DNA üzerinde benzer bir etkiye sahip oldukları düşünülmektedir (Weiss ve Poster, 1982).

Sisplatinle oluşan nefrotoksisite ilacın dozuna ve zamanlamasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Weiss ve Poster, 1982). Sisplatinin ana doz sınırlayıcı faktörü nefrotoksisitedir (Loehrer ve Einhorn, 1984). Yapılan klinik deneylerde 50 mg/m² ve üstünde tek doz veya tekrarlayan doz sisplatin uygulamasının hastaların üçte birinde nefrotoksisiteye sebep olabileceği belirtilmektedir. Tek doz 50-75 mg/m² aralığında yapılan uygulamalarda nefrotoksisite genellikle geri dönüşümlü ve hafif olmaktadır. Daha yüksek dozlarda ve tekrarlanan dozlarda yapılan sisplatin uygulamalarında ise şiddetli ve geri dönüşümsüz olabilmektedir. Tüm bu bilgilerin aksine yapılan koruyucu çalışmalarda ise <40 mg/m² dozlarda bile sisplatinin hastaların yarısında nefrotoksisiteye sebep olduğu bildirilmiştir (Weiss ve Poster, 1982).

2.3.6.1. Sisplatin Nefrotoksisitesinde Mekanizmalar

Sisplatinin neden olduğu nefrotoksisitenin mekanizması tam bilinmemektedir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda böbreklerde proksimal tübül, distal tübül ve toplayıcı kanallarda değişiklikler gözlenmiştir (Loehrer ve Einhorn, 1984). Sisplatinin atılımının %90'ından fazlasının böbrekler yoluyla gerçekleşmesi böbreklerde sisplatin birikimine sebep olabilmektedir. Düşük doz 50 mg/m²'lik sisplatin tedavisinde bile hastaların yaklaşık %28-36'sında nefrotoksisite gözlenmektedir (Ghosh, 2019). Yapılan  alışmalar sisplatinin doruk plazma değerleri ile nefrotoksisite arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. Bazı hastalarda nefrotoksisite riskinin değerlendirilmesi için plazma platin seviyelerinin belirteç işlevi olabilmektedir (Barabas ve ark., 2008).

Sisplatinin içeriğinde bulunan platinin klirensi glomerüler filtrasyon hızını açmaktadır. Buna bağlı olarak renal tübüler hücrelerde platin birikimi olmakta sonuç olarak ise nefrotoksisite oluşabilmektedir (Jacobs ve ark., 1980). Sisplatin kaynaklı nefrotoksisite proksimal tübüllerin üçüncü segmentinde gerçekleşmektedir. İnsanlarda yapılan çalışmalar ise distal tübüllerin ve toplama kanallarının proksimal tübülden daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Tekrarlanan doz uygulamalarda böbrek medullasındaki tübüllerin kistik dilatasyonu, kortikal tübüllerin ise atrofi si gözlemlenebilmektedir. Nefrotoksisiteye bağlı olarak sisplatin kullanan insanların

böbreklerinde hücresel atipi, hiperkromatik çekirdekler, tübüler dilatasyon ve nekroz oluşabilmektedir (Weiss ve Poster, 1982). Sisplatin böbreklerde hücre altı düzeyde mikrozomları ve çekirdeği hedeflemektedir (Choie ve ark., 1980).

Proksimal tübüllerdeki hücre ölümünün bir başka sebebi ise reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. Böbreklerdeki yüksek sisplatin konsantrasyonları nekroza düşük konsantrasyonlar ise apoptoza neden olmaktadır. ROS ise bu apoptozda rol oynamaktadır. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyon kaynaklı nefrotoksisite olabilmekte, mitokondriyal disfonksiyona ise ROS'ların aracılık ettiği düşünülmektedir (Barabas ve ark., 2008).

Nefrotoksisite oluşumundaki görülen bir diğer durum kreatinin klirensindeki azalma; kreatinin, ürik asit ve kan üre nitrojen (BUN) seviyelerindeki artıştır. Ağır şekilde hidrasyon tedavisi bu şekildeki nefrotoksisiteyi azaltabilmekte ancak çözüm sunmamaktadır (Ghosh, 2019).

2.3.6.2. Sisplatin Nefrotoksisitesinin Biyokimyası ve Önlenmesi

Sisplatin toksisitesinin klinik yansımada böbreklerde azotemi, histopatolojik değişiklikler ve ölümcül fonksiyon yetmezliği gibi çeşitli durumlar gözlenebilmektedir (Weiss ve Poster, 1982).

Sisplatin nefrotoksisitesinin ilk klinik belirtileri BUN veya kreatinin seviyelerindeki artıştır. Bu durumda kreatinin klirensi de azalmaktadır ve klirensteki bu azalma nefrotoksisitenin tek göstergesi olabilmektedir (Weiss ve Poster, 1982). Sisplatin alan bazı hastalarda ise hipomagnezemi gözlenebilmektedir. Bu durumun tübüller üzerindeki etkiyle bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. Bu hastalarda magnezyum replasmanı hipomagnezemi oluşumunu engellememektedir (Loehrer ve Einhorn, 1984). Serum kreatinin seviyeleri normalken ise sisplatin alan bazı hastalarda hipomagnezemi görülmüştür ve bu duruma bazen hipokalsemi de aracılık etmiştir. Hipomagnezemi, hastaların bir kısmında semptomatik olabilmekte, tetanilere sebep olabilmektedir. Bu durumun sisplatinin neden olduğu tübüler hasara bağlı olarak renal magnezyum kaybından ileri geldiği düşünülmektedir (Weiss ve Poster, 1982).

Şiddetli nefrotoksisite durumunda idrarda kırmızı ve beyaz kan hücreleri bulunabilmektedir. Ciddi disfonksiyon oluşan olgularda ise idrarda granüler döküntüler ve renal tübüler hücreler gözlenebilir. Küçük moleküler ağırlıklı bir protein olan beta-2 mikroglobulinin idrarla atılımı sisplatin nefrotoksisitesini düşündürmektedir. Yapılan gözlemler neticesinde sisplatin alan hastalarda kreatinin seviyelerinde değişiklik gözlenmeyen veya çok az değişiklik gözlenen hastalarda beta-2 mikroglobulin atılımının arttığı tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak böbrek fonksiyon testleri ve belirgin bir patoloji gözlenmeyen olgularda beta-2 mikroglobulinin renal tübüler hasarı gösterdiği tespit edilmiştir (Weiss ve Poster, 1982).

Sisplatin nefrotoksisitesi hidrasyon-diürez mekanizmaları üzerinden engellenmeye çalışılmıştır (Weiss ve Poster, 1982). Günde 3-6 litre su içilmesi veya salin hidrasyonu nefrotoksisitenin önlenmesinde başlıca başvuru yoldur. Ancak, nefrotoksisiteye tam bir çözüm sunmamakta, halen sıklıkla nefrotoksisite gözlenmektedir (Ghosh, 2019). Hidrasyon tedavisi ile birlikte sisplatin uygulamasından yarım saat önce verilen furosemid hayvanlarda nefrotoksisite riskini azaltmıştır (Weiss ve Poster, 1982). Birçok çalışmada salin ile birlikte furosemid ya da mannitol kullanımının nefrotoksisite riskini azalttığını rapor edilmiştir (Ghosh, 2019; Weiss ve Poster, 1982). Ancak bu çalışmaların aksine bazı hayvan çalışmalarında furosemidin sisplatinin sebep olduğu nefrotoksisiteyi artırabileceği tespit edilmiştir. Bu duruma paralel olarak birkaç çalışmada sadece salin hidrasyonu ile sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisite engellenmeye çalışılmış ve kısmen başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca salin kullanımı sisplatinin antitümör etkinliği üzerinde negatif bir sonuca sebebiyet vermemiştir. Oluşturulan bu koruyucu mekanizmanın sisplatinin konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak renal tübüllerin ilaca daha az maruz kalmasından ileri geldiği düşünülmüştür. Ancak yüksek düzeyde ve uzun süreli sıvı sağaltımının uygun olmaması, kardiyak disfonksiyon durumlarında olumsuz bir prognoza sebep olma ihtimalinin bulunması ve her ilaç uygulamasının hastanede takibinin yapılması gibi sebeplerden dolayı araştırmacılar alternatif koruyucu tedavi yöntemlerine yönelmişlerdir (Weiss ve Poster, 1982).

Nefrotoksisitenin önlenmesinde kullanılan başka bir madde ise sodyum tiyosülfattır. Sodyum tiyosülfat, serbest platin kompleksine bağlanarak onu inaktive

eder ve daha sonra idrar yoluyla atılır. Ancak kandaki platin konsantrasyonunun azalması istenen bir durum değildir (Ghosh, 2019).

Sisplatinin sebep olduğu nefrotoksisitenin önlenmesinde p-aminohippurat taşıyıcı sistemini inhibe eden probenesid tedavisi denenmiştir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar probenesid uygulanan grubun sisplatin grubuna kıyasla BUN ve serum kreatinin seviyelerinde düşüş olduğunu göstermiştir (Weiss ve Poster, 1982).

Sisplatinin süperoksit radikallerini indüklediği bilinmektedir. Serbest radikaller ise renal tübüler hücrelerde lipidler ve makromoleküller ile reaksiyona girerek hücre hasarı oluşturmaktadır. Orgotein, süperoksit radikallerini inhibe etmektedir. Yapılan bir çalışmada orgoteinin süperoksit radikallerini inhibe edici etkisinden yararlanılarak sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisite engellenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda orgoteinin sisplatinin oluşturduğu BUN ve böbrek histolojisindeki değişiklikleri engelleyerek sisplatinin nefrotoksisiteni azalttığı tespit edilmiştir (Weiss ve Poster, 1982). Ayrıca, E vitamini, dimetiltioüre, ebselen, allopurinol (ksantin oksidaz inhibitörü), amifostin gibi antioksidanlar sisplatin tedavisinde nefrotoksisiteyi azalma amacıyla kullanılabilir (Ghosh, 2019).

2.4. Oksidatif Stres

Oksijen (O₂) zehirli bir elementtir ve organizmalar antioksidan sistemlerin dengesi ile yaşamını sürdürmektedir (Halliwell, 2007). Aynı zamanda organizmalarca çeşitli değişkenlere bağlı olarak ROS üretilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin üretiminin antioksidan sistem aktivitesinden daha yüksek olması durumuna oksidatif stres denilmektedir (Finaud ve ark., 2006).

Sisplatin nefrotoksisitesi başta olmak üzere böbrek hastalıkları, gebelik komplikasyonları, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalıkta oksidatif stresin rolü olduğu bilinmektedir (Barabas ve ark., 2008; Barnham ve ark., 2004; Burton ve Jauniaux, 2011; Liguori ve ark., 2018).

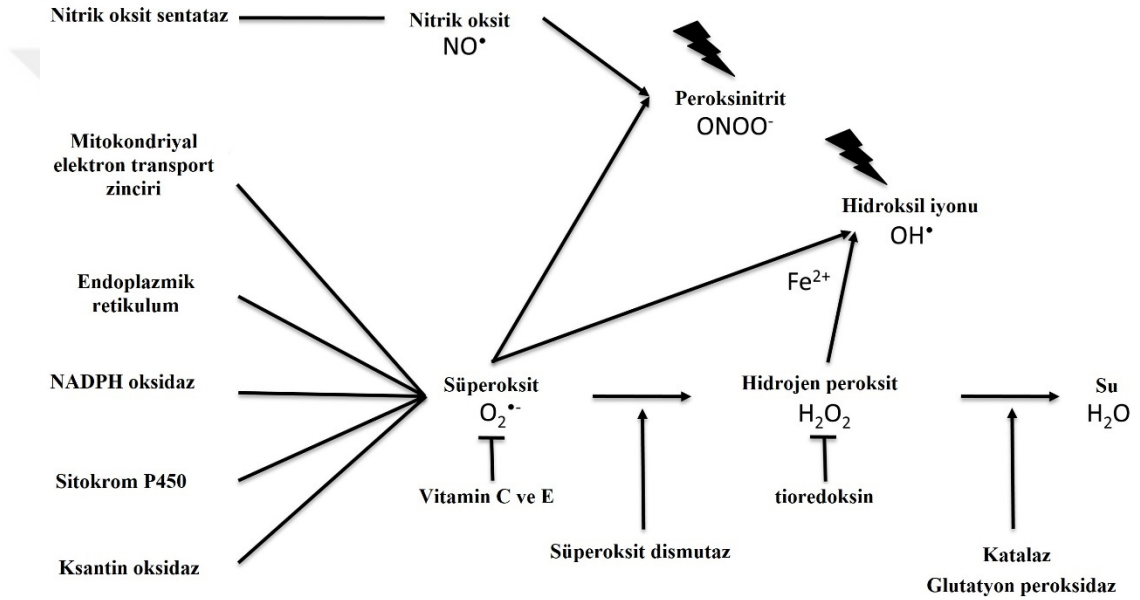
Oksidatif stresin belirlenmesinde birçok belirteç kullanılmaktadır. Oksidatif stres belirteçleri birçok faktörden köken alabilmektedir ancak temelinde hepsi oksidatif durumun seviyesinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Oksidatif stres belirteçlerindeki yükselme oksidatif stres durumunun varlığını göstermektedir (Czerska ve ark., 2015). Oksidatif stres belirteçleri ve köken aldıkları süreçler **Tablo 2.3**'de listelenmiştir. Bu belirteçlerden malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonu (LPO)'nu belirtmesi sebebiyle önemli bir yere sahiptir ve yıllardır en çok analiz edilen belirteçler arasındadır (Czerska ve ark., 2015). İndüklenebilir nitrik oksit sentataz (iNOS) ise diğer radikaller ile reaktif olan nitrik oksit (NO) oluşumuna sebep vermesi sebebiyle önem taşımaktadır (Ponnuswamy ve ark., 2009). Ayrıca oksidatif stres durumunda interleukin (İL)-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artmaktadır (Kim ve ark., 2016). Ek olarak, oksidatif stresin apoptozu indüklediği bilinmektedir. Kaspaz-3, oksidatif stresin rol oynadığı apoptozda yer alması sebebiyle önemli bir belirteçtir (Yuan ve ark., 2003).

Tablo 2.3. Oksidatif stres belirteçleri ve köken aldıkları süreçler (Czerska ve ark., 2015; Ponnuswamy ve ark., 2009).

Köken alınan süreç	Oksidatif stres belirteçleri
Lipid peroksidasyonu	Malondialdehit F2-izoprostanlar Oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) Oksitlenmiş LDL antikoru Gelişmiş lipid oksidasyon ürünleri Akrolein 4-hidroksinonenal
Protein oksidasyonu	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) Gelişmiş oksidasyon protein ürünleri Gelişmiş glikasyon son ürünleri Disülfid oluşumu
Karbonhidrat oksidasyonu	Karbonil oluşumu 3-nitrotirozin
Nükleik asit oksidasyonu	Reaktif aldehytler İndirgenmiş şeker (askorbat, riboz, vb.) 8-oksi-2-deoksiguanozin
Nitrik oksit oluşumu	İndüklenebilir nitrik oksit sentataz

2.4.1. Serbest Radikaller

Bazı atomlar ve molekülleri normalden farklı olarak eşleşmemiş elektronlara sahiptirler. Bu eşleşmemiş elektrona sahip maddelere serbest radikaller denilmektedir (Yoshikawa ve Naito, 2002). Serbest radikallerinin reaktiviteleri eşleşmemiş elektronlardan ileri gelmektedir. Bu maddeler birçok tepkime sonucu ve birçok elementten üretilmektedir (Betteridge, 2000; Burton ve Jauniaux, 2011). Başlıca serbest radikaller, oluşumlarına sebep olan tepkimeler ve detoksifikasyon yolları Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Başlıca serbest radikaller ve detoksifikasyon yolları (Burton ve Jauniaux, 2011).

Serbest radikallerin yapılarında bulunan eşleşmemiş elektronların diğer elektronlara bağlanma eğilimi sebebiyle serbest radikaller genellikle reaktiftir ve kararsızdır. Oksijenin metabolizma edilmesi sırasında ROS üretilmektedir. Bu O_2 metabolitleri $O_2^{\bullet-}$ ’den daha fazla reaktiftir ve aktif oksijen türleri olarak isimlendirilmektedir. Hidroksil radikalleri, süperoksit, singlet oksijen, NO ve hidrojen peroksit (H_2O_2) aktif oksijen türleri içerisinde (Yoshikawa ve Naito, 2002).

Serbest radikaller, bahsedildiği gibi biyokimyasal süreçlerin ürünü olarak üretilmesine karşın çevreden gelen uyaranlara tepki olarak da üretilmektedir.

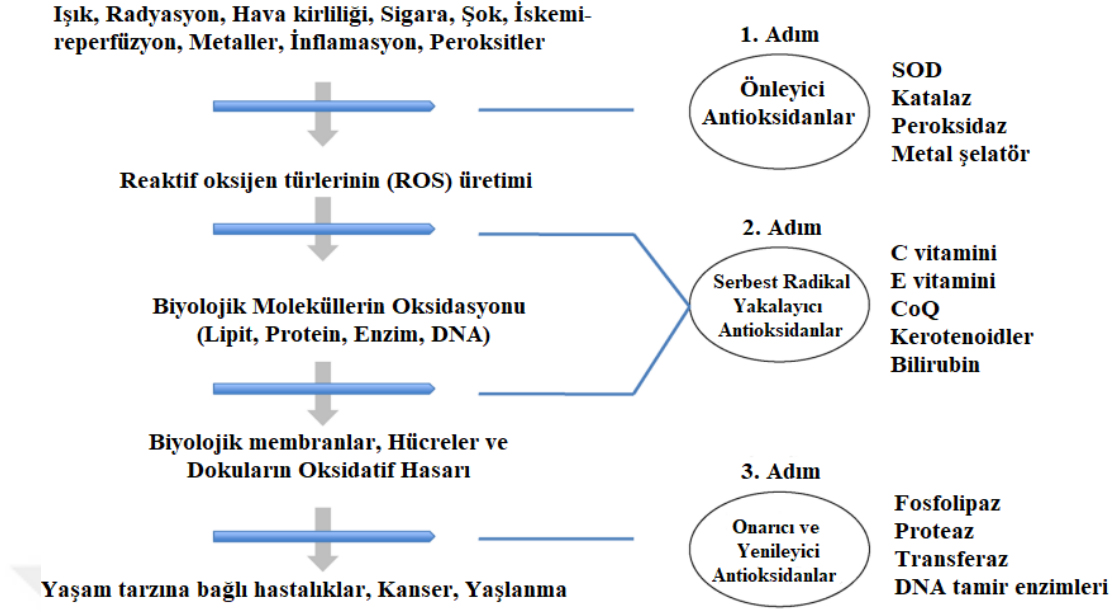
Ayrıca, serbest radikallere ozon ve nitrojen dioksit gibi doğrudan maruziyet olabilmektedir (Betteridge, 2000). Ayrıca hemeostaz sırasında ROS hücre fonksiyonları üzerinde etkilidir (Burton ve Jauniaux, 2011).

2.4.2. Antioksidanlar

Oksijene bağımlı organizmalar, yaşamlarını sürdürebilmeleri için ROS'a karşı bir savunma mekanizması geliştirmiştir. Bu mekanizmalara antioksidan savunma mekanizmaları, maddelere ise antioksidanlar denilmektedir (Yoshikawa ve Naito, 2002).

Antioksidan savunma başlıca serbest radikal kaynaklarından uzaklaşmayı, antioksidan kapasitenin artırılmasını ve antioksidanların dışarıdan alınmasını içeren bir süreçtir. Bunlar arasında antioksidanların dışarıdan alınması en sık çalışılan yöntemler arasındadır (Naito ve ark., 2010).

Antioksidanlar içerisinde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), vitaminler vb. gibi birçok enzim, madde ve sistem bulunmaktadır. Bu antioksidan maddeler serbest radikallere doğrudan tepki verebilmektedir. Serbest radikalleri yok ettikleri için radikal süpürücü antioksidanlar şeklinde de adlandırılabilirler (Kurata ve ark., 1993; Naito ve ark., 2010). Antioksidanların işleyiş aşamaları ve bazı antioksidanlar **Şekil 2.8**'de gösterilmiştir



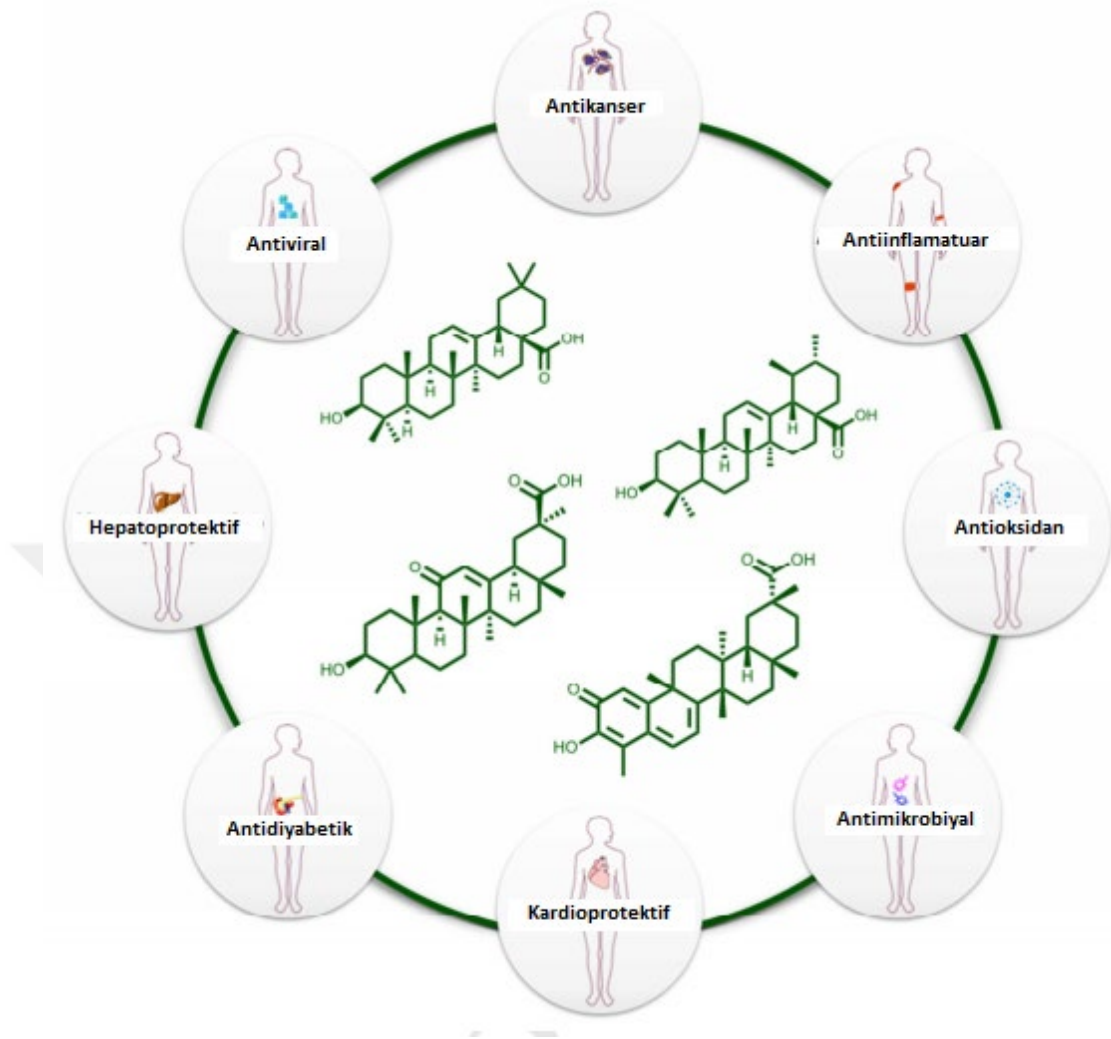
Şekil 2.8. Antioksidanlar ve etkileri (Naito ve ark., 2010).

Belirtilen antioksidanlardan SOD, O_2 'nin H_2O_2 'ye katalize edilmesinin dismutasyonunu sağlayan metalloprotein grubu bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz ve CAT ise H_2O_2 'yi temizleyen sistemlerdir (Kurata ve ark., 1993).

2.5. Triterpenler

Triterpenler, tıp ve tarım gibi çeşitli endüstrilerde kullanım alanı bulan, bitkilerin başlıca kök ve meyvelerine dağılmış maddelerdir (Ladhari ve Chappell, 2019; Pereira Beserra ve ark., 2018). Genellikle bitkilerin meyve kabuğu, kabuk ya da yaprak gibi yüzeysel kısımlarında bulunmaktadır ve günlük olarak tükettiğimiz bitkiler, meyveler, bitkisel yağlar ve tahıllarda bulunabilmektedirler (Jacometti Cardoso Furtado ve ark., 2017).

Triterpenler ve türevleri; antitümör, antiviral, antibakteriyal, antifungal, antiinflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik, karaciğer için koruyucu ve kardiyovasküler sistem üzerine koruyucu etkileri olan biyoaktif özellikler gösteren yapılardır (Jacometti Cardoso Furtado ve ark., 2017; Loesche ve ark., 2019). Triterpenlerin bazı etkilerinin şematik gösterimi **Şekil 2.9**'da verilmiştir (Salvador ve ark., 2017)



Şekil 2.9. Triterperlerin bazı etkilerinin şematik gösterimi (Salvador ve ark., 2017).

2.6. Escin

Escin, at kestanesi olarak bilinen *Aesculus hippocastanum* bitkisinin ana aktif bileşeni olan triterpen saponinlerin bir karışımıdır (Wu ve ark., 2012). İlk olarak 1953'te izole edilen escin, antioksidan, antiödem, antiinflamatuvar, vazoprotektif, sitoprotektif etkiler göstermiştir (Gallelli, 2019; Küçükkurt ve ark., 2010; Wang ve ark., 2015). At kestanesi ekstratları ile birçok ortak etki gösteren escinin gösterdiği antioksidan, antiödem ve vazoprotektif etkilerin sadece escine özgü olduğu yapılan araştırmalarca tespit edilmiştir (Küçükkurt ve ark., 2010; Sirtori, 2001). Escin klinik olarak, hemoroid, inflamasyon, kronik venöz yetmezlik ve serebral iskemik hasar gibi

durumları tedavi etmek için kullanılmıştır (Wu ve ark., 2012), (Zhang ve ark., 2010), (Wetzel ve ark., 2002), (Wei ve ark., 2004), (Ottillinger ve Greeske, 2001).

2.6.1. Kaynakları

Escinin ana kaynağı olan *Aesculus hippocastanum* (at keşanesi) geleneksel Türk tıbbında kullanılmaktadır. At keşanesi, çevre koşullarına dayanıklılığı nedeniyle Türkiye’de ve Dünya’da (İran, Kuzey Hindistan, Asya, Güneydoğu Avrupa, ABD vb.) yaygın olarak bulunan bir ağaçtır (Küçükurt ve ark., 2010; Selvakumar ve ark., 2015; Sirtori, 2001). Parklarda, bahçelere ve şehir sokaklarında yaygın şekilde yetiştirilen ağacın dallarının kabukları ve tohumları medikal amaç ile kullanılmaktadır (Sirtori, 2001). Ağacın meyveleri dikenli ve küresel yapılıdır. Meyveler, 2 ile 4 arasında tohum içermektedir ve olgunlaştıkça kösele yapısı almaktadır (Sirtori, 2001). At keşanesi ağacı ve meyvesi **Şekil 2.10**’da gösterilmiştir.

At keşanesi tohumları, bütün halde hemoroidde semptomların azaltılmasında, çay olarak mide ağrısında ve böbrek taşı düşürmede geleneksel Türk tıbbında geçmişte kullanım alanı bulmuştur (Küçükurt ve ark., 2010). Avrupa’da ise artrit, tendinit, spor yaralanmaları, varis, hemoroit, sırt ağrısı gibi inflamatuvar durumları tedavi etmek için uzun süredir at keşanesi tohumları kullanılmaktadır (Küçükurt ve ark., 2010; Sirtori, 2001). Mide ağrısı ve mide problemlerine yönelik olarak ise geleneksel Çin tıbbında kullanım alanı bulmaktadır (Wang ve ark., 2014b).



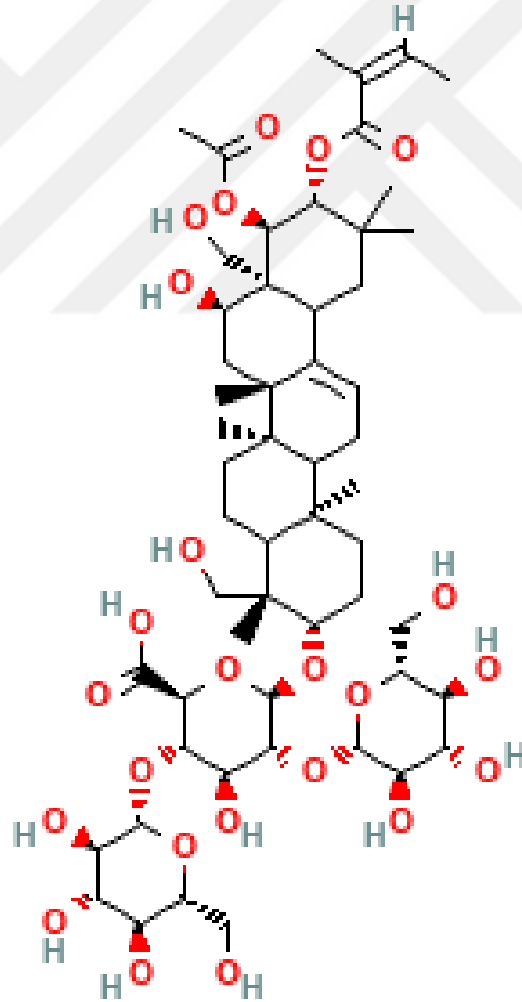
Şekil 2.10. At kestanesi ağacı ve meyvesi (Horvath ve Şerban, 2011).

2.6.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

At kestanesi tohumları kuersetin, kaemferol, diglikosil türevleri, proantosiyanidin A2, kumarinler, eskülin ve fraksin gibi bioflavonoidler ve antioksidanlar içermektedir (Sirtori, 2001). Yirminci yüzyılın ortalarında at kestanesi tohumlarında kimyasal olarak izole edilebilen triterpenik saponin karışımından oluşan bir fraksiyon tespit edilmiştir. Pentasiklik triterpenoik saponinler protoescigenin ve barringtonol olarak tanımlanmıştır ve fraksiyon escin olarak isimlendirilmiştir (Wu

ve ark., 2012). Sonrasında ise at kestanesi ekstraktının ana biyoaktif özelliklerinin escine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Sirtori, 2001).

Escinin moleküler formülü $C_{55} H_{86} O_{24}$, molekül ağırlığı 1131,27 Da'dır (Gallelli, 2019). Escinin kimyasal yapısı **Şekil 2.11**'de gösterilmiştir. Escinin içindeki saponinler α -escin ve β -escin olmak üzere ikiye ayrılır. Bu saponinlerden, α -escin C_{28} 'de bir asetil grubuna sahiptir, izoescin Ia ve izoescin Ib'den oluşur ve β -escin'e göre daha az biyoaktiviteye sahiptir. β -escin, C_{22} 'de bir asetil grubuna sahiptir ve escin Ia, escin Ib'den oluşur (Wu ve ark., 2012). β -escin, farmasötik ürünlerde bulunan başlıca formdur ve karışımın aktif bileşeni olarak görülmektedir (Sirtori, 2001).



Şekil 2.11. Escinin kimyasal yapısı (Anonim, 2022b).

2.6.3. Farmakokinetik Özellikleri

Oral uygulama sonrası escinin yaklaşık %13-16'sı emilmektedir. Uygulama sonrası maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks})'na ortalama 4 saatte ulaşmaktadır. Oral alımını takiben yaklaşık üçte ikisi safra yoluyla atılmaktadır (Gallelli, 2019). İntravenöz uygulama sonrası oral uygulamaya benzer şekilde escinin üçte ikisi safra üçte biri ise idrarla atılmaktadır (Rasheed ve ark., 2021). Escinin yarılanma ömrü ortalama 6-8 saattir (Wu ve ark., 2012). İntravenöz uygulamayı takiben escinin dağılım hacmi 100,9 L, plazma proteinlerine bağlanma oranı %84'tür. Ayrıca escinin total plazma klerensi 21,8 mL/dk, renal klerensi 1,7 mL/dk'dır (Dudek-Makuch ve Studzinska-Sroka, 2015).

Topikal escin uygulaması sonrası ilk 24 saatte uygulama miktarının %0,5-1'i idrarla atılmaktadır. Uygulama sonrası ilk 24 saatte safra ve idrarla toplam atılım miktarı ise toplam dozun %1-2,5'i kadardır. Atılan miktarın yarısından azı escin formunda iken geriye kalan kısmı metabolit halindedir. Topikal uygulama sonrası escin uygulama bölgesinin altındaki subkutan ve kas dokusuna geçebilmektedir. Topikal uygulama sonrası iç organlarda escine rastlanabilirken buralardaki miktarı oldukça düşük ölçülmektedir (Lang, 1977; Rasheed ve ark., 2021). Ayrıca escinin yüksek molekül ağırlığına bağlı olarak escin kan beyin bariyerini geçememektedir (Ding ve ark., 2021).

Escin izomerleri olan escin 1a ve izoescin 1a oral uygulama sonrası 15 dakikada plazmaya geçmektedir ve yaklaşık 3 saat sonra C_{maks} 'a ulaşmaktadır. Ancak izomerlerin de escine benzer şekilde emilme miktarları düşüktür ve plazma konsantrasyonları düşük olarak ölçülmektedir. Emilme miktarlarının düşük olması escin izomerlerinin ilk geçiş etkisine maruz kalarak *Lactobacillus brevis* tarafından metabolize edilmesi sonucu olduğu düşünülmektedir. Escin izomerlerinin yarılanma ömürleri escine benzer şekilde ortalama 7 saattir. Escin izomerlerinin dağılım hacmi ise geniş doku dağılımı göstermektedir (Wu ve ark., 2012).

At keşanesi ağacında escin ile birlikte eskulin ve fraksetin gibi kumarin türevleri vardır. Escin uygulaması sırasında escin saf olarak izole edilemezse ve yanında eskulin ve fraksetin gibi kumarin türevleri bulunursa uygulama varfarin gibi antikoagölan ilaçların etkisini güçlendirebilmektedir (Gallelli, 2019).

2.6.4. Etki Mekanizması

Escinin gösterdiği anti-ödematöz, antiinflamatuvar ve venotonik özellikler seçici vasküler geçirgenlik olarak tanımlanan bir mekanizmaya bağlıdır (Sirtori, 2001). Ayrıca escin apoptozu uyarak antikanser etki gösterebilmektedir (Yuan ve ark., 2017).

Hipoksi, ödem ve inflamasyonun başlangıç faktörüdür. Endotel hücrelerde hipoksi durumunda ATP miktarı azalmakta, fosfolipaz A2 ve trombosit aktive edici faktör (PAF) yolu üzerinden prostaglandinler sentezlenmektedir. Bu duruma bağlı olarak hipoksi şiddetlenmekte nötrofiller tarafından elastin vb. enzimler serbest bırakılmaktadır. Escin bu süreçte nötrofil adezyonunu önleyerek hipoksiyi engellemekte ve çeşitli aşamalarda ödemi ve venöz duvar hasarını baskılamaktadır (Sirtori, 2001). Escin ayrıca iyonların kanallara daha iyi girmesini sağlayarak antiinflamatuvar ve venotonik etkiler göstermektedir. Ek olarak escin, 5-hidroksitriptamin (5-HT) ve histamine antagonistik etki oluşturarak ve mukopolisakkaritlerin dokulardaki katabolizmasını düzenleyerek de etki göstermektedir (Rasheed ve ark., 2021).

Escinin iyonların kanallara daha iyi girmesini sağlama etkisinin altında kalsiyum (Ca^{2+}) kanallarını duyarlı hale getirmesi yatmaktadır. Ca^{2+} kanallarındaki duyarlılığın prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) salınımının artmasının bir sonucu olarak gerçekleştiği tahmin edilmektedir. İyon kanallarındaki duyarlılığı artırması ayrıca antiinflamatuvar etkisinde de işlev görmektedir (Sirtori, 2001).

Escin antikanser etkisini ise p21 proteinin aracılık ettiği G1/S fazında hücre döngüsünü durdurarak ve kaspaza bağlı apoptozu indükleyerek göstermektedir. Escin kanser hücrelerinde ROS üretimine aracılık edip mitokondriyal membran potansiyelini

azaltmakta buna bağlı olarak sitokrom c salınmasına neden olmaktadır. Bu şekilde mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ile başlayan yol ise apoptoz ile sonuçlanmaktadır (Yuan ve ark., 2017).

Escinin antioksidan etkisinin altında SOD seviyelerini yükselterek H₂O₂ üretimini artırmasının, GPx ve CAT seviyelerini yükselterek H₂O₂'nin süpürülmesini sağlamasının, MDA seviyelerini baskılayarak lipid peroksidasyonunu önlemesinin yattığı bildirilmiştir (Gür ve ark., 2021; Xin ve ark., 2011a).

