



T.C.  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



**ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULAN AKUT  
KARACİĞER HASARINDA SİNİR BÜYÜME  
FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ VE p38 MAPK SİNYAL  
YOLAĞININ ROLÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**ASIM AYAZ**

**Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı**  
Bilim Alan Kodu: 10102.16



**BALIKESİR**  
2025

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULAN AKUT KARACİĞER  
HASARINDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ VE  
p38 MAPK SİNYAL YOLAĞININ ROLÜ**



**PROF. DR. MUSA KARAMAN**

**Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı**

**Bilim Alan Kodu: 10102.16**

**Proje No: 2022/026-Balıkesir Üniversitesi BAP**

**BALIKESİR**

**2025**



T.C.  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TEZ KABUL VE ONAY**

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde  
**Asım AYZ** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

**“ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULAN AKUT KARACİĞER HASARINDA  
SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ VE p38 MAPK SİNYAL YOLAĞININ  
ROLÜ”**

başlıklı tez çalışması,  
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından  
**DOKTORA TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi:** 17/06/2025

**TEZ SINAV JÜRİSİ**

Prof. Dr. Hasan ÖZEN  
Balıkesir Üniversitesi  
**(Başkan)**

Prof. Dr. Musa KARAMAN  
Balıkesir Üniversitesi  
Üye **(Danışman)**

Prof. Dr. Fatma İLHAN  
Balıkesir Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Musa Özgür ÖZYİĞİT  
Uludağ Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Ahmet AKKOÇ  
Uludağ Üniversitesi  
Üye

Yukarıdaki Doktora Tezi,  
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 23/06/2025 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI  
Enstitü Müdürü

## BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi **beyan ederim.**

26/05/2025

İmza

Asım AYZ

## TEŞEKKÜR

Kalbim tarif edilemez biçimde minnet ve şükranla dolu. Eğitim sürecim boyunca, bana inanan, sabır ve anlayış gösteren, rehberliği ve engin birikimiyle yolumu aydınlatan danışman hocam Prof. Dr. Musa KARAMAN'a; kıymetli fikirleri, yapıcı eleştirileri ve sunduğu farklı perspektiflerle bakış açımı genişleten Prof. Dr. Hasan ÖZEN'e; zorlu zamanlarda verdiği samimi ve şefkat dolu desteğiyle eğitimime ayrı bir zenginlik katan Prof. Dr. Fatma İLHAN'a; bu çalışmanın ve eğitimimin olmazsa olmazı, her bir anımda yanımda olan, her türlü zahmetime katlanan kardeşim Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA'ya; bilgi ve tecrübeleriyle ufku genişleten Tıp Fakültesi öğretim üyeleri Doç. Dr. Figen ASLAN ve Doç. Dr. Gülay TURAN'a; laboratuvarının kapılarını açan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ziya İLHAN'a; İnönü Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e; karmaşık istatistiki analizlerde verdiği desteğiyle Sağlık Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Celalettin ÇEVİK'e; proje ve materyal destekleri için Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına; öğrencilik sürecimin sorunsuz tamamlanmasını sağlayan Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetimi ve personeline; doktora başlarken verdiği cesaret ve yolculuk boyunca gösterdiği ilgi için Prof. Dr. Mehmet Ali AZMAN'a; anabilim dalımızda sağladıkları sıcak ve samimi ortam ile öğrenciliğimi keyifli hale getiren İlayda YILDIRIM, M. Yusuf KURBAN ve diğer öğrenci arkadaşlarıma; süreç boyunca desteğini esirgemeyen değerli müdürüm Abdülkadir ŞAHİN'e ve kıymetli mesai arkadaşlarıma; hayatımın her anında olduğu gibi bu dönemde de destekleriyle yanımda olan aileme ve dostlarıma; ve son olarak, sevgileri, sabırları ve anlayışları için en büyük destekçilerim eşime ve kızıma;

Sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Asetaminofen.....	3
2.1.1. Asetaminofenin Farmakolojik Özellikleri .....	4
2.2. İlaça Bağlı Karaciğer Hasarı .....	7
2.3. Asetaminofen Hepatotoksitesisi .....	9
2.3.1. Toksik Metabolit Oluşumu ve Glutasyon Tükenmesi.....	10
2.3.2. Oksidatif Stres ve Mitokondri Disfonksiyonu .....	12
2.3.3. Hücre Ölümü ve Yangı .....	16
2.3.4. Rejenerasyon.....	19
2.4. Sinir Büyüme Faktörü (NGF).....	21
2.5. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolakları .....	25
2.5.1. p38 MAPK Sinyal Yolağı .....	28
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>32</b>
3.1. Deney Aşaması ve Gruplar.....	32
3.2. Histopatolojik Analizler .....	34
3.3. Biyokimyasal Analizler .....	35
3.3.1. Kan Serumu Analizleri.....	35

3.3.2. Doku Analizleri.....	35
3.4. İmmunohistokimyasal Analizler .....	37
3.5. mRNA Ekspresyon Analizi .....	38
3.5.1. Total RNA Ekstraksiyonu.....	39
3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi .....	39
3.5.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	40
3.6. İstatistiksel Analizler .....	41
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>42</b>
4.1. Makroskobik Bulgular .....	42
4.2. Histopatolojik Bulgular .....	43
4.3. Biyokimyasal Bulgular .....	50
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	55
4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları .....	75
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>77</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>94</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>96</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>111</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>112</b>
Ek-1. Yerel Etik Kurulu Kararı .....	112

## ÖZET

### ASETAMİNOFEN İLE OLUŞTURULAN AKUT KARACİĞER HASARINDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ VE p38 MAPK SİNYAL YOLAĞININ ROLÜ

Bu çalışmada, farelerde asetaminofen (APAP) ile oluşturulan akut karaciğer hasarında, eksojen sinir büyüme faktörünün (NGF) hepatoprotektif etkisi ve p38 MAPK sinyal yolağıyla etkileşimi araştırılmıştır. Çalışmada 9-10 haftalık, erkek, 64 adet BALB/c fare eşit olarak aşağıda belirtilen şekilde 8 gruba ayrıldı; Kontrol, NGF, SB203580, NGF + SB203580, APAP, APAP + NGF, APAP + SB203580 ve APAP + NGF + SB203580. Tüm uygulamalar (APAP 150 mg/kg, NGF 10 µg/kg ve SB203580 20 mg/kg) intraperitoneal tek doz olarak yapıldı. 24 saat sonra dekapitasyonla çalışma sonlandırılarak deneklerden biyokimyasal (ALT, AST, GGT, GSH, MDA, TAS, TOS), histopatolojik (Hematoksilen-Eozin boyama), immunohistokimyasal (iNOS, nitrotirozin, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, kaspaz 3, kaspaz 8, NGF) ve moleküler (PZR) analizler için kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. APAP uygulanan gruplarda farklı derecelerde, sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde hidropik dejenerasyon ile karakterize hücre hasarı belirlendi. APAP+NGF+SB203580 ve APAP+SB203580 gruplarında hasarın diğer gruplardan daha şiddetli olduğu tespit edildi. Enzimatik hasar belirteçleri olan ALT, AST, GGT ile oksidatif strese ilişkin GSH, MDA, TAS, TOS, iNOS ve nitrotirozin seviyeleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. IL-1 $\beta$  ve IL-10 seviyelerinde APAP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış şekillenmediği, TNF- $\alpha$  ve IL-6 ekspresyonlarında ise artışın anlamlı olduğu görüldü. TNF- $\alpha$  ekspresyonunun APAP+NGF+SB203580 grubunda, IL-1 $\beta$  ve IL-6 ekspresyonlarının ise ayrıca APAP+SB203580 grubunda da diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi. APAP uygulamasının NGF ekspresyonunu artırdığı, en yüksek ekspresyonun APAP+SB203580 grubunda şekillendiği gözlemlendi. APAP grubunda kaspaz 3 ve kaspaz 8 enzim seviyelerinin arttığı, APAP grupları arasında APAP+NGF grubunda kaspaz 3'ün, APAP+NGF+SB203580 grubunda ise kaspaz 8'in anlamlı düzeyde yükseldiği görüldü. Moleküler yöntemle yapılan analizlerde APAP grubunda p38 mRNA seviyesi kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, APAP

uygulanan gruplar arasında p38 seviyeleri açısından anlamlı derecede farklılık bulunmadı. Çalışmamızın sonucunda; hepatositlerin 24 saatlik sürenin sonunda oksidan molekül yükünü tamponlayarak redoks homeostazını sağlayabildikleri gözlemlendi. Bu durumun doz ve zaman ilişkisine bağlı olarak GSH rezervlerinin yeterliliği sayesinde oluştuğu ve çalışmamızda hücreleri nekrozdan koruyan en önemli etken olduğu düşünüldü. Eksojen NGF uygulamasının p38 MAPK sinyali aracılığıyla aktive kaspaz 3 seviyesini artırdığı belirlendi. Eksojen NGF'nin APAP hepatotoksitesine karşı koruyucu etkisinin bulunmadığı ve p38 MAPK sinyali inhibisyonunun hasarda artışa neden olduğu tespit edildi. APAP hepatotoksitesinde, moleküler sinyallerin sonuca etkilerini ve aralarındaki etkileşimleri ortaya koyabilmek için, farklı APAP dozlarında ve çeşitli stres sinyallerini birlikte değerlendirecek çalışmalara ihtiyaç bulunduğu sonucuna varıldı.

***Anahtar Kelimeler:** Asetaminofen, APAP, NGF, parasetamol, p38 MAPK.*

## ABSTRACT

### EFFECT OF NERVE GROWTH FACTOR AND ROLE OF p38 MAPK SIGNALING PATHWAY IN ACETAMINOPHEN-INDUCED ACUTE LIVER INJURY

In this study, the hepatoprotective effect of exogenous nerve growth factor (NGF) and its association with the p38 MAPK signaling pathway were investigated in acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury in mice. In the study, 64 male BALB/c mice, 9-10 weeks old, were equally divided into 8 groups as follows; Control, NGF, SB203580, NGF + SB203580, APAP, APAP + NGF, APAP + SB203580 and APAP + NGF + SB203580. All applications (APAP 150 mg/kg, NGF 10 µg/kg and SB203580 20 mg/kg) were made as a single intraperitoneal dose. After 24 hours, the study was terminated by decapitation, and blood and liver tissue samples were taken from the subjects for biochemical (ALT, AST, GGT, GSH, MDA, TAS, TOS), histopathological (Hematoxylin-Eosin staining), immunohistochemical (iNOS, nitrotyrosine, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, caspase 3, caspase 8, NGF) and molecular analyses. In the APAP-applied groups, cell damage characterized by hydropic degeneration in hepatocytes in the centrilobular region was determined at different degrees. Cellular damage was found to be more severe in APAP+NGF+SB203580 and APAP+SB203580 groups than in the other groups. Enzymatic damage markers ALT, AST, GGT and oxidative stress-related GSH, MDA, TAS, TOS, iNOS and nitrotyrosine levels did not show significant differences between the groups. It was observed that there was no significant increase in IL-1 $\beta$  and IL-10 levels in APAP group compared to the control group, but the increases in TNF- $\alpha$  and IL-6 expressions were significant. It was determined that TNF- $\alpha$  expression was significantly higher in APAP+NGF+SB203580 group, and IL-1 $\beta$  and IL-6 expressions were also significantly higher in APAP+SB203580 group than in the other groups. It was observed that APAP application increased NGF expression, and the highest expression was observed in APAP+SB203580 group. Caspase 3 and caspase 8 enzyme levels increased in APAP group, and caspase 3 was significantly increased in the APAP+NGF group and caspase 8 was significantly increased in APAP+NGF+SB203580 group. In molecular analysis, p38 mRNA level was found to

be higher in APAP group compared to the control group, while no significant difference was found in terms of p38 MAPK expression level between the APAP-applied groups. As a result of our study, it was observed that hepatocytes were able to provide redox homeostasis by buffering the oxidant molecular load at the end of 24 hours. This was thought to be due to the sufficiency of GSH reserves depending on the dose and time relationship and was the most important factor protecting the cells from necrosis in our study. Exogenous NGF administration increased the level of activated caspase 3 through p38 MAPK signaling. Exogenous NGF had no protective effect against APAP hepatotoxicity and inhibition of p38 MAPK signaling caused an increase in damage. It was concluded that further studies evaluating different APAP doses and various stress signals together are needed to reveal the effects of molecular signals and their associations in APAP hepatotoxicity.

*Keywords: Acetaminophen, APAP, NGF, paracetamol, p38 MAPK.*

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin Aminotransferaz
APAP	: Asetaminofen
AST	: Aspartat Aminotransferaz
CYP	: Sitokrom P450
ERK1/2	: Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz 1/2
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
GPCR	: G Proteini Kenetli Reseptörler
GSH	: Glutatyon
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MDA	: Malondialdehit
NAC	: N-Asetilsistein
NAPQI	: N-asetil-p-benzokinonimin
NGF	: Nerve Growth Factor (Sinir Büyüme Faktörü)
p38	: p38 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
p75NTR	: Pan-nörotrofin Reseptörü p75
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
TAS	: Total Antioksidan Durumu
TOS	: Total Oksidan Durumu
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TrkA	: Tropomiyozin ile İlişkili Kinaz A (TrkA) Reseptörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Asetaminofen Metabolizması .....	5
Şekil 2.2. APAP Hepatotoksisitesinde ROS ve ROT Oluşumu .....	15
Şekil 2.3. NGF Reseptörleri ve Sinyalizasyon .....	23
Şekil 2.4. MAPK Katmanları ve Hedef Substratlarının Şematik Gösterimi .....	27
Şekil 3.1. Gruplara Göre Kafeslere Ayrılmış Fareler .....	32
Şekil 4.1. Karaciğerlerin Makroskopik Görünümleri .....	42
Şekil 4.2. Kontrol Grubuna Ait Bir Karaciğer .....	43
Şekil 4.3. NGF Grubuna Ait Bir Karaciğer .....	44
Şekil 4.4. SB203580 Grubuna Ait Bir Karaciğer .....	44
Şekil 4.5. NGF+SB203580 Grubuna Ait Bir Karaciğer .....	45
Şekil 4.6. APAP Grubuna Ait Bir Karaciğer .....	46
Şekil 4.7. APAP+NGF Grubuna Ait Bir Karaciğerde Hidropik Dejenerasyon .....	46
Şekil 4.8. APAP+SB203580 Grubuna Ait Bir Karaciğer .....	47
Şekil 4.9. APAP+NGF+SB203580 Grubuna Ait Bir Karaciğer .....	48
Şekil 4.10. Gruplara Göre Hasar Skorlarının Dağılım Grafiği .....	49
Şekil 4.11. Gruplara Göre ALT Analiz Sonuçları .....	52
Şekil 4.12. Gruplara Göre AST Analiz Sonuçları .....	52
Şekil 4.13. Gruplara Göre GGT Analiz Sonuçları .....	53
Şekil 4.14. Gruplara Göre GSH Analiz Sonuçları .....	53
Şekil 4.15. Gruplara Göre MDA Analiz Sonuçları .....	54
Şekil 4.16. Gruplara Göre TOS Analiz Sonuçları .....	54
Şekil 4.17. Gruplara Göre TAS Analiz Sonuçları .....	55
Şekil 4.18. Anti-iNOS İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	57

<b>Şekil 4.19.</b> Anti-iNOS İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	58
<b>Şekil 4.20.</b> Anti-Nitrotirozin İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	59
<b>Şekil 4.21.</b> Anti-Nitrotirozin İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	60
<b>Şekil 4.22.</b> Anti-TNF- $\alpha$ İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	61
<b>Şekil 4.23.</b> Anti-TNF- $\alpha$ İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	62
<b>Şekil 4.24.</b> Anti-IL-1 $\beta$ İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	63
<b>Şekil 4.25.</b> Anti-IL-1 $\beta$ İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	64
<b>Şekil 4.26.</b> Anti-IL-6 İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	65
<b>Şekil 4.27.</b> Anti-IL-6 İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	66
<b>Şekil 4.28.</b> Anti-IL-10 İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	67
<b>Şekil 4.29.</b> Anti-IL-10 İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	68
<b>Şekil 4.30.</b> Anti-Kaspaz 3 İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	69
<b>Şekil 4.31.</b> Anti-Kaspaz 3 İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	70
<b>Şekil 4.32.</b> Anti-Kaspaz 8 İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	71
<b>Şekil 4.33.</b> Anti-Kaspaz 8 İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	72
<b>Şekil 4.34.</b> Anti-NGF İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları .....	73
<b>Şekil 4.35.</b> Anti-NGF İmmunohistokimyasal Boyanma Paternleri .....	74
<b>Şekil 4.36.</b> p38 MAPK ve $\beta$ -Aktin Genine Ait Örnek Çoğalma Eğrisi .....	75
<b>Şekil 4.37.</b> Gruplara Göre p38 MAPK mRNA Ekspresyon Seviyeleri .....	76

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışma Grupları ve Uygulamalar .....	33
<b>Tablo 3.2.</b> GSH Analizi .....	35
<b>Tablo 3.3.</b> MDA Analizi .....	36
<b>Tablo 3.4.</b> Kullanılan Primer Antikorlar ve Dilüsyonları .....	38
<b>Tablo 3.5.</b> Primer Dizileri .....	38
<b>Tablo 3.6.</b> cDNA Sentezinde Kullanılan Reaktifler .....	40
<b>Tablo 3.7.</b> PZR İçin Kullanılan Karışımın Bileşenleri .....	41
<b>Tablo 3.8.</b> PZR Cihazı Döngü Koşulları .....	41
<b>Tablo 4.1.</b> Gruplara Göre Ortalama Hasar Skorları .....	49
<b>Tablo 4.2.</b> Biyokimyasal Analiz Sonuçlarının Gruplara Göre Dağılımı .....	51
<b>Tablo 4.3.</b> Gruplara Göre İmmunohistokimyasal Skorlandırma Sonuçları .....	56
<b>Tablo 4.4.</b> p38 MAPK mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Dağılımı .....	76

## 1. GİRİŞ

Parasetamol adıyla da bilinen asetaminofen (APAP, N-asetil-p-aminofenol), dünyada en yaygın kullanılan analjezik ve antipiretik ilaçların başında gelmektedir. Terapötik dozlarda oldukça etkili ve güvenli olan APAP, doz aşımı durumunda ise karaciğer yetmezliğine varabilen akut karaciğer hasarına neden olmaktadır. Kabul görmüş etkinliği, reçetesiz ve kolay temin edilebilmesi ile farklı bileşiklerle kombinasyon halinde hazırlanan çok sayıda formülasyonunun varlığı yaygın kullanımına sebep olmakla birlikte, APAP'ı aynı zamanda küresel bir halk sağlığı sorunu haline de getirmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde akut karaciğer yetmezliği tanılarının yaklaşık yarısının, karaciğer nakillerinin ise %20'sinin etiolojisini APAP hepatotoksitesisi oluşturmaktadır. APAP toksikasyonuna karşı kullanılabilen onaylı tek antidot N-asetilsistein (NAC), ilaç alımını takip eden ilk 8-10 saat içinde uygulandığında hepatotoksitesite insidansını önemli ölçüde azaltmaktadır. Ancak, mükemmel bir antidot olan NAC'ın etkinliği toksik dozdan sonraki ilk 16 saatle sınırlıdır ve anafilaktik reaksiyonlar gibi potansiyel komplikasyonlar klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, gerek etkinlik ve sınırlamalar açısından NAC'dan daha üstün yeni ilaçların geliştirilebilmesi, gerekse kaydedilen önemli ilerlemeye rağmen APAP hepatotoksitesisinin moleküler mekanizmalarında henüz aydınlatılmamış detayların açığa çıkarılabilmesi için, yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu konusunda ittifak bulunmaktadır (Cai vd. 2022; Hodgman ve Garrard, 2012; Jaeschke ve Ramachandran, 2024; Li vd. 2025; Li vd. 2023; Liao vd. 2023; McGill ve Hinson, 2020; Moles vd. 2018; Yan vd. 2018; Yoon vd. 2016).