2.6.5. Biyoaktif ve Farmakolojik Etkileri

Escinin başlıca etkileri arasında antikanser, antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler bulunmaktadır (Domanski ve ark., 2016; Selvakumar ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2017). Escin ayrıca antiviral, venotonik, gastroprotektif etkiler göstermektedir (Brunner ve ark., 2001; Fu ve ark., 2005; Gallelli ve ark., 2020).

2.6.5.1. Antikanser Etkisi

Escin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme ve apoptozu indükleme yeteneklerine sahiptir (Wu ve ark., 2012). Pankreas, kolon, karaciğer, böbrek gibi birçok dokunun kanserinde ve osteosarkom üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir (Idris ve ark., 2020; Yuan ve ark., 2017). Ayrıca escin tümör hücrelerinin büyümesini baskılamakta metastazları azaltmaktadır (Cheong ve ark., 2018).

Escin böbrek kanseri hücrelerinde mitokondriyal apoptozu indükleyerek hücreleri öldürmüştür. Apoptozu indüklerken kaspaz yolunu aktifleştirmiş, ROS üretimini artırmış ve anti apoptotik B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) geni seviyelerini azaltmıştır (Yuan ve ark., 2017). Kolon kanseri hücrelerinde escinin etkisi *in vivo* ve *in vitro* olarak doğrulanmıştır. Escin *in vivo* olarak kolon kanserinin gelişmesini inhibe etmiş, *in vitro* olarak ise HT29 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır. Çalışmada escinin p21 yolu üzerinden apoptozu indüklediği ancak kaspaz yolu üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Patlolla ve ark., 2006). Osteosarkom modelinde escin p38, mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) ve ROS aktivitesi üzerinden kaspaza bağımlı apoptozu indükleyerek osteosarkom

hücrelerine karşı *in vivo* ve *in vitro* olarak güçlü antitümör aktivite göstermiştir (Zhu ve ark., 2017). Bir diğer osteosarkom çalışmasında escinin gösterdiği apoptoz aktivitesinde kaspaz yollarının aktif katılımı olduğu, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (BAX) ve Bcl-2 ekspresyonlarını düzenlediği ve fosfoinositid-3 kinaz (PI3K)/serin-treonin kinaz (Akt) yolunu bloke ederek anti tümör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 2018). Escinin hepatosellüler karsinoma üzerindeki etkileri HepG2, PLC/PRF5 hücre hatlarında gösterilmiş, *in vivo* olarak doğrulanmıştır. Escin hepatosellüler karsinomada G1/S fazında hücre döngüsünü durdurarak, kaspaza bağımsız apoptoz yollarını indükleyerek ve transkripsiyon 3'ün sinyal dönüştürücü ve aktivatörü (STAT3)/janus kinaz (JAK) yolunun inhibisyonu üzerinden etki göstermektedir (Tan ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2009).

2.6.5.2. Antioksidan Etkisi

Birçok hastalığın ve ilaçların oluşturduğu toksisitenin temelinde rol oynayan oksidatif strese karşı fitoterapide kullanılan bitkisel ekstratların etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada %70 escin içeren at kestanesi ekstresinin doza bağımlı şekilde LPO'yu azalttığı tespit edilmiştir (Küçükkurt ve ark., 2010). Lineolik asitle indüklenen bir oksidatif modelde ise at kestanesi tohumlarının süperoksit anyonları ve radikallerini süpürdüğü tespit edilmiştir (Küçükkurt ve ark., 2010; Sato ve ark., 2005). Escin kullanılan bir çalışmada, indometasin kaynaklı mide ülseri modelinde, escinin miyeloperoksidaz (MPO), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), P-selektin, MDA ve vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Escinin bu yollar üzerinden antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstererek gastroprotektif özellik sergilediği tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2014b). Küçükkurt ve ark. (2010) yüksek yağlı diyetle uyardığı oksidatif stres modelinde karaciğer, böbrek ve kalpte yapılan incelemelerde escin uygulamasının MDA, SOD, CAT seviyelerini azalttığı GSH seviyesini artırdığı bulunmuştur. Bu şekilde de escinin antioksidan savunma sistemini artırdığı, LPO'yu önlediği tespit edilmiştir.

Parkinson hastalığı substantia nigra dopaminarjik nöron ölümüyle seyreden oksidatif stresle bağlantılı bir hastalıktır. Selvakumar ve ark. (2014) yaptığı çalışmada escinin 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin/probenesid (MPTP/p) ile indüklenen

Parkinson hastalığı modelinde antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler göstererek koruyucu etkinlik gösterdiğini rapor etmiştir. Aynı çalışmada, escin tedavisi ile motor davranışsal kusurların iyileştiği, dopaminerjik belirteçlerin ekspresyonlarının arttığı, striatal dopamin seviyelerin iyileştiği, oksidatif stresin azaldığı, inflamatuvar sitokin ekspresyonunun zayıfladığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise Bcl-2, BAX, sitokrom c ve kaspaz yolu üzerinden MPTP/p ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde escinin mitokondriyal disfonksiyonu, oksidatif stresi ve apoptozu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada davranışsal ve ultrastrüktürel analizler bu etkilerini doğrulamıştır (Selvakumar ve ark., 2015).

Reaktif oksijen türlerine bağlı olarak dejeneratif retinal hastalıklar oluşabilmektedir. Retina pigment epitelyum hücreleri ROS tarafından oksitlenerek hasara maruz kalabilmektedir (Bhutto ve Luty, 2012; Wang ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada H₂O₂ ile retina pigment epitelyum hücrelerinin dejenerasyonu uyarılmış, escinin bu hücrelerdeki koruyuculuğu araştırılmıştır. Escin, antioksidanlara genlerin transkripsiyonu ve Akt ile ifade edilen nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) sinyal aktivasyonu yoluyla retinal pigment hücrelerini oksidatif stresten korumuştur. Bu hücrelerde ROS'un üretimi ve LPO escin tarafından engellenmiştir (Wang ve ark., 2015).

2.6.5.3. Antiinflamatuvar Etkisi

İnflamasyon; travmatik, enfeksiyöz, iskemik, toksik ya da otoimmün durumlarda şekillenen, dokularda ortaya çıkan faktörler ve hücreler arasındaki etkileşimdir (Nathan, 2002). İnflamasyon kendi kendini sınırlayan terapötik sonuçlara sahip bir süreçtir. Ancak, inflamasyonda rol alan birçok yol aynı zamanda kanserde rol oynamaktadır ve inflamatuvar yanıtın yetersiz düzeyde çözünmesi kanser dahil birçok hastalığa sebebiyet verebilmektedir. Bu sebeple antiinflamatuvar maddeler kanser tedavisinde önem arz etmektedir (Aggarwal ve Gehlot, 2009) (Kannaiyan ve ark., 2011).

Escinin inflamasyon ve ödem üzerindeki etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Gallelli, 2019; Xin ve ark., 2011b; Zhao ve ark., 2018). Çeşitli

çalışmalarda escinin etkisinin altında yatan mekanizmanın net bir şekilde ortaya ıkarılamadığından bahsedilmiş olsa da antiinflamatuvar etkinin, antihistaminik ve antiserotoninerjik etkiden ileri geldiği belirtilmiştir (Gallelli, 2019; Matsuda ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2010). Escin hyaluronik asiti bozan hyaluronidaz aktivitesini yüksek düzeyde inhibe etmektedir. Ekstravasküler matrisin ana bileşeni olan hyaluronik asit gibi bileşenlerin inhibe edilmesi ise endotelden plazma sızıntısını azaltabilmektedir (Gallelli, 2019). Escinin lipopolisakkarit (LPS) ile aktive olan endotel hücrelerde IL-6 salınımını ve VCAM-1 aktivitesini azalttığı belirtilmiştir (Gallelli ve ark., 2020; Montopoli ve ark., 2007). Ayrıca, escinin TNF- α , prostaglandin E₂ ve IL-1 β 'nın aşağı regülasyonu ve nükleer faktör κ B (NF- κ B) ve aktive edici protein-1 (AP-1) ekspresyonlarının inhibisyonu yoluyla glukokortikoid reseptör üzerinde oluşan etkinlik vasıtasıyla antiinflamatuvar etki gösterebileceği rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2018). Benzer şekilde, escin sıçan beyinde TNF- α ekspresyonunu ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek travmatik beyin hasarı modelinde beyin hasarını hafifletmiştir (Xiao ve Wei, 2005). Yapılan başka bir çalışmada escinin glukortikoid ile kombinasyonunun benzer mekanizmalar üzerinden sinerjizma göstererek antiinflamatuvar etki oluşturabileceğini tespit edilmiştir (Xin ve ark., 2011b). İnsan endotel hücrelerinde escinin p50 ve p65 proteinlerinin nükleer translokasyonunu bloke eden inflamasyonu inhibe ettiği belirtilmiştir (Domanski ve ark., 2016; Gallelli ve ark., 2020). Bir başka çalışmada escinin deksametazonondan uzun süreli ve benzer şekilde antiinflamatuvar etki gösterdiği ancak immünosupresif etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2009).

Bahsedilen çalışmalarda escinin sitokinler üzerinden gösterdiği antiinflamatuvar etki gösterilmiştir. Sitokinler inflamatuvar yanıt harici aktive lökositlerin endotel hücrelere yapışmasını kolaylaştıran E-selektin ve hücre içi adhezyon molekülü-1'in (ICAM-1) gibi adhezyon moleküllerinin sentezini ortaya çıkarmaktadır (Cheng ve ark., 2008). Ayrıca, inflamatuvar reaksiyonların önlenmesi nöroproteksiyon sağlayarak iskemik beyin hasarı için terapötik potansiyel oluşurmaktadır (Zhang ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada escinin serebral iskemide ICAM-1 ve E-selektin ekspresyonlarını azalttığı, MPO enzim aktivitesini düşürdüğü, serebral enfarktüs hacmini azalttığı ve nörolojik defisiti iyileştirdiği tespit edilmiştir (Hu ve ark., 2004b).

Serebral iskemi üzerine yapılan bir diğer çalışmada escin granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörün ekspresyonunu aşağı regüle ederek antiinflamatuvar etki göstermiştir. Aynı çalışmada escinin serebral iskemide öğrenme ve hafızayı iyileştirdiği, hipokampal hasar üzerine iyileştirici etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2010).

2.6.5.4. Antiviral Etkisi

Escin, şiddetli akut solunum yolu sendromu korona virüsü (SARS-CoV), herpes simpleks virüsü (HSV-1), veziküler stomatitis virüsü (VSV), respiratuvar sinsityal virüsü (RSV) gibi virüslere karşı etkinlik göstermektedir (Gallelli ve ark., 2020). Wu ve ark. (2004) SARS-CoV hücrelerini içeren bir modelde escinin bu virüse karşı etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. RSV üzerine yapılan bir çalışmada ise escin ve *Aesculus hippocastanum* L. tohum özütünün sitokin aktivitesi, AP-1 ve NF- κ B üzerinden virüsidal ve antiviral etki gösterdiği, *in vivo* olarak akciğer inflamasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Gallelli ve ark., 2020; Salinas ve ark., 2019). Bir diğer çalışmada escinin aynı şekilde NF- κ B, AP-1 aktivasyonu ve sitokin üretimini düzenlediği, HSV-1 ve VSV'ye karşı antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Michelini ve ark., 2018).

2.6.5.5. Diğer Etkileri

Çeşitli araştırmalar escinin venotonik, gastroprotektif, adezyon oluşumunu inhibe etme etkilerini göstermiştir.

Venotonik Etkisi

Escinin venotonik etkisi önceki çalışmalarla ortaya konulmuştur ve mikrosirkülasyonun düzenlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Brunner ve ark., 2001; Gallelli, 2019; Matsuda ve ark., 1999). Venotonik etkiyi PGF_{2 α} üzerinden gerçekleştirmektedir. Yapılan bir çalışmada escinin venotonik etkisi indometasin gibi non steroid antiinflamatuvar ilaçlarla kaldırılmıştır. Bu durum da PGF_{2 α} üzerinden venotonik etkisi olduğunu göstermiştir. Bir diğer çalışmada norepinefrin uygulanan insan safen venine escin uygulamasının, escin ortamdan kaldırıldıktan sonra 1 saat

süreyle venöz tonda artışa sebep olduğu gösterilmiştir(Gallelli, 2019). Bu durum escinin venotonik etkisinin escin ortamdan uzaklaştıktan sonra da devam ettiğini göstermiştir.

Gastroprotektif Etkisi

Oral yolla escin uygulanmasının endojen prostaglandinler, duyuşal sinirler ve merkezi sinir sistemi yoluyla oluşun mide boşalmasını inhibe ettiğı bilinmektedir (Matsuda ve ark., 2000). Fu ve ark. (2005) yaptığı çalışmada paranteral escin uygulamasının akut inflmasyon ve granölom oluşumunu azalttığı, gastrointestinal geçişin hızlanmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu etkileriyle postoperatif olarak sorun teşkil eden ve net bir tedavisi olmayan postoperatif adezyonların oluşumunu hafifletmiş, asetik asit kaynaklı kılcal geçirgenlikteki artışı azaltmıştır (Wang ve ark., 2014b). Başka bir çalışmada escin etanol kaynaklı mide mukozal lezyonlarını asit ortamdan bağımsız olarak endojen prostaglandinler, afferent nöronlar ve sempatik sinir sistemi üzerinden azaltmıştır (Matsuda ve ark., 1999). Diğer bir çalışmada escinin mideden ince bağırsağına geçişi ve ince bağırsakta glikoz taşıma sistemini azaltarak oral glikoz emilimini baskıladığı tespit edilmiştir (Matsuda ve ark., 1998). Wang ve ark. (2014b) ise escinin indometasin kaynaklı ülşere ve gastropatiye karşı MDA, TNF- α , P-selektin, VCAM-1 ve MPO aktivitelerindeki azalmalar ile etki ettiğini göstermişlerdir. Çalışmada aynı zamanda antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GPx'in değışen aktiviteleri de escin tedavisi ile düzenlenmiştir.

2.6.6. Terapötik Kullanım ve Uygulanması

Etnofarmakolojik çalışmalar, escinin öksürük, mesane hastalıkları, dismenore, kulak çınlaması, ishal dahil çok sayıda durumda kullanımına dair kanıt sağlamaktadır. Ancak, mevcut kullanımı antiinflamatuvar ve antiödematoz özelliklerine dayanan venotonik ve venoprotektif kullanımı ile sınırlı kalmıştır (Domanski ve ark., 2016) (Anonim, 2020). Escinin etki mekanizması tam olarak bilinmese de ABD ve Avrupa'da 2014 yılında 226 milyon ABD doları pazar hacmine ulaşmıştır ve en çok satan bitkisel özütlerden biridir (Domanski ve ark., 2016).

Escin Çin’de başlıca ödemle ilişkili hastalıkların tedavisinde 20 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır (Cheong ve ark., 2018). Escinin Çin’de kullanımı sadece ödemle ilişkili rahatsızlıklarla sınırlı değildir. Escin Çin’de mide ağrısı, gaz, iştahsızlık tedavisinde ve antiseptik, antioksidan, ateş düşürücü, analjezik ve yaşlanma karşıtı ajan olarak kullanım alanı bulmaktadır (Idris ve ark., 2020; Wang ve ark., 2014b). Ayrıca Türkiye’de at kestanesi tohumlarının hemoroid, mide ağrısı ve böbrek taşı gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Küçükkurt ve ark., 2010). Avrupa ülkelerinde genel olarak artrit, tendinit, varis gibi inflamatuvar durumları tedavi etmek için kullanım alanı bulmaktadır (Küçükkurt ve ark., 2010; Sirtori, 2001). Genel olarak kullanımında ise escin hematoma, kardiyak venöz yetmezlik, ağrı, yanık, epidermis aşınması, ishal, flebit, prostat büyümesi, cilt iltihabı, beyin travması, selülit gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanım alanı bulabilmektedir. Escinin ayrıca kozmetik endüstrisinde ve kulak, burun, boğaz hastalıklarında kullanım alanı bulunduğu belirtilmektedir (Idris ve ark., 2020).

Escinin geleneksel kullanımlarının yanı sıra kanser üzerine klinik çalışmaları yapılmaktadır (Cheong ve ark., 2018). Ayrıca travma ve venöz yetmezliğe karşı escin uygulamasının klinik çalışmaları da mevcuttur (Gallelli, 2019).

2.6.7. Toksisitesi

Escinin genel toksikolojik profili temiz olarak gözüktüğü de at kestanesine yönelik çeşitli zehirlenme vakaları bulunmaktadır ancak bunlar ekstraktın içerisindeki eskulosiden ileri geldiği belirtilmektedir (Sirtori, 2001).

Escinin ratlar için hazırlanan raporlarında oral letal doz (LD)₅₀ dozu 833 mg/kg, i.p. LD₅₀ dozu 10,15 mg/kg subkutan LD₅₀ dozu 150 mg/kg, i.v. LD₅₀ dozu 1,6 mg/kg olarak belirtilmiştir (Anonim, 2010; Anonim, 2022a). Bu dozlar ise etkili dozların oldukça üzerindedir (Cengiz ve ark., 2020; Jiang ve ark., 2011; Singh ve ark., 2017). Escinin oral uygulamasında yüzde kızarıklık, gastrointestinal sistemde tahriş gibi nadir yan etkiler belirtilmiştir. (Küçükkurt ve ark., 2010). Subakut ve kronik toksisite çalışmalarında önemli bir toksisite gözlenmemiş, üreme ve fertilitate çalışmalarında yavrularda ve erkek fertilitesinde istenmeyen bir durum oluşmamıştır

(Sirtori, 2001). Escinin ratlarda akut oral toksisite çalışmasında 300 mg/kg dozunda herhangi bir toksisite gözlenmemiştir. Ratlarda tekrarlanan doz toksisite çalışmasında ise 28 günlük oral 5, 10, 20 mg/kg escin uygulaması biyokimyasal ve hematolojik parametreleri etkilememiş organlardaki histopatolojik değişikliklere sebep olmadığı bildirilmiştir. (Suryavanshi ve Kulkarni, 2021).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı ve Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma öncesinde Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30.09.2020 tarihli 671 sayılı kararı ile onay alındı.

Çalışmada kapsamında 40 adet Wistar-Albino rat Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Ratların barınması, bakımı, beslenmesi aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince ratlar Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen normal rasyonla *ad libitum* olarak beslenmiştir. Rutin kafeslerde kısıtlama olmadan, 12/12 saat gece/gündüz ışıklandırma ve normal havalandırma nemlendirme koşullarında barındırılmıştır. Çevreye uyumun sağlanması için ratlar bir hafta öncesinden aynı deney ortamına alınmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler **Tablo 3.1**'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Sıra No	Kimyasal madde	Marka/Model
1	Anti-IL-1 Beta Antikoru	Abcam, Ab2105
2	Anti-iNOS Antikoru	Abcam, Ab15323
3	Anti-Kaspaz-3 Antikoru	Abcam, Ab4051
4	Entellan	Merck
5	Escin	Sigma:E1378
6	EXPOSE fare ve tavşana özel HRP/DAB saptama kiti	Abcam, Ab80436
7	Formaldehit	Merck 103999
8	Fosfat Tamponu	
9	Glutasyon Peroksidaz ELISA Kiti	BT Laboratory
10	Hematoksilen-Eozin	Sigma
11	Hidrojen Peroksit	
12	Ketamin	Ketalar
13	Ksilazin	İnterhas
14	Ksilol	Merck
15	Malondialdehit ELISA Kiti	BT Laboratory
16	Metanol	Merck
17	Serum Fizyolojik	Polifarma
18	Sisplatin	Sigma $\geq 95\%$
19	Sitrat Buffer Solüsyonu (Ph 6)	
20	Süperoksit Dismutaz ELISA Kiti	BT Laboratory

3.1.3. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Çalışmada kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri **Tablo 3.2'**de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri.

Sıra No	Cihaz	Marka/Model
1	Bilgisayar	HP
2	Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
3	Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch
4	Etüv	Termal
5	Hassas terazi	BX 4200H
6	Homojenizatör	IKA
7	Işık mikroskobu	Olympus CX21
8	Kamera	Olympus DP26
9	Manyetik karıştırıcı	IKA-RH Basic 2
10	Mikrodalga fırın	Vestel
11	Otoanalizör	Randox RX Monaco
12	Otomatik pipet seti	Eppendorf
13	Ototeknikon	Leica ASP300S
14	Parafin cihazı	Lecia Histocore
15	Rotary mikrotom	Leica 2155
16	Sekiz kanallı pipet	Eppendorf
17	Soğutmalı santrifüj	Eppendorf-5810R
18	Spektrofotometre	Thermo Multiskan GO
19	Vorteks	Yellowline TTS2

3.2. Deney Grupları ve Uygulamalar

Çalışma için her biri 10 rattan oluşan toplam 4 grup oluşturuldu (**Tablo 3.3**). Gruplar kontrol, sisplatin, escin ve escin+sisplatin grubu olarak dizayn edildi. Kontrol grubuna 6 gün boyunca intraperitoneal salin uygulandı. Sisplatin grubuna deneyin 4. gününde 7,5 mg/kg dozunda i.p. olarak sisplatin tek doz uygulandı. Escin grubuna 6 gün boyunca 3,6 mg/kg/gün dozunda escin i.p. olarak uygulandı. Escin+sisplatin grubuna 6 gün boyunca 3,6 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak escin uygulandı, 4. günde escin uygulamasından 1 saat sonra 7,5 mg/kg dozunda sisplatin i.p. olarak uygulandı (**Tablo 3.3**). Tüm gruplar, intrakardiyak kan örnekleri alınarak uygulama sonrası 7. günde ketamin+ksilazin anestezisi altında servikal dislokasyon tekniği ile ötenazi edildi.

Tablo 3.3. Deney grupları.

Grup	Uygulanan Madde ve Doz	Uygulanan Günler
Kontrol	Salin, i.p.	6 gün
Sisplatin	Sisplatin - 7,5 mg/kg tek doz, i.p.	4. gün
Escin	Escin - 3,6 mg/kg c.a./gün, i.p.	6 gün
Escin+Sisplatin	Escin - 3,6 mg/kg c.a./gün, i.p.+ Sisplatin tek doz (4. Gün) 7,5 mg/kg, i.p.	6 gün + 4. gün

3.3. Yöntem

3.3.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Ratlardan 7. günde intrakardiyak kan örnekleri ketamin+ksilazin anestezisi altında steril şartlarda serum tüplerine alındı. Biyokimyasal analizler için kan örnekleri 4000 rpm’de 10 dk. +4 °C’de santrifüj edildikten sonra soğuk zincir altında biyokimyasal testler için laboratuvara gönderildi. Kan alma işlemini takiben ötenazi edilen ratların böbrek, karaciğer ve beyin dokuları alındı. Her bir doku kandan temizleninceye kadar soğuk ortamda serum fizyolojik ile yıkandı. Dokuların fazla suyu gazlı bez ile alındı. Sağ böbrekler, beyinin bir bölümü ve karaciğerin bir bölümü formaldehit çözeltisi içinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Sol böbrekler, beyinin bir bölümü ve karaciğerin bir bölümü SOD, GPx ve MDA tayini için soğuk zincir altında laboratuvara gönderildi.

Sol böbrekler, beyinin bir bölümü ve karaciğerin bir bölümü SOD, MDA ve GPx analizleri için homejenizasyon işlemine alındı. Dokular homejenizasyon öncesi tartıldı ve 1/10 oranında fosfat buffer solüsyonu (PBS)’nda (pH 7.4)’te homojenizatör yardımıyla buz üzerinde homojenize edildi. Homejenizasyon homojenat soğuk zincir korunarak +4 °C’de 10 dakika boyunca 3500 rpm’de santifüjlendi.

3.3.2. Biyokimyasal Analizler

Kreatinin, BUN, total bilirubin (TB), aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) seviyeleri otoanalizör yardımıyla (Randox Monaco) uygun ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

3.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini

Böbrek, karaciğer ve beyin dokularının SOD seviyeleri Bioassay Technology Laboratory marka SOD enzime bağlı immünosorbent tahlil (ELISA) kiti (Katolog Numarası: E0168Ra) kullanılarak standart kit protokolü ile renk değişimi absorbansları ölçülerek hesaplandı.

Bu testin prensibinde antijen-antikor kompleks oluşumları vardır. Testte kullanılan plakalar SOD antikoruna ile önceden kaplanmıştır. Numunedeki SOD oyuklardaki antikorlara bağlanır. Biotinlenmiş SOD antikoruna eklenerek örnekteki SOD'a bağlanır. Streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) eklenir ve biyotinlenmiş SOD antikoruna bağlanır. Bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir ve SOD miktarı ile orantılı renk değişimi gözlenir. Reaksiyon durdurma çözeltisiyle sonlandırılarak 450 nm absorbansta renk değişimi ölçülür.

Ticari Kit ile Sağlanan Çözeltiler:

- Standart çözelti (24 ng/mL)
- Standart seyreltici
- Standart seri (12 ng/mL, 6 ng/mL, 3 ng/mL, 1,5 ng/mL, 0,75 ng/mL)
- Streptavidin-HRP
- Durdurma çözeltisi
- Substrat çözeltisi A
- Substrat çözeltisi B
- Yıkama tamponu
- Biotinlenmiş rat SOD antikoruna

Ölçüm ve Hesaplama

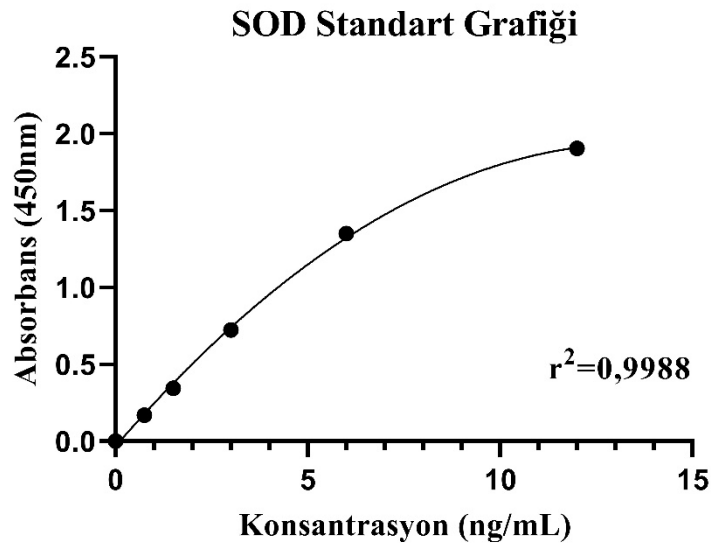
Süperoksit dismutaz enzim tayini için ticari kit ile birlikte sağlanan protokole göre yapılan işlemler **Tablo 3.4'**de verilmiştir. İşlemler 96 kuyucuklu platede gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4. SOD enzim tayini için yapılan işlemler.

Kullanılan Madde	Numune Kuyucuğu	Standart Kuyucuğu
Numune	40µl	
Standart		50µl
Anti-SOD Antikoru	10µl	
Streptavidin-HRP	50µl	50µl
Substrat çözeltisi A	50µl	50µl
Substrat çözeltisi B	50µl	50µl
Durdurma çözeltisi	50µl	50µl

Streptavidin-HRP uygulaması sonrası plate karıştırıldı ve yapışkan bant ile kapatıldı. 37 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her kuyucuk 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Substrat çözeltisi B uygulaması sonrası plate yapışkan bant ile kapatıldı ve karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Durdurma çözeltisi uygulaması sonrası plate 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Numune kuyucukları ve standartlara ait optik dansite (OD) değerlerinden kör kuyucukların OD değerlerinin ortalaması çıkarıldı. Standartların OD değerleri kullanılarak Prism – GraphPad yazılımı ile **Şekil 3.1**'de belirtilen standart grafiği oluşturuldu. Elde edilen SOD değerleri ng/mL ve kontrolün yüzdesi şeklinde verildi.



Şekil 3.1. Süperoksit Dismutaz enzim aktivitesi standart grafiği.

3.3.4. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivite Tayini

Böbrek, karaciğer ve beyin dokularının GPx seviyeleri Bioassay Technology Laboratory marka GPx ELISA kiti (Katolog Numarası: E1242Ra) kullanılarak standart kit protokolü ile renk değişimi absorbanları ölçülerek hesaplandı.

Bu testin prensibinde antijen-antikor kompleks oluşumları vardır. Testte kullanılan plakalar GPx antikoruna ile önceden kaplanmıştır. Numunedeki GPx oyuklardaki antikorlara bağlanır. Biotinlenmiş GPx antikoruna eklenerek örnekteki GPx'e bağlanır. Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş GPx antikoruna bağlanır. Bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir ve GPx miktarı ile orantılı renk değişimi gözlenir. Reaksiyon durdurma çözeltisiyle sonlandırılarak 450 nm absorbansta renk değişimi ölçülür.

Ticari Kit ile Sağlanan Çözeltiler:

- Standart çözelti (240 ng/mL)
- Standart seyreltici
- Standart seri (120 ng/mL, 60 ng/mL, 30 ng/mL, 15 ng/mL, 7,5 ng/mL)
- Streptavidin-HRP
- Durdurma çözeltisi
- Substrat çözeltisi A
- Substrat çözeltisi B
- Yıkama tamponu
- Biotinlenmiş rat GPx antikoruna

Ölçüm ve Hesaplama

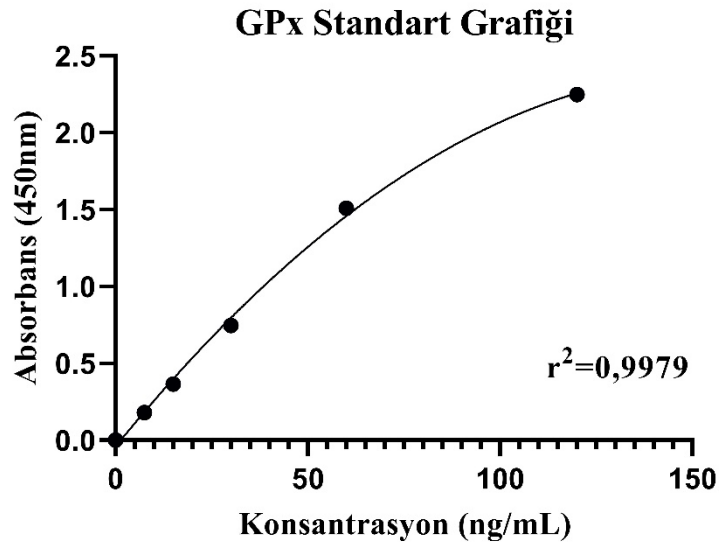
Glutasyon peroksidaz enzim tayini için ticari kit ile birlikte sağlanan protokole göre yapılan işlemler **Tablo 3.5'**de verilmiştir. İşlemler 96 kuyucuklu platede gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. GPx enzim tayini için yapılan işlemler.

Kullanılan Madde	Numune Kuyucuğu	Standart Kuyucuğu
Numune	40µl	
Standart		50µl
Anti-GPx Antikoru	10µl	
Streptavidin-HRP	50µl	50µl
Substrat çözeltisi A	50µl	50µl
Substrat çözeltisi B	50µl	50µl
Durdurma çözeltisi	50µl	50µl

Streptavidin-HRP uygulaması sonrası plate karıştırıldı ve yapışkan bant ile kapatıldı. 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her kuyucuk 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Substrat çözeltisi B uygulaması sonrası plate yapışkan bant ile kapatıldı ve karanlıkta 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Durdurma çözeltisi uygulaması sonrası plate 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Numune kuyucukları ve standartlara ait OD değerlerinden kör kuyucukların OD değerlerinin ortalaması çıkarıldı. Standartların OD değerleri kullanılarak Prism – GraphPad yazılımı ile **Şekil 3.2**’de belirtilen standart grafiği oluşturuldu. Elde edilen GPx değerleri ng/mL ve kontrolün yüzdesi şeklinde verildi.



Şekil 3.2. Glutatyon Peroksidaz enzim aktivitesi standart grafiği.

3.3.5. Malondialdehit (MDA) Tayini

Böbrek, karaciğer ve beyin dokularının MDA seviyeleri Bioassay Technology Laboratory marka MDA ELISA kiti (Katolog Numarası: E0156Ra) kullanılarak standart kit protokolü ile renk değişimi absorbanları ölçülerek hesaplandı.

Bu testin prensibinde antijen-antikor kompleks oluşumları vardır. Testte kullanılan plakalar MDA antikoruna ile önceden kaplanmıştır. Numunedeki MDA oyuklardaki antikorlara bağlanır. Biotinlenmiş MDA antikoruna eklenerek örnekteki MDA'ya bağlanır. Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş MDA antikoruna bağlanır. Bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu eklenir ve MDA miktarı ile orantılı renk değişimi gözlenir. Reaksiyon durdurma çözeltisiyle sonlandırılarak 450 nm absorbansta renk değişimi ölçülür.

Ticari Kit ile Sağlanan Çözeltiler:

- Standart çözelti (12,8 nmol/mL)
- Standart seyreltici
- Standart seri (6,4 nmol/mL, 3,2 nmol/mL, 1,6 nmol/mL, 0,8 nmol/mL, 0,4 nmol/mL)
- Streptavidin-HRP
- Durdurma çözeltisi
- Substrat çözeltisi A
- Substrat çözeltisi B
- Yıkama tamponu
- Biotinlenmiş rat MDA antikoruna

Ölçüm ve Hesaplama

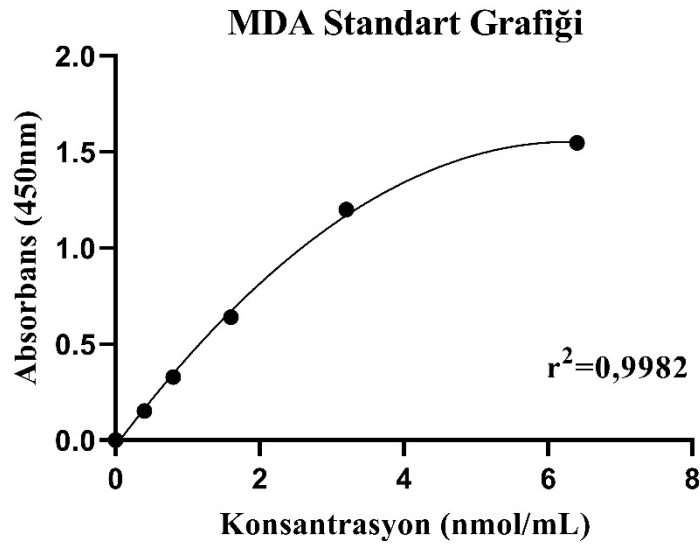
Malondialdehit konsantrasyonu ölçümünde ticari kit ile birlikte sağlanan protokole göre yapılan işlemler **Tablo 3.6**'da verilmiştir. İşlemler 96 kuyucuklu platede gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. MDA kontrasyonu ölçümünde yapılan işlemler.

Kullanılan Madde	Numune Kuyucuğu	Standart Kuyucuğu
Numune	40µl	
Standart		50µl
Anti-MDA Antikoru	10µl	
Streptavidin-HRP	50µl	50µl
Substrat çözeltisi A	50µl	50µl
Substrat çözeltisi B	50µl	50µl
Durdurma çözeltisi	50µl	50µl

Streptavidin-HRP uygulaması sonrası plate karıştırıldı ve yapışkan bant ile kapatıldı. 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her kuyucuk 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Substrat çözeltisi B uygulaması sonrası plate yapışkan bant ile kapatıldı ve karanlıkta 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Durdurma çözeltisi uygulaması sonrası plate 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Numune kuyucukları ve standartlara ait OD değerlerinden kör kuyucukların OD değerlerinin ortalaması çıkarıldı. Standartların OD değerleri kullanılarak Prism – GraphPad yazılımı ile **Şekil 3.3**’de belirtilen standart grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen MDA değerleri nmol/mL ve kontrolün yüzdesi şeklinde verildi.



Şekil 3.3. Malondialdehit standart grafiği.

3.3.6. Histopatolojik Yöntem

Nekropsi sırasında ratlardan alınan beyin, karaciğer ve böbrek dokuları %10 tamponlu formaldehid solüsyonunda tespit edildi. Ertesi gün dokulardan örneklemeler yapılarak doku takip kasetlerine alındı. İki gün daha formaldehid içinde tespit işlemine devam edildi ardından kasetler tam otomatik doku takip cihazına yerleştirilerek rutin doku takip işlemlerinden geçirildi. Dokuların daha iyi hazırlanması için vakumlu takip programına seçildi. Doku takibi işleminde kasetler gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek organlardaki yağın alınması ve sıcak parafinden geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Ertesi sabah dokuların blokajı için takip cihazından alınarak parafin cihazının sıcak haznesine yerleştirildi ve parafine blokajları gerçekleştirildi. Parafine gömülen bloklar parafin cihazının soğuk tabla bölümüne alındı ve birkaç saat bekletilerek parafinin donması sağlandı. Bloklar ardından buzdolabına alındı ve bir gün boyunca soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotomda 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin kuruması için bir gece oda ısısında bekletildi.