Sinir büyüme faktörü (NGF, Nerve growth factor) nöronların hayatta kalma ve farklılaşmalarında kritik rol oynayan düzenleyiciler arasındadır. Sinir doku dışında da fonksiyonları olduğu ortaya çıkarılan NGF'nin, reseptörleriyle birlikte hepatositlerde eksprese edildiği, farklı karaciğer hasarı modellerinde antioksidan ve antiapoptotik etkileriyle hepatoprotektif rol oynadığı (Tsai vd. 2014, 2018; Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013), karaciğer fibrozisinde sınırlayıcı (Kendall vd. 2009; Trim vd. 2000) veya hızlandırıcı (Atorrasagasti vd. 2021) etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir.

NGF'nin antioksidan genlerin transkripsiyonunu uyararak, APAP hasarında koruyucu etki gösterdiği öne sürülmüştür (Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013).

Hücreler yaşamları boyunca hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda birçok farklı strese maruz kalır. Hücrelerin bu farklı stres unsurlarının üstesinden gelebilmeleri, çeşitli sinyal ağlarına bağlıdır. Bu bağlamda öne çıkan sinyallerden biri de p38 MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) sinyal yolağıdır (Canovas ve Nebreda, 2021). p38 MAPK sinyali oksidatif stres, patojenle ve hasarla ilişkili moleküler paternler (PAMP ve DAMP), inflamatuvar sitokinler, ısı şoku, ozmotik şok, hipoksi ve iskemi, DNA'ya zarar veren ajanlar, UV ışık,  $\gamma$ -radyasyon gibi çok çeşitli stres faktörü tarafından uyarılır (Cargnello ve Roux, 2011; Martínez-Limón vd. 2020). p38 MAPK ekspresyonu, çalışmamızın diğer hedefi NGF tarafından da uyarılmaktadır (Pearson vd. 2001). Hücrede stresi uyarın her türlü etken tarafından aktive edilen p38 MAPK'nin, APAP doz aşımı durumunda da ekspresyon ve fosforilasyonu artmaktadır (Zhang vd. 2017). Ancak p38 MAPK'nin APAP hasarındaki rolü tam olarak bilinmemektedir.

APAP'ın klinik kullanıma sunulmasından bu yana geçen uzun zamana ve çok sayıda araştırmaya konu olmasına rağmen, hepatotoksisitesi ve patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. NGF'nin karaciğerdeki fonksiyonlarına ilişkin sınırlı sayıdaki çalışma ise etki mekanizmaları ve sonuçlarının anlaşılması için yeterli veri sunmamakta, APAP hasarındaki etkisini inceleyen tek çalışma (Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013) bu alandaki bilgi boşluğunu doldurmamaktadır. Bu bilgiler ışığında tasarlanan çalışmamızda, APAP hepatotoksisitesinde eksojen NGF uygulamasının hasar üzerinde etkisinin olup olmayacağı, olası etkilerinde p38 MAPK sinyaliyle etkileşiminin bulunup bulunmadığı ve p38 MAPK sinyalinin hepatotoksisitedeki potansiyel etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Asetaminofen

Asetaminofen (APAP, N-asetil-p-aminofenol), terapötik dozlarda oldukça güvenli, doz aşımında hepatotoksisite ve akut karaciğer yetmezliğine neden olabilen, etkinliği ve güvenliği yanında reçetesiz temin edilebilmesi nedeniyle küresel olarak en yaygın kullanılan analjezik ve antipiretik etkili bir ilaçtır (Przybyła vd. 2021; Yan vd. 2018). Analjeziklerin kullanımına ilişkin kuralları tanımlayan Dünya Sağlık Örgütü analjezik merdiveninin birinci basamağında yer alan APAP, merdivenin ikinci ve üçüncü basamağındaki opioidlerle birlikte ek bir analjezik olarak da kullanılır (Jozwiak-Bebenista ve Nowak, 2014).

Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Japonya dışında, Avrupa kıtası ve diğer birçok ülkede asetaminofen yerine parasetamol ismi kabul görmüştür (Jaeschke ve Ramachandran, 2024; McGill ve Hinson, 2020; Ogemdi, 2019). Asetaminofen önceden aynı endikasyonlarla kullanılmış olan asetanilid ve fenasetinin aktif metaboliti olup, her üçü de anilin türevidir. Bu yapısal benzerlik APAP'ın tarihteki seyrinde belirleyici olmuştur (Toussaint vd. 2010). Anilin türevlerinden asetanilid 1852, APAP 1878 ve fenasetin 1887 yılında sentezlenmiştir. Bileşiklerin ilaç değeri kazanmaları ise bir tesadüfe dayanmaktadır. Arnold Chan ve Paul Heppa naftalinin bağırsak parazitleri üzerindeki etkisini incelerken, eczacı tarafından naftalin yerine yanlışlıkla gönderilen asetanilidin antipiretik etkisini fark etmişler ve 1886 yılında tıbbi kullanıma girmesinin yolunu açmışlardır. Kısa süre sonra asetanilidin methemoglobinemiye neden olduğu ortaya çıkmış, çalışmalar diğer anilin türevlerinin üzerine odaklanmıştır. Fenasetin 1887 yılında, APAP ise Joseph von Mering tarafından 1893 yılında kullanıma sunulmuş, ancak yine Mering'in APAP'ın asetanilide benzer toksik etkileri bulunduğuna dair hatalı gözlemleri nedeniyle, fenasetinin nefrotoksik etkileri tespit edilene kadar APAP kullanımını bir kenara bırakılmıştır. Asetanilid ve fenasetinin APAP'a metabolize olduğu ve farmakolojik etkilerinin APAP'dan kaynaklandığının ortaya çıkarıldığı 1940'lı yıllar, APAP için

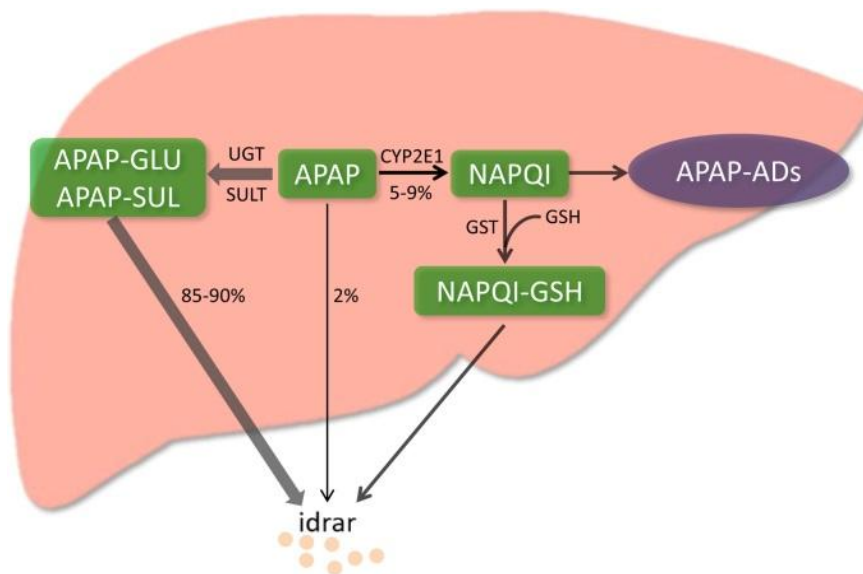
dönüm noktası olmuştur. Devamında ticari olarak 1955 yılında Tylenol adıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde, 1956 yılında Panadol adıyla İngiltere'de kullanıma sunulmuştur. APAP kullanımı 1960'lardan itibaren hızlı şekilde artmaya başlamış, asetilsalisilik asidin (Aspirin) gastrointestinal yan etkileri ve çocuklarda Reye sendromu ile ilişkisi nedeniyle, günümüzde narkotik olmayan analjezikler pazarına hakim olmuştur (Freo vd. 2021; McGill ve Hinson, 2020; Przybyła vd. 2021; Roy, 2011; Sharma ve Mehta, 2014; Toussaint vd. 2010).

### **2.1.1. Asetaminofenin Farmakolojik Özellikleri**

Asetaminofen benzene bağlı bir hidroksil ve bir amid (asetamid) grubu taşıyan yapısal olarak basit bir moleküldür (Roy, 2011). Lipidde orta derecede çözünen zayıf bir organik asittir (pKa değeri 9,5). Lipid çözünürlüğü hücre membranlarına hızlı nüfuz etmesini ve kolayca kan-beyin bariyerini geçmesini sağlar (Ayoub, 2021). Düşük molekül ağırlığına sahip APAP, büyük kısmı duodenumdan olmak üzere ince bağırsaktan pasif difüzyonla emilir (Raffa vd. 2014). Plazma proteinlerine düşük oranda bağlanır (Toussaint vd. 2010), yüksek oral biyoyararlanıma sahiptir (%88) ve 90 dakika içerisinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır (Hodgman ve Garrard, 2012). Terapötik dozlarda yarı ömrü 1,5 – 3 saattir, toksik dozlarda ya da karaciğer hasarı varlığında yarılanma ömrü uzar (McGill ve Jaeschke, 2013). Son yıllarda artmakta olan intravenöz uygulama, analjezinin 5 dakika kadar kısa bir sürede başlamasını sağlar (Freo vd. 2021).

APAP kullanımında vücut ağırlığına göre belirlenen bir dozaj rejimi uygulanmamaktadır (Sharma ve Mehta, 2014). Elli kg üzerindeki yetişkinlerde standart terapötik doz, en az 4 saat arayla 500-1.000 mg olmak üzere günlük maksimum 4 gramdır (Ayoub, 2021; Sharma ve Mehta, 2014). Günlük maksimum dozun çocuklarda 50-75 mg/kg (Hodgman ve Garrard, 2012), yenidoğanlarda 60 mg/kg (Jozwiak-Bebenista ve Nowak, 2014) olarak sınırlandırılması önerilmektedir. Tek dozda yetişkinlerde 7,5 g, çocuklarda 150 mg/kg üzerinde alınması potansiyel olarak toksik kabul edilmektedir (Hodgman ve Garrard, 2012).