Ertesi gün kesitler hematoksilin-eozin (HE) boyama için köprülere dizilerek boyama prosedürüne geçildi. Kesitler parafinin uzaklaştırılması için otuzar dakika süre ile 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi. Ardından sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkollerden geçirilerek dokulara su verildi. Daha sonra HE ile boyandı. Bunun ardından sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden geçirilen dokuların suyu alındı. Ksilolde parlatılan dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı. Boyamanın ardından bir gün kurutulan kesitler mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirildi. Olympus CX21 model ışık mikroskobunda incelenen preparatlar Olympus DP26 model kamera ile mikroskobik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.3.7. İmmunohistokimya

Bu çalışmada immunoperoksidaz inceleme için streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz metodu kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için parafin bloklardan

3 seri kesit alındı. Kesitler kaspaz-3 [Anti-kaspaz-3 antikoru (ab4051), Abcam, İngiltere 1/100 dilüsyon], IL-1 β [Anti-IL1 β antikoru (ab2105), 1/100 dilüsyon] ve iNOS [anti-iNOS antikoru (ab15323), 1/100 dilüsyon] ekspresyonlarının saptanması için immunohistokimyasal olarak boyandı. Sekonder kit olarak EXPOSE fare ve tavşana özel HRP/DAB saptama immunohistokimya kiti (ab80436) ve kromojen olarak DAB (3,3-diaminobenzidine) kullanıldı. Tüm primer ve sekonder antikolar Abcam, İngiltere firmasından sağlandı. Negatif kontroller için dokular primer antikolar yerine antikor sulandırma sıvıları ile inkübe edildi.

İmmunohistokimyasal incelemeler için polilizinli lamlara alınan seri kesitler bir gün boyunca oda sıcaklığında bir gece boyunca 50 °C’de etüvde kurutuldu. Ertesi sabah etüvden çıkarılan ve soğutulan kesitler boyama prosedürüne alındı. Bu amaçla boyama sepetlerine dizilen kesitler ksilol ve derecesi azalan seri alkollerden geçirilerek deparafinize ve rehidre edildi. Ardından kesitler distile su ile 10 dakika boyunca yıkandı. Kesitlerdeki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3’lük metanol içinde hazırlanmış H₂O₂’de 20 dakika bekletildi. Daha sonra tüm kesitler onar dakika süreyle 2 defa taze hazırlanmış PBS’de yıkandı. Hemen ardından kesitler mikrodalga fırında iki defa 5 dakika süreyle sitrat buffer solüsyonu (pH 6) ile 700’lük ayarda kaynatıldı. Soğutulan dokular onar dakika süreyle 2 defa PBS’de yıkandı. Ardından 20 dakika süreyle normal serumda inkübe edilerek non spesifik boyanmaların önüne geçildi. Nemli kamaraya alınan kesitler üzerine yıkama yapılmadan primer serumlar damlatıldı ve gece boyunca +4 °C’de buzdolabında inkübe edildi. Ertesi sabah buzdolabından alınan dokular aynı şekil ve süreyle PBS’de yıkandı. Ardından 30 dakika süreyle biotinli serum ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda PBS ile onar dakika boyunca 2 defa yıkandı. Daha sonra kesitler yine nemli kamara içinde 30 dakika süreyle streptoavidin ile muamele edildi. Tekrar aynı şekil ve süreyle PBS tamponu içinde yıkandı. Ardından 1 ml sulandırma solusyonuna 1 substrat damla olacak şekilde yeni hazırlanmış DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojen ile boyandı. Karşıt boyamalar Harris hematoksilen ile yapıldı ardından kurutulup kapatılan tüm preparatlar ışık mikroskobunda incelendi.

İmmunohistokimyasal boyanmaların şiddeti 0-3 arasında skorlandı. 0=boyama yok, 1=hafif boyanma, 2=orta şiddette boyama ve 3=şiddetli boyama olarak

değerlendirildi. Gruplar arası farkların belirlenmesi için elde edilen verilere istatistik analizler yapıldı ve tablollaştırıldı. Morfometrik analizler ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co., Tokyo, Japan) kullanıldı.

3.4. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi SPSS-20 programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılım (parametrik) gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile analiz edildi. Biyokimyasal sonuçlar, SOD, GPx, MDA düzeyleri normal dağılım gösterdiği için One-Way ANOVA ve ardından Tukey testi ile değerlendirildi. Patolojik skorlamalar normal dağılım göstermediği için Kruskal-Wallis testi ve Bronner düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. “ $p<0,05$ ” olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi.

SOD, GPx ve MDA absorbans değerlerinden ng/mL ve nmol/mL cinsinden değerlerin hesaplanmasında Prism – GraphPad yazılımı kullanıldı.

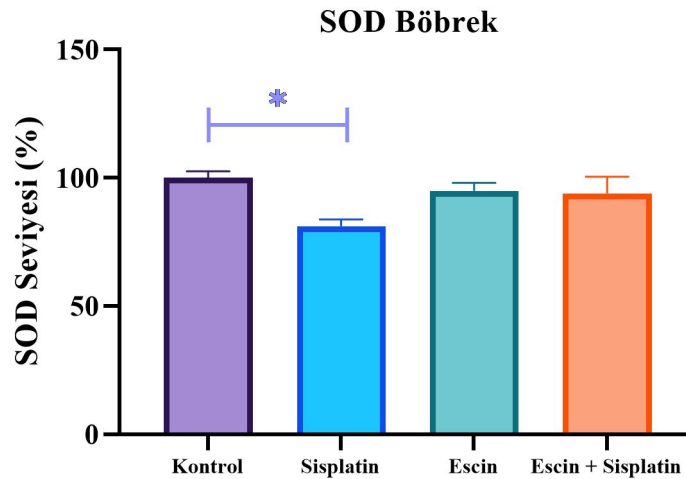
4. BULGULAR

4.1. SOD, GPx Aktivitesi ve MDA Seviyeleri

4.1.1. Böbrek SOD, GPx Aktivitesi ve MDA Seviyeleri

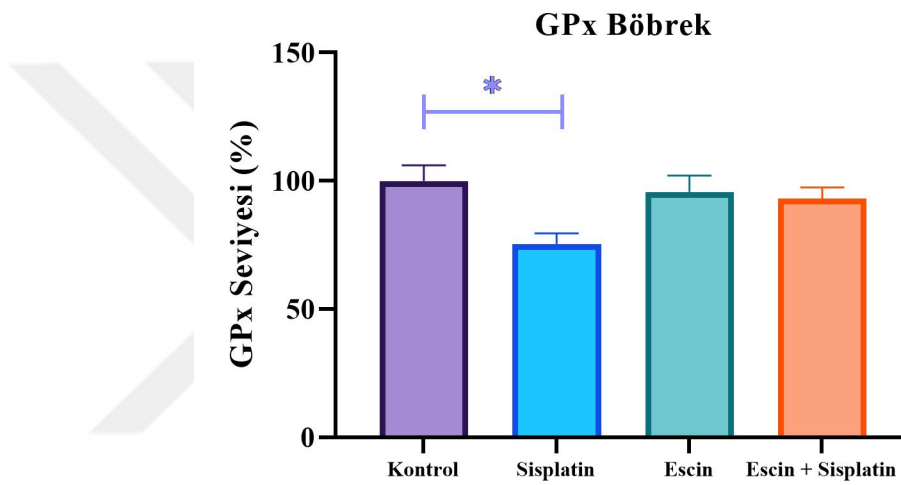
Böbrek dokusundaki SOD seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$). GPx seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Böbrek dokusunda MDA seviyeleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermiştir ($p<0,05$).

Böbrek dokusundaki SOD seviyeleri karşılaştırıldığında sisplatin grubu kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p<0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının böbreklerindeki SOD seviyelerinde kontrol ve sisplatin gruplarına göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının SOD seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Böbrek dokusundaki SOD seviyeleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir. **Şekil 4.1**'de böbrek dokusundaki SOD seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



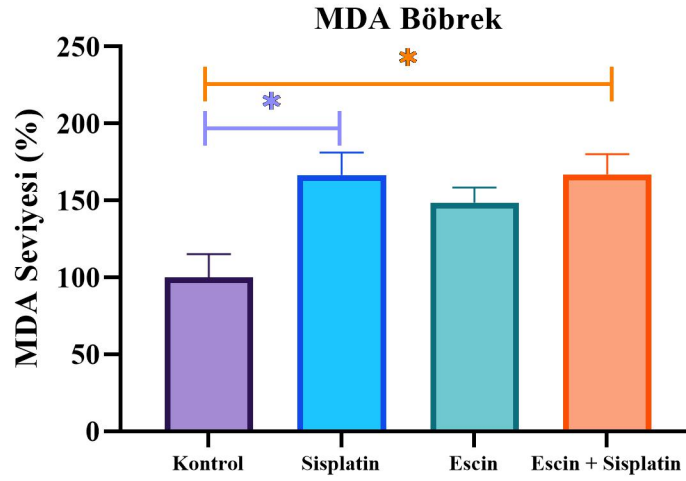
Şekil 4.1. Böbrek dokusu SOD seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Böbrek dokusundaki GPx seviyeleri incelendiğinde sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının böbreklerindeki GPx seviyelerinde kontrol ve sisplatin gruplarına göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının GPx seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Böbrek dokusundaki GPx seviyeleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir. **Şekil 4.2**'de böbrek dokusundaki GPx seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Böbrek dokusu GPx seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Böbrek dokusundaki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında sisplatin ve escin+sisplatin grupları kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p<0,05$). Escin grubundaki MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Sisplatin, escin ve escin+sisplatin gruplarının böbreklerindeki MDA seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Böbrek dokusundaki MDA seviyeleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir. **Şekil 4.3**'de böbrek dokusundaki MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Böbrek dokusu MDA seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.1. Deney gruplarının böbrek SOD, GPx ve MDA seviyeleri.

GRUPLAR	SOD	GPx	MDA
Kontrol	47,20±1,18 ^a	363,61±21,92 ^a	14,07±2,13 ^a
Sisplatin	38,31±1,24 ^b	273,27±16,08 ^b	23,43±2,05 ^b
Escin	44,80±1,52 ^{ab}	348,02±23,28 ^{ab}	20,91±1,39 ^{ab}
Escin+Sisplatin	44,34±3,07 ^{ab}	338,33±15,77 ^{ab}	23,49±1,86 ^b

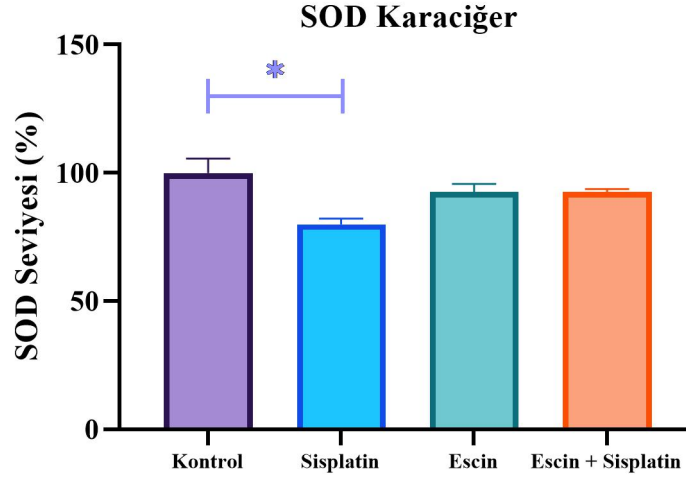
Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Üst simgeleri aynı olan gruplar istatistiki açıdan benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$). SOD (ng/mL), GPx (ng/mL) ve MDA (nmol/mL).

4.1.2. Karaciğer SOD, GPx Aktivitesi ve MDA Seviyeleri

Karaciğer dokusundaki SOD seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$). Glutasyon peroksidaz seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Karaciğer dokusunda MDA seviyeleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermiştir ($p<0,05$).

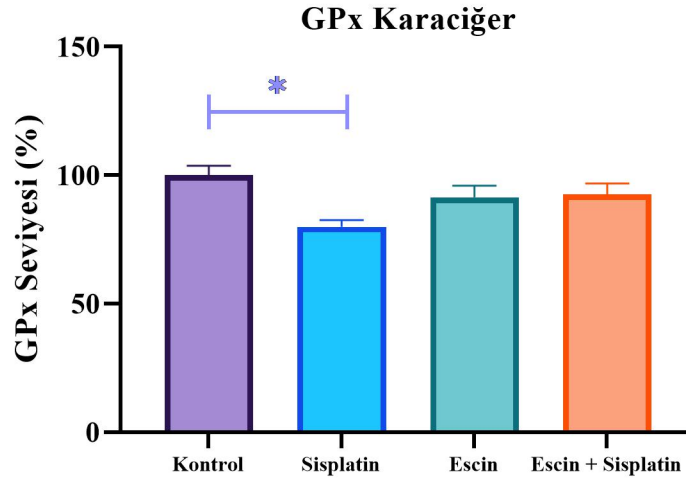
Karaciğer dokusundaki SOD seviyeleri karşılaştırıldığında sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının karaciğerlerindeki SOD seviyeleri kontrol ve sisplatin gruplarına göre anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının karaciğer SOD seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

($p>0,05$). Karaciğer dokusundaki SOD seviyeleri **Tablo 4.2**'de verilmiştir. **Şekil 4.4**'de karaciğer dokusundaki SOD seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



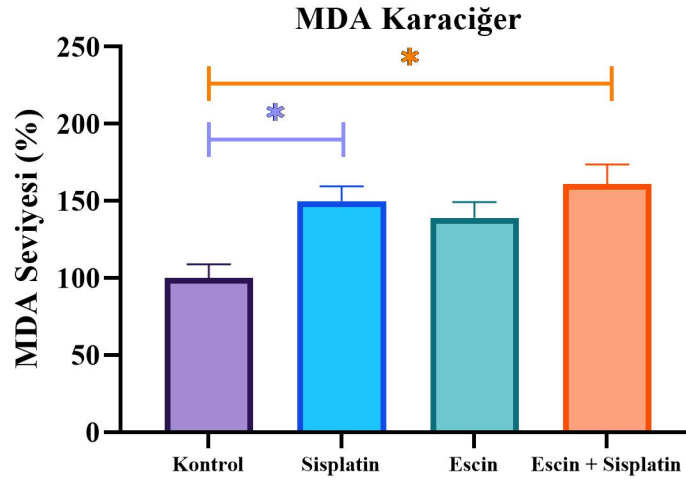
Şekil 4.4. Karaciğer dokusu SOD seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Karaciğer dokusundaki GPx seviyeleri incelendiğinde sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir ($p<0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının karaciğerlerindeki GPx seviyelerinde kontrol ve sisplatin gruplarına göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının karaciğer GPx seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Karaciğer dokusundaki GPx seviyeleri **Tablo 4.2**'de verilmiştir. **Şekil 4.5**'de karaciğer dokusundaki GPx seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Karaciğer dokusu GPx seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Karaciğer dokusundaki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında sisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir ($p<0,05$). Escin+sisplatin grubunun MDA seviyeleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiştir ($p<0,05$). Escin grubunun karaciğer MDA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Sisplatin, escin ve escin+sisplatin gruplarının karaciğer MDA seviyeleri birbirine kıyasla anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Karaciğer dokusundaki MDA seviyeleri **Tablo 4.2**'de verilmiştir. **Şekil 4.6**'da karaciğer dokusundaki MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Karaciğer dokusu MDA seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.2. Deney gruplarının karaciğer SOD, GPx ve MDA seviyeleri.

GRUPLAR	SOD	GPx	MDA
Kontrol	56,98±3,20 ^a	459,90±17,00 ^a	13,92±1,23 ^a
Sisplatin	45,54±1,30 ^b	367,46±12,21 ^b	20,85±1,36 ^b
Escin	52,77±1,77 ^{ab}	420,53±20,45 ^{ab}	19,35±1,44 ^{ab}
Escin+Sisplatin	52,73±0,67 ^{ab}	425,49±19,87 ^{ab}	22,40±1,77 ^b

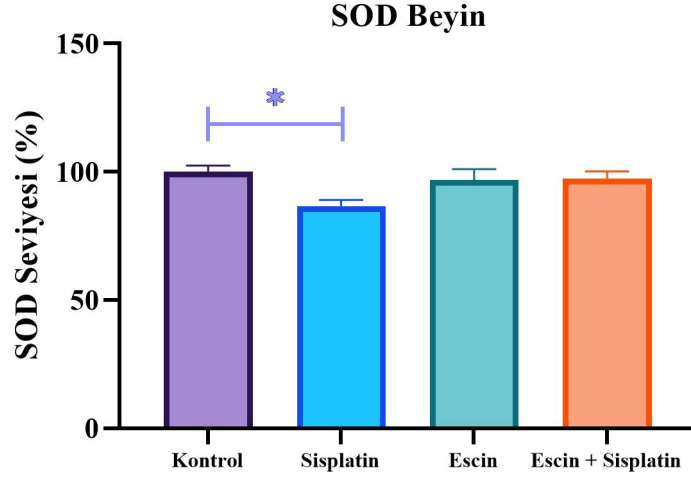
Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Üst simgeleri aynı olan gruplar istatistiki açıdan benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$). SOD (ng/mL), GPx (ng/mL) ve MDA (nmol/mL).

4.1.3. Beyin SOD, GPx Aktivitesi ve MDA Seviyeleri

Beyin dokusundaki SOD seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Glutatyon peroksidaz seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Beyin dokusunda MDA seviyeleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermiştir ($p<0,05$).

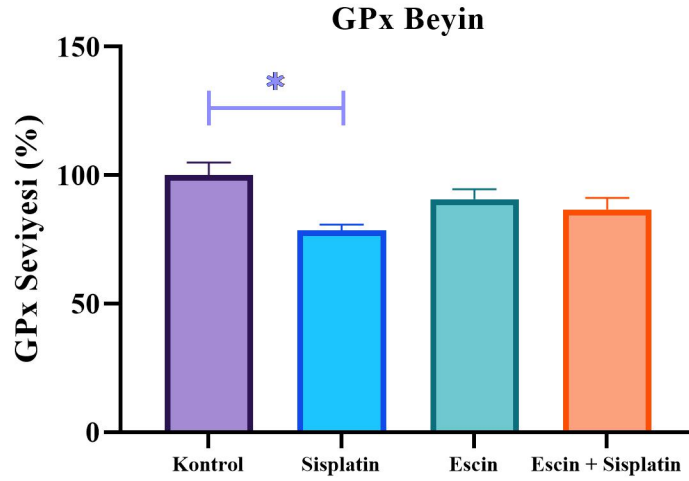
Beyin dokusundaki SOD seviyeleri karşılaştırıldığında sisplatin grubu kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p<0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının beyinlerindeki SOD seviyelerinde kontrol ve sisplatin gruplarına göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının SOD seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Beyin

dokusundaki SOD seviyeleri **Tablo 4.3**'de verilmiştir. **Şekil 4.7**'de beyin dokusundaki SOD seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



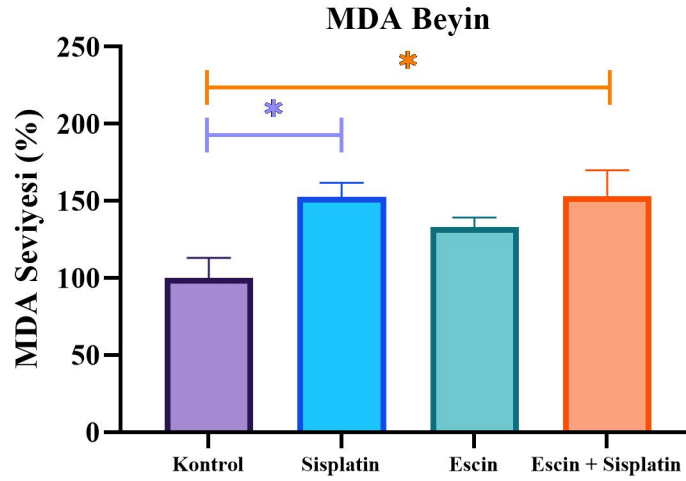
Şekil 4.7. Beyin dokusu SOD seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Beyin dokusundaki GPx seviyeleri incelendiğinde sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir ($p<0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının beyinlerindeki GPx seviyelerinde kontrol ve sisplatin gruplarına göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Escin ve escin+sisplatin gruplarının SOD seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Beyin dokusundaki GPx seviyeleri **Tablo 4.3**'de verilmiştir. **Şekil 4.8**'de beyin dokusundaki GPx seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Beyin dokusu GPx seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Beyin dokusundaki MDA seviyeleri karşılaştırıldığında sisplatin ve escin+sisplatin grupları kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p<0,05$). Escin grubunun MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Sisplatin, escin ve escin+sisplatin gruplarının beyinlerindeki MDA seviyelerinde birbirine kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Beyin dokusundaki MDA seviyeleri **Tablo 4.3**'de verilmiştir. **Şekil 4.9**'da beyin dokusundaki MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre yüzdelik değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Beyin dokusu MDA seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak kontrolün yüzdesi şeklinde verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.3. Deney gruplarının beyin SOD, GPx ve MDA seviyeleri.

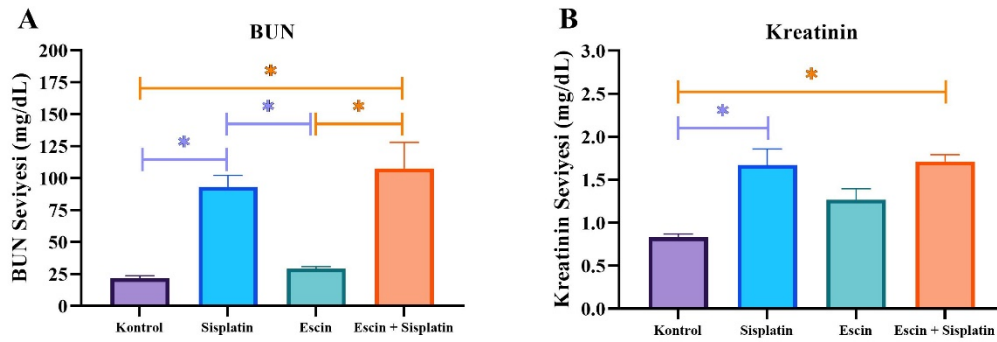
GRUPLAR	SOD	GPx	MDA
Kontrol	53,15±1,32 ^a	418,43±20,84 ^a	14,71±1,92 ^a
Sisplatin	46,08±1,26 ^b	328,83±9,25 ^b	22,45±1,35 ^b
Escin	51,47±2,21 ^{ab}	379,64±16,10 ^{ab}	19,58±0,91 ^{ab}
Escin+Sisplatin	51,77±1,47 ^{ab}	362,61±18,79 ^{ab}	22,54±2,43 ^b

Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Üst simgeleri aynı olan gruplar istatistiki açıdan benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$). SOD (ng/mL), GPx (ng/mL) ve MDA (nmol/mL).

4.2. Serum Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Serum BUN seviyeleri arasında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Sisplatin grubundaki BUN seviyeleri kontrol ve escin gruplarına kıyasla bir şekilde yükselmiştir ($p<0,05$). Escin+sisplatin grubunun BUN seviyelerinde kontrol ve escin gruplarına göre anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol ve escin gruplarında birbirine kıyasla serum BUN seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Escin+sisplatin ve sisplatin gruplarında birbirine kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Serum BUN seviyeleri **Tablo 4.4** ve **Şekil 4.10**'da verilmiştir.

Serum kreatinin seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sisplatin grubundaki kreatinin seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p<0,05$). Escin+sisplatin grubundaki kreatinin seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükselmiştir ($p<0,05$). Escin grubu ile hiçbir grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Escin+sisplatin ve sisplatin grupları arasında birbirine kıyasla kreatinin seviyeleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Serum kreatinin seviyeleri **Tablo 4.4** ve **Şekil 4.10**'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Serum (A) BUN ve (B) kreatinin seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.4. Deney gruplarının serum BUN ve kreatinin seviyeleri.

GRUPLAR	BUN	Kreatinin
Kontrol	21,89±1,84 ^a	0,83±0,04 ^a
Sisplatin	93,29±8,93 ^b	1,67±0,19 ^b
Escin	29,28±1,62 ^a	1,27±0,13 ^{ab}
Escin+Sisplatin	107,63±20,47 ^b	1,71±0,08 ^b

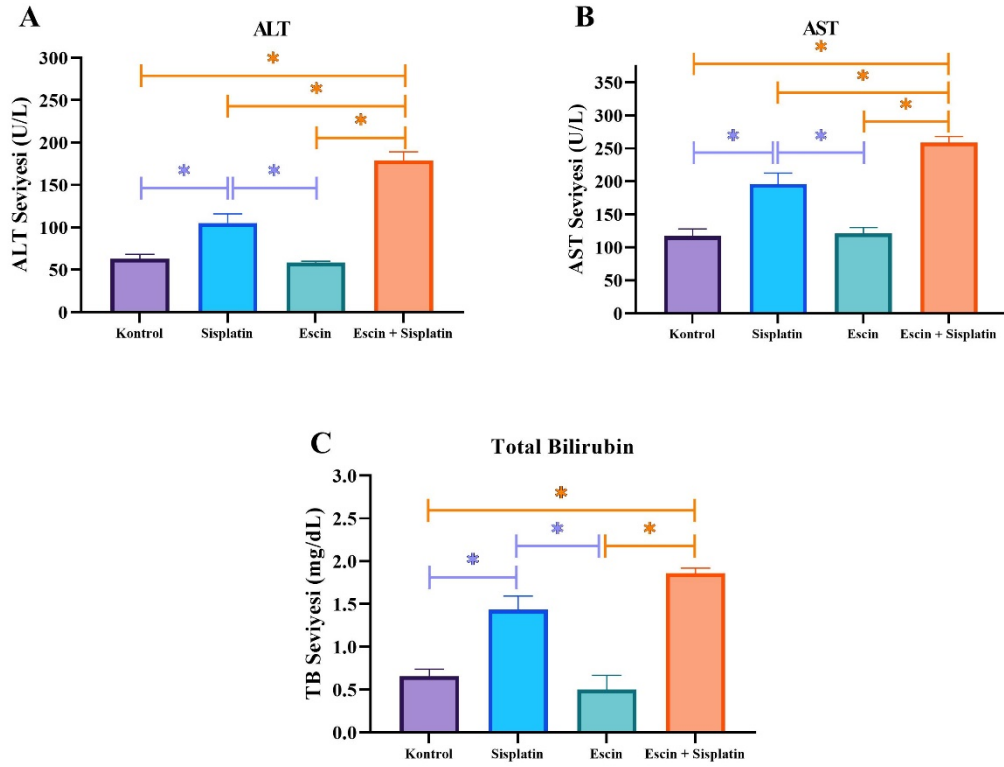
Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Üst simgeleri aynı olan gruplar istatistiki açıdan benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$). BUN (mg/dL) ve kreatinin (mg/dL).

Serum TB seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$). Escin+sisplatin ve sisplatin gruplarının TB seviyeleri kontrol ve escin gruplarına göre anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p<0,05$). Escin+sisplatin ve sisplatin grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Escin ve kontrol grupları

arasında birbirine kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Serum TB seviyeleri **Tablo 4.5** ve **Şekil 4.11**'de verilmiştir.

Serum ALT seviyeleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermiştir ($p<0,05$). Escin+sisplatin grubunda kontrol, sisplatin ve escin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sisplatin grubundaki ALT seviyeleri kontrol ve escin gruplarına göre anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p<0,05$). Escin ve kontrol gruplarında birbirine kıyasla anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Serum ALT seviyeleri **Tablo 4.5** ve **Şekil 4.11**'de verilmiştir.

Serum AST seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Escin+sisplatin grubu kontrol ve escin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p<0,05$). Escin+sisplatin grubundaki AST seviyelerinde sisplatin grubuna göre anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir ($p<0,05$). Sisplatin grubu kontrol ve escin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p<0,05$). Escin ve kontrol grupları birbirine kıyasla anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$). Serum AST seviyeleri **Tablo 4.5** ve **Şekil 4.11**'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Serum (A) ALT, (B) AST ve (C) TB seviyeleri. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

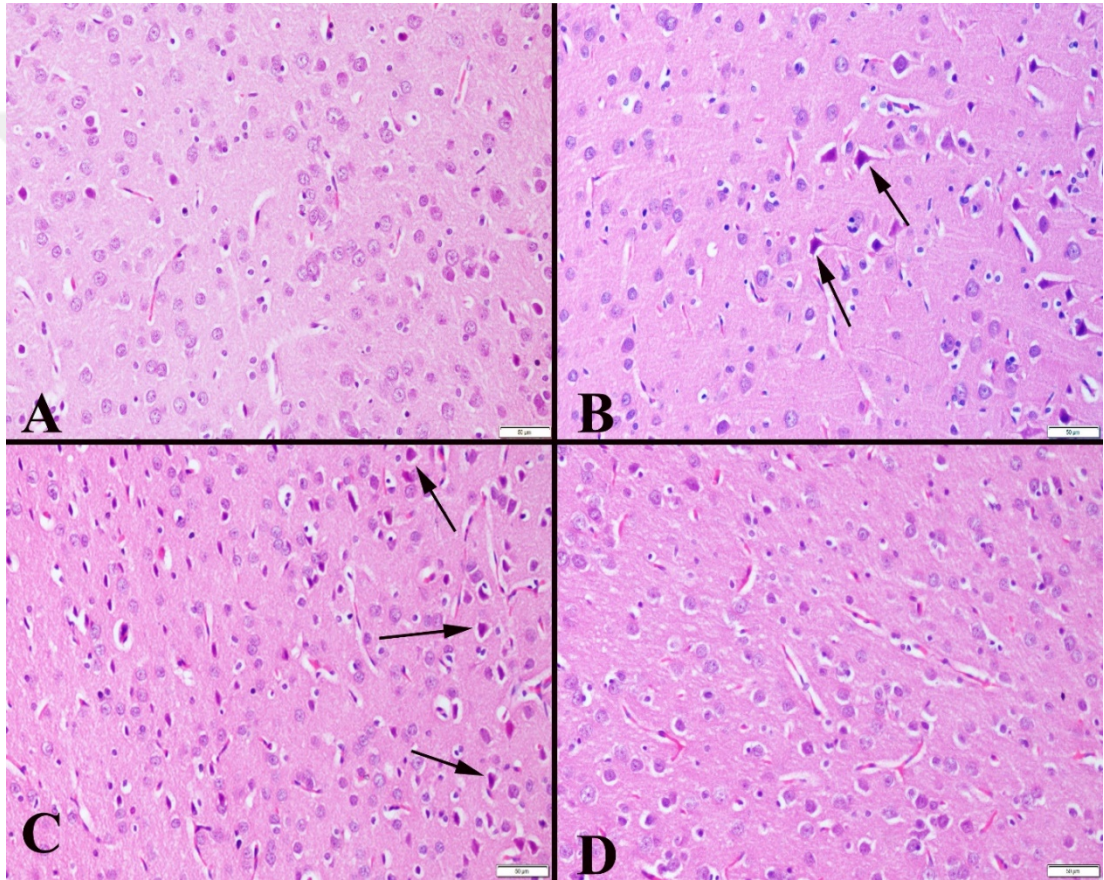
Tablo 4.5. Deney gruplarının serum TB, ALT ve AST seviyeleri.

GRUPLAR	TB	ALT	AST
Kontrol	0,66±0,08 ^a	62,93±5,11 ^a	116,97±10,85 ^a
Sisplatin	1,43±0,16 ^b	105,08±10,90 ^b	196,20±16,36 ^b
Escin	0,50±0,17 ^a	58,42±1,83 ^a	121,22±8,83 ^a
Escin+Sisplatin	1,86±0,06 ^c	178,88±10,31 ^c	258,77±9,67 ^b

Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Üst simgeleri aynı olan gruplar istatistiki açıdan benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$). TB (mg/dL), ALT (U/L) ve AST (U/L).

4.3. Histopatolojik Bulgular

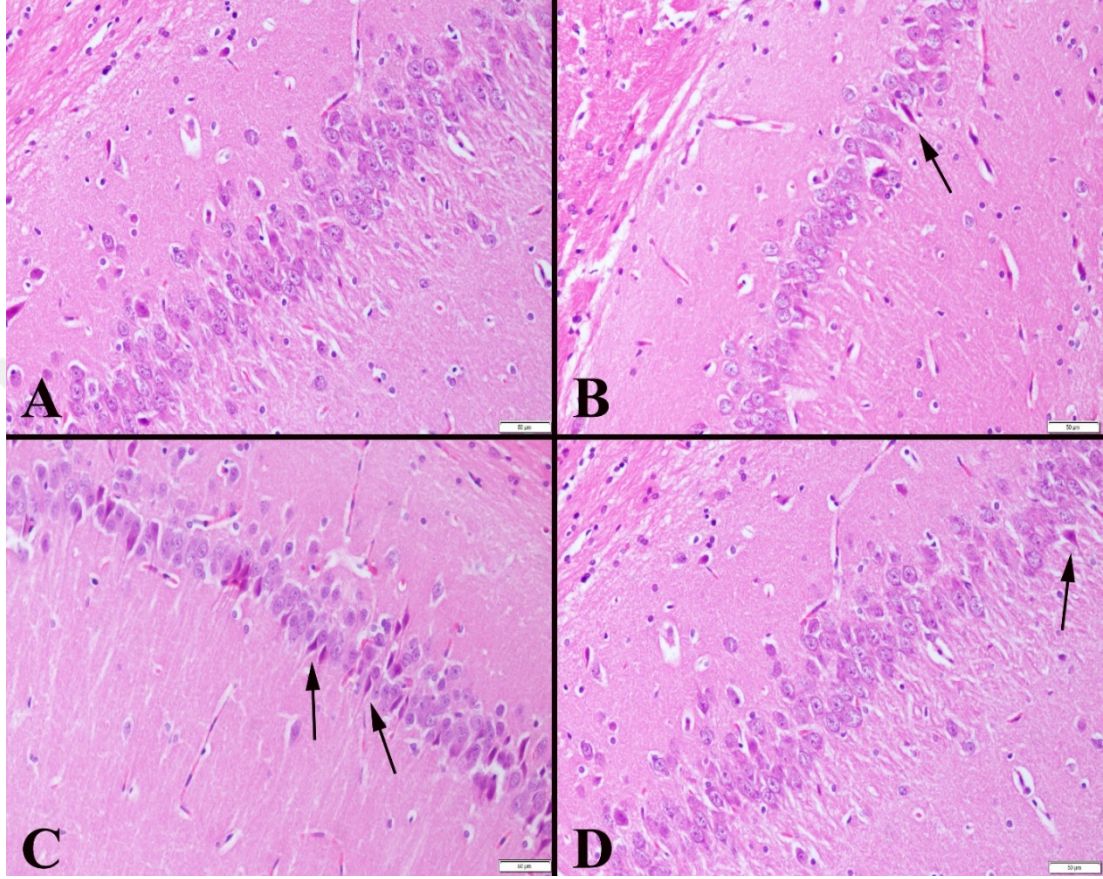
Beyin örneklerinin histopatolojik incelemesinde kontrol grubunda normal beyin histolojisi saptandı. Sisplatin grubunda çok sayıda nöronda dejeneratif ve nekrotik değişiklikler gözlemlendi. Özellikle bu nekrotik nöronlar çevresinde boşluklar dikkati çekti. Escin+sisplatin grubunda dejeneratif ve nekrotik nöronlarda belirgin bir artış gözlemlendi. Escin grubunda hiperemi ve daha az sayıda olmak üzere nöronlarda dejeneratif değişiklikler saptandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Gruplara göre beyin kortekslerinin histopatolojik görünümü. (A) Kontrol grubunda normal beyin histolojisi, (B) sisplatin grubunda çok sayıda dejeneratif nöronlar (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda belirgin şekilde artmış dejeneratif ve nekrotik nöronların görünümü, (D) escin grubunda hiperemik beyin görünümü, HE, Barlar=50µm.

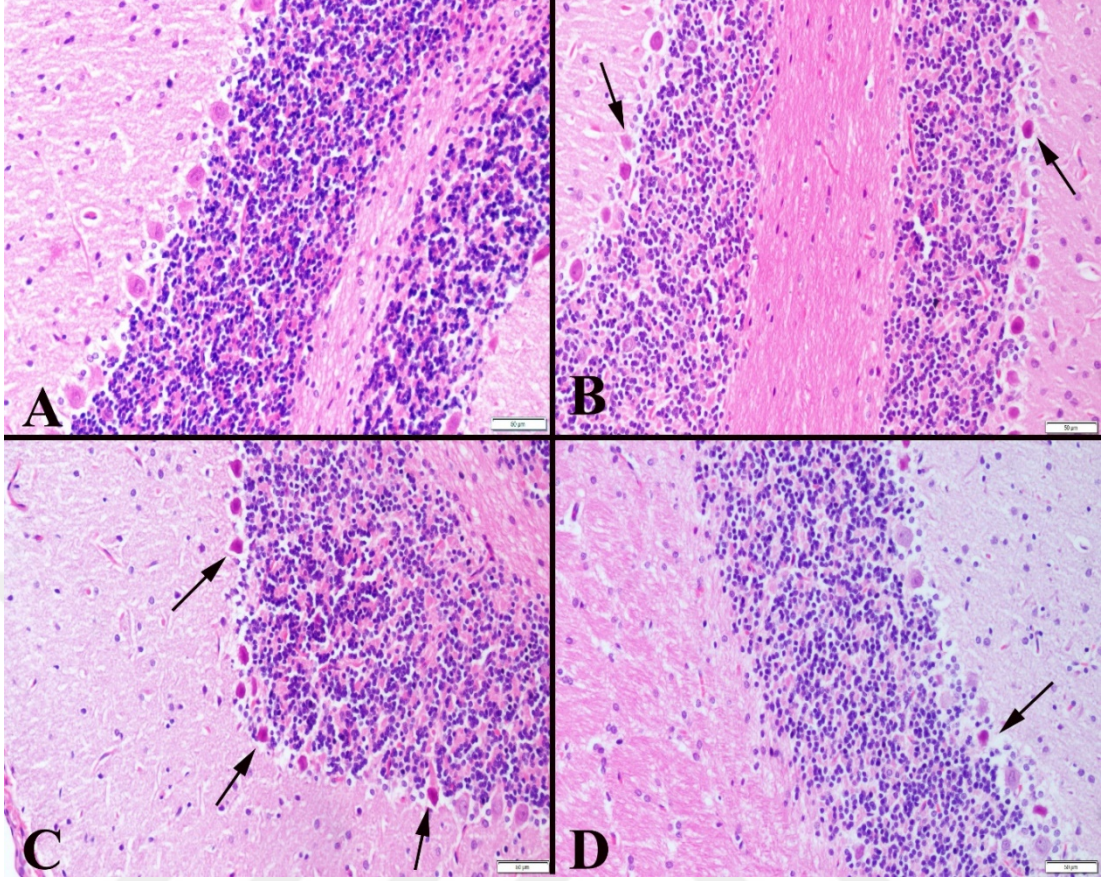
Hipokampuslar incelendiğinde kontrol grubunda normal histolojik yapı gözlenirken sisplatin grubunda damarlarda hiperemi yanı sıra az sayıda dejeneratif ve nekrotik değişiklikler gösteren nöronlar dikkati çekti. Escin+sisplatin grubunda

dejeneratif ve nekrotik nöronlarda oldukça belirgin bir artış dikkati çekti. Escin grubunda hiperemi ve daha az sayıda olmak üzere nöronlarda dejeneratif değişiklikler saptandı (Şekil 4.13).



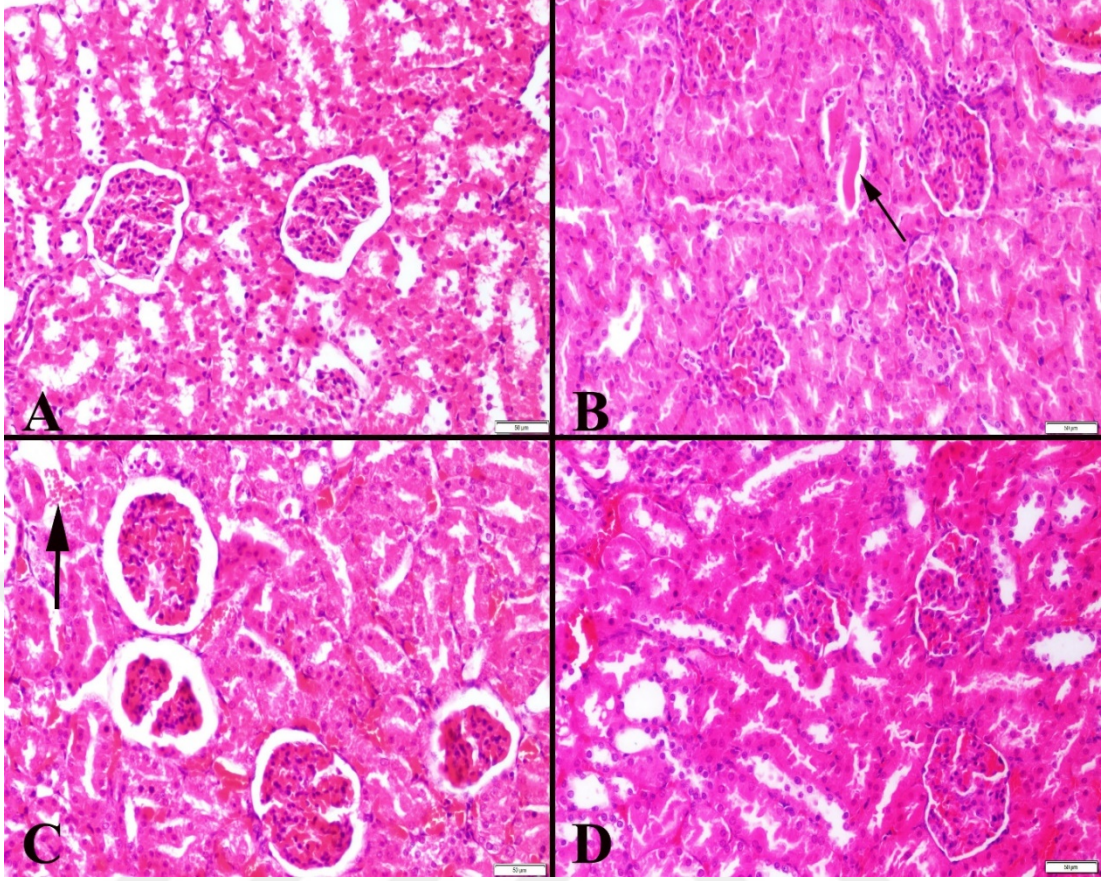
Şekil 4.13. Hipokampusların gruplar arasında mikroskopik görünüşleri. (A) Kontrol grubunda normal doku histolojisi, (B) sisplatin grubunda az sayıda dejeneratif nöronlar (ok), (C) escin+sisplatin grubunda belirgin şekilde artmış dejeneratif ve nekrotik nöronların görünümü (oklar), (D) escin grubunda dejeneratif nöronların görünümü, HE, Barlar=50µm.

Gruplara göre beyincikler histopatolojik olarak incelendiğinde kontrol grubunda herhangi bir patolojik bulgu gözlenmezken diğer gruplarda özellikle Purkinje hücrelerinde belirgin şekilde dejeneratif değişiklikler dikkati çekti (Şekil 4.14).



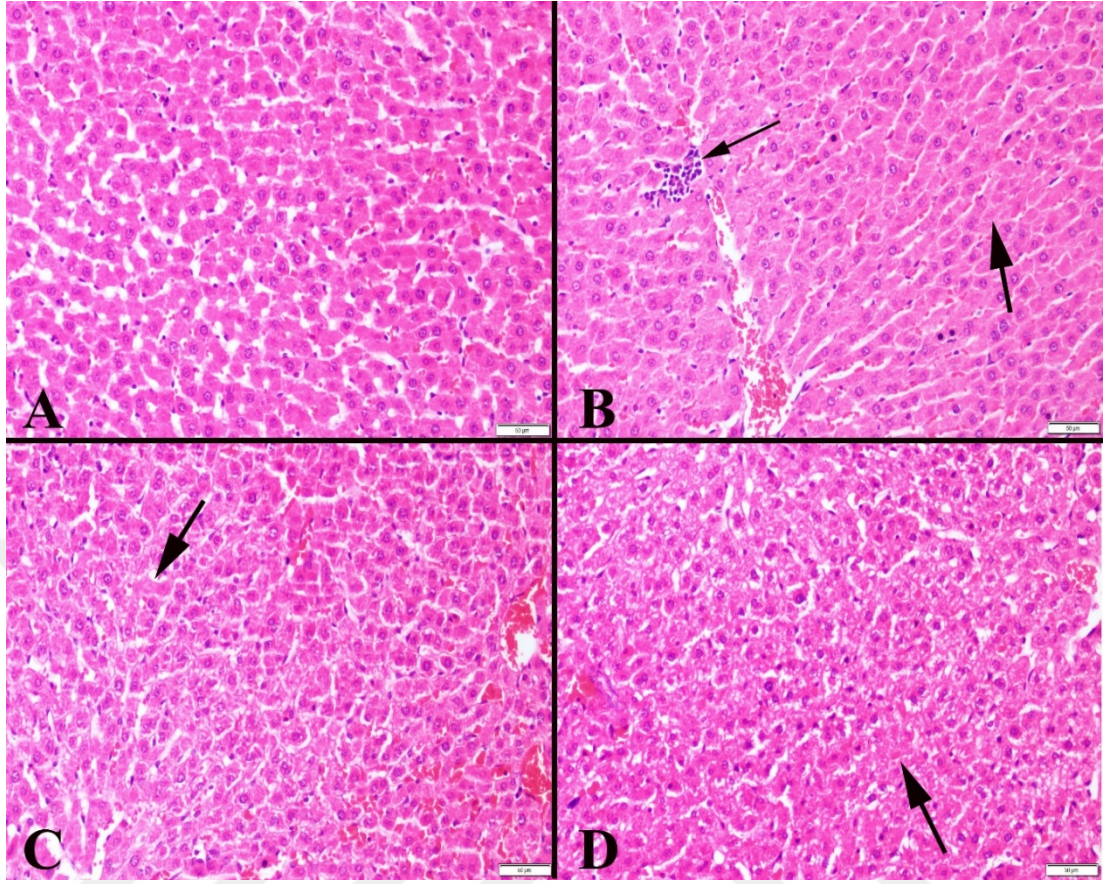
Şekil 4.14. Gruplara göre beyinciklerin histopatolojik görünüşleri. (A) Kontrol grubunda normal doku histolojisi, (B) sisplatin grubunda bazı Purkinje hücrelerinde dejeneratif değişiklikler (ok), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda Purkinje hücresinde dejeneratif ve nekrotik görünüm (oklar), (D) escin grubunda dejeneratif nöronların görünümü, HE, Barlar=50µm.

Böbreklerin mikroskopik incelemesinde kontrol grubunda normal böbrek histolojisi dikkati çekti. Sisplatin grubunda glomerulus ve tübül hücrelerinde şişkinlik ve Bowman boşluğuna daralma gözlemlendi. Yer yer bazı tübül lümenlerinde proteinöz materyaller saptandı. Damarlar hiperemik bir görünümdeydi. Escin+sisplatin grubunda benzer bulguların daha şiddetli şekilde geliştiği gözlemlendi. Bazı ratlarda hücrelerde nekrotik değişiklikler de saptandı. Az sayıda hayvanda lezyonlar daha şiddetliydi ve bu hayvanların böbreklerinde kanamalar dikkati çekti. Escin grubunda ise hücre şişmeleri ve belirgin hiperemi görüldü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Grupların böbreklerinin histopatolojik görünümü. (A) Kontrol grubunda normal böbrek mikroskopik görünümü, (B) sisplatin grubunda şiddetli hiperemi ve tübül lümenlerinde proteinli materyal (ince ok), (C) escin+sisplatin grubunda belirgin hiperemi, tübül epitellerinde dejenerasyon ve parankimde kanamalar (kalın ok), (D) escin grubunda hiperemi ve dejeneratif şişkin hücrelerden oluşan tübül lümenleri daralmış böbrek görünümü, HE, Barlar=50µm.

Karaciğerlerin histopatolojik değerlendirilmesinde kontrol grubunda herhangi bir lezyon saptanmadı. Sisplatin grubunda ise damarlarda şiddetli hiperemi ve yer yer yangısal hücre infiltrasyonları gözlemlendi. Bazı hepatositlerde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler dikkati çekti. Escin+sisplatin grubunda ise hiperemi ile dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin daha belirgin hale geldiği saptandı. Escin grubundaki ratların karaciğerlerinde de orta şiddette dejeneratif değişiklikler gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Grupların karaciğerlerinin histopatolojik görünümü. (A) Kontrol grubunda normal karaciğer yapısı, (B) sisplatin grubunda şiddetli hiperemi ile hepatositlerde nekrotik değişiklikler (kalın ok) ve mononükleer yangısal hücre infiltrasyonları (ince ok), (C) escin+sisplatin grubunda hepatositlerde belirgin nekrotik değişiklikler (kalın ok), (D) escin grubunda hiperemi ve dejeneratif hepatositler (kalın ok), HE, Barlar=50µm.

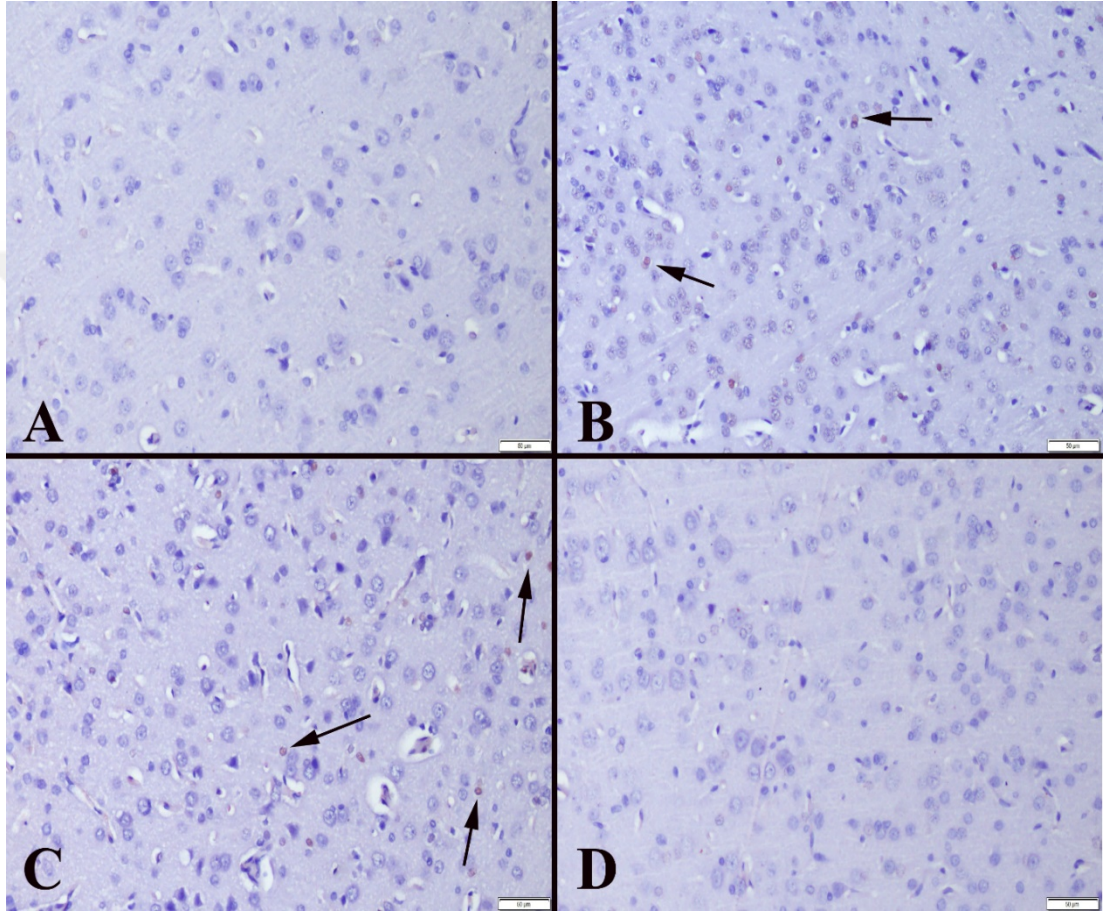
Histopatolojik bulgular tüm organlarda toplu olarak değerlendirildiğinde escin+sisplatin grubunun en şiddetli bulguları gösteren grup olduğu, bunu sırası ile sisplatin ve escin gruplarının takip ettiği dikkati çekti.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları

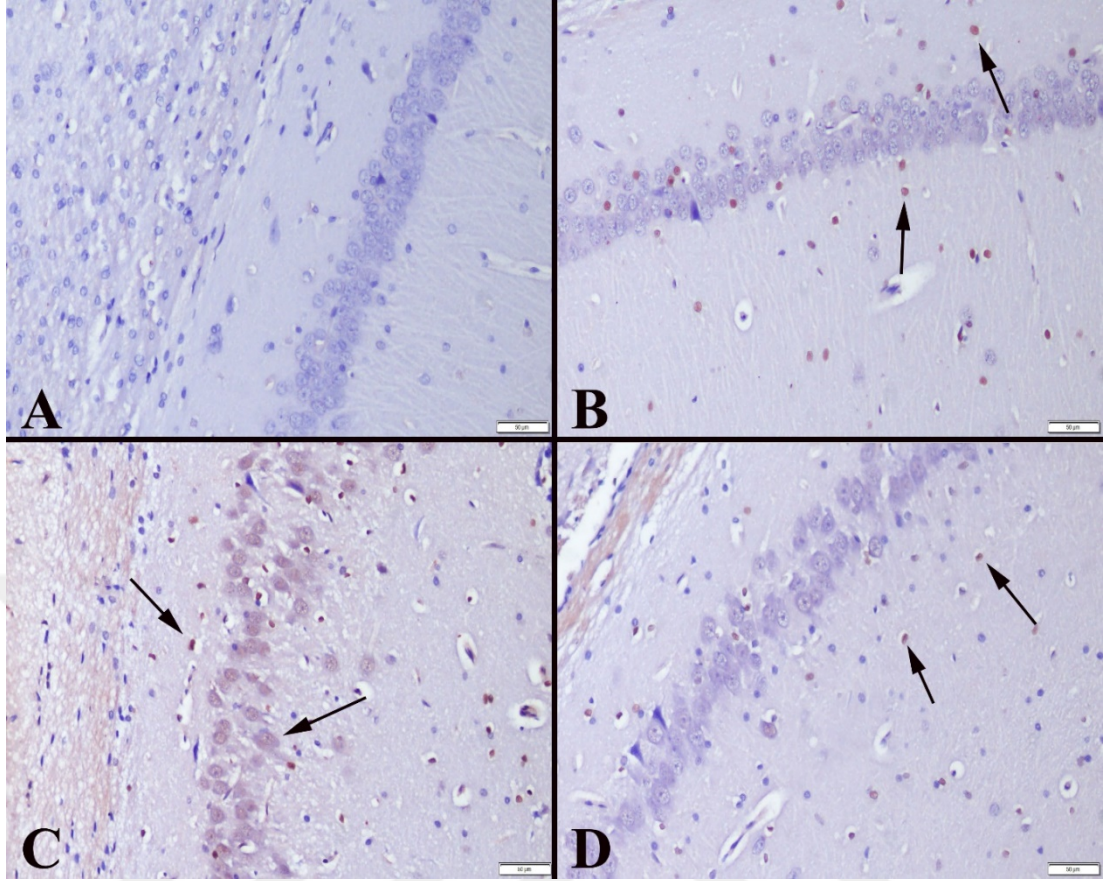
Beyin dokularının gruplar arasında kaspaz-3 ekspresyonları değerlendirilirken özellikle aynı bölgelerin incelenmesine özen gösterildi. Hücrelerdeki apoptotik aktivitenin göstergesi olan kaspaz-3'ün kontrol grubunda negatif olan

ekspresyonlarının sisplatin ve escin+sisplatin gruplarında artış gösterdiği saptandı. Bu iki grupta gliosis sebebiyle hücre yoğunluğunda artış şekillendiği de görüldü. Ekspresyon escin+sisplatin grubunda daha fazla nörona dikkati çekti. Bu gruptaki nöronlarda apoptotik aktivite çok daha şiddetli bir görünümdeydi. Escin grubunda ise bazı ratlarda az sayıda hücrede pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.17).



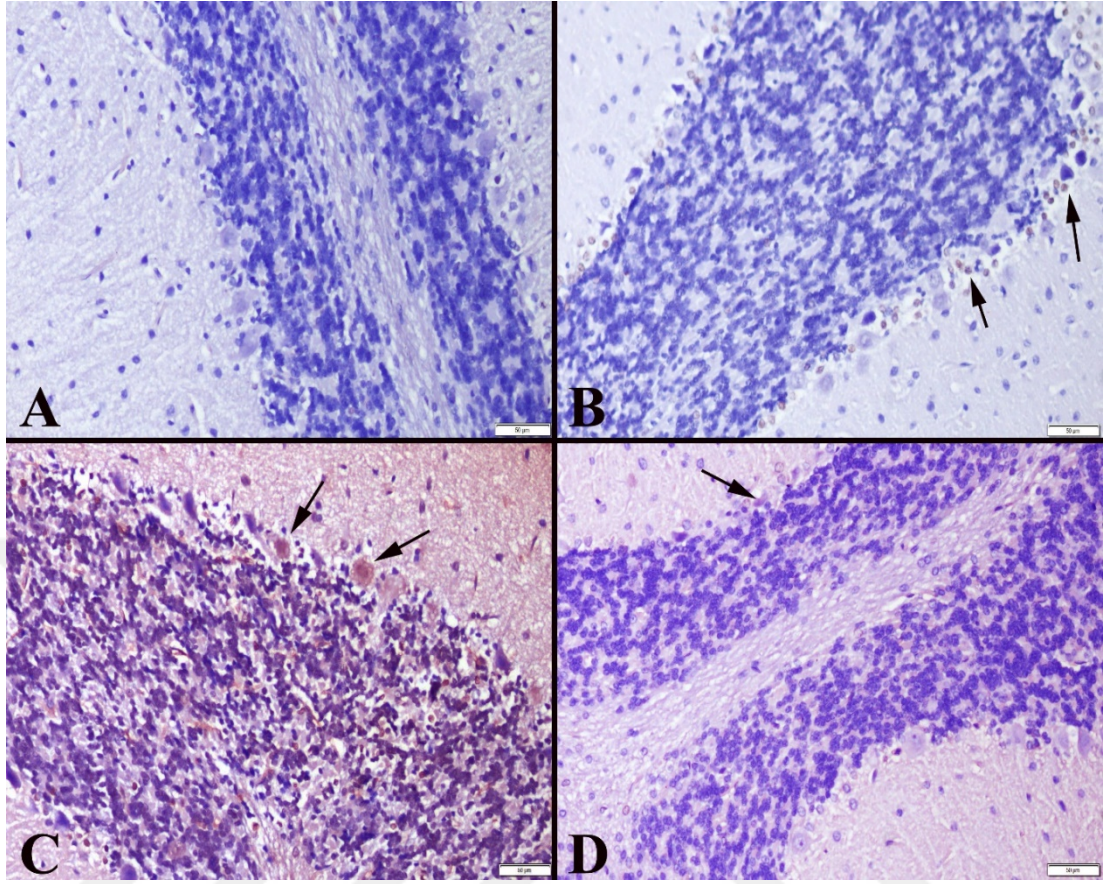
Şekil 4.17. Gruplara göre beyinlerde kaspaz-3 ekspresyonları. (A) Kontrol grubunda negatif reaksiyon. (B) sisplatin grubunda bazı nöronlara artmış ekspresyonlar (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda nöronda pozitif immunoreaksiyon (oklar), (D) escin grubunda bir ratta negatif ekspresyon, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

Hipokampuslerin gruplara göre kaspaz-3 ekspresyonları değerlendirildiğinde kontrol grubunda ekspresyon gözlenmezken sisplatin grubunda orta, escin+sisplatin grubunda şiddetli ve escin grubunda hafif ekspresyonlar gözlemlendi (Şekil 4.18).



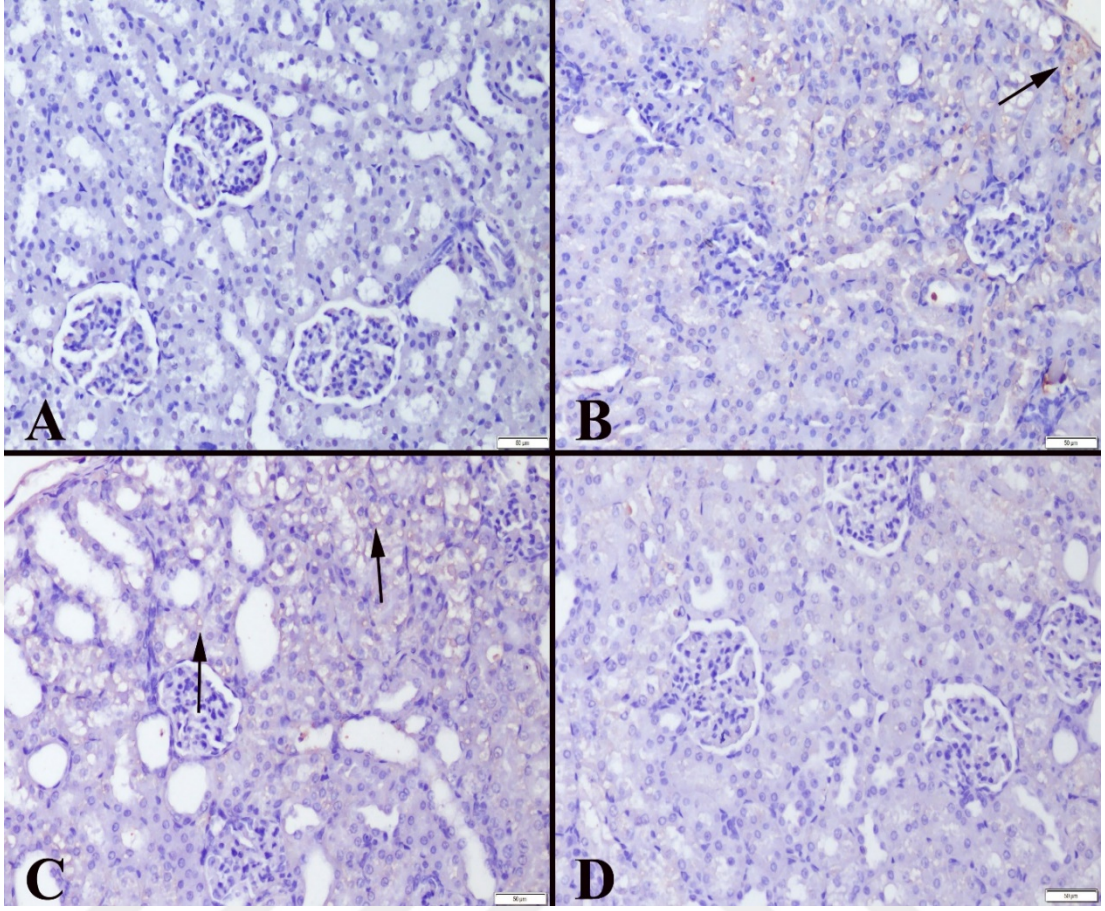
Şekil 4.18. Hipokampusların gruplar arasında kaspaz-3 ekspresyonları. (A) Kontrol grubunda negatif reaksiyon. (B) sisplatin grubunda bazı küçük nöronlara artmış ekspresyonlar (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda büyük ve küçük nöronda pozitif immunoreaksiyon (oklar), (D) escin grubunda bir ratta hafif ekspresyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

Beyinciklerin kaspaz-3 ekspresyonları incelendiğinde kontrol grubunda negatif escin+sisplatin grubunda şiddetli diğer gruplarda ise orta şiddette ekspresyonlar dikkati çekti. Ekspresyonlar özellikle Purkinje hücrelerinde daha belirgin şekildeydi (Şekil 4.19).



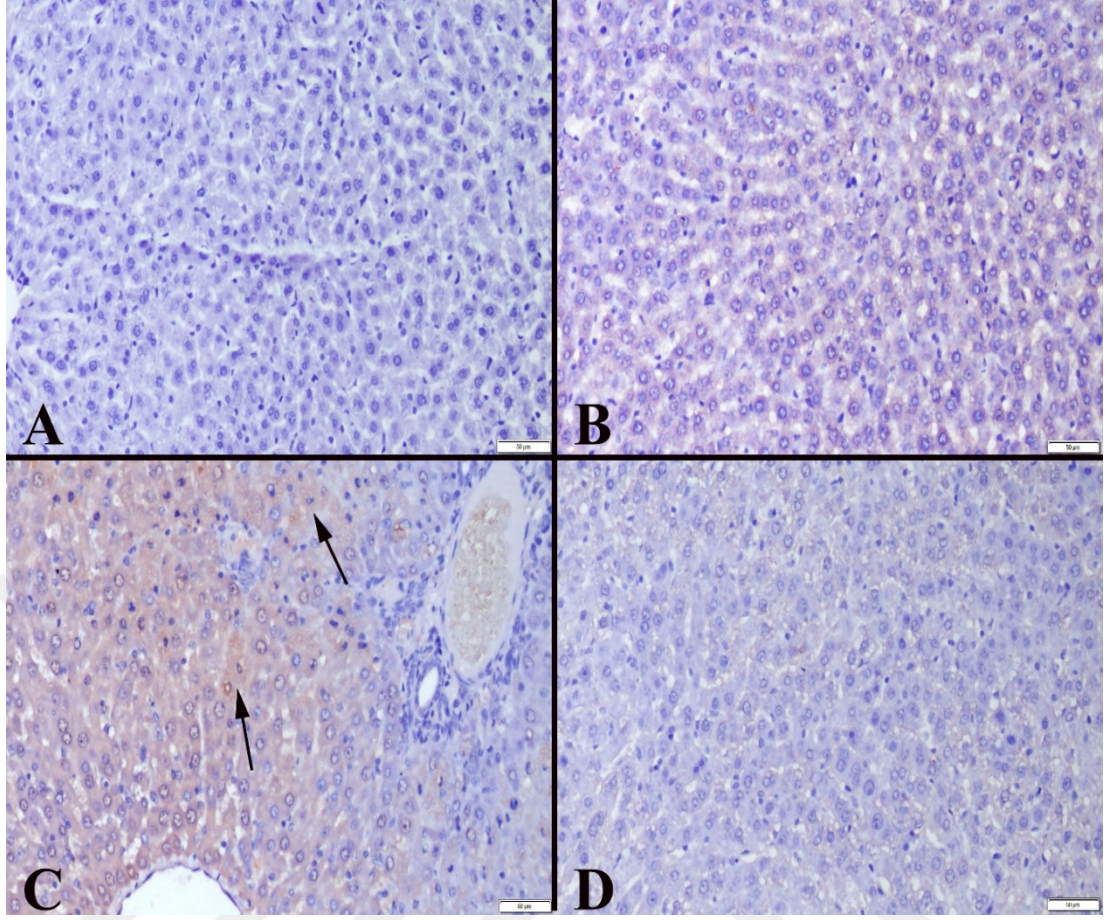
Şekil 4.19. Beyinciklerin gruplar arası kaspaz-3 ekspresyonları. (A) Kontrol grubunda negatif reaksiyon. (B) sisplatin grubunda bazı nöronlara artmış ekspresyonlar (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda Purkinje hücrelerinde pozitif immunoreaksiyon (oklar), (D) escin grubunda Purkinje hücrelerinde hafif ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

Çalışma gruplarının böbreklerinin kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesinde hem korteks hem de medulladaki ekspresyonlar göz önüne alındı. Reaksiyonun kortikal bölgede biraz daha şiddetli olduğu dikkati çekti. Kontrol grubunda ekspresyon saptanmazken sisplatin grubunda apoptotik aktivitenin arttığı ve özellikle tübül epitellerinin değişik şiddetlerde kaspaz-3 eksprese ettikleri saptandı. İmmunoekspresyonun escin+sisplatin grubunda daha fazla hücrede şekillendiği gözlemlendi. Escin grubundaki ratların böbrek dokuları incelendiğinde bazı hayvanların hafif düzeyde böbrek hücrelerinde kaspaz-3 eksprese ettikleri görüldü (**Şekil 4.20**). Ekspresyon glomeruler hücrelerde de olmasına rağmen tübül hücrelerinde çok daha belirgin bir şekilde gelişmişti.



Şekil 4.20. Böbrek kaspaz-3 ekspresyonlarının gruplara göre görünümü. (A) Kontrol grubunda ekspresyon görülüyor, (B) sisplatin grubunda bazı tübül epitellerinde pozitif reaksiyonlar (ok), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda hücrede pozitif immunoreaksiyon (oklar), (D) escin grubunda bir ratta çok hafif ekspresyon, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

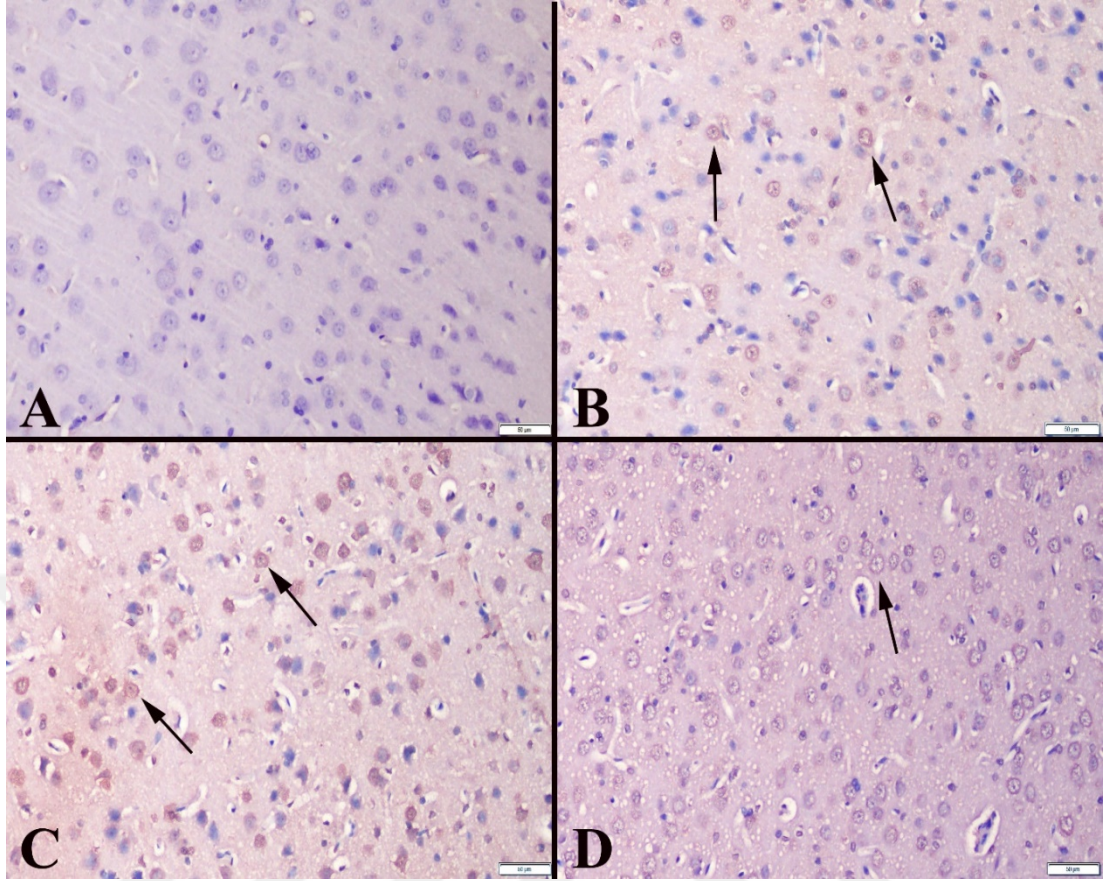
Grupların karaciğerleri kaspaz-3 ekspresyonları açısından incelendiğinde kontrol grubunda negatif olan ekspresyonun sisplatin grubunda birçok hepatositte belirginleştiği saptandı. Escin+sisplatin grubunda ise apoptotik aktivitenin çok sayıda hepatositte ve daha belirgin şekilde geliştiği gözlemlendi. Bu gruptaki ratların karaciğerlerinde dejeneratif değişikliklerde ve yangısal reaksiyonda da artış dikkati çekti. Escin grubundaki ratların karaciğerlerinde de hafif şiddette kaspaz-3 ekspresyonları dikkati çekti (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Karaciğer kaspaz-3 ekspresyonlarının gruplara göre görünümü. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) sisplatin grubunda birçok hepatositte hafif şiddette ekspresyon (ok), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda hepatositte belirgin şekilde pozitif ekspresyonlar (oklar), (D) escin grubuna ait bir karaciğerde hafif şiddette ekspresyon, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

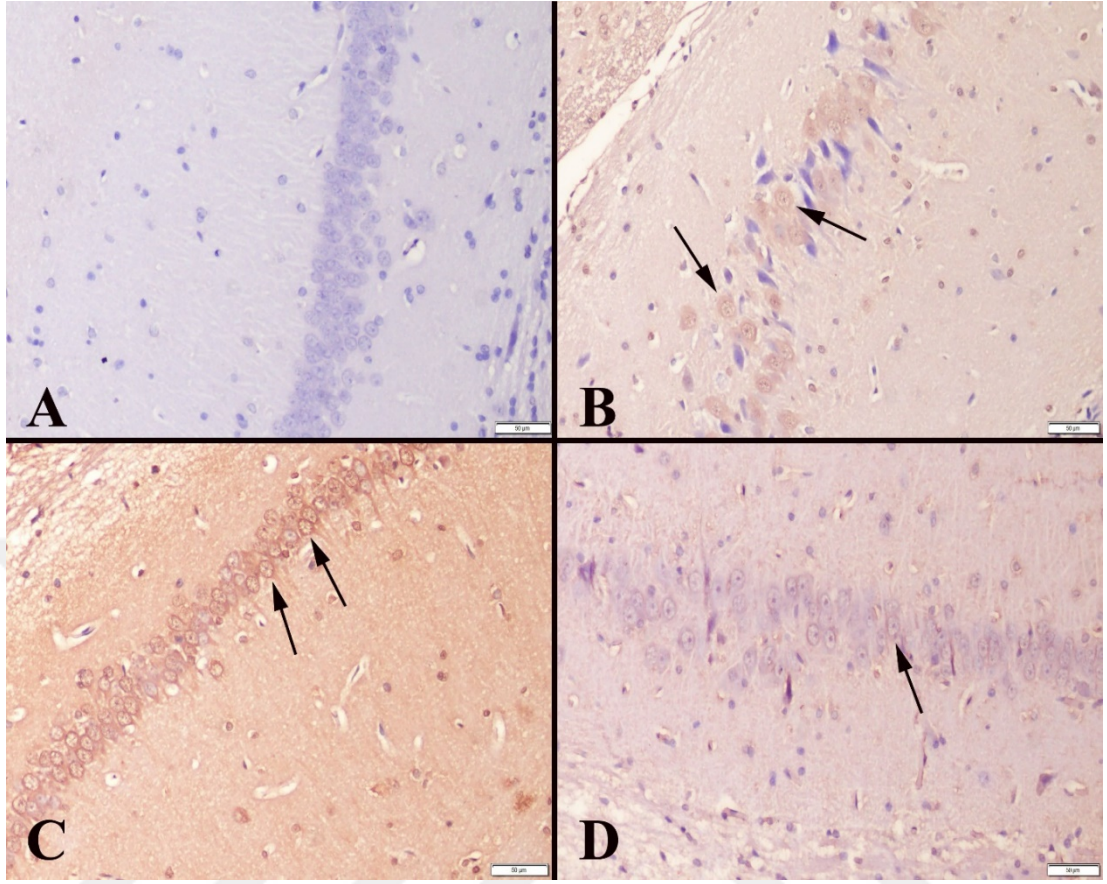
4.4.2. İL-1β İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplara göre beyinlerde İL-1β ekspresyonlarının incelemesinde kontrol grubunda ekspresyon saptanmadı. Sisplatin grubundaki hayvanların beyin kortekslerindeki birçok nörona İL-1β ekspresyonlarının değişik şiddetlerde şekillendiği dikkati çekti. Escin+sisplatin grubunun beyin dokusundaki ekspresyonlar incelendiğinde ekspresyonların çok sayıda nörona ve daha şiddetli şekilde geliştiği saptandı. Çok sayıda dejeneratif ve nekrotik nöronlara rastlandı. Escin grubundaki ratların beyinlerinde daha az sayıdaki nörona ve daha hafif şiddette ekspresyon dikkati çekti (Şekil 4.22).