Fenolik türevler esas olarak konjugasyon (faz II) reaksiyonlarıyla ve daha düşük oranda oksidasyon yoluyla çeşitli metabolitlere dönüştürülür. Konjugasyon reaksiyonları daha ziyade detoksifikasyonla sonuçlanırken, oksidasyon ürünleri hücresel makro moleküllerle etkileşime girebilir (Mészáros vd. 2022). Bir fenol bileşiği olan APAP da ağırlıklı olarak karaciğerde ve daha az oranda böbrek ile bağırsakta, glukuronidasyon (%52-57), sülfasyon (%30-44) ve oksidasyon (%5-10) yoluyla metabolize edilir. Yüzde beşinden daha azı değişmeden idrarla atılır (Mazaleuskaya vd. 2015). APAP-glukuronid ile sonuçlanan glukuronidasyon reaksiyonlarına UDP-glukuronosiltransferazlar (UGT1A1 ve 1A6), APAP-sülfat ile sonuçlanan sülfasyon reaksiyonlarına sülfotransferazlar (SULT1A1, 1A3/4 ve 1E1) aracılık eder (McGill ve Jaeschke, 2013). İlacın faz II reaksiyonlarına girmeyen az bir miktarı ise sitokrom P450 enzim sistemi yoluyla oksitlenerek, oldukça toksik bir metabolit olan N-asetil-p-benzokinonimin'i (NAPQI) oluşturur. Oluşan NAPQI glutatyon (GSH) ile konjugasyon yoluyla detoksifiye edilir. Detoksifikasyon sonucunda sistein ve merkapturik asit konjugatları (APAP-GSH) ortaya çıkar (Sharma ve Mehta, 2014). Glutatyon konjugasyonu hem spontan olarak, hem de glutatyon-S-transferazlar (GST) tarafından katalizlenen enzimatik bir reaksiyonla gerçekleşir (Coles vd. 1988). Faz I ve II reaksiyonları sonucu üretilen metabolitler, safrayla atılan küçük bir kısım haricinde idrarla elimine edilir (Bessemis ve Vermeulen, 2001). Ana bileşiğin aksine, APAP metabolitlerinin hareketi Mrp2, Mrp3, Mrp4 ve Bcrp gibi taşıyıcı proteinler gerektirir (McGill ve Jaeschke, 2013) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Asetaminofen metabolizması (Yan vd. 2018).

Uzun kullanım geçmişine rağmen APAP'ın etki mekanizması hakkında fikir birliği yoktur. Birçok araştırma nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) etki şekli olan siklooksijenaz (COX) enziminin inhibisyonuna odaklanmıştır. Ancak APAP önemli bir antiinflamatuvar etkiye sahip değildir ve asetilsalisik asit gibi antitrombotik aktivite göstermez (Anderson, 2008). Bu nedenle genellikle nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlarla birlikte tartışılrsa da bir NSAİİ olarak kabul edilmez (Ohashi ve Kohno, 2020). APAP'ın etki mekanizmasına ilişkin birçok teori öne sürülmüş, önerilen her mekanizmanın lehinde ve aleyhinde kanıtlar ortaya konulmuştur. Etkisinin COX inhibisyonuna bağlı şekillendiği dışlanmamakla birlikte, primer etki mekanizmasının bu olmadığı kabul edilmektedir (Przybyła vd. 2021). Terapötik konsantrasyonda APAP, araşidonik asit ve peroksit seviyeleri düşük olduğunda COX aktivitesini inhibe eder, ancak romatoid artrit gibi araşidonik asit ve peroksit seviyelerinin yüksek olduğu şiddetli yangı durumlarında çok az inhibitör etki gösterir (Ohashi ve Kohno, 2020). APAP'ın bir fenol olduğu ve fenollerin güçlü indirgeyici ajanlar olduğu gerçeğine dayanarak, COX enzimlerini NSAİİ'ler gibi doğrudan inhibe etmek yerine dolaylı olarak inhibe edebileceği öne çıkan teoriler arasındadır. Buna göre APAP prostaglandin oluşumundaki tirozil radikal basamağını bozar ve COX enzimini inaktif oksitlenmiş formuna dönüştürerek dolaylı yoldan inaktive eder. Peroksit tonusunun yüksek olduğu inflamatuvar ortamda ise APAP indirgeyici bir ajan olarak inaktif hale gelir. Bu mekanizmanın zayıf antiinflamatuvar etkiyi açıklayabileceği düşünülmektedir (Ayoub, 2021; Mazaleuskaya vd. 2015; Toussaint vd. 2010). Bu açıklamayla uyumlu biçimde, düşük peroksit tonusuyla karakterize edilen merkezi sinir sisteminde APAP'ın COX aktivitesini inhibe etmesi yüksek seviyededir. Flower ve Vane (1972), APAP'ın beyin homojenatlarındaki COX inhibisyonunun dalaktakinden daha güçlü olduğunu göstermiştir. Buradan hareketle farklı dokularda varyant COX enzimlerinin var olduğu ve APAP'ın santral etkisinin buna bağlı olabileceği hipotezi ortaya çıkmıştır. Nitekim 2002 yılında köpek serebral korteksinde COX-1'in ek varyantı olarak COX-3 enzimi tanımlanmıştır (Chandrasekharan vd. 2002). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarla, insanlarda ve farelerde COX-3'ün COX-1 ve COX-2'den tamamen farklı amino asit dizilimlerine sahip COX aktivitesi göstermeyen proteinleri kodladığı, dolayısıyla COX-3'ün bu türlerde prostaglandin aracılı ateş ve ağrıda rol oynayamayacağı gösterilmiştir (Anderson, 2008; Przybyła vd. 2021; Sharma ve Mehta, 2014).

Högestätt vd. (2005)'nin APAP'ın santral etkilerini ortaya çıkarmaya yönelik çalışmasında, APAP'ın deasetilasyonla p-aminofenol'e dönüştüğü, daha sonra beyne geçen metabolitin yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) enziminin etkisiyle araşidonik asit ile konjugasyona uğrayarak N-araşidonil aminofenol (AM404) oluşturduğu gösterilmiştir. Biyoaktif AM404'ün Cav3.2 kalsiyum kanalı, kannabinoid CB1 reseptörleri ve TRPV1 reseptörleri gibi ağrı modülasyonunda rol oynayan moleküler hedefler üzerine etki ederek, APAP'ın analjezik etkisine aracılık ettiği ileri sürülmektedir (Mallet vd. 2023; Ohashi ve Kohno, 2020). APAP için öne çıkan diğer potansiyel etki mekanizmaları arasında inen inhibitör serotonerjik ağrı yollarının güçlendirilmesi, N-metil-D aspartat veya P maddesi aracılı etki ve L-arjinin/ nitrik oksit (NO) yolağının inhibisyonu bulunmaktadır (Ayoub, 2021; Przybyła vd. 2021; Toussaint vd. 2010).

Özetle, APAP'ın doku reseptörlerinden omuriliğe, talamusa ve serebral kortekse kadar ağrı uyarısı iletiminin tüm seviyelerinde etkili olduğuna dair kanıtlar bulunmakla birlikte, etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. APAP'ın analjezik ve antipiretik etkilerinde birden fazla mekanizmanın kombinasyon halinde rol alabileceği kabul edilmektedir (Ayoub, 2021; Jozwiak-Bebenista ve Nowak, 2014; Przybyła vd. 2021; Sharma ve Mehta, 2014).

## **2.2. İlaça Bağlı Karaciğer Hasarı**

İlaça bağlı karaciğer hasarı (İBKH), ilaçların piyasadan geri çekilme nedenleri arasında ilk sırada yer alır. Çoğu ilaç, karaciğerde iki aşamalı olarak yürütülen biyotransformasyon reaksiyonları sonucu metabolize edilir (Gu vd. 2022). Genel olarak biyotransformasyon, ana ilacın yıkımlanarak güvenli bir şekilde ortadan kaldırılması amacını taşır. Ancak bu reaksiyonlar bazen ana ilaçtan daha toksik olan reaktif metabolitlerin oluşumuna ve birikimine neden olur. İlaça ya da diğer ksenobiyotiklere bağlı oluşan çoğu karaciğer hasarının patogenezi, ana ürünün elektrofilik bileşikler veya serbest radikaller gibi reaktif ara türlere metabolik dönüşümüyle başlar (Corsini ve Bortolini, 2013; Gu ve Manautou, 2012). Karaciğer, biyotransformasyon enzimleri yönünden en zengin organ olması, dolaşımdaki portal konumu, anatomik ve fizyolojik yapısı nedeniyle, ilaç ve diğer ksenobiyotiklere bağlı

hasara en yatkın organ durumundadır (Sturgill ve Lambert, 1997). Faz I ve faz II süreçlerinden oluşan biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda, ksenobiyotiğin suda çözünürlüğü artırılarak idrar ve safrayla atılımı kolaylaştırılır (Gu ve Manautou, 2012). Faz I reaksiyonlarında (oksidasyon, redüksiyon veya hidroliz), hidroksil, karboksil, amino veya tiyol grupları eklenerek bileşiğe hidrofilik özellik kazandırılır. Glukuronat, sülfat, asetat, glutatyon, vb. ile konjugasyon reaksiyonlarından oluşan faz II metabolizması ile de bileşiğin hidrofiliği daha da artırılır. Faz I reaksiyonlarında görev alan başlıca metabolik enzimler, APAP hepatotoksitesinden de sorumlu olan sitokrom P450 (CYP) ailesinin üyeleridir (Corsini ve Bortolini, 2013). CYP enzimlerinin ekspresyonu sentrilobüler hepatositlerde daha fazladır ve bu nedenle, karaciğerde reaktif ara ürünlere metabolize olan birçok ksenobiyotik, sentrilobüler bölgede hasara yol açar (Lehman-McKeeman ve Ruepp, 2018).