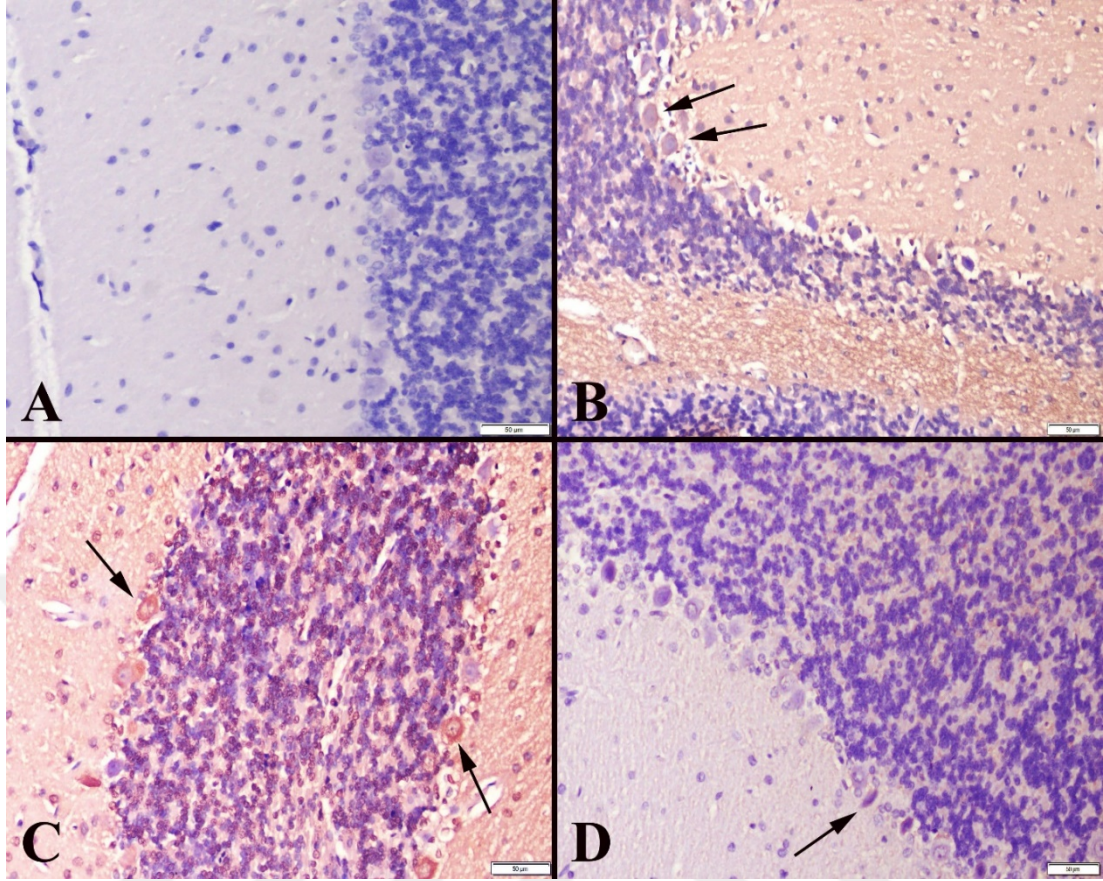
Şekil 4.22. Gruplara göre beyinlerde İL-1 β ekspresyonlarının görünümü (A) Kontrol grubunda negatif reaksiyon, (B) sisplatin grubunda bazı nöronlara artmış İL-1 β ekspresyonları (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda nöronda pozitif immunoreaksiyon (oklar), (D) escin grubunda nöronlarda hafif şiddette ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50 μ m.

İL-1 β ekspresyonlarının grupların hipokampuslarındaki görünümünü incelendiğinde kontrol grubundaki ratlarda ekspresyon gözlenmezken sisplatin grubunda artmış ekspresyonlar dikkati çekti. Escin+sisplatin grubundaki ratlarda en şiddetli ekspresyonlar saptandı. Escin grubunda da ekspresyonlarda artış gözlemlendi (Şekil 4.23).



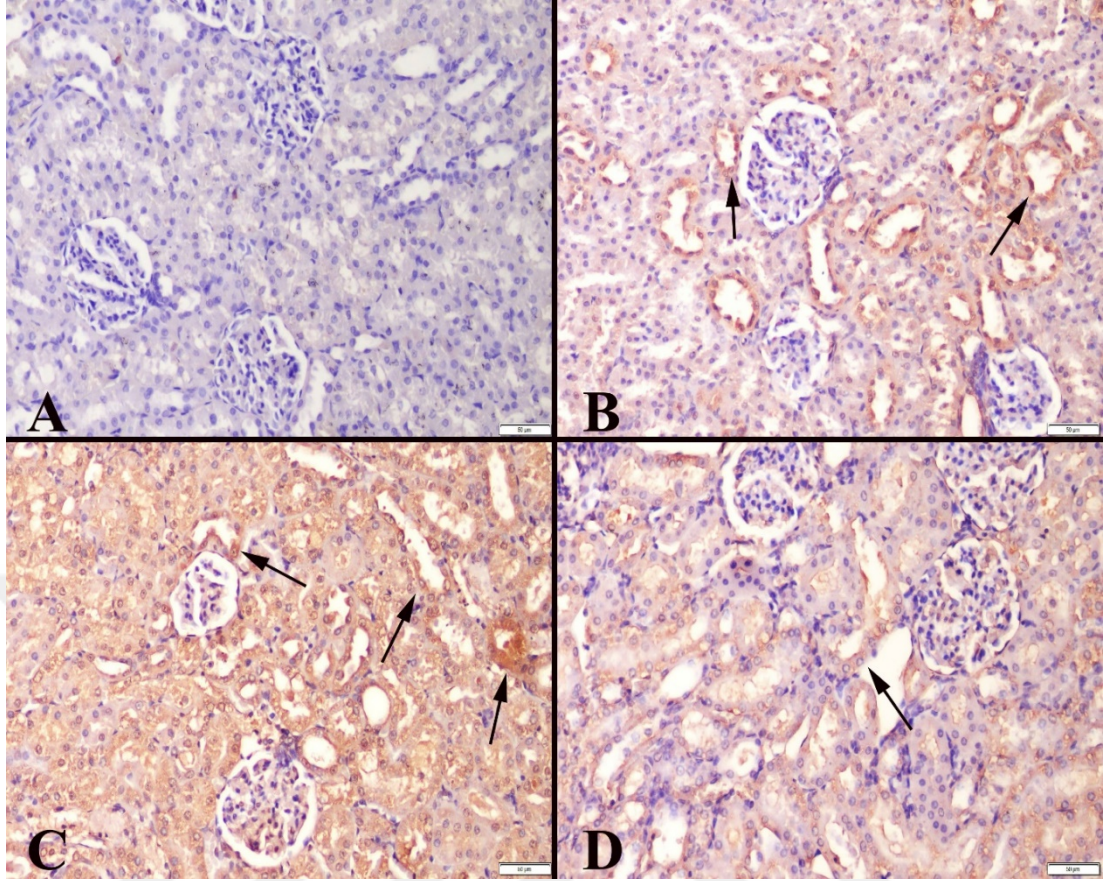
Şekil 4.23. Hipokampusların İL-1 β ekspresyonlarının gruplara göre görünümü (A) Kontrol grubunda negatif reaksiyon, (B) sisplatin grubunda bazı nöronlara artmış İL-1 β ekspresyonları (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda nöronda şiddetli pozitif ekspresyonlar (oklar), (D) escin grubunda nöronlarda hafif şiddette ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50 μ m.

Beyinciklerin İL-1 β immunoreaksiyonlarının gruplara arasındaki görünümeleri incelendiğinde kontrol grubunda negatif ekspresyonlar gözlenirken sisplatin grubunda özellikle Purkinje hücrelerinde daha belirgin olmak üzere ekspresyonlar dikkati çekti. En şiddetli ekspresyonlara ise escin+sisplatin grubunda ve özellikle Purkinje hücrelerinde saptandı. Escin grubundaki ratların beyinciklerinde Purkinje hücrelerinde hafif şiddette ekspresyonlara rastlandı (**Şekil 4.24**).



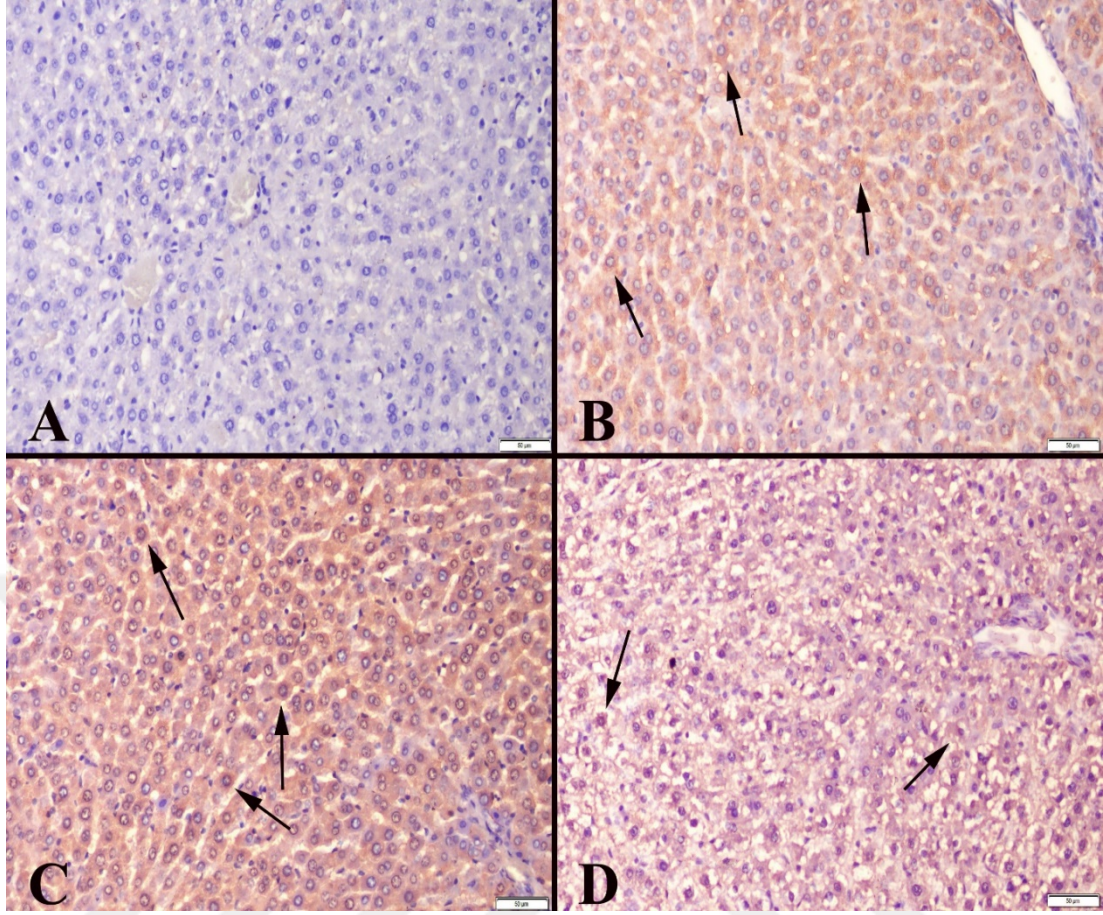
Şekil 4.24. Beyincik İL-1 β ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümü. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) sisplatin grubunda bazı Purkinje hücrelerinde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda Purkinje hücrelerinde şiddetli pozitif immunoreaksiyon (oklar), (D) escin grubunda Purkinje hücrelerinde hafif ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50 μ m.

Böbrek dokularının İL-1 β ekspresyonlarının incelenmesinde kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda değişik şiddetlerde ekspresyonların bulunduğu gözlemlendi. Sisplatin grubunda tübüllerde daha belirgin olmakla birlikte tüm hücrelerde ekspresyonlar saptandı. Escin+sisplatin grubundaki ratların böbreklerinde hemen hemen tüm hücrelerde şiddetli ekspresyonlar dikkati çekti. Bazı tübüllerde tüm hücrelerde şiddetli ekspresyonlar görüldü. Escin grubunda ise şiddeti daha az olmakla birlikte çok sayıda glomeruler ve tübüler hücrede ekspresyonları önemli ölçüde şekillenmiş olduğu dikkati çekti (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Böbrek İL-1 β ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümü. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) sisplatin grubunda çok sayıda tübül epitelinde belirgin pozitif reaksiyonlar (ok), (C) escin+sisplatin grubunda hemen hemen tüm tübül ve glomerulus hücrelerinde pozitif immunoreaksiyonlar (oklar), (D) escin grubunda bir böbrekte tübül ve glomerulus hücrelerinde orta şiddette ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50 μ m.

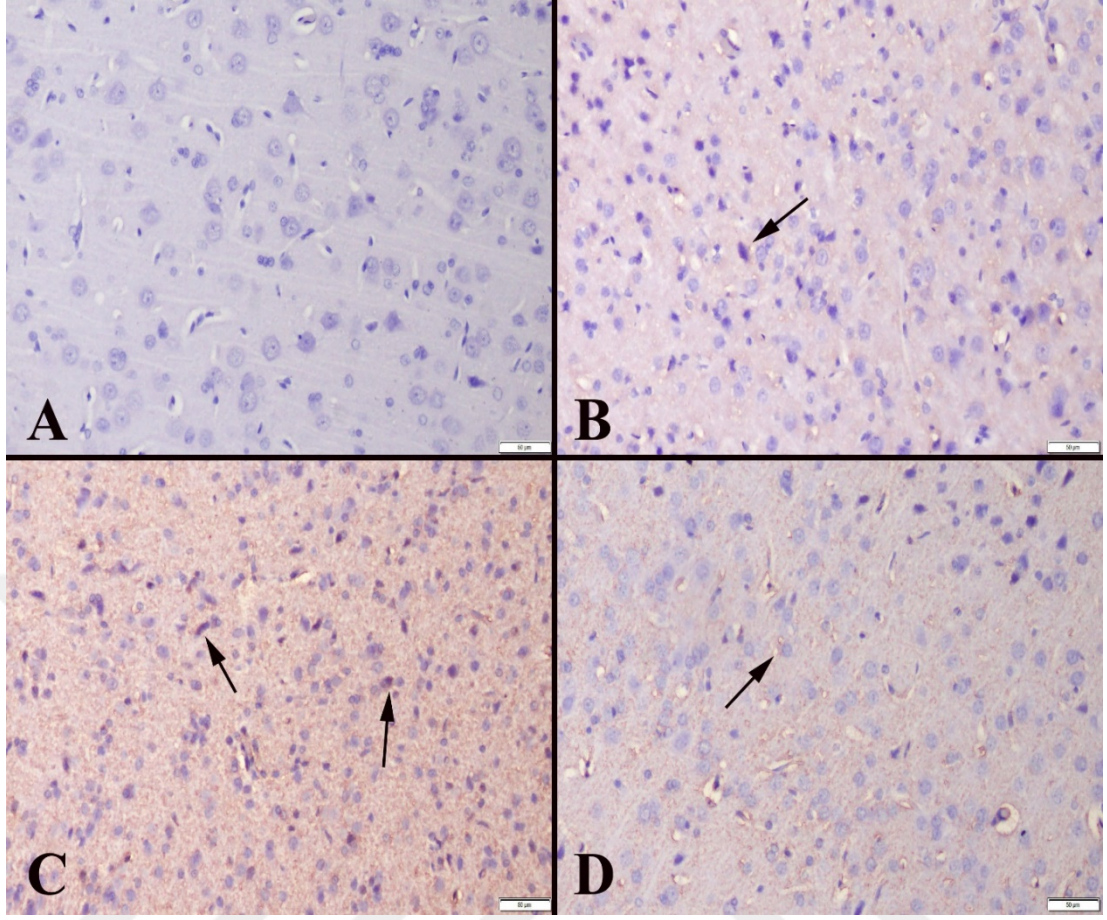
Gruplara göre karaciğerlerin İL-1 β ekspresyonları incelendiğinde kontrol grubu hariç ekspresyonların varlığı saptandı. Sisplatin grubunda birçok hepatositte orta-şiddetli düzeyde ekspresyonlar saptanırken, ekspresyon şiddetinin ve eksprese eden hepatosit sayısının escin+sisplatin grubunda çok daha belirgin bir şekilde arttığı dikkati çekti. Bu iki grupta da hücrelerin dejeneratif değişiklikler gösterdiği görüldü. Escin grubundaki birkaç ratta çok belirgin olmak üzere karaciğer epitel hücrelerinin dejeneratif ve nekrotik görünümde oldukları ve önemli ölçüde İL-1 β eksprese ettikleri saptandı (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Karaciğerlerde İL-1 β ekspresyonlarının gruplara göre görünümü. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) sisplatin grubunda birçok hepatositte belirgin (oklar) bazılarında daha hafif şiddette ekspresyon, (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda hepatositte belirgin şekilde pozitif ekspresyonlar (oklar), (D) escin grubuna ait bir ratın karaciğerinde belirgin dejenerasyon ve hepatositlerde şiddetli ekspresyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50 μ m.

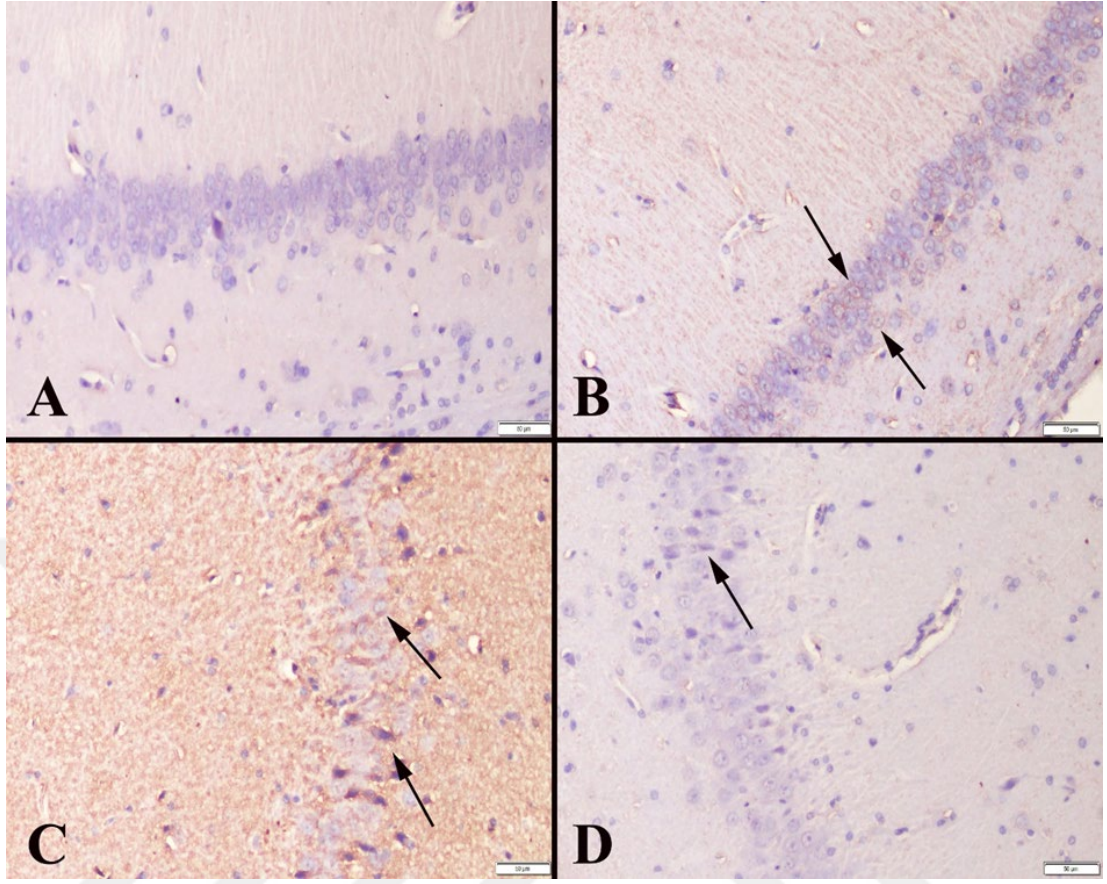
4.4.3. iNOS İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplara göre beyinlerin iNOS immunohistokimyasal ekspresyonları incelendiğinde kontrol grubunda negatif ekspresyon saptanırken sisplatin grubundaki ratların beyin kortekslerindeki nöronlarda dejeneratif değişikliklerin yanı sıra artmış iNOS ekspresyonları da dikkati çekti. Escin+sisplatin grubunun ratlarının beyinlerindeki nöronlarda hem dejeneratif değişikliklerin hem de ekspresyonların şiddetinde belirgin bir artış olduğu saptandı. Escin grubundaki beyinlerde de hafif şiddette iNOS ekspresyonları nöronal hücrelerde gözlemlendi (Şekil 4.27).



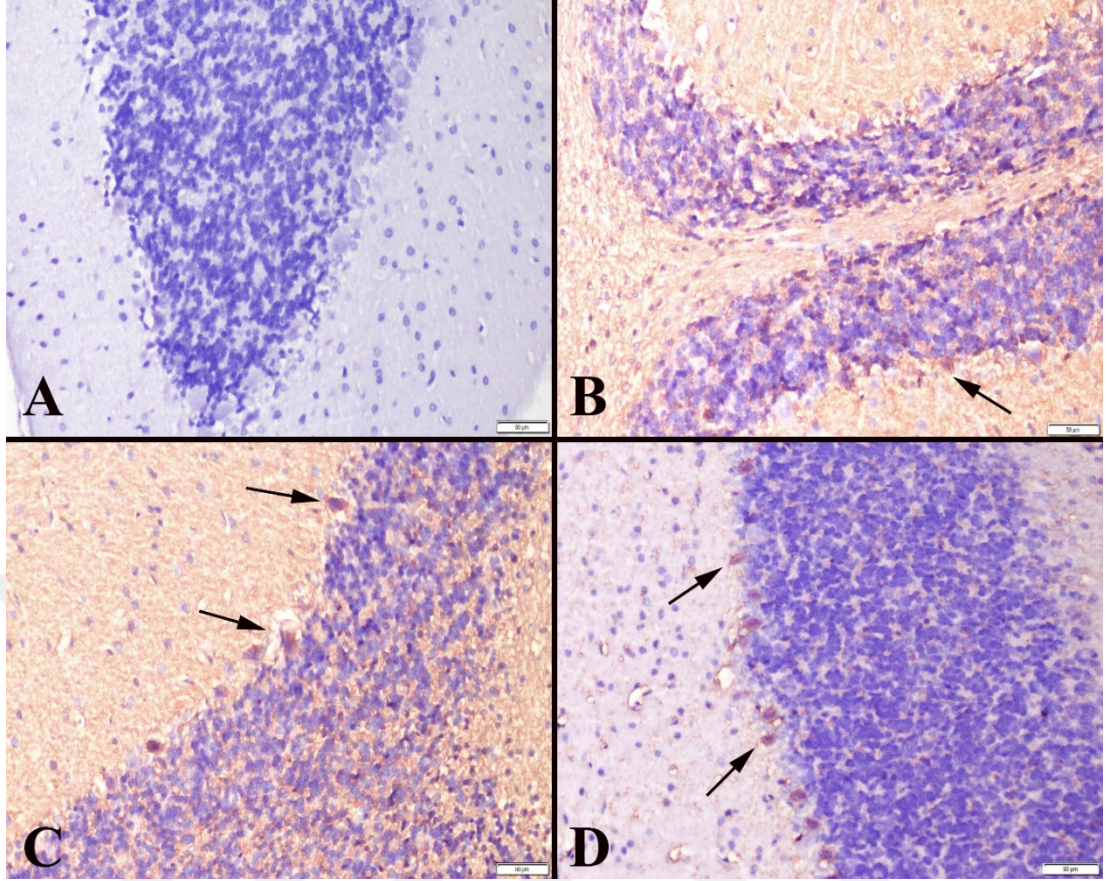
Şekil 4.27. Beyinde iNOS ekspresyonlarının gruplara göre görünümü (A) Kontrol grubunda reaksiyon yok, (B) sisplatin grubunda bazı dejeneratif nöronlara artmış ekspresyonları (ok), (C) escin+sisplatin grubunda bazı dejeneratif nöronlarda artmış ekspresyonlar (oklar), (D) escin grubundaki bazı nöronlarda hafif şiddette ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

İndüklenebilir nitrik oksit sentataz ekspresyonlarının grupların hipokampuslarındaki görünimleri incelendiğinde kontrol grubunda negatif reaksiyon gözlemlendi. Sisplatin grubunda ekspresyonlarda artış escin+sisplatin grubunda ise belirgin şekilde artmış immunoekspresyonlar dikkati çekti. Escin grubunda ise hafif immunoreaksiyonlar gözlemlendi (Şekil 4.28).



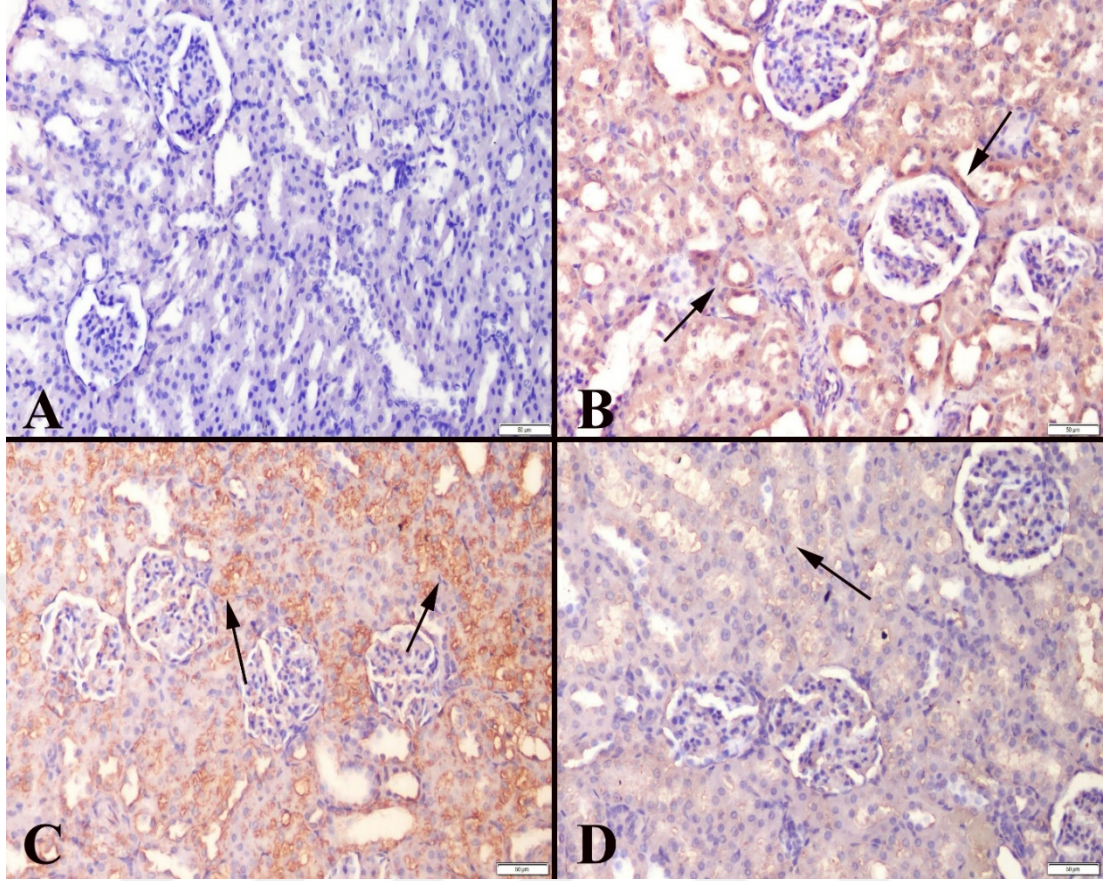
Şekil 4.28. Hipokampusların iNOS ekspresyonlarının gruplara göre görünümü (A) Kontrol grubunda negatif reaksiyon, (B) sisplatin grubunda bazı hipokampus nöronlarında artmış iNOS ekspresyonları (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda çok sayıda dejeneratif nöron ve bazı nöronlarda artmış ekspresyonlar (oklar), (D) escin grubunda nöronlarda hafif şiddette ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

Gruplar arasında beyinciklerde iNOS ekspresyonları incelendiğinde kontrol grubunda negatif ekspresyon gözlemlendi. Sisplatin grubunda beyinciklerde özellikle Purkinje hücrelerinde daha belirgin olmak üzere artmış immunoekspresyonlar dikkati çekti. Escin+sisplatin ve escin grubundaki hayvanların beyinciklerinde çok belirgin immunoekspresyonlar gözlemlendi (Şekil 4.29).



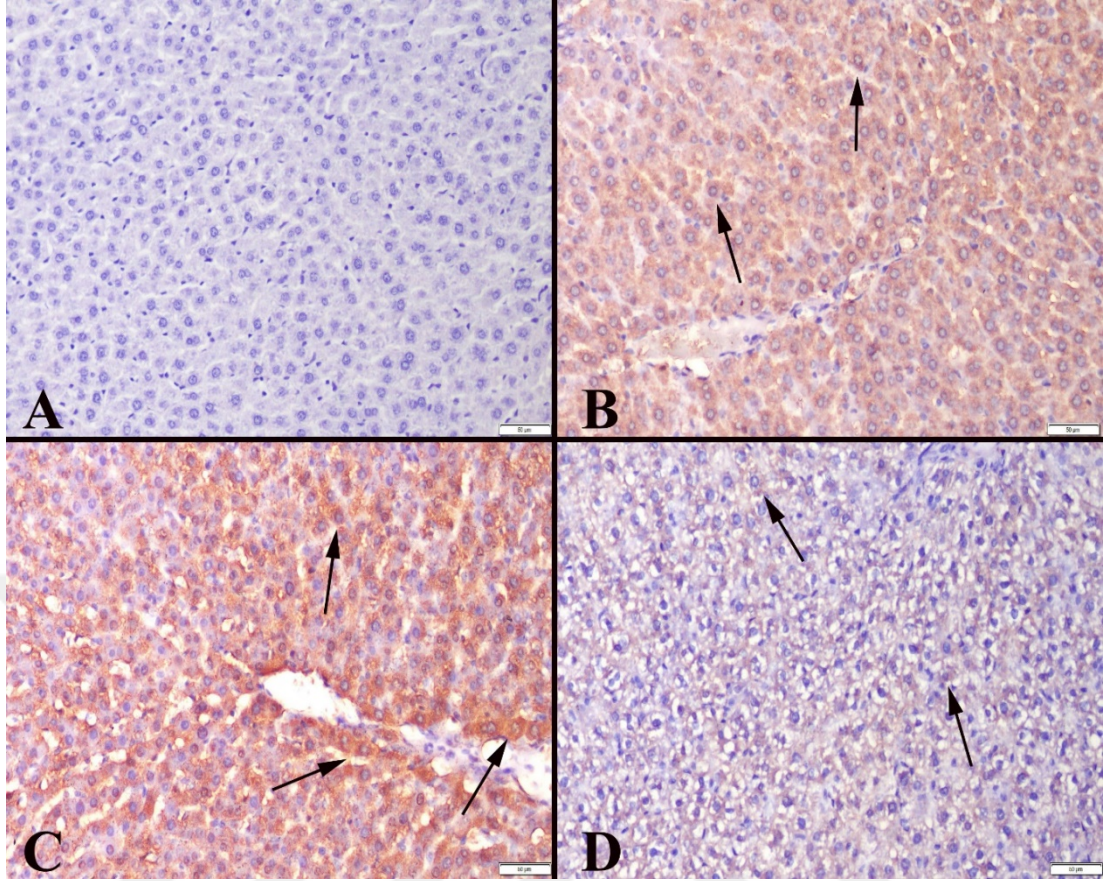
Şekil 4.29. Gruplar arasında beyinciklerin iNOS ekspresyonlarının görünümü. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) sisplatin grubunda bazı Purkinje hücrelerinde artmış ekspresyonlar (ok), (C) escin+sisplatin grubunda Purkinje hücrelerinde şiddetli pozitif immunoreaksiyon (oklar), (D) escin grubunda Purkinje hücrelerinde hafif ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

Böbrek iNOS immunoekspresyonlarının değerlendirilmesinde kontrol grubunun ekspresyonlar açısından negatif oldukları saptandı. Sisplatin grubunda ekspresyonlarda belirgin bir artış saptanırken ekspresyonların escin+sisplatin grubunda çok daha şiddetlendiği dikkati çekti. Ekspresyonlar özellikle tübül epitellerinde saptanırken glomerular hücrelerde de gözlendi. Escin grubundaki ratların böbreklerinde özellikle tübüler hücrelerde hafiften ortaya değişen şiddetlerde ekspresyonlar saptandı (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Gruplara göre böbreklerde iNOS ekspresyonlarının görünümü. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) sisplatin grubunda çok sayıda tübül ve glomerular hücrelerde belirgin pozitif reaksiyonlar (oklar), (C) escin+sisplatin grubunda tübül ve glomerulus hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda pozitif immunoreaksiyonlar (oklar), (D) escin grubunda bir ratın böbreğinde özellikle tübül hücrelerinde orta şiddette ekspresyon (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

Karaciğerlerin iNOS ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünümünün incelenmesinde kontrol grubunda ekspresyonlar gözlenmezken sisplatin grubunda karaciğerlerin belirgin şekilde etkilendikleri ve çok sayıda hepatositin önemli ölçüde iNOS eksprese ettikleri saptandı. Escin+sisplatin grubunda ekspresyonlarda ciddi bir artışın bulunduğu dikkati çekti. Escin grubundaki bazı ratların karaciğerlerinin belirgin bir şekilde dejeneratif olduğu ve birçok hepatositin iNOS eksprese ettiği gözlemlendi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Karaciğer iNOS ekspresyonlarının gruplar arasındaki görünimleri. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) sisplatin grubunda çok sayıdaki hepatositte belirgin şiddette (oklar) bazılarında ise daha hafif ekspresyon, (C) escin+sisplatin grubunda bir ratın karaciğerindeki hepatositlerin büyük bölümünde ve belirgin şekilde pozitif ekspresyonlar (oklar), (D) escin grubuna ait bir ratın karaciğerinde belirgin dejenerasyon ve hepatositlerde belirgin ekspresyon (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar =50µm.