Fizyolojik veya patolojik süreçlerin ya da terapötik bir müdahaleye verilen yanıtın göstergesi olarak, objektif şekilde ölçülüp değerlendirilebilen bir özellik biyobelirteç olarak tanımlanır (Robles-Díaz vd. 2016). Bu bağlamda alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) olarak bilinen transaminazlar, karaciğer hasarlarının değerlendirilmesinde kullanılan en yaygın biyobelirteçlerdir. Transaminazlar glikoliz ve glukoneogenez yollarında görev alan anahtar enzimler arasındadır. ALT karaciğer dokusu dışında diğer dokularda düşük konsantrasyonlarda bulunurken, AST eritrositler, kalp ve iskelet kası gibi karaciğer harici birçok dokuda da yüksek seviyede bulunur (Green ve Flamm, 2002). Transaminazlar karaciğerde nekroz veya hücre membran geçirgenliğindeki değişiklik durumunda periferik kana sızar. Akut hepatoselüler hasarı takiben serum transaminaz seviyelerinde orta veya yüksek derecede artış gözlenir. Yarılanma ömrü daha uzun olan ALT, karaciğer hasarı değerlendirilmesinde AST'ye göre daha güvenilir ve nispeten spesifik kabul edilmektedir (Ramaiah, 2007). Transaminazlar gibi yaygın kullanılan belirteçlerden biri de plazma membranında bulunan gama glutamiltransferaz (GGT) enzimidir. Ana fonksiyonu glutatyon katabolizmasıdır. Böbrek, karaciğer, dalak, pankreas ve ince bağırsak gibi dokularda eksprese edilir. En yüksek seviyede böbrek tubül epitelinde bulunmasına rağmen, serum GGT artışı daha çok karaciğer hastalıklarında saptanır. Yüksek GGT düzeyi tek başına tanı koymak için yeterli olmayıp, diğer karaciğer enzimleriyle birlikte değerlendirilmelidir. Öncelikli olarak kolestaz tespitinde kullanılmakla birlikte, İBKH, alkolik karaciğer

hastalığı ve non alkolik yağlı karaciğer hastalığında GGT seviyesi yükselmektedir (Xing vd. 2022).

Hepatotoksik ilaçlar reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimine neden olarak, oksidanların artışı, antioksidanların tükenmesi, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon gibi mekanizmalarla oksidatif stresi indükleyebilir (Allameh vd. 2023). Doğrudan ve dolaylı yöntemlerle ölçülen oksidatif strese ilişkin belirteçler bulunmakla birlikte, hücre, doku veya organizma düzeyindeki karmaşık redoks durumu, tek bir parametre üzerinden değerlendirilemez (Arauz vd. 2016). Farklı oksidan ve antioksidan molekülleri laboratuvar ortamında ayrı ayrı analiz etmek teorik olarak mümkündür. Ancak zaman alıcı olan bu ölçümler karmaşık tekniklerle birlikte, yoğun emek ve yüksek maliyeti de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle oksidan ve antioksidanların pratik olarak tespitinde, toplam oksidan durumu (TOS, total oxidant status) ve toplam antioksidan durumu (TAS, total antioxidant status) analizleri kullanılarak, redoks durumu değerlendirilmektedir (Erel, 2004, 2005).

### **2.3. Asetaminofen Hepatotoksisitesi**

Asetaminofen doz aşımı, birçok gelişmiş ülkede ilaca bağlı akut karaciğer yetmezliğinin önde gelen nedenidir (Marañón vd. 2025). Terapötik dozlarda oldukça güvenli ve etkili olan APAP, aşırı dozlarda sentrilobüler bölgede başlayan hepatosit nekrozuyla karakterize hepatotoksisiteye neden olmaktadır. Asetaminofene bağlı oluşan karaciğer hasarında gelişen olaylar; glutasyonu tüketen ve proteinlere kovalent bağlanan toksik metabolit NAPQI oluşumu, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşması, mitokondri fonksiyonlarının bozulması, hepatositlerin nekrozu, ölen hepatositlerden açığa çıkan hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP) etkisiyle başlayan steril (aseptik) yangı ve karaciğer rejenerasyonu şeklinde sıralanır (Hinson vd. 2010; Yan vd. 2018). Bu olayların seyri esnasında süreç hasarın onarılması ya da hücrenin ölümüyle sonuçlanır (Hodgman ve Garrard, 2012).

APAP ayrıca karaciğer hasarıyla birlikte bazen de bağımsız olarak, akut tubüler nekroz ile karakterize böbrek hasarına da neden olmaktadır. Böbrek hasarı tüm APAP toksikasyonlarının %2'sinden daha azında görülür ise de karaciğer hasarının şiddetiyle birlikte insidansı artar (Blakely ve McDonald, 1995). Ayrıntılı çalışmalar insidansın

daha da yüksek olabileceğini (%10-79) göstermektedir (Arzuk vd. 2022). Biyotransformasyon sonucunda böbrekte de hepatotoksisiteden sorumlu NAPQI metaboliti oluşur ancak, karaciğer toksikasyonunun karakteristik özelliği olan c-Jun N-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu ile mitokondriye translokasyonunun gerçekleşmemesi (Akakpo vd. 2020), karaciğer hasarına karşı koruyucu olan N-Asetilsistein'in (NAC) böbrekte başarısız olması (Slitt vd. 2004), karaciğer hasarından bağımsız olarak nefrotoksisite görülebilmesi gibi nedenlerle, APAP kaynaklı böbrek hasarında karaciğerden farklı moleküler mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmektedir (Akakpo vd. 2020; Arzuk vd. 2022).

### **2.3.1. Toksik Metabolit Oluşumu ve Glutasyon Tükenmesi**

Terapötik dozda alınan APAP'ın %85-90'ı faz II konjuge edici enzimlerle metabolize edilerek (sülfasyon ve glukuronidasyon) idrar ve düşük oranda safrayla, %5'den daha azı da herhangi bir değişime uğramadan idrarla atılır. Yaklaşık %10 kadarı ise faz I oksidasyonuna uğrayarak, sitokrom P450 (CYP) enzimleri tarafından NAPQI'ya dönüştürülür (Hodgman ve Garrard, 2012; Li vd. 2023). APAP'ın oksidasyon reaksiyonlarında CYP1A2, CYP3A4 ve CYP2D6 enzimleri de yer almakla birlikte, etanol metabolizmasında da görev alan CYP2E1 enzimi birinci derecede sorumludur (Hinson vd. 2010). Perivenöz bölgede CYP konsantrasyonu yüksek olup, APAP toksisitesinde karakteristik olarak sentrilobüler hepatik nekroz oluşmasına neden olmaktadır (Hodgman ve Garrard, 2012). Reaktif NAPQI, hepatositlerde bol miktarda bulunan glutasyon (GSH) ile hızlı bir şekilde konjuge edilerek, toksik olmayan sistein ve merkapturat metabolitlerine dönüşerek idrarla atılır (Hodgman ve Garrard, 2012; Mazaleuskaya vd. 2015). Glutasyon konjugasyonu hem glutasyon-S-transferazlar (GST) tarafından enzimatik olarak, hem de kendiliğinden gerçekleşir (Coles vd. 1988).

Asetaminofen yüksek dozda alındığında önce sülfasyon yolu doygun hale gelirken, glukuronidasyon ve oksidasyon artar. Toksik doza ulaşıldığında glukuronidasyon da doymuş hale gelerek, ilacın değişmeden atılan ve oksidasyona giren miktarları artar. Artan oksidasyon, sonunda GSH depolarını tüketerek NAPQI tamponlanamaz hale gelir (Mazaleuskaya vd. 2015). Güçlü bir elektrofil ve oksidan

olan NAPQI, hücre içerisinde birçok hedefle reaksiyona girme kapasitesine sahiptir (Jaeschke vd. 2018a). Sistein kalıntıları üzerindeki sülfidril gruplarını hedefleyerek hücre proteinleriyle kovalent bağlar kurar ve protein eklentilerinin oluşumuna neden olur (Mazaleuskaya vd. 2015). Eklenti oluşumu, nekrozla sonuçlanan mitokondriyal oksidatif stres ve disfonksiyonu başlatır (Yan vd. 2018). Terapötik dozlarda bile sınırlı seviyede eklenti varlığı görülebilmekle birlikte (Ramachandran ve Jaeschke, 2017), hasar oluşmasında genel protein bağlanma derecesinden ziyade, hedef proteinlere bağlanmanın önemli olduğu varsayılmaktadır (Jaeschke vd. 2018a). Glutatyon depolarının %70 azalması, hasara götüreceği düzeyde eklenti oluşturmak için yeterlidir (Mitchell vd. 1973). Görüldüğü gibi, GSH stoklarının durumu APAP toksikasyonu için kritik önem taşımaktadır. Hücre içerisinde birçok reaksiyona katılan glutatyon, iki temel detoksifikasyon göreviyle hücreyi APAP hasarına karşı korur. Bunlardan birincisi, GSH APAP ve bromobenzen gibi ksenobiyotikler, elektrofiller ve fizyolojik metabolitlerle (örn. östrojen, melanin, prostaglandinler ve lökotrienler) reaksiyona girerek merkapturatlar oluşturur. İkincisi, serbest radikalleri ve diğer reaktif oksijen türlerini (örn. hidroksil, lipid peroksil radikali, peroksinitrit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) doğrudan ve enzimatik reaksiyonlarla etkili bir şekilde temizler (Fang vd. 2002). İçerdiği sistein kalıntısı aracılığıyla, elektrofilik maddeler tarafından kolaylıkla glutatyon disülfüre (GSSG) oksitlenir (Wu vd. 2004). APAP toksikasyonu için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı tek antidot olan N-Asetilsistein, deasetilasyon yoluyla sisteine ve enzimatik yollarla sonunda GSH'ye dönüşerek, GSH rezervlerini yeniler. Doz aşımından sonraki ilk 8 saat içinde alındığında hepatotoksisite insidansı önemli ölçüde (<%5) azalır (Hodgman ve Garrard, 2012; Li vd. 2023; McLaughlin vd. 2025; Moss vd. 2024).