Gruplara göre immunohistokimyasal ekspresyon skorlarının istatistik analizleri **Tablo 4.6'**da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. İmmunohistokimyasal ekspresyon skorları.

Doku	Gruplar	Kaspaz-3	İL-1β	iNOS
Beyin	Kontrol	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	Sisplatin	0,40±0,16 ^{ab}	1,30±0,15 ^b	0,50±0,16 ^{ab}
	Escin	0,57±0,20 ^b	0,57±0,20 ^b	0,28±0,18 ^a
	Escin+Sisplatin	0,71±0,18 ^b	2,28±0,18 ^c	1,14±0,14 ^b
Hipokampus	Kontrol	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	Sisplatin	0,80±0,24 ^b	1,60±0,22 ^b	0,60±0,16 ^b
	Escin	1,28±0,18 ^b	1,42±0,20 ^b	0,57±0,20 ^{bc}
	Escin+Sisplatin	2,14±0,14 ^c	2,71±0,18 ^c	1,57±0,20 ^c
Beyincik	Kontrol	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	Sisplatin	0,50±0,16 ^{ab}	1,50±0,22 ^b	1,30±0,15 ^b
	Escin	1,28±0,28 ^b	1,00±0,30 ^b	0,57±0,20 ^b
	Escin+Sisplatin	2,57±0,20 ^c	2,71±0,18 ^c	1,85±0,34 ^b
Böbrek	Kontrol	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	Sisplatin	0,60±0,16 ^b	1,30±0,15 ^b	1,40±0,16 ^b
	Escin	0,42±0,20 ^{ab}	1,42±0,20 ^b	1,28±0,18 ^b
	Escin+Sisplatin	1,14±0,26 ^b	2,71±0,18 ^c	2,57±0,20 ^c
Karaciğer	Kontrol	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
	Sisplatin	0,70±0,15 ^b	1,90±0,17 ^b	1,50±0,16 ^b
	Escin	0,42±0,20 ^{ab}	1,42±0,20 ^b	1,14±0,26 ^b
	Escin+Sisplatin	1,85±0,14 ^c	2,85±0,14 ^c	2,71±0,18 ^c

Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Üst simgeleri aynı olan gruplar istatistiki açıdan benzer, farklı simgesi olan gruplar arası farklar istatistiki açıdan önemlidir (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Sisplatin toksisitesi başta olmak üzere böbrek hastalıkları, kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkta oksidatif stresin rolü olduğu bilinmektedir (Barabas ve ark., 2008; Barnham ve ark., 2004; Burton ve Jauniaux, 2011; Liguori ve ark., 2018). Oksidatif stres durumunda MDA, süperoksit, H_2O_2 gibi birçok radikal rol oynamaktadır (Czerska ve ark., 2015; Tsang ve ark., 2014). Oksidan-antioksidan dengenin bozulumu ve artmış olan bu radikallerin yol açtığı LPO'nun göstergesi olarak MDA önemli bir yere sahiptir ve yıllardır en çok analiz edilen belirteçler arasındadır (Czerska ve ark., 2015). MDA dokular ile kompleks halinde bulunabilmektedir ve serbest radikal oluşumunun bir ürünü olarak salınır. MDA, aynı zamanda doymamış yağ asidi peroksidasyonunun ana kaynağıdır. Hücre hasarı durumlarında MDA seviyesi artmaktadır (Valenzuela, 1991).

Oksidatif stresi baskılayan maddelere antioksidanlar denilmektedir (Yoshikawa ve Naito, 2002). Antioksidan savunma, başlıca serbest radikal kaynaklarının süpürülmesi, antioksidan kapasitenin artırılmasını ve antioksidanların dışarıdan alınmasını içeren bir süreçtir (Naito ve ark., 2010). Antioksidanlar içerisinde SOD, GPx v.b. birçok enzim, vitamin, madde ve sistem bulunmaktadır. Bu antioksidan maddeler serbest radikallere doğrudan tepki verebilmektedir. Serbest radikalleri yok ettikleri için radikal süpürücü antioksidanlar şeklinde de adlandırılabilirler (Kurata ve ark., 1993; Naito ve ark., 2010). Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalının H_2O_2 'ye katalize edilmesinin dismutasyonunu sağlayan metalloprotein grubu bir enzimdir (Kurata ve ark., 1993). Süperoksit dismutazın başlıca görevi, hücrelerin sitozol, endoplazmik retikulum ve mitokondrisinde üretilen, O_2 'nin H_2O_2 'ye katalize edilmesidir. Ancak, H_2O_2 'de hücreler için toksik olmaktadır. Bu nedenle SOD antioksidan işlevinin yanında pro-oksidan etkiye sahiptir. Bu sebeple, SOD ile birlikte GPx ve CAT gibi sistemlere ihtiyaç vardır (Carillon ve ark., 2013). Glutasyon peroksidaz ve CAT, H_2O_2 'yi temizleyen sistemlerdir (Kurata ve ark., 1993). Bunlardan GPx, GSH kullanarak H_2O_2 ve GSH'ı, oksitlenmiş glutasyon ve suya dönüştürür (Finaud ve ark., 2006).

Çalışma kapsamında SOD, GPx ve MDA seviyelerine bakılarak escinin sisplatin kaynaklı oksidant ve antioksidan durum üzerine etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucuna göre böbrek, karaciğer ve beyin dokularında SOD ve GPx seviyelerinin sisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düştüğü tespit edilmiştir. Sisplatin ile birlikte escin uygulamasıyla sisplatinin tek başına neden olduğu SOD ve GPx düzeylerindeki düşüş engellenmiştir. Böbrek, karaciğer ve beyin dokularındaki MDA seviyeleri ise sisplatin uygulamasıyla birlikte kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükselirken, sisplatin ile birlikte escin uygulaması MDA seviyelerindeki yükselişi engelleyememiştir. Escin ve sisplatinin birlikte uygulanmasının MDA seviyelerindeki sisplatine bağlı yükselişi engelleyememesinin haricinde MDA seviyeleri belirtilen dokularda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek ölçülmüştür.

Belirtilen dokulardaki sisplatine bağlı MDA seviyelerindeki yükseliş ve SOD, GPx seviyelerindeki düşüş önceki çalışmalara paraleldir. Literatürde sisplatin toksisitesinin oksidatif stres oluşturduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bazmandegan ve ark. (2019) sisplatin ile indüklenen nefrotoksisite modelinde sisplatin uygulamasının MDA düzeylerini anlamlı ölçüde yükselttiğini gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada sisplatin uygulaması sonrası antioksidan parametrelerden SOD ve GPx'in sisplatin uygulamasıyla baskılandığı tespit edilmiştir (Bazmandegan ve ark., 2019). Yapılan bir diğer çalışmada sisplatinin oksidatif stresi artırdığı gözlenmiştir. Böbrek dokusundaki MDA seviyeleri sisplatin uygulaması ile birlikte artış göstermiştir (Zhang ve ark., 2018). Koyuncu (2018) yaptığı çalışmada sisplatin uygulamasının MDA seviyelerinde yükselişe yol açtığını, total antioksidan kapasiteyi ve GSH seviyelerini azaltarak antioksidan sistemi baskıladığını göstermiştir. Bir diğer çalışmada renal MDA düzeylerinin sisplatin uygulaması ile yükseldiği SOD, GPx ve CAT seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir. Aynı çalışmada oksidatif durumdaki artışın böbrek hasarıyla ilişkili olduğu serum biyokimyasal parametreleriyle doğrulanmıştır (Silici ve ark., 2011). Sisplatin hepatotoksisitesinin incelendiği bir çalışmada sisplatinin karaciğer MDA seviyelerini anlamlı bir şekilde yükselttiği, SOD ve GPx seviyelerini ise düşürdüğü gözlenmiştir (Mansour ve ark., 2006). Sisplatinin oluşturduğu nörotoksisitede nefrotoksisite ve hepatotoksisiteye

benzer şekilde MDA seviyelerindeki yükseliş, SOD ve GPx seviyelerindeki azalış ile karakterize oksidatif stres durumu genel olarak görülmektedir (Huang ve ark., 2021). Çeşitli çalışmalarla da gösterildiği üzere sisplatin nefrotoksitesisi, hepatotoksitesisi ve nörotoksitesisi oksidatif stresin artışı ve antioksidan sistemlerdeki baskılanma ile karakterizedir.

Escinin ise genel olarak antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir ve sisplatinin oluşturduğu toksite üzerine escinin etkisi bilginiz dahilinde henüz araştırılmamıştır. Diğer bazı toksik maddelerle yapılan çalışmalarda escinin bu maddelere karşı koruyucu olabileceğine dair yayınlar mevcuttur. İndometasin kaynaklı mide ülseri modelinde escinin TNF- α , P-selectin, MDA ve VCAM-1 üzerinden antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstererek gastroprotektif özellik sergilediği tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2014b). Yapılan bir başka çalışmada, Parkinson hastalığı modelinde escinin antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler göstererek koruyucu etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (Selvakumar ve ark., 2014). Gür ve ark. (2021) yaptığı çalışmada, escinin siklofosfamidin sebep olduğu kardiyotoksitesiyi SOD ve CAT seviyelerini yükselterek azalttığı görülmüştür. Bir diğer çalışmada escin ile yapılan ön tedavinin LPS ile indüklenen akut akciğer hasarında sitokin seviyelerini aşağı yönlü düzenlediği, MDA seviyelerini düşürüp GPx ve SOD seviyelerini yükselterek antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir (Xin ve ark., 2011a). Qiao ve ark. (2022) yaptığı çalışmada escinin H₂O₂ ile indüklenen miyokard enfarktüsü modelinde hücre canlılığını artırdığı, SOD seviyelerinde düşüşü engellediği, ROS üretimini düşürdüğü, apoptoz ve inflamasyonu engellediği gözlenmiştir. Başka bir çalışmada escinin apoptoz ve oksidatif stres yollarını baskılayarak siklofosfamid kaynaklı hepatotoksitesiteye karşı koruyucu etkinlik gösterdiği bulunmuştur. Escin uygulaması, siklofosfamid kaynaklı MDA yükselişini ve GSH düşüşünü engellemiştir (Cengiz ve ark., 2020).

Her ne kadar birçok çalışma escinin antioksidan etkisini göstermiş olsa da escinin gösterdiği antioksidan etkiye dair çelişkili sonuçlar da bulunmaktadır. Yüksek yağlı diyet modelinde escin, plazma MDA seviyelerindeki yükselişi ve plazma GSH seviyesindeki düşüşü engellemiştir. Plazma SOD ve CAT düzeylerini yüksek yağlı diyet grubunda düşürmediği aksine yükselttiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada escin

uygulamasý, karaciğer ve böbrek MDA seviyelerini düşürmüş ve GSH seviyelerini yükseltmiştir. SOD ve CAT seviyeleri ise plazma seviyelerine benzer şekilde böbrek, karaciğer ve kalp dokularında farklılıklar göstermiştir (Küçükkurt ve ark., 2010). Bir diğer çalışmada hepatik iskemi reperfüzyon hasarı modelinde escin uygulamasının iskemi ve reperfüzyonun sebep olduğu MDA yükselişini engellediği ancak CAT ve SOD seviyesini sadece reperfüzyonun uygulandığı grupta yükselttiği, GPx seviyelerindeki düşüşü ise etkilemediği gözlenmiştir (Ugras ve ark., 2016). Yapılan başka bir çalışmada MPTP/p ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde beyindeki substantia nigra bölgesinde tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), SOD ve CAT seviyeleri artmış, GSH ve GPx seviyeleri azalmıştır. Escin uygulamasıyla birlikte TBARS seviyelerinde doza bağımlı bir düşüş gözlenirken SOD ve CAT seviyeleri düşük dozlarda escin uygulamasıyla daha fazla yükselmiş, GPx ve GSH düzeylerinde düşüş olduğu rapor edilmiştir. Bu durumda escin uygulamasının oksidan ve antioksidan dengenin homeostazına müdahale etmediği sonucuna varılmıştır (Selvakumar ve ark., 2014). Makrofaj benzeri RAW264.7 hücrelerine LPS uygulanmasıyla gerçekleştirilen inflamatuvar modellenli bir *in vivo* çalışmada ise escinin NO seviyelerini sadece yüksek dozda (10 mg/L) inhibe edebildiği gözlenmiştir. Düşük dozda escin uygulaması (0,1 ve 1 mg/L) NO seviyelerinde anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Xin ve ark., 2011b).

Escinin aynı zamanda antikanser etkisi bulunmaktadır. Escinin gösterdiği antikanser etkinin antioksidan etkiye zıt bir şekilde ROS seviyelerini yükselterek gerçekleştiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Böbrek kanseri hücre hattı olan 786-O üzerinde yapılan bir çalışmada escin ROS üretimini artırmıştır (Yuan ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada ise escinin *in vitro* olarak ROS süpürme yeteneği tespit edilmiştir. Ancak aynı çalışmada A2780 ovaryum kanseri ve Vero hücre hatlarında sitotoksik etki yaptığı ve TBARS seviyelerini yükseltip SOD ve GSH'ı düşürdüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak antioksidan durumu azaltıp, apoptozu uyardığı bunu yaparken de oksidanları süpürme yeteneğini koruduğu tespit edilmiştir (Zhao ve ark., 2022). Escinin bir kanser hücre hattı olan jurkat hücrelerinde GSH tükenmesini indüklediği, GPx ve glutatyon redüktaz aktivitelerini değiştirmedeği gözlenmiştir. Aynı çalışmada

escinin ROS seviyelerini yükselterek apoptotik yoldan hücre ölümünü gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Mojžišová ve ark., 2016).

Çalışmamızda SOD ve GPx düzeylerinde sisplatine bağlı düşüş ve MDA düzeylerindeki sisplatine bağlı yükseliş önceki çalışmalar ile uyumludur. Bu durum sisplatinin sebep olduğu oksidatif stres modelinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ancak, çalışmamızda sisplatin ile birlikte escin uygulaması SOD ve GPx seviyelerindeki sisplatin uygulamasına bağlı düşüşü engellerken, MDA düzeylerindeki artışı engelleyememiştir. Bu durum escinin sisplatin ile birlikte uygulanmasının oksidatif strese sebep olduğunu ancak SOD ve GPx'e bağlı antioksidan sisteme etkisinin olmadığını göstermiştir. Escinin bu şekilde bir etkisi olabileceği daha önce Zhao ve ark. (2022)'nin yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca çalışmamızda escinin sisplatin ile birlikte uygulanması MDA seviyelerindeki yükseliş ile gösterilen LPO'ya sebep olduğu tespit edilmiştir. Lipit peroksidasyonunun bir sonucu olarak escin ile birlikte sisplatin uygulaması böbrek, karaciğer ve beyinde hasara sebep olmuştur. Ayrıca, lipit peroksidasyonu farklı ROS'lara bağlı olarak gerçekleşmektedir ve H₂O₂ bunlardan sadece biridir (Aslankoç ve ark., 2019; Ayala ve ark., 2014). Süperoksit dismutaz ve GPx ise çoğunlukla H₂O₂ ile ilişkili antioksidan enzimlerdir (Carillon ve ark., 2013; Kurata ve ark., 1993). Bu durum escin ve sisplatinin birlikte uygulanmasıyla gözlenen MDA ile SOD ve GPx seviyeleri arasındaki dengesizliğin lipit peroksidasyonunun H₂O₂'ye bağımsız yollar üzerinden gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, escinin çeşitli dokulardaki antioksidan etkisi gösterilmiş olsa da beyin ve böbrek dokusundaki antioksidan etkisi net değildir ve sisplatine bağlı toksisiteye karşı etkisine dair bir çalışma literatürde tespit edilememiştir.

Çalışmamızda gözlenen MDA seviyelerindeki yükselişe bağlı hücresel hasar dozla ilişkili olabilmektedir. Canlılara uygulanan maddelerin dozları toksik etki veya terapötik etkide belirleyici bir faktördür (Grandjean, 2016). Bu nedenle uygulanan sisplatin ve escin dozları çalışma öncesinde detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Sisplatin toksisitesi için önceki çalışmalarda 5 mg'dan 50 mg'a kadar çeşitli dozlar ve uygulama yolları kullanılmıştır (Bazmandegan ve ark., 2019; Kawai ve ark., 2009; Ogbe ve ark., 2020; Ozen ve ark., 2004; Palipoch ve Punsawad, 2013). Dozlardan 7,5 mg/kg'ın

sıklıkla tercih edilmesi, belirgin toksisite oluşturmaması ve ölüm oranı az olması sebebiyle seçilmiştir.

Escin üzerine yapılan bazı çalışmalarda gözlenen doza bağlı antioksidan sistemlerdeki değişim ise doza bağlı toksisitenin yanında escinin dozunun iyi belirlendiğinin doğrulanmasını gerektirmektedir. Escin üzerine yapılan çalışmalarda 0,9 mg'dan 20 mg'a kadar çeşitli dozlar ve uygulama yolları kullanılmıştır (Lee ve ark., 2019; Li ve ark., 2015; Singh ve ark., 2017; Suryavanshi ve Kulkarni, 2020). Lee ve ark. (2019) yaptıkları karaciğer hasarı çalışmasında 0,5; 1; 2 ve 4 mg/kg escin kullanmışlardır. Belirtilen dozlardan sadece 2 ve 4 mg/kg dozları karaciğer hasarını hafifletmiştir. Bir diğer çalışmada diyabetik hepatotoksisite modelinde escin en iyi koruyucu etkiyi 3,6 mg/kg dozda göstermiştir (Gupta ve ark., 2021). Singh ve ark. (2017) karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarı oluşturmuşlardır ve 14 gün boyunca 0,9; 1,8; ve 3,6 mg/kg dozlarında i.p. escin uygulamışlardır. Çalışma sonucunda 1,8 ve 3,6 mg/kg escin uygulamasının karaciğer hasarını hafiflettiğini ve 3,6 mg/kg dozda uygulamanın en iyi sonucu verdiğini göstermişlerdir. Ayrıca escinin toksikolojik profilinde 300 mg/kg üstündeki dozlarda kullanılmadığı sürece olumsuz etkisi olmadığı bildirilmiştir (Suryavanshi ve Kulkarni, 2021). Dozlardan 3,6 mg/kg uzun süre (14 gün) uygulanması sonucunda toksik etki göstermemesi ve en etkili doz olarak belirtilmesi sebebiyle seçilmiştir. Uygulama kolaylığı ve seçilen dozun i.p. uygulamasının bulunduğu çalışmalar referans alınarak escin i.p. yoldan uygulanmıştır.

Çeşitli çalışmalarla da gösterildiği üzere çalışmada kullanılan 7,5 mg/kg dozda sisplatin ve 3,6 mg/kg dozda escin kullanımı güvenilir, kabul edilen dozlardır. Bu nedenle escin+sisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla gözlenen MDA seviyelerindeki yükselişin dozdan bağımsız olduğu ve escin+sisplatin uygulamasının lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla böbrek, karaciğer ve beyinde hasara sebep olduğu gözlenmiştir.

Kan üre nitrojeni ve kreatinin seviyeleri nefrotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan en yaygın parametreler arasındadır (Baum ve ark., 1975). Üre ve kreatinin seviyeleri sisplatinin oluşturduğu oksidatif stres durumunda doku hasarına bağlı şekilde yükselen parametreler arasındadır (Kawai ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2018).

Üre ve kreatinin protein olmayan azotlu metabolitlerdir ve böbreklerdeki hasar sonucunda oluşan metabolitler değildirler (Burtis ve Bruns, 2014). Böbreklerde meydana gelen yetmezlik durumlarında üre ve kreatinin gibi azotlu atık ürünlerin eliminasyonunda sorunlar ortaya çıkmaktadır ve serum düzeylerindeki yükseliş bu duruma bağlıdır (Kamal, 2014). Bu azotlu atık ürünlerden üre normalde amonyağın karaciğerde metabolize edilmesi sonucu üretilen ve metabolize olamayan bir maddedir. Üre düzeylerinin kontrolünde genel olarak BUN seviyeleri esas alınmaktadır. Kan üre nitrojen seviyelerindeki yükselişin sebebi başlıca; böbrek hasarı, glomerüler filtrasyon hızının azalması, glomerülonefrit ve idrar yolunun tıkanması durumlarıdır (Wang ve ark., 2014a). Kreatinin ise başlıca kas metabolizmasında oluşan bir üründür (Baum ve ark., 1975). Kas dokularındaki kreatin ve fosfokreatinin parçalanması sonucu oluşmaktadır (Salazar, 2014). Kreatinin başlıca böbrek yoluyla atılmaktadır ve bu sebeple BUN ile birlikte değerlendirilmeleri böbrek hasarını göstermektedir. Kreatinin serum seviyelerindeki yükselişin böbrek dışında kaslardaki değişimlere de bağlı olması ve serum BUN seviyelerindeki yükselişin böbrek hasarı dışında protein alımı ve katabolizmasına da bağlı olması sebebiyle böbrek hasarının tespitinde BUN ve kreatinin birlikte değerlendirilmektedir (Baum ve ark., 1975; Salazar, 2014).

Çalışma kapsamında serum biyokimyasal parametrelerinden BUN, kreatinin seviyelerine bakılarak escinin sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisite üzerindeki etkisi gösterilmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışma sonucu sisplatin grubunun serum BUN düzeylerinde kontrol ve escin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş gözlenirken, escin+sisplatin grubu da sisplatin grubuna benzer şekilde kontrol ve escin gruplarına göre anlamlı bir yükseliş sergileyerek sisplatinin gösterdiği yükselişi desteklemiştir. Serum kreatinin seviyelerinde sisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir yükseliş tespit edilmiştir. Escin ile birlikte sisplatin uygulaması sisplatinin uyardığı kreatinin düzeylerindeki yükselişi desteklemiştir ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiştir. Tek başına escin uygulaması hem BUN hem kreatinin seviyelerinde kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Bu durum nefrotoksisite açısından 2 maddenin potansiyalizasyonuna işaret etmektedir.

Serum BUN ve kreatinin düzeylerindeki sisplatine bağılı yükseliş önceki çalışmalar ile uyumludur. Sisplatin ile yapılan çeşit çalışmalar böbrek hasarına bağılı olarak BUN ve kreatinin seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir. Sisplatin ile yapılan bir çalışmada 7 mg/kg sisplatin uygulamasının BUN değerlerini yaklaşık 4 kat arttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada kreatinin seviyelerinde yaklaşık 3 kat artış gözlenmiştir (Ozen ve ark., 2004). Bir diğerk çalışmada 7,5 mg/kg sisplatin uygulanmıştır. Sisplatin uygulaması kreatinin ve BUN seviyelerini belirgin şekilde yükseltmiştir (Kawai ve ark., 2009). Benzer şekilde diğerk bir çalışmada BUN seviyelerinin sisplatin uygulaması ile anlamlı şekilde yükseldiğı bu duruma kreatininin eşlik ettiğı tespit edilmiştir (Bazmandegan ve ark., 2019). Yapılan başka bir çalışmada serum BUN düzeyleri sisplatin uygulaması ile yaklaşık 7 kat artmıştır. Kreatinin düzeylerinde BUN seviyelerine benzer şekilde yaklaşık 7 kat artış gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2018). Ogbe ve ark. (2020) yaptığı çalışmada ise 5 mg/kg dozunda sisplatin uygulamasının bile üre ve kreatinin miktarlarını yükselttiğini göstermiştir. Bu duruma bağılı olarak sisplatinin böbrek hasarını uyardığı tespit edilmiştir. Bir diğerk çalışmada ise sisplatinin böbreklerde oluşturduğu oksidatif stres durumuna BUN ve kreatinin seviyelerinin eşlik ettiğı gözlenmiştir (Koyuncu, 2018). Bahsedilen çalışmalarla gösterildiğı üzere sisplatin nefrotoksitesisi serum BUN ve kreatinin düzeylerindeki artış ile bağlantılıdır.

Escinin ise BUN ve kreatinin seviyeleri üzerindeki etkisini gösteren sınırlı veri mevcuttur. Escinin sisplatin ile birlikte yapılmış bir çalışmasına rastlanmamış olsa da escinin bazı toksik maddelerle yapılan çalışmalarında BUN ve kreatinin seviyelerini düşürebildiğine yönelik yayınlar vardır. Escin toksitesisine bakılan bir çalışmada 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarda 28 günlük oral uygulama sonrası BUN ve kreatinin seviyelerinde anlamlı bir değişim göstermemiştir (Suryavanshi ve Kulkarni, 2021). Potasyum dikromat ile indüklenen akut böbrek hasarı modelinde escinin 3,6 mg/kg dozunda 2 hafta uygulamasında koruyucu ve tedavi edici etkinlik gözlenmiştir. Akut böbrek hasarının indüklenmesi sonucu kontrol grubuna kıyasla kreatinin seviyesi %76, BUN seviyesi %87 artarken koruyucu olarak escin uygulaması hasar grubuna göre kreatinin seviyesini %32, BUN seviyesini %31 azaltmıştır. Ayrıca aynı çalışmada tedavi edici olarak escin kullanımı hasar grubuna göre kreatinin seviyesini %28, BUN seviyesini

%10 azaltmıştır (Salama ve Elmalt, 2021). Diyabetik nefropati modelinde yüksek oranda escin içeren at kestanesi süspansiyonunun etkisine bakılan bir çalışmada diyabetik nefropati BUN ve kreatinin seviyelerini yükseltmiştir. Süspansiyon uygulaması BUN ve kreatinin değerlerindeki yükselişi baskılamıştır (Elmas ve ark., 2016).

Çalışmamızda yalnızca escin uygulamasının kontrole kıyasla serum BUN ve kreatinin seviyelerinde değişime sebep olmaması önceki çalışmalarla ve escinin toksikolojik profili ile uyumludur. Aynı şekilde tek başına sisplatin uygulaması sisplatine yapılan çalışmalara benzer şekilde BUN ve kreatinin seviyelerini kontrole kıyasla yükseltmiştir. Sisplatin nefrotoksitesinde, nefronlardaki hasara bağlı olarak üre ve kreatinin atılımı gerçekleşememiş buna bağlı olarak BUN ve kreatinin değerleri yükselmiştir. Bu durum MDA seviyelerindeki yükseliş ile uyumlu olarak gerçekleşmiştir. Escin ile birlikte sisplatin uygulaması ise serum BUN ve kreatinin düzeylerindeki sisplatine bağlı yükselişi engellememiştir. Aksine ortalamalar dikkate alındığında escin ile birlikte sisplatin uygulaması BUN ve kreatinin düzeylerini sadece sisplatin uygulamasından daha fazla yükseltmiştir. Buna bağlı olarak sisplatine bağlı BUN ve kreatinin seviyelerindeki yükselişi escin engelleyememiş, aksine sisplatinin uyardığı böbrek hasarını escinin artırdığı görülmektedir. Bu durum böbrek hasarı, glomerüler filtrasyon hızının azalması veya glomerülonefritten ileri gelmiş olabilir. Ancak escin ile birlikte sisplatin uygulaması, MDA seviyeleriyle bağlantılı şekilde, oksidatif böbrek hasarı durumunda BUN ve kreatinin atılımını azaltmış, serumda üre ve kreatinin birikimine sebep olmuştur. Ayrıca sınırlı sayıda çalışma olsa da bazı toksik maddelerle yapılan önceki çalışmaların aksine escin böbrek toksisitesi durumunda BUN ve kreatinin seviyelerini baskılayamamıştır. Bu durum escinin sisplatinin neden olduğu nefrotoksositeye potansiyelize bir etki yapabileceğini düşündürmektedir.

Sisplatin toksisitesi durumunda nefrotoksosite ile birlikte hepatotoksosite en sık gözlenen toksik etkiler kapsamındadır (Al-Malki ve Sayed, 2014). Karaciğer hasarının göstergesi olan aminotransferazlar amino asitleri katelize eden enzimlerdir. Aminotransferazlar genel olarak vücuda dağılmış şekildedir. Bunlardan AST başlıca kalp, karaciğer, iskelet kasları ve böbrekte bulunurken ALT başlıca karaciğer ve

böbrekte bulunur (Burtis ve Bruns, 2014). Aspartat aminotransferaz ve ALT seviyeleri öncelikli olarak karaciğer hastalıklarının teşhisinde kullanılırken bu enzimlerdeki yükseliş her zaman karaciğere spesifik değildir (Huang ve ark., 2006). Serum AST seviyelerindeki yükseliş kalp ve kas hastalıklarıyla ilişkili olabilirken ALT seviyesindeki yükseliş genellikle karaciğer, nadiren de böbrek ile ilgilidir. Bu sebeple, ALT ve AST'nin birlikte değerlendirilmesi karaciğer hasarının değerlendirilmesi için önemlidir (Burtis ve Bruns, 2014). Karaciğerde meydana gelen hasar durumunda kan dolaşımına normalin üzerinde bir AST ve ALT salınımı olur. Buna bağlı olarak, bu parametrelerdeki yükseliş doğrudan hasar ile ilişkilidir (Huang ve ark., 2006). Karaciğere bağlı hastalıklarda ALT ve AST değerleri referans değerlerin 100 katına kadar artabilmektedir. Artış miktarının hastalıkla ilişkisi olmamakta hastanın durumu kötüleşirken düşüşler gözlenebilmektedir (Burtis ve Bruns, 2014).

Karaciğer hasarını gösteren bir diğer parametre olan bilirubin ise hemoglobinin gibi yapısında hem halkası bulunan proteinlerin hem halkasının parçalanması sonucu oluşan bir maddedir (Scharschmidt ve ark., 1982). Bilirubin canlılarda indirekt ve direkt bilirubin halinde bulunabilmektedir. Hem halkasının parçalanması sonucu oluşan forma indirekt bilirubin denilmektedir. İndirekt bilirubin kanda albümin ile karaciğere taşınmaktadır (Méndez-Sánchez ve ark., 2017). Karaciğere gelen indirekt bilirubin, glukuronik asitle konjuge olarak direkt bilirubin haline geçmektedir. Direkt bilirubin safra yoluyla atılmaktadır (Scharschmidt ve ark., 1982). İndirekt ve direkt bilirubin seviyelerinin toplamı total bilirubin olarak isimlendirilmektedir. Bilirubin seviyelerindeki yükseliş fazla miktarda hem halkası parçalanmasından olabileceği gibi çoğunlukla hepatositlerdeki bilirubin alımı, konjugasyonu veya atılımındaki bozukluklardan kaynaklanmaktadır (Méndez-Sánchez ve ark., 2017). Total bilirubin serum seviyeleri karaciğer hastalıklarında ve hasarında yükselmektedir (López-Velázquez ve ark., 2014; Méndez-Sánchez ve ark., 2017; Scharschmidt ve ark., 1982). Ayrıca, TB düzeylerindeki yükseliş, indirekt veya direkt bilirubin miktarı ile ayrılan karaciğer hasarına ya da hemoglobinin parçalanmasına bağlı sarılığa sebep olmaktadır. Bu yükseliş, karaciğer hasarı ile birlikte gerçekleştiğinde hepatoselüler sarılık olarak isimlendirilmektedir (Fargo ve ark., 2017).

Çalışmamızda serum biyokimyasal parametrelerinden ALT, AST ve TB seviyelerine bakılarak escinin sisplatinin oluşturduğu hepatotoksositeye yönelik etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda sisplatin grubunun serum ALT ve AST seviyelerinde kontrol ve escin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir. Escin+sisplatin grubundaki serum ALT ve AST seviyeleri ise kontrol, escin ve sisplatin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş göstermiş, escin uygulaması sisplatinin uyardığı ALT ve AST seviyelerindeki yükselişi şiddetlendirmiştir. Serum TB seviyelerinde ise sisplatin ve escin+sisplatin gruplarında kontrol ve escin gruplarına kıyasla anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir. Sadece escin uygulaması ALT, AST ve TB düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır.

Geçmişte yapılan çalışmalar sisplatin hepatotoksitesinin serum ALT, AST ve TB seviyelerini yükselttiğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada sisplatin uygulamasının karaciğer üzerinde toksisite gösterdiği serum biyokimyasal parametrelerindeki yükseliş ile gösterilmiştir. Sisplatin uygulaması sonucu serum ALT, AST ve TB seviyelerinin kontrol grubuna göre yükseldikleri tespit edilmiştir (Ogbe ve ark., 2020). Bir diğer çalışmada 5 mg/kg dozda sisplatin uygulamasıyla serum ALT, AST ve TB düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir. Yükselen ALT, AST ve TB düzeylerinin karaciğer hasarıyla ilgili olduğu histopatolojik bulgular ile doğrulanmıştır (Ezz-Din ve ark., 2011). Benzer şekilde başka bir çalışmada 7 mg/kg dozunda sisplatin uygulamasıyla serum ALT ve AST düzeylerinin 2 kat, bilirubin düzeylerinin 1,5 kat arttığı gözlenmiştir (Silici ve ark., 2011). Çalışmalarda belirtilen şekilde sisplatin hepatotoksitesi ALT, AST ve TB düzeyleri ile doğrudan bağlantılıdır.

Çeşitli toksik maddeler ile yapılan çalışmalar escinin serum ALT, AST ve TB seviyelerindeki toksik maddeye bağlı yükselişi düşürdüğünü ve fizyolojik koşullarda etkisinin olmadığını göstermektedir. Karbontetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarı modelinde 0,9; 1,8 ve 3,6 mg/kg escin uygulamaları doza bağımlı şekilde karbontetraklorürün sebep olduğu ALT, AST ve TB düzeylerindeki yükselmeyi baskılamıştır (Singh ve ark., 2017). Gupta ve ark. (2021) yaptığı streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik hepatotoksite modelinde ALT, AST ve TB düzeyleri diyabetik grupta artmıştır. Aynı çalışmada escin uygulaması yükselen ALT, AST ve

TB seviyelerini sadece 3,6 mg/kg dozda baskılamıştır. Başka bir çalışmada ise siklofosfamid ile hepatotoksisite uyarılmıştır. Escin uygulaması siklofosfamid kaynaklı artan AST ve ALT seviyelerini baskılamıştır (Cengiz ve ark., 2020). Lee ve ark. (2019) asetaminofen ile indükledikleri karaciğer hasarı modelinde escinin etkisini incelemişlerdir. Escin uygulaması asetaminofenin sebep olduğu ALT seviyelerindeki yükselişi doza bağımlı olarak baskılamıştır. Genel olarak çalışmalarda escin dozu ile karaciğer hasarındaki iyileşme arasında bir bağlantı var gibi gözükse de endotoksemik hepatotoksisite modelinde yalnızca 5 ve 10 mg/kg oral escin uygulamasının serum ALT düzeylerini endotoksemik gruba göre baskıladığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 20 mg/kg escin uygulaması ALT seviyelerindeki yükselişe anlamlı bir etki gösterememiştir. ALT seviyeleri üzerindeki dozun azalmasına bağlı etki histopatolojik bulgular ile desteklenmiştir (Li ve ark., 2015). Hepatik iskemi ve reperfüzyon hasarı modelinde escinin etkisine bakılan bir çalışmada 10 mg/kg escin uygulamasının ALT ve AST seviyelerini iskemi ve reperfüzyon grubuna göre baskıladığı gözlenmiştir (Uğras ve ark., 2016). Bahsedilen çalışmalarda tek başına escin uygulaması ise ALT, AST ve TB seviyelerinde anlamlı bir artış ya da düşüş göstermemiştir.

Çalışma kapsamında escin uygulaması kontrol grubuna kıyasla ALT, AST ve TB düzeylerinde literatüre uygun şekilde herhangi bir etki göstermemiştir. Sisplatin benzer şekilde literatüre uygun olarak ALT, AST ve TB seviyelerini kontrol grubuna kıyasla yükseltmiştir. Bu durum LPO ve nefrotoksisite ile uyumlu şekilde gerçekleşmiştir. Escin ile birlikte sisplatin uygulaması ise escin, kontrol ve sisplatin gruplarına göre ALT ve AST seviyelerini, escin ve kontrol gruplarına kıyasla TB düzeylerini anlamlı şekilde yükseltmiştir. Bu durum sisplatin harici diğer bazı toksik maddelerle yapılan çalışmaların aksine bir durumdur. Ancak bu yükseliş MDA, BUN ve kreatinin verileri ile uyumludur. Ayrıca TB düzeylerinde sisplatin ve escin+sisplatin grupları arasında her ne kadar anlamlı bir fark gözlenmemiş olsa da ortalamalar dikkate alındığında escin ile birlikte sisplatin uygulaması sadece sisplatin uygulamasına kıyasla TB düzeylerindeki artışı şiddetlendirmiştir. Total bilirubin, ALT ve AST düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde escin sisplatinin neden olduğu hepatotoksisiteyi hafifletmemiş aksine daha da şiddetlendirmiştir. Alanin aminotransferaz ve AST düzeylerindeki yükseliş direkt olarak karaciğerdeki

harabiyeti göstermiştir. Alanin aminotransferaz ve AST düzeylerindeki yükselişle gösterilen karaciğer harabiyeti kan dolaşımına yüksek oranda ALT ve AST salınımına neden olmuştur. Ek olarak, TB seviyelerindeki yükseliş ALT ve AST düzeyleri ile gösterilen karaciğerdeki hasarı doğrulamıştır. Total bilirubin düzeylerindeki yükseliş hemoglobin parçalanmasından olabileceği gibi karaciğer hasarına bağlı şekilde de gerçekleşebilmektedir. Escin ve sisplatinin birlikte uygulanmasının sebep olduğu ALT ve AST seviyelerindeki yükselişe bağlı olarak gerçekleşen TB düzeylerindeki artış hepatoselüler sarılık oluştuğunu göstermiştir. Bu durum çalışma esnasında escin ve sisplatinin birlikte uygulandığı gruplarda ikterus gözlenmesi ile paralel şekilde gerçekleşmiştir.

Biyokimyasal parametreler ve lipid peroksidasyonu ile belirtilen karaciğer, böbrek ve beyindeki hasar histopatolojik bulgular ile desteklenmiştir. Birçok çalışma sisplatinin belirtilen dokularda histopatolojik değişikliklere sebep olduğunu göstermektedir. Histopatolojik değişiklikler serum biyokimyasal ve oksidatif belirteçlerdeki hasarın mikroskopik göstergesidir. Sisplatin kullanılarak yapılan bir çalışmada, sisplatin uygulamasının karaciğer dokusunda hepatositlerde hasar yaptığı, kanama odakları gösterdiği, inflamasyona ve nekroza sebep olduğu histopatoloji ile tespit edilmiştir. Aynı çalışmada böbrek dokusunda kapsüller dilatasyon, glomerüller şekil bozuklukları ve interstisyel boşluklarda tıkanıklıklar gözlenmiştir (Ogbe ve ark., 2020). Bir diğer çalışmada sisplatin uygulamasının karaciğerde yapısal değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada başlıca hepatositlerde hidropik dejenerasyon, sitoplazmada granülasyon, piknotik nükleus, Karyoreksis, karyolizis, fokal nekroz gözlenmiştir. Böbrek dokularında ise dejenere olmuş, tıkanmış ve küçülmüş glomerüller, tübül lümenlerinde kalıntılar, piknotik nükleus, tübüler dejenerasyon ve genişleme, kanama tespit edilmiştir (Ezz-Din ve ark., 2011). Fouad ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada sisplatin nefrotoksisitesinin böbreklerde tübüler dilatasyon, vakuolar dejenerasyon ve nekroza sebep olduğunu göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada sisplatinin beyinde kılcal tıkanıklıklara, gliozise ve nöronal dejenerasyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Kandeil ve ark., 2019). Li ve ark. (2019) yaptığı çalışmada sisplatinin serebellumda hasara ve nöronal hücre sayısında azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise sisplatinin beyinde

ensefalomalazi, fokal hemoraji, dejenerasyon ve apoptoza neden olduğu hipokampüste ise nöronal dejenerasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Abdelkader ve ark., 2017). Çeşitli çalışmalar ile gösterildiği üzere sisplatin toksisitesi böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampüste hasar oluşturmaktadır.

Sisplatin üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda gözlenen lezyonlar çalışmamız ile uyumludur. Mikroskopik olarak HE boyama ile incelenen karaciğer dokusunda kontrol grubunda lezyon saptanmamış escin grubunda ise sisplatin ve escin+sisplatin gruplarına göre azalmış lezyon saptanmıştır. Biyokimyasal parametreler ve LPO'ya paralel şekilde sisplatin grubunda damarlarda şiddetli hiperemi, yangısal hücre infiltrasyonları, dejeneratif ve nekrotik değişiklikler gözlenmiştir. Belirtilen değişiklikler escin ile birlikte sisplatin uygulanmasında yalnızca sisplatin uygulanan gruba kıyasla daha belirgin şekilde gerçekleşmiştir. Benzer şekilde, böbreklerde kontrol grubunda lezyon gözlenmemiş, escin grubunda ise hafif şekilde lezyonlar gözlenmiştir. Sisplatin uygulaması ise böbreklerde glomerüler ve tübüler hücrelerde şişkinliğe Bowman boşluğunda daralmaya sebep olmuş, escin+sisplatin uygulanan grupta bu lezyonlar şiddetlenmiştir.

Her ne kadar çalışmamızda nörotoksisiteyi gösteren serum biyokimyasal parametresi mevcut olmasa da beyin, beyincik ve hipokampüste sisplatinin lezyonlara sebep olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Bu sebeple escinin belirtilen dokularda sisplatin varlığında ya da tek başına etkisi incelenmiştir. Genel olarak, karaciğer ve böbrek dokularına benzer şekilde beyin, beyincik ve hipokampüste sisplatin uygulanan grupta lezyon gözlenen hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla artış veya şiddetlenmiş lezyonlar gözlenmiştir. Escin ile birlikte sisplatin uygulaması lezyonları sisplatin uygulanan gruba kıyasla şiddetlendirmiş yalnız escin uygulaması ise hafif lezyonlar göstermiştir. Beyin dokusunun histopatolojisinde sisplatin grubunda çok sayıda nöronda dejeneratif ve nekrotik odaklar tespit edilmiş, escin+sisplatin grubunda sisplatin grubuna göre dejeneratif ve nekrotik görünüm sergileyen nöronların sayısında artış gözlenmiştir. Escin uygulaması sisplatin grubuna kıyasla az sayıda nöronda lezyon göstermiştir. Hipokampüste lezyonlar beyin dokusundaki lezyonlara paralel şekilde gerçekleşmiştir. Beyincikte ise kontrol grubu dışındaki gruplarda Purkinje

hücrelerinde dejeneratif değişiklikler gözlenmiş bu değişiklikler escin ile birlikte sisplatin uygulanan grupta şiddetlenmiştir.

Çalışmamızda incelenen oksidatif ve biyokimyasal belirteçlerdeki değişimler ve histopatolojik bulgular toplu şekilde değerlendirildiğinde sisplatinin nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisiteye sebep olduğu gözlenmiştir. Escin ile birlikte sisplatin uygulaması ise sisplatin toksisitesini azaltamamış aksine daha da artırmıştır.

Çalışma sonucunda sisplatin ve escinin IL-1 β üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İnterleukin-1 β ve TNF- α gibi sitokin ve kemokinlerin salınımı inflamasyon durumunda artmaktadır (Yang ve ark., 2020). Enfeksiyon ya da doku hasarına bağlı olarak LPS, patojenler, çeşitli proteinler ve ligandlar patojenle ve hasarla ilişkili molekülleri indüklemekte buna bağlı olarak IL-1 β salınımı ve üretimi olmaktadır. Ayrıca hücrelerdeki lizise bağlı olarak hücrelerdeki IL-1 β 'nın serbest kalması gerçekleşebilmektedir (Eder, 2009). IL-1 reseptörleri genel olarak LPS ya da TNF- α tarafından uyarılmaktadır ve IL-1 salınımına yol açmaktadır (Bird ve ark., 2002). IL-1 β inflamasyona karşı yanıtın en önemli araçlarından biridir. IL-1 β seviyelerindeki yükseliş, sisplatin toksisitesi dahil çok sayıda hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Eder, 2009; Faubel ve ark., 2007). Endotelial hücrelerin proinflamatuvar sitokinler tarafından uyarılması sonucunda hasarlı dokuların vasküler geçirgenliği artmaktadır ve vazodilatasyon şekillenmektedir (Yang ve ark., 2020). IL-1 β vücudun çeşitli uyarılara karşı verdiği yanıtta yararlı bir rol üstlenmektedir. Ancak bu durum haricinde IL-1 β zararlı etkilere aracılık edebilmekte doku hasarını destekleyebilmektedir (Eder, 2009).

Çalışmamızda immunohistokimyasal olarak IL-1 β immunoreaktivitesi böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampüste incelenmiştir ve skorlanmıştır. İmmunohistokimyasal skorlama ve mikroskopik değerlendirme sonuçları toplu şekilde değerlendirildiğinde IL-1 β immunoreaktivitesi escin ve sisplatin uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla artmış şekilde gözlenirse de escin+sisplatin grubunda immunoreaktivite sisplatin grubuna kıyasla şiddetlenmiş şekilde ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda gözlenen İL-1 β düzeylerindeki sisplatinin neden olduğu nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisiteye paralel şekilde gerçekleşen artış çeşitli çalışmalarda İL-1 β gen ekspresyonları, immunoreaktivitesi veya düzeyi belirlenerek gösterilmiştir. Sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin IL'lerle ilişkisinin tespit edilmeye çalışıldığı bir çalışma sisplatinin renal IL-1 β , IL-18 ve IL-6 seviyelerini artırdığını göstermiştir (Faubel ve ark., 2007). Bir diğer çalışmada sisplatin indüklü hepatotoksite modelinde, sisplatin, inflamasyonla ilgisi bulunan IL-1 β , TNF- α ve iNOS seviyelerini belirgin şekilde yükseltmiş ve oksidatif stresi artırmıştır (Al-Malki ve Sayed, 2014). Sisplatinin nörotoksisitesi üzerine yapılan bir çalışmada ise sisplatin uygulamasına bağlı beyin IL-1 β , IL-18 ve IL-6 seviyeleri artmıştır. Aynı çalışmada serum IL-1 β , IL-18 ve IL-6 seviyeleri beyindeki seviyelerini destekler şekilde artmış bu duruma oksidatif stres eşlik etmiştir (Abdel-Wahab ve Moussa, 2019). Çalışmalarda da gözlemlendiği üzere sisplatin nefrotoksisitesi, hepatotoksisitesi ve nörotoksisitesi İL-1 β salınımindaki artış ile bağlantılıdır.

Escinin IL-1 β seviyeleri üzerindeki etkisi ise çeşitli çalışmalarda farklılık göstermektedir ve sınırlı sayıda veri mevcuttur. Sisplatin dışındaki yapılan çalışmalarda escinin İL-1 β salınımindaki artışı engellediği gözlenmiştir. Escinin karaciğer hasarı üzerine etkilerine bakılan bir çalışmada escin karaciğerde asetaminofene bağlı IL-1 β yükselişini baskılamıştır (Lee ve ark., 2019). Bir diğer çalışmada escin intraserebral kanama modelinde, serum IL-1 β seviyelerini baskılamış monosit sayısını inhibe etmiştir. Aynı çalışmada rekombinant IL-1 β uygulaması sonucu tedavi grubunda escin grubuna kıyasla serum IL-1 β artışı gözlenmiştir. Bu duruma bağlı olarak IL-1 β uygulamasının escine bağlı iyileşmeyi tersine çevirdiği tespit edilmiştir (Ding ve ark., 2021). Parkinson hastalığı modelinde ise beyinin substantia nigra bölgesindeki IL-1 β seviyelerinde artış gözlenmektedir. Escin ile tedavi sonucunda IL-1 β seviyelerindeki yükselişin önlendiği tespit edilmiştir (Selvakumar ve ark., 2014). Benzer şekilde bir diğer çalışmada prostat hiperplazisinde prostat IL-1 β , TNF- α ve TGF- β 1 seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Escin uygulaması IL-1 β , TNF- α ve TGF- β 1 seviyelerini anlamlı bir şekilde azaltmıştır (Raafat ve ark., 2022). Zhang ve ark. (2021) escinin akut pankreatitdeki etkilerini *in vivo* olarak ratlarda ve *in vitro* olarak AR42J pankreas hücrelerinde incelemişlerdir.

Escin uygulaması akut pankreatit ile birlikte artan TNF- α , IL-6, IL-1 β ve IL-18 seviyelerini hem pankreas hem de hücrelerde baskılamıştır.

Genel olarak escin IL1- β seviyelerini ve inflamasyonu baskılıyor gibi gözükse de escinin inflamasyonu ve IL1- β seviyelerini etkilemediği veya yükselttiği çalışmalar da mevcuttur. Serebral iskemi üzerine yapılan bir çalışmada serebral iskemi sonrası, hipokampüsteki IL-1 α , IL-1 β , TLR-4 ve TNF- α 'nın en az iki kat yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir. Ancak escin uygulaması sonrası diğer çalışmaların aksine IL-1 β 'nın aşağı regüle edilmesinin sağlanmadığı sadece TNF- α 'nın aşağı regülasyonunun uyarıldığı gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2010). Escinin makrofaj benzeri RAW264.7 hücrelerine LPS uygulanmasıyla gerçekleştirilen inflamatuvar modelde yapılan çalışmada, IL1- β ve TNF- α seviyelerine bakılmıştır. Escin uygulaması hem IL1- β hem de TNF- α seviyelerini sadece yüksek dozda (10 mg/L) düşürmüştür. Düşük dozda (0,1 mg/L ve 1 mg/L) escin uygulaması IL1- β ve TNF- α seviyelerinde anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Aynı çalışmada karregenana kaynaklı pençe ödeminde escin uygulamasının antiinflamatuvar bir etki göstermediği tespit edilmiştir (Xin ve ark., 2011b). Potasyum dikromat tarafından indüklenen akut böbrek hasarı modelinde renal TNF- α , TLR4 ve HSP70 seviyeleri artmıştır. Böbrek hasarı öncesi veya sonrası uygulanan escin renal TNF- α , TLR4 ve HSP70 seviyelerini yükseltmiştir (Salama ve Elmalt, 2021).

Çalışmamızda gözlenen böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampüsteki sisplatin uygulamasına bağlı kontrol grubuna kıyasla İL-1 β immunoreaktivitesindeki artış, sisplatin üzerine yapılan önceki çalışmalar ile uyumludur. Ancak escinin İL-1 β immunoreaktivitesi üzerindeki etkisi literatürde farklı sonuçlar göstermekte ve çalışma sayısının azlığı ve çelişkili sonuçlar nedeniyle literatüre tamamen uyumlu bir şekilde değerlendirilememektedir. Escin ile birlikte sisplatin uygulanan grupta mikroskopik bulguların ve skorlama sonuçlarının toplu şekilde değerlendirilmesiyle gözlemlendiği üzere diğer gruplara göre bir artış vardır. Bu durum doku hasarını gösteren biyokimyasal, histopatolojik bulgular ve LPO ile uyumludur. Sisplatin uygulaması ile birlikte escin uygulaması doku hasarına bağlı olarak diğer gruplara kıyasla İL-1 β immunoreaktivitesini artırmış bu durum inflamasyona işaret etmektedir. Ayrıca, escin ve sisplatinin birlikte uygulanmasının sebep olduğu inflamasyon sisplatinin

oluşturduğu inflamasyona göre şiddetlenmiş şekilde ortaya çıkmıştır. Bu durum escin ve sisplatinin inflamasyon üzerinde sinerjistik etki yaptığını ileri sürebilir. Ayrıca, oksidant durum ve inflamasyon arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Oksidatif stres, inflamatuvar yollarda bazı transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir ve inflamasyona sebep olmaktadır (Hussain ve ark., 2016). Oksidatif stres ve inflamasyon arasındaki bu ilişkiye bağlı olarak sisplatinin ve escin+sisplatinin kontrol grubuna kıyasla gösterdiği İL-1 β immunoreaktivitesindeki artışında doku hasarının yanında LPO'nun da etkili olduğu görülmüştür.

Çalışmada tespit edilen İL-1 β immunoreaktivitesindeki artışın özellikle inflamatuvar bozukluklarda artış gösteren iNOS ile ilişkisini açığa çıkarmak için böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampüsteki iNOS immunoreaktivitesi üzerinde escin ve sisplatinin etkisine bakılmıştır. İndüklenebilir nitrik oksit sentataz NO sentezinden sorumludur ve NO vücudun birçok sisteminde fizyolojik ve patolojik mekanizmalarında düzenlenmesinde görevli bir sinyal molekülüdür (Aktan, 2004). Nitrik oksit canlılar için vasküler sistem, bağışıklık sistemi ve sinir sistemi gibi birçok sistemde yararlı etkileri sebebiyle görevli olması haricinde bir serbest oksijen radikalidir (Moncada ve Higgs, 1991; van Acker ve ark., 1995). Bir serbest oksijen radikali olan NO, özellikle inflamatuvar bozukluklarla karakterizedir ve sitotoksik etkileri mevcuttur. Çeşitli dokular ve birçok hücre tipi NO üretebilmektedir (Coleman, 2001). Nitrik oksit sentezi nitrik oksit sentatazları tarafından gerçekleştirilmektedir. İndüklenebilir nitrik oksit sentataz, sitokinler, hücre ölümü, bakteriyel enfeksiyonlar veya inflamatuvar hastalıklara bağlı olarak indüklenebilmektedir ve NO sentezini sağlamaktadır. İndüklenebilir nitrik oksit sentataz ekspresyonu ise LPS ve IL-1 β tarafından düzenlenmektedir. IL-1 β ve LPS, sırasıyla IL-1 β reseptörü ve CD14 reseptörüne bağlanarak İkB kinaz (IKK) yolunu aktive eder. IKK yolunun aktive olması sonucu normalde inaktif halde bulunan İkB- NF- κ B kompleksindeki NF- κ B aktive olur ve iNOS gen ekspresyonunu indükler. Ek olarak H₂O₂ ve ROS mevcudiyeti NF- κ B'yi aktive ederek iNOS ekspresyonunun artmasına sebep olur (Aktan, 2004). İnflamasyonla ve ROS ile artan iNOS konsantrasyonlarına bağlı olarak NO seviyelerinin yükselmesi ise birçok hastalıkla ilişkili olan oksidatif stres oluşumuna katılmaktadır (Aktan, 2004; Pierini ve Bryan, 2015).

Çalışmamızda immunohistokimyasal olarak iNOS immunoreaktivitesi böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampüste incelenmiştir ve skorlanmıştır. İmmunohistokimyasal skorum ve mikroskopik değerlendirme sonuçları toplu şekilde değerlendirildiğinde, beyin haricindeki dokularda iNOS immunoreaktivitesi escin ve sisplatin uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla artmış şekilde gözlenirse de escin+sisplatin grubunda immunoreaktivite sisplatin grubuna kıyasla şiddetlenmiş şekilde ortaya çıkmıştır. Beyin dokusunda ise iNOS immunoreaktivitesi sisplatin ve escin uygulanan gruplarda kontrole benzer skorlanmış olsa da escin ile birlikte sisplatin uygulaması escin ve kontrol gruplarına kıyasla immunoreaktivitede anlamlı bir artış göstermiştir.

Gözlemlediğimiz iNOS immunoreaktivitesindeki artış sisplatin toksisitesi ile doğrudan ilişkilidir. Sisplatin nefrotoksitesisi üzerine yapılan bir çalışmada sisplatin uygulamasının iNOS, NF- κ B ve kaspaz-3 immünoreaktivitesini yükselttiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada iNOS salınımına bağlı olarak gerçekleşen böbrek hasarı, NO, TNF- α ve oksidan-antioksidan sistemlerdeki değişimler ile doğrulanmıştır (Fouad ve ark., 2010). Kart ve ark. (2010) sisplatin hepatotoksitesisi üzerine yaptıkları bir çalışmada sisplatinin karaciğer iNOS immünoreaktivitesini yükselttiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada iNOS seviyelerindeki yükselişe karaciğer hasarının eşlik ettiği histopatolojik değişiklikler, ALT, AST seviyeleri ve antioksidan parametreler ile gösterilmiştir. İndüklenebilir nitrik oksit sentataz seviyelerindeki yükselişe artan NO seviyeleri eşlik etmiştir. Bir diğer çalışmada sisplatin nörotoksitesisinde hipokampal iNOS ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Artan iNOS ekspresyonu hipokampal nitrit oluşumu ve oksidatif stres ile desteklenmiştir (Chtourou ve ark., 2015). Benzer şekilde, başka bir çalışmada sisplatin nörotoksitesisinde beyin NO seviyelerinin yükseldiğini bu duruma oksidatif stresin eşlik ettiği gösterilmiştir (Hassan ve ark., 2013). Çeşitli çalışmalar ile gösterildiği üzere sisplatin toksisitesi durumunda iNOS ve NO sentezi ve seviyeleri artış göstermektedir.

Escinin ise iNOS seviyeleri üzerinde etkisini gösteren sınırlı sayıda veriye ulaşılabilmektedir. Selvakumar ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada MTTP/p ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde beyinin substantia nigra bölgesindeki iNOS

seviyelerinin sadece MTTP/p uygulanan grupta önemli bir artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada escin uygulaması beyindeki iNOS seviyelerindeki yükselişi engellemiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise akciğer kanseri hücreleri olan A549 hücrelerine sitokin karışımı verilerek NO ve iNOS seviyelerinin yükselmesi sağlanmıştır. Escin uygulaması A549 hücrelerinde gözlenen NO ve iNOS seviyelerini doza bağlı bir şekilde baskılamıştır. Escinin gösterdiği bu etki iNOS immunoreaktivitesinin değerlendirilmesi ile doğrulanmıştır. Ancak aynı çalışmada escin her ne kadar iNOS ve NO seviyelerini baskılamış olsa da escinin A549 hücrelerinin canlılığını ve çoğalma hızını doza bağlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Ji ve ark., 2011). Cheng ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada travmatik omurilik yaralanmasının omurilikteki iNOS seviyelerini yükselttiğini gözlemlemişlerdir. Escin uygulaması sonrası iNOS seviyeleri anlamlı bir şekilde düşmüştür. Çeşitli çalışmalarla da gösterildiği gibi escin deneysel olarak indüklenmiş iNOS artışını baskılıyor gibi gözükse çalışmamız kapsamındaki birçok dokuda iNOS seviyelerini gösteren bir çalışmaya rastlanamamış ve bahsedilen çalışmalar bizim çalışmamız ile tam bir uyum sağlayamamaktadır.

Çalışma sonucunda iNOS immunoreaktivitesi literatüre uygun şekilde beyin haricindeki tüm dokularda sisplatin varlığında kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Escinin tek başına uygulaması sisplatin kadar olmasa da iNOS immunoreaktivitesini beyin haricindeki tüm dokularda kontrol grubuna kıyasla yükseltmiştir. Escine bağlı iNOS immunoreaktivitesindeki artış literatüre aksi yönde gibi gözükse de bu konuyla ilgili sınırlı bilginin mevcut olması ve çalışma kapsamında değerlendirilen çoğu dokuda daha önce çalışılmamış olması kontrol grubuna kıyasla escin grubundaki artışın karşılaştırılmasını mümkün kılmamaktadır. Escin ve sisplatinin birlikte uygulanması ise kontrol grubuna kıyasla iNOS seviyelerini sisplatin toksisitesinin gösterdiği immunoreaktiviteden daha fazla artırmıştır. Yükselen iNOS immunoreativitesinin MDA ve IL-1 β seviyeleri ile uyumlu olmasından dolayı, iNOS seviyelerindeki yükselişin hem ROS varlığından hem de IL-1 β seviyelerinin yükselmesi yoluyla inflamasyondaki artıştan gerçekleştiği gözlenmektedir. Genel olarak iNOS ekspresyonu IL-1 β ve ROS seviyelerine bağlıdır ve çalışmamızda gözlenen iNOS seviyelerindeki yükseliş IL-1 β ve ROS seviyelerine uyumludur.

Sisplatin ve escin+sisplatin uygulaması doku hasarına ve ROS'a bağılı İL-1 β salınımını artırmış, artan İL-1 β ve ROS'un bir sonucu olarak ise iNOS sentezi artmıştır. iNOS sentezinin artmasına bağılı olarak iNOS'un sentezinden sorumlu olan NO seviyeleri artmaktadır ancak bu çalışmada NO seviyeleri ölçülememiştir. Yine de iNOS'un NO üretiminden sorumlu olması ve çalışmamızda gözlenen iNOS immüreaktiviteleindeki artışın NO üretimine sebep olma olasılığının yüksek olması sebebiyle NO'nun, MDA ile birlikte oksidatif stresi şiddetlendirdiği düşünülmüştür. Sisplatin ile birlikte escin uygulaması yalnızca sisplatin uygulanmasına kıyasla iNOS seviyelerini İL-1 β , doku hasarı ve ROS'a uyumlu şekilde daha fazla yükseltmiştir. Bu durumun bir sonucu olarak escin+sisplatin uygulamasının sisplatine kıyasla daha fazla NO üretimine sebep olduğu ve oksidatif stresi ağırlaştırdığı düşünülmüştür.

Çalışmada tespit edilen inflamasyondaki ve ROS'daki artışın, ROS'a veya sitokin salınmasına bağılı gerçekleşebilen kaspaz-3 apoptozuyla ilişkisini açığa çıkarmak için kaspaz-3 immunoreaktivitesi değerlendirilmiştir. Böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampüsteki kaspaz-3 immunoreaktivitesi üzerinde escin ve sisplatinin etkisine bakılmıştır. Memelilerde başlıca kaspaz-3 olmak üzere kaspazlar apoptozda görev almaktadır (Porter ve Janicke, 1999). Apoptoz, homeostaz veya hastalık durumunda organizmaların programlı hücre ölümünü sağlayan biyolojik bir süreçtir (Porter ve Janicke, 1999). Apoptoz, toksisite, hormonlar ve sitokinler tarafından tetiklenebilmektedir (Earnshaw ve ark., 1999). Apoptozun aktivasyonu ve devamında IL dönüştürücü enzim benzeri proteazlar ve kaspazlar görevlidir (Porter ve Janicke, 1999). Apoptozun içsel ve dışsal olmak üzere iki yolu vardır. İçsel apoptoz yolu başlıca Bcl-2 aktivasyonu ile başlamaktadır ve sitokrom c gibi proteinlerin sitozole salınmasına sebep olur. Sitokrom c kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 ise kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktive etmektedir (Brentnall ve ark., 2013). Dışsal apoptoz yolu ise kaspaz 8 tarafından ölüm reseptörü yolu ile aktive edilmektedir ve TNF- α gibi sitokinler tarafından indüklenmektedir (Tummers ve Green, 2017). Kaspazlar, ROS üretimi, DNA parçalanması, hücre bozuklukları, mitokondriyal bozukluklar gibi apoptozla ilişkili çok sayıda fonksiyondan sorumludur. Kaspazlar içerisinde kaspaz-3 hücre ölümünden sorumludur (Brentnall ve ark., 2013). Kaspazlar aktive olduğunda sitoplazma ve çekirdekteki DNA onarım mekanizmasında görevli bileşenleri, hücre içi

polipeptitleri parçalayarak hücrenin hayatta kalma yollarını bozmakta ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. Kaspazlar hücre iskeleti ve çekirdekdeki bileşenler haricinde sinyal yollarında yer alan proteinleri parçalamaktadırlar (Earnshaw ve ark., 1999). Ayrıca, apoptoz kanserin başlamasını, ilerlemesini ve çoğu antikanser ilacın etki yolunu etkileyen önemli bir süreçtir (Yang ve ark., 2001). Kaspaz-3 seviyeleri kansere yönelik apoptozda ve sisplatin nefrotoksitesisi, nörotoksitesisi ve hepatotoksitesisinde artmaktadır. Kaspaz-3, sisplatin toksisitesinde hücre ölümünün göstergesi olabilirken aynı zamanda kanserde apoptoza bağlı tedavide rol almaktadır (Cummings ve Schnellmann, 2002; Gomaa ve ark., 2020; Taghizadeh ve ark., 2021; Zhou ve ark., 2018).

Çalışma sonucunda immunohistokimyasal olarak kaspaz-3 immunoreaktivitesi böbrek, karaciğer, beyin, beyincik ve hipokampüste incelenmiştir ve skorlanmıştır. Immunohistokimyasal skorlama ve mikroskopik değerlendirme sonuçları toplu şekilde değerlendirildiğinde karaciğer, böbrek ve hipokampüste kaspaz-3 immunoreaktivitesi escin ve sisplatin uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla artmış şekilde gözlenmiştir. Belirtilen dokularda escin+sisplatin grubundaki immunoreaktivite sisplatin grubuna kıyasla şiddetlenmiş şekilde ortaya çıkmıştır. Beyin ve beyincik dokusunda ise iNOS immunoreaktivitesi sisplatin uygulanan grupta kontrole benzer skorlanmıştır. Ancak, belirtilen dokularda karaciğer, böbrek ve hipokampüse uyumlu şekilde escin ile birlikte sisplatin uygulaması diğer gruplara kıyasla kaspaz-3 immunoreaktivitesini artırmıştır.

Çalışmamızda gözlenen sisplatinine bağlı kaspaz-3 immunoreaktivitesindeki artışın çeşitli çalışmalarda gözlenen sisplatin toksitesisi ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada sisplatinin böbrek dokularında kaspaz-3 aktivitesini yükselttiği tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak sisplatinin oluşturduğu nefrotoksitede apoptoz yollarının etkili olduğundan bahsedilmiştir (Santos ve ark., 2007). Arjumand ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada sisplatin nefrotoksitesisinin apoptoz ile bağlantılı olduğunu tespit etmişlerdir. Sisplatin uygulamasına bağlı olarak NF- κ B ve kaspaz-3 immünoreaktivitesi anlamlı şekilde yükselmiş bu duruma oksidatif stres eşlik etmiştir. Sisplatin hepatotoksitesisi üzerine yapılan başka bir çalışma benzer şekilde sisplatinin karaciğer dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesini artırdığını göstermiştir. Kaspaz-

3 seviyelerindeki yükselişe artan ALT, AST, ALP seviyeleri ve oksidatif stres eşlik etmiştir (Taghizadeh ve ark., 2021). Sisplatin nörotoksitesi üzerine yapılan bir çalışmada ise sisplatinin serebral kaspaz-3 düzeylerini belirgin şekilde artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca kaspaz-3 seviyelerindeki yükselişe oksidatif stresin eşlik ettiği kaspaz-3 seviyelerindeki yükselişin intrinsik yoldan gerçekleştiği tespit edilmiştir (Gomaa ve ark., 2020). Belirtilen çalışmalarda gözlemlendiği üzere sisplatin nefrotoksitesi, hepatotoksitesi ve nörotoksitesi, kaspaz-3 ile doğrudan bağlantılıdır.

Escinin ise apoptoz yolları üzerindeki etkisi net değildir. Escin üzerine yapılan çalışmalarda doku farklılığında, diğer bazı toksik maddeler üzerinde ya da kanserde artmış ya da azalmış şekilde ölçülebilen kaspaz-3 seviyeleri çelişkili sonuçlara sebebiyet vermektedir. Cengiz ve ark. (2020) yaptığı çalışmada siklofosfamidin karaciğerdeki kaspaz-3 boyanmasını belirgin bir şekilde artırdığını escin uygulamasının kaspaz-3 pozitif hücre sayısını azalttığını tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada MPTP/p ile indüklenen Parkinson hastalığı modelinde beyinin substantia nigra bölgesinde kaspaz-3, 6, 7, 8 ve 9 seviyelerinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada escin tedavisinin kaspaz seviyelerindeki yükselişi baskıladığı görülmüştür (Selvakumar ve ark., 2015). Bir diğer çalışmada fokal serebral iskeminin apoptoza yol açtığı TUNEL boyama ile gösterilmiştir. Aynı çalışmada iskemi beyinde kaspaz immunoreaktivitesini artırmıştır. Escin ile ön tedaviye tabi tutulan grupta TUNEL pozitif hücre sayısı ve kaspaz-3 immunoreaktivitesi azalmıştır. Sonuçlar escinin kaspaza bağımlı yollar üzerinden apoptozu inhibe ettiğini göstermiştir (Hu ve ark., 2004a).

Sınırlı sayıda çalışmada escinin apoptozu baskıladığı belirtilmiş olsa da birçok çalışmada escinin apoptozu indüklediğinden bahsedilmektedir. Cheng ve ark. (2018) escinin mesane kanseri hücrelerinde apoptoza neden olduğunu tespit etmişlerdir. Escin, kaspaz-3, 8 ve 9 seviyelerini önemli ölçüde artırmış buna bağlı olarak kaspaza bağlı apoptoz yolunu uyarmıştır. Akut pankreatit modelinde escinin etkilerine bakılan bir çalışmada escin, pankreasta Bcl-2/BAX oranını azaltmış, kaspaz-3 ve p53 seviyelerini yükseltmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda escin, hem içsel hem dışsal apoptoz yollarını etkileyerek apoptozu artırmıştır. Çalışmada 1, 3 ve 6 mg/kg olarak

üç farklı escin dozu kullanılmasına rağmen escin apoptozu sadece 3 mg/kg dozunda artırmıştır. Aynı çalışmada escinin pankreas hücreleri olan AR42J hücrelerinde yapılan uygulamasında escinin apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2021). Bir diğer çalışmada escinin ROS seviyelerini ve kaspaz-3 aktivasyonunu yükselttiği GPx ve glutatyon redüktaz seviyelerini değiştirmeden GSH seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir. Buna bağlı olarak escinin apoptoz yolları üzerinden kanser hücrelerini baskıladığı bulunmuştur (Mojžišová ve ark., 2016). Böbrek kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise escinin hücreleri öldürürken ROS üretimini de yükselttiği buna bağlı olarak apoptoz kaskadını aktifleştirdiği tespit edilmiştir (Yuan ve ark., 2017). Osteosarkom hücrelerinde *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada escin kaspaz 3, 7, 8 ve 9 seviyelerini ve BAX, Bcl-2 seviyelerini yükselterek mitokondriyal apoptozu yükseltmiştir. Escinin kaspazlar üzerinden apoptozu indüklemesi *in vitro* olarak aneksin boyama ile gösterilmiştir. Aynı çalışmada escin apoptozu bağı olarak ROS seviyelerini yükselttiği tespit edilmiştir. Ayrıca *in vivo* olarak oluşturulan osteosarkom modelinde escinin tümör dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesini artırdığı gözlemlenmiştir (Zhu ve ark., 2017).

Çalışmamızda gözlenen kontrol grubuna kıyasla sisplatin ve escin gruplarındaki kaspaz-3 immunoreaktivitesindeki artış çoğunlukla literatüre paralel şekilde gerçekleşmiştir. Escin+sisplatin grubunda diğer gruplara kıyasla kaspaz-3 immunoreaktivitesinde artış olması ise inflamasyon, doku hasarı ve ROS ile uyumlu gerçekleşmiştir. Escin ve sisplatinin tek başına veya birlikte uygulanması toksisiteye sebep olarak kaspaz-3'e bağımlı içsel apoptoz yolunu etkinleştirmiştir. Sisplatin ve escinin birlikte uygulanması kaspaz-3 bağımlı apoptozu sisplatin veya escine kıyasla şiddetlenmiş şekilde gerçekleştirmiştir. Apoptozun bir sonucu olarak ise MDA ve NO'ya bağı oksidatif stres oluşmuştur. Çalışmada gözlenen doku hasarı, hücresel değişimler ve hücre ölümü üzerinde kaspaz-3'e bağı apoptozun etkisi olabileceğine işaret etmektedir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde escinin sisplatin kaynaklı nefrotoksiste, hepatotoksiste ve nörotoksiste üzerinde koruyucu ya da iyileştirici etkinliğinin olmadığı görülmektedir. Escin ve sisplatin tek başına veya birlikte kaspaz-3'e bağı apoptozu indüklemiştir. Escin+sisplatin grubunda LPO ve NO oluşumu

oksidatif hasara işaret etmektedir. Aynı zamanda muhtemel artmış apoptoz, ROS ve inflamasyona bağı olarak escin+sisplatinin birlikte uygulanmasıyla diğ er gruplardan daha fazla doku hasarına ve hücre sel ölüme yol açmıştır. İnflamasyon ve ROS'a bağımlı şekilde dokulardaki iNOS seviyelerindeki artış, oksidatif strese katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçlar sisplatinin neden olduğu toksisitenin escin varlığında artmasının kaspaza ve sitokin kaynaklı olabileceğine işaret etmektedir. IL-1 β seviyelerindeki yükseliş apoptozun bir sonucu olarak ya da inflamasyondan kaynaklı olabilmektedir. Buna bağlı olarak sisplatin ve escinin birlikte uygulanmasında gözlenen IL-1 β seviyelerindeki yükselişin kaynağı apoptoz ve inflamasyondan kaynaklı olabilmektedir. MDA seviyelerindeki yükseliş hücre içi oksidatif stresin artmasına bağlı hücre membranlarında görülen LPO ve apoptozun indüklenmesine işaret etmektedir. İndüklenebilir nitrik oksit sentataz seviyeleri ise dolaylı olarak IL-1 β 'ya bağlı şekilde yükselmekte veya doğrudan ROS seviyelerindeki artışla karakterize olabilmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde escin ile birlikte sisplatin uygulaması tek başına sisplatin toksisitesinden daha yüksek seviyede bir hasara sebep olmuştur. Bu durum artan kaspaz-3 immunoreaktivitesinde de gösterildiği üzere sisplatin ve escinin toksisite açısından sinerjistik etki yaptığını ve inflamasyon ve oksidatif stresi artırdığını düşündürmektedir.