Karaciğer yağlanması, obezite ve açlık, GSH rezervlerinin azalmasına neden olduğundan APAP kaynaklı hepatotoksisite için risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Açlık koşullarında hepatik metabolizma glukoneogeneze doğru kayar, glukuronidasyon için gereken substratlar azalır. Uzun süreli açlıkta oksidasyona yönlendirilen APAP oranı artar (Mazaleuskaya vd. 2015). İzoniazid ve etanol CYP2E1 için substrattır. Bu kimyasallar mevcut olduklarında APAP'ın enzimle metabolize edilmesini inhibe ederler. Ancak her iki bileşik de CYP2E1 uyarıcısıdır, elimine edilmelerinden sonra APAP toksisitesi riskini artırır (Jaeschke vd. 2018a). İnsanlarda gözlenen CYP aktivitesindeki varyasyonların APAP toksisitesini de

etkileyebileceği ve yüksek CYP aktivitesinin APAP hepatotoksitesisi için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Utkarsh vd. 2016). İlaç metabolizması ve toksisiteye duyarlılık açısından türler arasında da belirgin farklılıklar vardır. Hamster ve fareler, ratlara göre APAP toksisitesine daha duyarlıdır (Hinson vd. 2010). Fare, yaygın araştırma türleri arasında genel CYP işlevi yönünden insana en yakın olan türdür. Toksikiteye neden olan APAP dozları ( $\geq 150$  mg/kg) ile hasar mekanizmaları insanla aynı görünmektedir. İnsan ve fareler arasında hasar oluşumu açısından tespit edilen fark, hasarın zaman açısından seyridir. Daha hızlı hasar gerçekleşen farelerde 12-24 saat aralığında hasar zirve yaparken, aynı seviye insanlarda 24-72 saat aralığında gerçekleşir (McGill ve Jaeschke, 2019). Bu yakınlık nedeniyle deney modellerinde en çok kullanılan hayvanlar fareler olup, fareler içerisinde de erkekler daha sık tercih edilmektedir (Taguchi vd. 2015). Erkek farelerin APAP hasarına daha duyarlı olduğu, GSH rezervlerinin dişilerde daha hızlı yenilendiği gösterilmiştir (Du vd. 2014).

### **2.3.2. Oksidatif Stres ve Mitokondri Disfonksiyonu**

Oksidatif stres kavramı, reaktif oksijen türleri (ROT) seviyelerinin antioksidan savunma kapasitesini önemli ölçüde aştığı durumu ifade etmektedir. Oksidatif stres, artan ROT oluşumundan, antioksidan aktivitenin azalmasından ya da her ikisinden kaynaklanabilir. ROT ve çoğu zaman iç içe kullanılan reaktif nitrojen türleri (RNT), hücrelerdeki diğer moleküllerle hızla reaksiyona giren oksijen veya nitrojen içeren kararsız türler olarak tanımlanır (Li vd. 2016). Bu türler arasında süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $\cdot OH$ ), alkoksil ( $\cdot OR$ ), nitrik oksit ( $NO\cdot$ ) ve peroksil ( $\cdot OOR$ ) dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıdıkları için serbest radikaller; hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), nitrojen dioksit ( $NO_2$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) ise eşlenmemiş elektron içermediklerinden nonradikaller olarak sınıflandırılmaktadır (Aranda-Rivera vd. 2022). Bu bileşikler aşırı miktarda biriktiklerinde hücre bileşenleriyle etkileşerek, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı gibi zararlı etkilerle hücrede çeşitli fonksiyonların ve homeostazın kaybına neden olabilirler (Araújo vd. 2016). Oksidatif stres çoğu zaman süperoksit radikalinin oluşumuyla başlar. Süperoksit radikalinin ana kaynağı mitokondri olup, mikrozomal sitokrom P450 sistemi de radikal üretimine kayda değer katkı sağlayabilir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c).

Yüksek metabolik aktiviteleri nedeniyle, hepatositler çok sayıda mitokondri içerir. Öncelikli olarak hücrenin enerji homeostazından sorumlu olan mitokondriler, hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazı, termogenez, proliferasyon ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde görev alır. İşlevlerinin bozulması doğrudan hücre hasarıyla ilişkilidir. Yoğun oksidatif metabolizma sırasında mitokondri sürekli olarak ROT üretir. Bu durum normal aerobik metabolizmanın bir parçasıdır ve reaktifler, metabolizma, gen transkripsiyonu, hücre döngüsü ve farklılaşmada sinyal ileten moleküller olarak rol alırlar. Fizyolojik şartlarda, hücre tarafından alınan moleküller oksijenin %1-2'si ROT'a dönüştürülür (Kowalczyk vd. 2021; Shi vd. 2021). Mitokondrideki elektron taşıma zinciri (ETZ) bileşenlerinden elektron sızıntısını artıran herhangi bir değişiklik, süperoksit üretimini artırarak hücre üzerinde oksidatif stres baskısı kurabilir. Ancak, manganez süperoksit dismutaz (MnSOD), bakır çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD), glutatyon peroksidaz ve tiyoredoksin gibi güçlü antioksidan enzimler sayesinde mitokondri bu durumun üstesinden gelir (Ramachandran ve Jaeschke, 2019a).

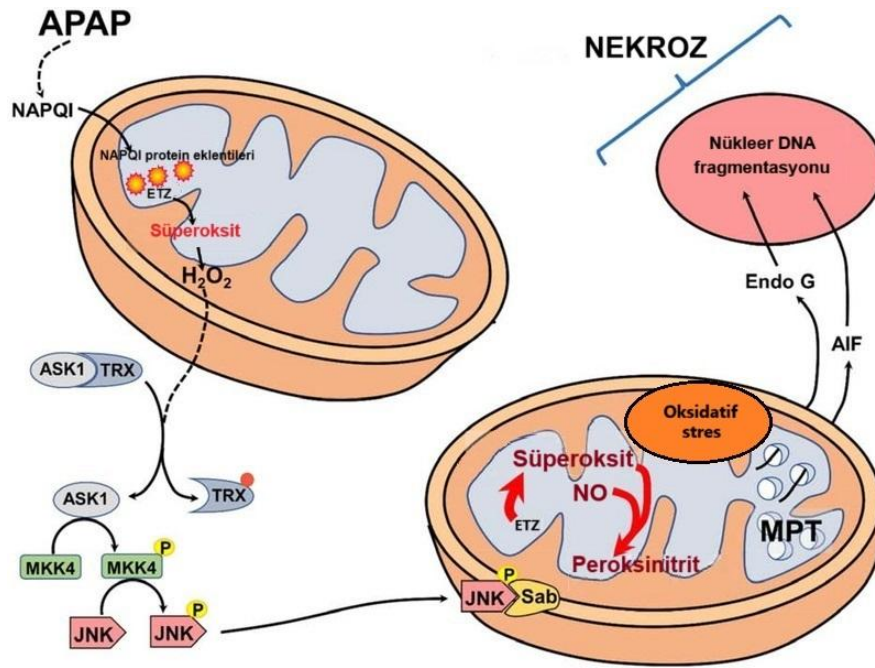
Hepatositlerdeki toplam protein eklentileriyle karşılaştırıldığında, housekeeping protein, glutatyon peroksidaz ve ATP sentaz  $\alpha$ -alt birimi dahil olmak üzere, mitokondriyal proteinler NAPQI'nın ana hedefleridir (Qiu vd. 1998). NAPQI, oksidatif stresle ilişkili GATM, PARK7, PRDX6 ve VDAC2 gibi proteinlere bağlanarak (Bruderer vd. 2015), mitokondrinin oksidatif strese direnme yeteneğini büyük oranda zayıflatır (Cai vd. 2022). Ayrıca elektron taşıma zinciri komplekslerine de müdahale ederek, elektron kaçağına ve süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olur (Yan vd. 2018). Oluşan süperoksit mitokondride MnSOD, sitozolde CuZnSOD tarafından hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Hidrojen peroksit de glutatyon peroksidaz tarafından GSH depoları kullanılarak indirgenir. Eğer bu sağlanamazsa, hidrojen peroksit demir tarafından Fenton reaksiyonuyla hidroksil radikale indirgenebilir. Devamında hidroksil radikali de hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c).

Lipid peroksidasyonu (LPO); serbest radikaller gibi oksidanların, özellikle çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere karbon-karbon çift bağı içeren lipidlere saldırarak, lipidlerin oksidatif bozulmasına neden olduğu zincirleme reaksiyon sürecidir (Ayala vd. 2014). Saldırıda öncelikli hedef biyolojik membranlardır. Lipid peroksidasyonu, hücre ve organel membranlarındaki lipid tabakalarının normal yapı

ve işlevini bozar (Araújo vd. 2016). Hızlı ve yıkıcı şekilde hücre membran bütünlüğünün kaybına ve nekroza neden olabilir (Jaeschke ve Ramachandran, 2018). Bir kez başlatılan reaksiyon kendi kendine yayılır ve substrat tüketilene ya da sonlandırma gerçekleşene kadar devam eder (Nam, 2011). Yağda çözünen E vitamini, radikal zincir reaksiyonunu keserek LPO'yu bloke edebilen oldukça etkili bir radikal temizleyicidir (Jaeschke ve Ramachandran, 2018). Zincir reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler arasında malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE), oksipinler, izoprostanlar ve oksisteroller bulunmaktadır (Aranda-Rivera vd. 2022). MDA, araşidonik asit ve daha büyük çoklu doymamış yağ asitlerinin ayrışması sonucu oluşan bir son ürün olup, lipid peroksidasyonunu belirlemede uygun bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Ayala vd. 2014). Bununla birlikte, LPO'nun hücrel toksisitede hasarın nedeni mi yoksa sekonder bir sonucu mu olduğu konusu netlik kazanmamıştır (Grotto vd. 2009). LPO'nun APAP hepatotoksitesindeki rolüne ilişkin tartışmalar da benzer durumdadır (Du vd. 2016).

Artan süperoksitin akıbetini belirleyen diğer yol, ortamda nitrik oksit sentazlar (NOS) tarafından üretilen nitrik oksitin (NO) varlığına bağlıdır. Süperoksit ve NO herhangi bir enzime gerek duymadan hızlı bir şekilde birleşerek, çok güçlü bir oksidan ve nitratlayıcı olan peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit, doğrudan oksidatif reaksiyonlar veya dolaylı radikal aracılı mekanizmalar yoluyla, DNA, proteinler ve lipidlerle etkileşime girer (Pacher vd. 2007). Peroksinitritin toksisitede önemli bir özelliği, kovalent bir oksidatif posttranslasyonel modifikasyon olan, protein tirozin nitrasyonunu teşvik etme kabiliyetidir. Tirozin kalıntılarının nitrasyonu, proteinin işlev kaybıyla ya da önceden var olmayan yeni bir işlev kazanmasıyla sonuçlanabilir. Fosforilasyon basamaklarını değiştirebilir veya nitratlanmış proteinlere karşı antikor üretimine neden olabilir (Bartesaghi ve Radi, 2018). Peroksinitrit tarafından tirozin kalıntılarının nitratlanması, oksidatif/nitrozatif stres için güçlü bir belirteç kabul edilen 3-nitrotirozin oluşumuyla sonuçlanır (Hinson vd. 2010; Pacher vd. 2007). Toksik dozda APAP uygulanan fare karaciğerlerinde, sentrilobüler hepatositlerde nitrotirozin oluştuğu gösterilmiştir (Hinson vd. 1998). Sitozol veya çekirdekte nitrotirozin varlığına kanıt sunulamamış olması, nitrotirozin oluşumunun mitokondriyal matriksle sınırlı olduğunu göstermektedir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c). Mitokondriye lokalize protein nitrasyonu nedeniyle, peroksinitritin APAP toksitesinin önemli bir aracısı olduğu ya da asıl aracısı olabileceği ileri sürülmektedir (Jaeschke ve

Ramachandran, 2020c; Knight vd. 2002). Peroksinitrit ayrıca ayrışma ürünleri aracılığıyla lipid peroksidasyonunu da başlatabilmektedir (Radi vd. 1991). Peroksinitritin oynadığı kritik role rağmen, mitokondri içindeki nitrik oksitini kaynağı ise belirsizliğini korumaktadır. Farklı hipotezler indüklenebilir NOS (iNOS), endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) ya da mitokondriyal NOS (mtNOS) izoformlarının etkisini öne sürseler de katkıları doğrulanamamıştır (Hinson vd. 2010; Jaeschke vd. 2018a; Moles vd. 2018).



**Şekil 2.2.** APAP hepatotoksitesinde reaktif oksijen ve azot türlerinin oluşumu (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c).

GSH peroksinitritin etkili bir temizleyicisidir, fakat NAPQI tarafından GSH'nin tüketilmesi bu savunma hattını devre dışı bırakır (Knight vd. 2002). Peroksinitrit artışını minimize etmenin bir yolu da süperoksitin hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü hızlandırmaktır (Jaeschke, 2019). Ancak, mitokondride bu görevi üstlenecek olan MnSOD'un, APAP hepatotoksitesisi sırasında protein nitrasyonu ile inaktif olduğu tespit edilmiştir (Agarwal vd. 2011).

Güçlü antioksidan sistemler göz önüne alındığında, buraya kadar anlatılan protein eklentileri oluşumu ve GSH tükenmesini takip eden oksidatif/nitrozatif stresin, hepatoselüler ölümü tetiklemeye yeterli olmadığı kabul edilmektedir. Hücreyi ölüme sürükleyen etken, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) sinyal yolağının kalıcı

aktivasyonudur (Han vd. 2013; Moles vd. 2018; Ramachandran ve Jaeschke, 2017; Yan vd. 2018). Yüksek doz APAP sonrası gelişen oksidatif stres ve artan süperoksit salınımı, sitozolde tiyoredoksinin oksidasyonuna ve bağlanmış olduğu ASK1'in serbest kalmasına neden olur. Serbest ASK1 MKK4'ü, MKK4 de JNK'yi fosforilleyerek aktive eder (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c). Ayrıca, artan ROT'a bağlı olarak, GSK-3 $\beta$ , MLK3, RIP1 ve RIP3 tarafından da JNK aktive edilebilmektedir (Jaeschke vd. 2018a; Moles vd. 2018). Fosforile JNK mitokondriye yer değiştirerek, dış mitokondriyal membranın sitoplazmik tarafında bulunan Sab'ı fosforile eder. Sab'ın aktivasyonu, elektron naklinin sürmesinde görevli iç membranda yerleşik Src'nin inaktivasyonuna neden olarak, ETZ'nin inhibisyonuyla sonuçlanır (Şekil 2.2). Böylece sürekli artan mitokondriyal oksidatif stres ve bununla uyarılan JNK fosforilasyonu arasında kendi kendini sürdüren bir döngü oluşur (Win vd. 2016). Artan oksidatif stres RIP3'ün aktivasyonu ve Bax ile Drp1'in mitokondriye translokasyonuna neden olarak, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin (MPTP; mitochondrial permeability transition pore) oluşumunu uyarır (Ramachandran ve Jaeschke, 2017). MPTP'nin aktive olarak 1.500 Da'dan küçük moleküllerin geçişine izin vermesi, mitokondriyal depolarizasyon, mitokondriyal iyonların ve metabolik ara maddelerin salınması, oksidatif fosforilasyonun bozulması, ATP sentezinin durması ve mitokondriyal şişmeyle sonuçlanır (Moles vd. 2018). APAP dozlarının JNK aktivasyonuna etkisini inceleyen bir araştırma grubu tarafından, farelerde 150 mg/kg dozda uygulanan APAP'ın JNK aktivasyonunu ve MPTP oluşumunu uyardığı, ancak bu etkinin geçici süreli ve reversibl olduğu bildirilmiştir (Hu vd. 2016).

### **2.3.3. Hücre Ölümü ve Yangı**

Hücrenin çok sayıda farklı yol ile ölebildiğine dair verilerin artışı yanında, hücre ölümü genellikle morfolojik ve biyokimyasal özellikler temelinde apoptoz ve nekroz olarak iki geleneksel tip üzerinden ele alınır. Apoptoz enerji bağımlı, proteazlarla kontrollü olarak ilerletilen, yangının uyarılmadığı aktif bir süreçken; nekroz, telafi edilemeyen enerji açığı sonrası plazma membran bütünlüğünün kaybı ve yangıyla sonuçlanan pasif bir hücre ölüm türü olarak tanımlanır (D'Arcy, 2019; Elmore vd. 2016; Malhi vd. 2006). APAP hepatotoksitesinde, bazı özellikleri

nedeniyle hasarda apoptozun rolüne dair bildirimler bulunmasına rağmen, toksisitenin nekrozla sonuçlandığı kabul edilmektedir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020a).

APAP doz aşımında artan oksidatif stres sonrası şekillenen MPTP açılması, mitokondriyal membran potansiyelinin ve ATP üretiminin kaybıyla birlikte, matriksin şişmesine ve mitokondri dış membranının rupturuna neden olur. Mitokondriye daha önceden transloke olan Bax tarafından uyarılan porlar ve aktive MPTP etkisi ile membran rupturunun sonucu olarak, sitokrom c, Smac/Diablo, endonükleaz G ve apoptozu indükleyen faktör (AIF) gibi intermembran proteinler sitozole salınır. Çekirdeğe transloke olan endonükleaz G ile AIF, nükleer DNA fragmentasyonunu ve ardından nekrozu uyarır (Jaeschke vd. 2018b; Ramachandran ve Jaeschke, 2019b).

Apoptoz, hücre içi proteazlardan kaspazlar adı verilen enzimlerin aktivasyonu ile başlatılır ve yürütülür. Kaspazlar, diğer proteinlerle iskele kurmak için uzun bir prodomain içeren başlatıcı kaspazlar (2, 8, 9 ve 10) ve kısa bir prodomain içeren efektör kaspazlar (3, 6, 7) olarak sınıflandırılır (Malhi vd. 2010). Ekstrinsik ya da intrinsik olarak uyarılan apoptoz başlatıcı kaspazlar aracılığıyla efektör kaspazları aktive ederek, kaspaz ile aktive olan DNaz inhibitörünü (ICAD) yıkımlar ve asıl enzim olan kaspaz ile aktive olan DNaz'ı (CAD) serbest bırakır. Bu da nükleer DNA'yı kabaca 180 baz çifti ve katlarından oluşan internükleozomal parçalara ayırarak, elektroforetik analizlerde karakteristik bir DNA merdiveni görünümü oluşturur (Jaeschke ve Ramachandran, 2020a). Apoptotik hücre ölümü, hücre büzülmesi, membranda kabarcıklanma, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi ayırt edilebilir morfolojik özelliklerle karakterizedir (Malhi vd. 2010). APAP hepatotoksitesinde ise organel şişmesi, karyolizis, plazma membranı rupturu, hücre içeriğinin salınması ve yangı gibi nekrozda gözlenen değişiklikler tespit edilir. Ayrıca kaspazların aktivasyonuna ilişkin sunulan çalışma verileri ikna edici bulunmamaktadır. Oluşan DNA fragmanlarının daha büyük olması ve kaspaz inhibitörlerinin etkisizliği gibi sebeplerle, APAP hasarında apoptozun önemsenir bir rolü bulunmadığı kabul edilmektedir (Hinson, 2013; Jaeschke vd. 2018b; Jaeschke ve Ramachandran, 2020a; Malhi vd. 2010; Moles vd. 2018; Ramachandran ve Jaeschke, 2019b).