Daha önceki çalışmalar, escinin bazı toksik maddelerin sebep olduğu hasarı azalttığını göstermiş olsa da çalışmamızda elde edilen bulgular escinin sisplatin varlığında sinerjistik bir şekilde toksisite gösterdiği şeklindedir. Escinin tek başına uygulandığı grupta biyokimyasal, oksidant ve antioksidan parametrelerle gösterildiği ve histopatolojik parametreler ile desteklendiği üzere toksisiteye rastlanmaması bu durumu desteklemiştir. Bu nedenle sisplatinle birlikte escin kullanımında dikkatli olunması gerekmekte, escinin sisplatin toksisitesini artırıcı potansiyel bir ajan olarak düşünülmesi gerekmektedir. Ayrıca, bu durumun ileri çalışmalar ile desteklenmesi, etki mekanizmasının net bir şekilde aydınlatılması ve toksisitenin farklı dozlarla yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abdel-Wahab WM, Moussa FI (2019). Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des Devel Ther.*, **13**, p: 1155-1162.

Abdel Moneim AE, Othman MS, Aref AM (2014). Azadirachta indica attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress. *Biomed Res Int.*, **2014**, p: 647131.

Abdelkader NF, Saad MA, Abdelsalam RM (2017). Neuroprotective effect of nebivolol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats. *J Neurochem.* **141(3)**, p: 449-460.

Afsar T, Razak S, Aldisi D, Shabbir M, Almajwal A, Al Kheraif AA, Arshad M (2021). Acacia hydaspica R. Parker ethyl-acetate extract abrogates cisplatin-induced nephrotoxicity by targeting ROS and inflammatory cytokines. *Sci Rep.*, **11(1)**, p: 17248.

Aggarwal BB, Gehlot P (2009). Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol.*, **9(4)**, p: 351-369.

Aktan F (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.*, **75(6)**, p: 639-653.

Al-Malki AL, Sayed AA (2014). Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa-beta. *BMC Complement Altern Med.*, **14(1)**, p: 282.

Aldossary SA (2019). Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomed. Pharmacol. J.*, **12(1)**, p: 7-15.

Anonim (2010). Toxicity report of escin. *Drug Future.* <https://www.drugfuture.com/toxic/q52-q541.html> (Erişim Tarihi: 25.05.2021)

Anonim (2014). Türkiye böbrek hastalıkları nleme ve kontrol programı eylem planı (2014-2017). *TC Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara.* Alınan https://nefroloji.org.tr/uploads/pdf/Turkiye_Bobrek_Hastaliklari_Onleme_ve_Kontrol_Programi.pdf. (Erişim Tarihi: 25.03.2022)

Anonim (2020). Assessment report on Aesculus hippocastanum L., semen. *European Medicines Agency.* https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/assessment-report-aesculus-hippocastanum-l-semen-final-revision-1_en.pdf. (Erişim Tarihi: 15.05.2021)

Anonim (2021). What is cancer? *National Cancer Institute.* <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. (Erişim Tarihi: 17.01.2022)

Anonim (2022a). Escin. *Chem Search Engine*.
https://www.chemsrc.com/en/cas/6805-41-0_524527.html. (Erişim Tarihi: 25.01.2022)

Anonim (2022b). PubChem compound summary for CID 6540709, beta-Escin. *National Center for Biotechnology Information*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Escin>. (Erişim Tarihi: 01.03.2022)

Arjumand W, Seth A Sultana S (2011). Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF kappa B, TNF-alpha and caspase-3 expression in wistar rats. *Food Chem Toxicol.*, **49(9)**, p: 2013-2021.

Aslankoç R, Demirci D, Ümmahan İ, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, Savran EŞ Yılmaz B (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi.*, **26(3)**, 362-369.

Avarave S, Thomas J, Radha V, Altaff K (2021). Synergistic protective effect of Camellia sinensis leaf buds and Camellia sinensis flowers against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats and characterization of its bioactive compounds. *Nat Prod Res.*, p: 1-5.

Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.*, **2014**, p: 360438.

Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C (2008). Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.*, **6(1)**, p: 1-18.

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.*, **3(3)**, p: 205-214.

Baum N, Dichoso CC, Carlton CE (1975). Blood urea nitrogen and serum creatinine. Physiology and interpretations. *Urology*. **5(5)**, p: 583-588.

Bazmandegan G, Amirteimoury M, Kaeidi A, Shamsizadeh A, Khademalhosseini M, Nematollahi MH, Hassanipour M, Fatemi I (2019). Sumatriptan ameliorates renal injury induced by cisplatin in mice. *Iran J Basic Med Sci.*, **22(5)**, p: 563-567.

Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*. **49(2)**, p: 3-8.

Bhutto I, Luttly G (2012). Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med.*, **33(4)**, p: 295-317.

Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ (2002). Evolution of interleukin-1beta. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13(6)**, p: 483-502.

Blackadar CB (2016). Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol.*, **7(1)**, p: 54-86.

Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *Bmc Cell Biol.*, **14(1)**, p: 32.

Brunner F, Hoffmann C, Schuller-Petrovic S (2001). Responsiveness of human varicose saphenous veins to vasoactive agents. *Br J Clin Pharmacol.*, **51(3)**, p: 219-224.

Bucaloiu ID, Kirchner HL, Norfolk ER, Hartle JE, Perkins RM (2012). Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. *Kidney Int.*, **81(5)**, p:477-485.

Burtis CA, Bruns DE (2014). *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 7nd Edition, Missouri:Elsevier Health Sciences, p:286-885.

Burton GJ ve Jauniaux E (2011). Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, **25(3)**, p: 287-299.

Carillon J, Rouanet JM, Cristol JP, Brion R (2013). Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharm Res-Dordr.*, **30(11)**, p: 2718-2728.

Cengiz M, Kutlu HM, Peker Cengiz B, Ayhanci A (2020). Escin attenuates oxidative damage, apoptosis and lipid peroxidation in a model of cyclophosphamide-induced liver damage. *Drug Chem Toxicol.*, p: 1-8.

Chabner BA, Longo DL (2019). *Cancer chemotherapy, immunotherapy, and biotherapy : principles and practice*. 7nd Edition, Philadelphia:Wolters Kluwer.

Chabner BA, Roberts TG, Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer.*, **5(1)**, p: 65-72.

Cheng CL, Chao WT, Li YH, Ou YC, Wang SS, Chiu KY, Yuan SY (2018). Escin induces apoptosis in human bladder cancer cells: An in vitro and in vivo study. *Eur J Pharmacol.*, **840**, p: 79-88.

Cheng CY, Su SY, Tang NY, Ho TY, Chiang SY, Hsieh CL (2008). Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Res.*, **1209**, p: 136-150.

Cheng P, Kuang F, Ju G (2016). Aescin reduces oxidative stress and provides neuroprotection in experimental traumatic spinal cord injury. *Free Radic Biol Med.*, **99**, p: 405-417.

Cheong DHJ, Arfuso F, Sethi G, Wang L, Hui KM, Kumar AP, Tran T (2018). Molecular targets and anti-cancer potential of escin. *Cancer Lett.*, **422**, p: 1-8.

Choie DD, del Campo AA, Guarino AM (1980). Subcellular localization of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in rat kidney and liver. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **55(2)**, p: 245-252.

Chtourou Y, Gargouri B, Kebieche M, Fetoui H (2015). Naringin abrogates cisplatin-induced cognitive deficits and cholinergic dysfunction through the down-regulation of AChE expression and iNOS signaling pathways in hippocampus of aged rats. *J Mol Neurosci.*, **56(2)**, p: 349-362.

Coleman JW (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.*, **1(8)**, p: 1397-1406.

Cummings BS, Schnellmann RG (2002). Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther.*, **302(1)**, p: 8-17.

Czerska M, Mikolajewska K, Zielinski M, Gromadzinska J, Wasowicz W (2015). Today's oxidative stress markers. *Med Pr.*, **66(3)**, p: 393-405.

Dasari S, Tchounwou PB (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.*, **740**, p: 364-378.

Ding YX, Eerduna GW, Duan SJ, Li T, Liu RX, Zhang LM, Wang T, Fu FH (2021). Escin ameliorates the impairments of neurological function and blood brain barrier by inhibiting systemic inflammation in intracerebral hemorrhagic mice. *Exp Neurol.*, **337**, p: 113554.

Domanski D, Zegrocka-Stendel O, Perzanowska A, Dutkiewicz M, Kowalewska M, Grabowska I, Maciejko D, Fogtman A, Dadlez M, Koziak K (2016). Molecular mechanism for cellular response to beta-escin and its therapeutic implications. *PLoS One.*, **11(10)**, p: e0164365.

Dudek-Makuch M, Studzinska-Sroka E (2015). Horse chestnut - efficacy and safety in chronic venous insufficiency: an overview. *Rev. bras. farmacogn.*, **25(5)**, p: 533-541.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.*, **68(1)**, p: 383-424.

Eder C (2009). Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology.* **214(7)**, p: 543-553.

El-Galley RE, Keane TE (2000). Embryology, anatomy, and surgical applications of the kidney and ureter. *Surg Clin North Am.*, **80(1)**, p: 381-401.

Ellerby RA, Davis HL, Jr., Ansfield FJ, Ramirez G (1974). Phase I clinical trial of combined therapy with 5-FU (NSC 19893) and CIS-platinum (II) diaminedichloride (NSC 119875). *Cancer.* **34(4)**, p: 1005-1010.

Elmas O, Erbas O, Yigitturk G (2016). The efficacy of Aesculus hippocastanum seeds on diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Biomed Pharmacother.*, **83**, p: 392-396.

Ezz-Din D, Gabry MS, Farrag ARH, Moneim AEA (2011). Physiological and histological impact of Azadirachta indica (neem) leaves extract in a rat model of cisplatin-induced hepato and nephrotoxicity. *Med. Plant Res.*, **5(23)**, p: 5499-5506.

Fargo MV, Grogan SP, Saguil A (2017). Evaluation of jaundice in adults. *Am Fam Physician.*, **95(3)**, p: 164-168.

Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, Somerset H, Oh D-J, Lu L, Klein CL, Dinarello CA (2007). Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322(1)**, p: 8-15.

Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative stress. *Sports Med.*, **36(4)**, p: 327-358.

Finco DR (1997). *Kidney function*. In Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. (Eds.), Clinical biochemistry of domestic animals. Amsterdam:Elsevier, p: 441-484.

Fouad AA, Al-Sultan AI, Refaie SM, Yacoubi MT (2010). Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. *Toxicology*. **274(1-3)**, p: 49-56.

Fu F, Hou Y, Jiang W, Wang R, Liu K (2005). Escin: inhibiting inflammation and promoting gastrointestinal transit to attenuate formation of postoperative adhesions. *World J Surg.*, **29(12)**, p: 1614-1620.

Gallelli L (2019). Escin: a review of its anti-edematous, anti-inflammatory, and venotonic properties. *Drug Des Devel Ther.*, **13**, p: 3425-3437.

Gallelli L, Zhang L, Wang T, Fu F (2020). Severe acute lung injury related to covid-19 infection: A review and the possible role for escin. *J Clin Pharmacol.*, **60(7)**, p: 815-825.

Ghosh S (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.*, **88**, p: 102925.

Gomaa DH, Hozayen WG, Al-shafeey H, Elkelawy AMMH, Hashem KS (2020). Ginkgo biloba alleviates cisplatin-mediated neurotoxicity in rats via modulating APP/A β /P2X7R/P2Y12R and XIAP/BDNF-dependent caspase-3 apoptotic pathway. *Appl. Sci.*, **10(14)**, p: 4786.

Goodsell DS (2006). The molecular perspective: cisplatin. *Oncologist*. **11(3)**, p: 316-317.

Grandjean P (2016). Paracelsus revisited: The dose concept in a complex world. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **119(2)**, p: 126-132.

Gupta S, Tiwari M, Dubey V (2021). Assessment of β -aescin effect in streptozotocin induced diabetic model: Diabetic hepatotoxicity study. *J. Pharm. Res. Int.*, **33**.

Gür F, Cengiz M, Kutlu HM, Cengiz BP, Ayhancı A (2021). Molecular docking analyses of Escin as regards cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: In vivo and in silico studies. *Toxicol Appl Pharm.*, **411**, p: 115386.

Halliwell B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.*, **35(Pt 5)**, p: 1147-1150.

Harder HC, Rosenberg B (1970). Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. *Int J Cancer*. **6(2)**, p: 207-216.

Hassan I, Chibber S, Khan AA, Naseem I (2013). Cisplatin-induced neurotoxicity in vivo can be alleviated by riboflavin under photoillumination. *Cancer Biother Radio.*, **28(2)**, p: 160-168.

Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, Gonnermann M, Schonekas H, Rost A, Neuhaus H, Haag C, Clemens M, Heinrich B, Vehling-Kaiser U, Fuchs M, Fleckenstein D, Gesierich W, Uthgenannt D, Einsele H, Holstege A, Hinke A, Schalhorn A, Wilkowski R (2006). Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.*, **24(24)**, p: 3946-3952.

Hildebrandt F (2010). Genetic kidney diseases. *Lancet.*, **375(9722)**, p: 1287-1295.

Horvath T, Şerban G (2011). Evaluation of oligoelements in the fruits of aesculus hippocastanum l. by aasf. *Clujul Medical.*, **84(4)**.

Hu XM, Zhang Y, Zeng FD (2004a). Effects of beta-aescin on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin.*, **25(10)**, p: 1267-1275.

Hu XM, Zhang Y, Zeng FD (2004b). Effects of sodium beta-aescin on expression of adhesion molecules and migration of neutrophils after middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Pharmacol Sin.*, **25(7)**, p: 869-875.

Huang XJ, Choi YK, Im HS, Yarimaga O, Yoon E, Kim HS (2006). Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors.*, **6(7)**, p: 756-782.

Huang Y, Liu C, Song X, An M, Liu M, Yao L, Famurewa AC, Olatunji OJ (2021). Antioxidant and anti-inflammatory properties mediate the neuroprotective effects of hydro-ethanolic extract of tiliacora triandra against cisplatin-induced neurotoxicity. *J Inflamm Res.*, **14**, p: 6735-6748.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2003). Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. **3(4)**, p: 276-285.

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**.

Idris S, Mishra A, Khushtar M (2020). Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*, **31(5)**.

Iqbal MO, Ahmed MM, Arshad S, Javaid U, Khan IA, Manzoor M, Andleeb S, Riaz R, Munawar SH, Manzoor Z, Mumtaz A (2022). Nephroprotective effects of alhagi camelorum against cisplatin-induced nephrotoxicity in albino wistar rats. *Molecules*. **27(3)**, p: 941.

Jacobs C, Kalman SM, Tretton M, Weiner MW (1980). Renal handling of cisdiamminedichloroplatinum (II). *Cancer Treat. Rep.*, **64**, p: 1223-1226.

James CW, Steinhaus MC, Szabo S, Dressier RM (2004). Tenofovir-related nephrotoxicity: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*. **24(3)**, p: 415-418.

Jacometti Cardoso Furtado NA, Pirson L, Edelberg H, M Miranda L, Loira-Pastoriza C, Preat V, Larondelle Y, André CM (2017). Pentacyclic triterpene bioavailability: An overview of in vitro and in vivo studies. *Molecules*. **22(3)**, p: 400.

Ji DB, Xu B, Liu JT, Ran FX, Cui JR (2011). Beta-Escin sodium inhibits inducible nitric oxide synthase expression via downregulation of the JAK/STAT pathway in A549 cells. *Mol Carcinog.*, **50(12)**, p: 945-960.

Jiang N, Xin W, Wang T, Zhang L, Fan H, Du Y, Li C, Fu F (2011). Protective effect of aescin from the seeds of *Aesculus hippocastanum* on liver injury induced by endotoxin in mice. *Phytomedicine*. **18(14)**, p: 1276-1284.

Kamal A (2014). Estimation of blood urea (BUN) and serum creatinine level in patients of renal disorder. *Indian J Fundam Appl Life Sci.*, **4(4)**, p: 199-202.

Kandeil MA, Mahmoud MO, Abdel-Razik AH, Gomaa SB (2019). Thymoquinone and geraniol alleviate cisplatin-induced neurotoxicity in rats through downregulating the p38 MAPK/STAT-1 pathway and oxidative stress. *Life Sci.*, **228**, p: 145-151.

Kannaiyan R, Shanmugam MK, Sethi G (2011). Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Lett.*, **303(1)**, p: 9-20.

Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H (2010). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol.*, **62(1)**, p: 45-52.

Kauffman GB, Pentimalli R, Doldi S, Hall MD (2010). Michele Peyrone (1813-1883), discoverer of cisplatin. *Platinum Metals Review*, **54(4)**, p: 250-256.

Kawai Y, Satoh T, Hibi D, Ohno Y, Kohda Y, Miura K, Gemba M (2009). The effect of antioxidant on development of fibrosis by cisplatin in rats., *J Pharmacol Sci.* **111(4)**, p: 433-439.

Kim SK, Choe JY, Park KY (2016). Rebamipide suppresses monosodium urate crystal-induced interleukin-1 β production through regulation of oxidative stress and caspase-1 in THP-1 cells. *Inflammation.*, **39(1)**, p: 473-482.

Koyuncu İ (2018). Ratlarda sisplatin kaynaklı nefrotoksisite üzerine naringenin koruyucu etkisinin incelenmesi. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, **7(1)**, s: 119-125.

Küçük Kurt I, Ince S, Keles H, Akkol EK, Avcı G, Yesilada E, Bacak E (2010). Beneficial effects of Aesculus hippocastanum L. seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration. *J Ethnopharmacol.*, **129(1)**, p: 18-22.

Kurata M, Suzuki M, Agar NS (1993). Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp Biochem Physiol B.*, **106(3)**, p: 477-487.

Ladhari A, Chappell J (2019). Unravelling triterpene biosynthesis through functional characterization of an oxidosqualene cyclase (OSC) from *Cleome arabica* L. *Plant Physiology and Biochemistry.*, **144**, p: 73-84.

Lang W (1977). Studies on the percutaneous absorption of ³H-Aescin in Pigs. *Res in Exp Med.*, **169(3)**, p: 175-187.

Lee HC, Yu HP, Liao CC, Chou AH, Liu FC (2019). Escin protects against acetaminophen-induced liver injury in mice via attenuating inflammatory response and inhibiting ERK signaling pathway. *Am J Transl Res.*, **11(8)**, p: 5170-5182.

Li M, Lu C, Zhang L, Zhang J, Du Y, Duan S, Wang T, Fu F (2015). Oral administration of escin inhibits acute inflammation and reduces intestinal mucosal injury in animal models. *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2015**, p: 503617.

Li Y, Zheng M, Sah SK, Mishra A, Singh Y (2019). Neuroprotective influence of sitagliptin against cisplatin-induced neurotoxicity, biochemical and behavioral alterations in Wistar rats. *Mol Cell Biochem.*, **455(1-2)**, p: 91-97.

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.*, **13**, p: 757-772.

Litterst CL, Gram TE, Dedrick RL, Leroy AF, Guarino AM (1976). Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) to dogs. *Cancer Res.*, **36(7 PT 1)**, p: 2340-2344.

Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, Zhao MH, Lv J, Garg AX, Knight J, Rodgers A, Gallagher M, Kotwal S, Cass A, Perkovic V (2015). Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet.*, **385(9981)**, p: 1975-1982.

Loehrer PJ, Einhorn LH (1984). Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med.*, **100(5)**, p: 704-713.

Loesche A, Kahnt M, Serbian I, Brandt W ve Csuk R (2019). Triterpene-based carboxamides act as good inhibitors of butyrylcholinesterase. *Molecules*, **24(5)**, p: 948.

Loos M, Kleeff J, Friess H, Buchler MW (2008). Surgical treatment of pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci.*, **1138(1)**, p: 169-180.

López-Velázquez JA, Chávez-Tapia NC, Ponciano-Rodríguez G, Sánchez-Valle V, Caldwell SH, Uribe M, Méndez-Sánchez N (2014). Bilirubin alone as a biomarker for short-term mortality in acute-on-chronic liver failure: an important prognostic indicator. *Annals of Hepatology.*, **13(1)**, p: 98-104.

Mahadevan V (2019). Anatomy of the kidney and ureter. *Surgery (Oxford)*, **37(7)**, p: 359-364.

Manohar S, Leung N (2018). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol.*, **31(1)**, p: 15-25.

Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM (2006). Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol.*, **39(6)**, p: 656-661.

Matsuda H, Li Y, Murakami T, Ninomiya K, Yamahara J, Yoshikawa M (1997). Effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., on acute inflammation in animals. *Biol Pharm Bull.*, **20(10)**, p: 1092-1095.

Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M (1999). Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa, and IIb on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Eur J Pharmacol.*, **373(1)**, p: 63-70.

Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M (2000). Possible involvement of dopamine and dopamine₂ receptors in the inhibitions of gastric emptying by escin Ib in mice. *Life Sci.*, **67(24)**, p: 2921-2927.

Matsuda H, Murakami T, Li Y, Yamahara J, Yoshikawa M (1998). Mode of action of escins Ia and IIa and E,Z-senegin II on glucose absorption in gastrointestinal tract. *Bioorg Med Chem.*, **6(7)**, p: 1019-1023.

Méndez-Sánchez N, Vitek L, Aguilar-Olivos NE, Uribe M (2017). *Bilirubin as 13*. In Patel VB, Preedy VR. (Eds), *Biomarkers in Liver Disease*. Dordrecht:Springer, 281-289.

Michelini FM, Alche LE, Bueno CA (2018). Virucidal, antiviral and immunomodulatory activities of beta-escin and Aesculus hippocastanum extract. *J Pharm Pharmacol.*, **70(11)**, p: 1561-1571.

Missoum A (2019). Recent updates on mesenchymal stem cell based therapy for acute renal failure. *Curr. Urol.*, **13(4)**, p: 189-199.

Mojžišová G, Kello M, Pilátová M, Tomečková V, Vašková J, Vaško L, Bernátová S, Mirossay L, Mojžiš J (2016). Antiproliferative effect of β -escin-an in vitro study. *Acta Biochim. Pol.*, **63(1)**, p: 79-87.

Moncada S, Higgs EA (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.*, **21(4)**, p: 361-374.

Montopoli M, Frolidi G, Comelli MC, Prosdocimi M, Caparrotta L (2007). Aescin protection of human vascular endothelial cells exposed to cobalt chloride mimicked hypoxia and inflammatory stimuli. *Planta Med.*, **73(3)**, p: 285-288.

Naito Y, Masaichi C-iL, Kato Y, Nagai R, Yonei Y (2010). Oxidative stress markers. *J. anti-aging med.*, **7(5)**, p: 36-44.

Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, **420(6917)**, p: 846-852.

Nygren P (2001). What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol.*, **40(2-3)**, p: 166-174.

Ogbe RJ, Agbese SP, Abu AH (2020). Protective effect of aqueous extract of *Lophira lanceolata* leaf against cisplatin-induced hepatorenal injuries and dyslipidemia in Wistar rats. *Clin. Phytoscience.*, **6(1)**, p: 1-11.

Ong AC, Devuyst O, Knebelmann B, Walz G, Diseases K (2015). Autosomal dominant polycystic kidney disease: the changing face of clinical management. *Lancet*. **385(9981)**, p: 1993-2002.

Ottillinger B, Greeske K (2001). Rational therapy of chronic venous insufficiency--chances and limits of the therapeutic use of horse-chestnut seeds extract. *BMC Cardiovasc Disord.*, **1(1)**, p: 5.

Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sogut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z (2004). Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.*, **24(1)**, p: 27-35.

Palipoch S, Punsawad C (2013). Biochemical and histological study of rat liver and kidney injury induced by Cisplatin. *J Toxicol Pathol.*, **26(3)**, p: 293-299.

Patlolla JM, Raju J, Swamy MV, Rao CV (2006). β -Escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21waf1/cip1 in colon cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, **5(6)**, p: 1459-1466.

Pereira Beserra F, Xue M, Maia GLA, Leite Rozza A, Helena Pellizzon C, Jackson CJ (2018). Lupeol, a pentacyclic triterpene, promotes migration, wound closure, and contractile effect in vitro: Possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK pathways. *Molecules*. **23(11)**, p: 2819.

Pierini D, Bryan NS (2015). Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. In: Armstrong D. (eds) Advanced Protocols in Oxidative Stress III. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Vol 1208, New York:Springer, p: 63-71.

Ponnuswamy P, Ostermeier E, Schrott A, Chen J, Huang PL, Ertl G, Nieswandt B, Kuhlencordt PJ (2009). Oxidative stress and compartment of gene expression determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase. *Am J Pathol.*, **174(6)**, p: 2400-2410.

Porter AG, Janicke RU (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **6(2)**, p: 99-104.

Prestayko AW (2013). *Cisplatin: current status and new developments*. 1st Edition, New York:Academic Press.

Qiao P, Zhang B, Liu X, Xu J, Li X (2022). Effects of escin on oxidative stress and apoptosis of H9c2 cells induced by H₂O₂. *Dis Markers.*, **2022**, p: 7765353.

Raafat M, Kamel AA, Shehata AH, Ahmed AF, Bayoumi AMA, Moussa RA, Abourehab MAS, El-Daly M (2022). Aescin protects against experimental benign prostatic hyperplasia and preserves prostate histomorphology in rats via suppression of inflammatory cytokines and COX-2. *Pharmaceuticals (Basel)*, **15(2)**, p: 130.

Rasheed K, Gupta D, Dubey A, Singh Y (2021). A review on β -escin. *IJMRPS.*, **15**, p: 16.

Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T (1965). Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **205(4972)**, p: 698-699.

Salama A, Elmalt H (2021). Aescin ameliorates acute kidney injury induced by potassium dichromate in rat: involvement of TLR 4/TNF- α pathway. *Egypt. J. Chem.*, **64(4)**, p: 2067-2074.

Salazar JH (2014). Overview of urea and creatinine. *Labmedicine.*, **45(1)**, p:19-20.

Salinas FM, Vazquez L, Gentilini MV, A OD, Regueira E, Nabaes Jodar MS, Viegas M, Michelini FM, Hermida G, Alche LE, Bueno CA (2019). Aesculus hippocastanum L. seed extract shows virucidal and antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) and reduces lung inflammation in vivo. *Antiviral Res.*, **164**, p: 1-11.

Salvador JAR, Leal AS, Valdeira AS, Goncalves BMF, Alho DPS, Figueiredo SAC, Silvestre SM, Mendes VIS (2017). Oleanane-, ursane-, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: Recent advances in cancer treatment. *Eur J Med Chem.*, **142**, p: 95-130.

Santos NA, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC (2007). Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol.*, **81(7)**, p: 495-504.

Sato I, Suzuki T, Kobayashi H, Tsuda S (2005). Antioxidative and antigenotoxic effects of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata*) seeds. *J Vet Med Sci.*, **67(7)**, p: 731-734.

Schaake-Koning C, van den Bogaert W, Dalesio O, Festen J, Hoogenhout J, van Houtte P, Kirkpatrick A, Koolen M, Maat B, Nijs A ve et al. (1992). Effects of concomitant cisplatin and radiotherapy on inoperable non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.*, **326(8)**, p: 524-530.

Scharschmidt BF, Blanckaert N, Farina FA, Kabra PM, Stafford BE, Weisiger RA (1982). Measurement of serum bilirubin and its mono- and diconjugates: application to patients with hepatobiliary disease. *Gut.*, **23(8)**, p: 643-649.

Schaue D, McBride WH (2015). Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol.*, **12(9)**, p: 527-540.

Schurig JE, Bradner WT, Huftalen JB, Doyle GJ, Gyls JA (1980). *Toxic side effects of platinum analogs.* In Prestayko AW, Stanley TC, Stephen KC (Eds), Cisplatin. New York: Academic Press, p:227-236.

Selvakumar GP, Janakiraman U, Essa MM, Justin Thenmozhi A, Manivasagam T (2014). Escin attenuates behavioral impairments, oxidative stress and inflammation in a chronic MPTP/probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res.*, **1585**, p: 23-36.

Selvakumar GP, Manivasagam T, Rekha KR, Jayaraj RL, Elangovan N (2015). Escin, a novel triterpene, mitigates chronic MPTP/p-induced dopaminergic toxicity by attenuating mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis. *J Mol Neurosci.*, **55(1)**, p: 184-197.

Seyahi N, Ateş K, Süleymanlar G (2017). Türkiye’de renal replasman tedavilerinin güncel durumu: Türk Nefroloji Derneği kayıt sistemi 2015 yılı özet raporu. *Turk Neph Dial Transpl.*, **26(2)**, s: 154-160

Silici S, Ekmekcioglu O, Kanbur M, Deniz K (2011). The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World J Urol.*, **29(1)**, p: 127-132.

Singh H, Sidhu S, Chopra K, Khan MU (2017). The novel role of beta-aescin in attenuating CCl4-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol.*, **55(1)**, p: 749-757.

Sirtori CR (2001). Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res.*, **44(3)**, p: 183-193.

Suryavanshi SV, Kulkarni YA (2020). Escin alleviates peripheral neuropathy in streptozotocin induced diabetes in rats. *Life Sci.*, **254**, p: 117777.

Suryavanshi SV, Kulkarni YA (2021). Toxicity of escin-triterpene saponins from Aesculus. *Toxicol Environ Chem.*, 1-8.

Taghizadeh F, Hosseinimehr SJ, Zargari M, Karimpour Malekshah A, Mirzaei M, Talebpour Amiri F (2021). Alleviation of cisplatin-induced hepatotoxicity by gliclazide: Involvement of oxidative stress and caspase-3 activity. *Pharmacol Res Perspect.*, **9(3)**, p: e00788.

Tan SM-L, Li F, Rajendran P, Kumar AP, Hui KM, Sethi G (2010). Identification of β -escin as a novel inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3/Janus-activated kinase 2 signaling pathway that suppresses proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **334(1)**, p: 285-293.

Tsang CK, Liu Y, Thomas J, Zhang Y, Zheng XF (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun.*, **5(1)**, p: 3446.

Tummers B, Green DR (2017). Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev.*, **277(1)**, p: 76-89.

Ugras D, Mustafa U, Oguzhan O, Mehmet Y, Seckin A, Gazi OO, Cem O, Erol K, Akin A (2016). Protective effects of escin on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Medica Mediterr.*, **32(4)**, p: 973-979.

Valenzuela A (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.*, **48(4)**, p: 301-309.

Van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun.*, **214(3)**, p: 755-759.

Wallace MA (1998). Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J.*, **68(5)**, p: 800-821.

Wang H, Ran J, Jiang T (2014a). Urea. *Urea Transporters*. p: 7-29.

Wang K, Jiang Y, Wang W, Ma J, Chen M (2015). Escin activates AKT-Nrf2 signaling to protect retinal pigment epithelium cells from oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.*, **468(4)**, p: 541-547.

Wang T, Fu F, Zhang L, Han B, Zhu M, Zhang X (2009). Effects of escin on acute inflammation and the immune system in mice. *Pharmacol Rep.*, **61(4)**, p: 697-704.

Wang T, Zhao S, Wang Y, Yang Y, Yao L, Chu L, Du H, Fu F (2014b). Protective effects of escin against indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Toxicol Mech Methods.*, **24(8)**, p: 560-566.

Wei F, Ma LY, Jin WT, Ma SC, Han GZ, Khan IA, Lin RC (2004). Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).*, **52(10)**, p: 1246-1248.

Weinberg RA (1996). How cancer arises. *Sci Am.*, **275(3)**, p: 62-70.

Weiss RB, Poster DS (1982). The renal toxicity of cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Treat Rev.*, **9(1)**, p: 37-56.

Welters MJ, Fichtinger-Schepman AM, Baan RA, Jacobs-Bergmans AJ, Kegel A, van der Vijgh WJ, Braakhuis BJ (1999). Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: correlation between platinum content, DNA adduct levels and drug sensitivity in vitro and in vivo. *Br J Cancer.*, **79(1)**, p: 82-88.

Wetzel D, Menke W, Dieter R, Smasal V, Giannetti B, Bulitta M (2002). Escin/diethylammonium salicylate/heparin combination gels for the topical treatment of acute impact injuries: a randomised, double blind, placebo controlled, multicentre study. *Br J Sports Med.*, **36(3)**, p: 183-188.

Wu CY, Jan JT, Ma SH, Kuo CJ, Juan HF, Cheng YS, Hsu HH, Huang HC, Wu D, Brik A, Liang FS, Liu RS, Fang JM, Chen ST, Liang PH, Wong CH (2004). Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **101(27)**, p: 10012-10017.

Wu XJ, Zhang ML, Cui XY, Gao F, He Q, Li XJ, Zhang JW, Fawcett JP, Gu JK (2012). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of escin Ia and isoescin Ia after administration of escin and of pure escin Ia and isoescin Ia in rat. *J Ethnopharmacol.*, **139(1)**, p: 201-206.

Xiao GM, Wei J (2005). Effects of beta-Aescin on the expression of nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor-alpha after traumatic brain injury in rats. *J Zhejiang Univ Sci B.*, **6(1)**, p: 28-32.

Xin W, Zhang L, Fan H, Jiang N, Wang T, Fu F (2011a). Escin attenuates acute lung injury induced by endotoxin in mice. *Eur J Pharm Sci.*, **42(1-2)**, p: 73-80.

Xin W, Zhang L, Sun F, Jiang N, Fan H, Wang T, Li Z, He J, Fu F (2011b). Escin exerts synergistic anti-inflammatory effects with low doses of glucocorticoids in vivo and in vitro. *Phytomedicine.* **18(4)**, p: 272-277.

Xu X, Nie S, Ding H, Hou FF (2018). Environmental pollution and kidney diseases. *Nat Rev Nephrol.*, **14(5)**, p: 313-324.

Yang B, El Nahas AM, Thomas GL, Haylor JL, Watson PF, Wagner B, Johnson TS (2001). Caspase-3 and apoptosis in experimental chronic renal scarring. *Kidney Int.*, **60(5)**, p: 1765-1776.

Yang YQ, Wang LL, Yuan M, Yu Q, Fu FH (2020). Anti-Inflammatory and gastroprotective effects of escin. *Nat. Prod. Commun.*, **15(12)**, p: 1934578X20982111.

Yoshikawa T, Naito Y (2002). What is oxidative stress? *Jpn. Med. Assoc. J.*, **45(7)**, p: 271-276.

Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK (2009). Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol.*, **47(6)**, p: 1176-1183.

Yuan J, Murrell GA, Trickett A, Wang MX (2003). Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.*, **1641(1)**, p: 35-41.

Yuan SY, Cheng CL, Wang SS, Ho HC, Chiu KY, Chen CS, Chen CC, Shiao MY, Ou YC (2017). Escin induces apoptosis in human renal cancer cells through G2/M arrest and reactive oxygen species-modulated mitochondrial pathways. *Oncol Rep.*, **37(2)**, p: 1002-1010.

Zhang L, Fu F, Zhang X, Zhu M, Wang T, Fan H (2010). Escin attenuates cognitive deficits and hippocampal injury after transient global cerebral ischemia in mice via regulating certain inflammatory genes. *Neurochem Int.*, **57(2)**, p: 119-127.

Zhang L, Gu Y, Li H, Cao H, Liu B, Zhang H, Shao F (2018). Daphnetin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting inflammatory and oxidative response. *Int Immunopharmacol.*, **65**, p: 402-407.

Zhang Q, Zhao C, Zhang L, Sun K, Yu L, Wang X, Ren L, Zhang N, Chen C, Liu J, Wang H, Tian H (2021). Escin sodium improves the prognosis of acute pancreatitis via promoting cell apoptosis by suppression of the ERK/STAT3 signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev.*, **2021**, p: 9921839.

Zhao SQ, Xu SQ, Cheng J, Cao XL, Zhang Y, Zhou WP, Huang YJ, Wang J, Hu XM (2018). Anti-inflammatory effect of external use of escin on cutaneous inflammation: possible involvement of glucocorticoids receptor. *Chinese Journal of Natural Medicines.*, **16(2)**, p: 105-112.

Zhao W, Lao Y, Liu Y, Niu J, Xiao Z, Arulselvan P, Shen J (2022). Escin induces apoptosis in ovarian cancer cell line by triggering S-phase cell cycle arrest and p38 MAPK/ERK pathway inhibition. *J King Saud Univ Sci.*, **34(1)**, p: 101644.

Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer.*, **143(4)**, p: 921-930.

Zhou XY, Fu FH, Li Z, Dong QJ, He J, Wang CH (2009). Escin, a natural mixture of triterpene saponins, exhibits antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Planta Med.*, **75(15)**, p: 1580-1585.

Zhu J, Yu W, Liu B, Wang Y, Shao J, Wang J, Xia K, Liang C, Fang W, Zhou C, Tao H (2017). Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.*, **8(10)**, p: e3113.

Zhu M, Ying J, Lin C, Wang Y, Huang K, Zhou Y, Teng H (2018). β -Escin inhibits the proliferation of osteosarcoma cells via blocking the PI3K/Akt pathway. *RSC advances.*, **8(52)**, p: 29637-29644.