Yoğun nekrotik hücre ölümü gözlenen APAP hepatotoksitesisi, prototipik steril (aseptik) yangıyla karakterizedir (Ramachandran ve Jaeschke, 2019b). Nekrotik

hücrelerden açığa çıkan HMGB-1 (High Mobility Group Box-1), nükleer DNA parçaları, mitokondriyal DNA, ATP, ısı şok proteinleri, hyaluronik asit, vb. hücre içeriği, yangıyı uyaran hasarla ilişkili moleküler patern (DAMP - Damage Associated Molecular Patterns) vazifesi görür. DAMP'lar Kupffer hücreleri üzerindeki Toll-like reseptörlerine (TLR) bağlanarak, çeşitli sitokin (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, vb.) ve kemokinlerin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olur. Üretilen yangı mediyatörleri esas olarak nötrofillerin ve monositlerin hasar alanına göçü ile aktivasyonlarından sorumludur. Mediyatörler, hepatositler ve karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri üzerinde ICAM-1 gibi adezyon molekülleri ile nötrofiller üzerinde  $\beta$ 2 integrinlerin ekspresyonlarını uyarır ve devamında immun hücrelerin alana toplanmasını düzenler. NK/NKT hücreleri,  $\gamma\delta$ T hücreleri ve dendritik hücreler yangıya katılan diğer hücreler arasındadır. Steril yangı sırasında görev alan hücreler ile salınan sitokinler bir taraftan yangıyı modüle ederken, diğer taraftan iNOS'u uyararak peroksinitrit oluşumunun artışı sebebiyle hasarın şiddetlenmesine neden olabilir. Ancak Kupffer hücresi kaynaklı antiinflamatuvar sitokin IL-10'un, iNOS indüksiyonunu baskılayarak hasarı sınırlandırabileceği düşünülmektedir. Buna benzer şekilde gerek yangıya katılan hücreler ve gerekse sitokinlerin, eş zamanlı olarak zıt ya da çelişkili görünen etkileri gözlenebilmektedir. Bu durumun nedenleri arasında; karmaşık sitokin salgılama mekanizmalarının farklı hücre içi sinyal yolları tarafından düzenlenebilmesi, sinyal yolları arasındaki çapraz etkileşimin sitokin ekspresyonlarını etkileyebilmesi, aynı sitokinin farklı hücreler tarafından salgılanabilmesi sayılmaktadır. Literatürde, APAP toksisitesine cevaben karaciğerde steril yangı oluşumu ve mekanizmaları ile yangı sayesinde nekrotik artıkların temizlenerek rejenerasyonun desteklendiği hususlarında ittifak bulunmaktadır. Ancak, inflamatuvar yanıtla birlikte bölgede artan lökosit popülasyonunun, hasarın şiddetlenmesine katkıda bulunup bulunmadığı konusunda uzlaşma sağlanamamıştır (Cai vd. 2022; Jaeschke vd. 2014; Jaeschke vd. 2018a; Jaeschke ve Ramachandran, 2020b; Li vd. 2022; Ramachandran ve Jaeschke, 2019b; Yan vd. 2018; Yang vd. 2022).

APAP'ın neden olduğu hepatoselüler hasara ek olarak, hepatik mikrodolaşım fonksiyonunda görülen bozukluk da patogeneizde rol oynamaktadır (Yan vd. 2018). Sinüzoidal endotel hasarı ve sentrilobüler alanda kanama, APAP doz aşımı sonrasında gözlenen olaylardandır (Jaeschke vd. 2018a). Hepatosit nekrozundan önce endotel hasarı ve sentrilobüler konjesyon gelişmekte (Walker vd. 1985), endotel hücrelerinde

nitrotirozin boyanması hepatositlerden önce gözlenmektedir (Knight vd. 2001). İn vivo mikroskopide, endotel hücrelerinin şiştiği ve eritrositlerin ekstrasinüzoidal Disse aralığına sızdığı gösterilmiştir. Bu durum, sinüzoidal perfüzyonda ve oksijen iletiminde aksamaya neden olur (Ito vd. 2003). Hasarlı endotel doku faktörü üzerinden koagülasyon kaskadını aktive ederek, trombin ve ardından fibrin oluşumuna yol açar (Jaeschke vd. 2018a). CYP enzimlerini içeren hepatik sinüzoidal endotel hücrelerinin APAP'ı metabolize edebildiği bilinmesine rağmen (Hinson, 2013), vasküler hasarın oluşum mekanizmaları aydınlatılmayı beklemektedir (Wang vd. 2020).

Karaciğerde sentrilobüler koagülatif nekroz, APAP toksisitesinin karakteristik lezyonudur. Hasar midzonal bölgeye uzanıp, doza bağlı olarak masif nekroza kadar ilerleyebilir. Hidropik dejenerasyon, glikojen kaybı, sinüzoidal dilatasyon, sentrilobüler konjesyon, kanama, yangısal hücre infiltrasyonu, mikroveziküler steatozis ve erken dönemde apoptoz, gözlenen diğer histopatolojik bulgulardır. Bulguların çeşidi ve derecesi, farelerde doza ve doz aşımından nekropsiyeye kadar geçen süreye göre farklılık göstermektedir (Antoine vd. 2009; Blazka vd. 1996; Roberts vd. 1991; Shahid ve Subhan, 2014).

#### **2.3.4. Rejenerasyon**

Rejenerasyon kısaca, hasarlı dokuların yenilenerek yapısal ve fizyolojik doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasıdır. Rejeneratif kapasite türler, dokular ve yaşam evreleri arasında büyük farklılıklar gösterebilmektedir (Goldman ve Poss, 2020). Karaciğer, cerrahi rezeksiyon, enfeksiyon, toksik veya kimyasal ajan kaynaklı hasarlar sonrasında olağanüstü bir yenilenme kapasitesine sahiptir. Ağırlığı hepatositler tarafından yüklenilse de safra kanalı epitel hücreleri, stellat hücreler ve endotelial hücrelerin de rejenerasyon faaliyetlerine katılımıyla, genellikle her hücre popülasyonu kendi hücre türünün proliferasyonu ile yenilenerek, karaciğerin orijinal işlev ve kütlesi yeniden kazanılır (Bhushan ve Apte, 2023). Rejenerasyonun başlaması için ön koşul, nekrotik hücrelerin fagositler tarafından ortadan kaldırılmasıdır. Nekrotik alana en yakın hepatositler bölünerek ölen hepatositlerin yerini doldurur (Jaeschke vd. 2012). Hepatosit proliferasyonunun inhibe edildiği ciddi hasar vakalarında, Hering kanallarında yerleşik olan hepatik kök hücreler rejenerasyonu üstlenir (Bhushan ve

Apte, 2019). Eğer yenilenme başarısız olursa, organizmayı ۆlümle tehdit eden organ yetmezliği gelişir (Cai vd. 2022).

APAP hasarı sonrası karaciğer rejenerasyonu çok sayıda sitokin, bۆyüme faktörü ve endobiyotik tarafından aktive edilen sinyal yolakları vasıtasıyla düzenlenir. Çeşitli hepatik hücre tiplerinden gelen rejeneratif sinyaller hepatosit proliferasyonunu ve karaciğer rejenerasyonunu uyarır. Aynı zamanda dengeli proliferatif yanıt için anti rejeneratif sinyaller de etkinleştirilir (Bhushan ve Apte, 2023). Non parankimal hücreler tarafından salınan tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6), hepatosit bۆyüme faktörü (HGF), vasküler endotelyal bۆyüme faktörü (VEGF) ve epidermal bۆyüme faktörü (EGF) gibi primer mitojenlerin hücre siklusuna girme sinyallerine karşı hücreleri hazırlar. Sitokinler ve bۆyüme faktörlerinin koordineli uyarıları siklus düzenleyici proteinlerin ekspresyonunu tetikleyerek, hücreyi aktif hücre döngüsüne taşır. Dönüştürücü bۆyüme faktörü- $\beta$ 'nin (TGF- $\beta$ ) aracılığıyla rejenerasyonun sona ermesinin ardından, hücreler tekrar sessiz G<sub>0</sub> fazına geçer (Jaeschke vd. 2014; Jaeschke vd. 2018a). Yenilenme sürecinde her bir hepatik hücre türü, diğer hücre türlerinin çoğalmasında gerekli olan mediyatörleri üretebilir. Duodenumun Brunner bezlerinde üretilen EGF'nin portal dolaşımla katkı sağlaması gibi, ekstrahepatik dokular da rejenerasyona destek sağlayabilir (Bhushan ve Apte, 2023). Yine destek sağlayabileceği düşünölen farklı bir husus da APAP doz aşımında uyarıldığı bilinen otofajidir. Nekrotik alan sınırındaki hücrelerde hasarlı mitokondrilerin otofaji (mitofaji) yoluyla uzaklaştırıldığı gösterilmiş, nekrozdaki hücreler sayesinde hasarın hafifletilerek rejenerasyonun kolaylaştırılabileceği öne sürölmüştür (Ni vd. 2013). Bu hipotezle uyumlu biçimde, APAP uygulaması öncesi otofaji indüksiyonunun hasara karşı koruyucu olduğu, otofaji inhibisyonunun ise hasarı şiddetlendirdiği ortaya konulmuştur (Ni vd. 2012).

Çeşitli hepatotoksik maddelerde olduğu gibi, APAP hasarından sonra da rejenerasyon ilacın dozuyla bağlantılıdır. Rejenerasyon eşik bir doza kadar hasar boyutuyla orantılı olarak artış gösterirken, eşik geçildikten sonra yanıtta keskin bir düşüş ve gecikme görölr (Bhushan ve Apte, 2019, 2023). Farelerde 600 mg/kg APAP uygulamasının rejenerasyonu inhibe ettiği, uyarılar devam etmesine ve hepatositlerin yarısından fazlası halen canlı olmasına rağmen, hücrelerin proliferatif sinyallere cevap vermediği gösterilmiştir (Bhushan vd. 2014).

## 2.4. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Sinir büyüme faktörü (NGF, Nerve growth factor), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF, Brain-derived neurotrophic factor), nörotrofin 3 (NT 3) ve nörotrofin 4/5 (NT 4/5) ile birlikte memelilerde eksprese edilen dört nörotrofinden biridir (Reichardt, 2006). Glial hücre hattı kökenli nörotrofik faktör ailesi ligandları (GFL'ler) ve nöropoietik sitokinler ile birlikte nörotrofik faktörler ailesini oluşturan nörotrofinler (Deister ve Schmidt, 2006), hem gelişmekte olan hem de olgun nöronların büyümesini, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını destekleyen biyomoleküllerdir (Skaper, 2017). Gelişim sırasında nörotrofinlerin veya reseptörlerinin işlev bozuklukları, biliş, hafıza oluşumu ve ruhsal durumda uzun vadeli değişikliklere neden olabilir (Boschen ve Klintsova, 2017).

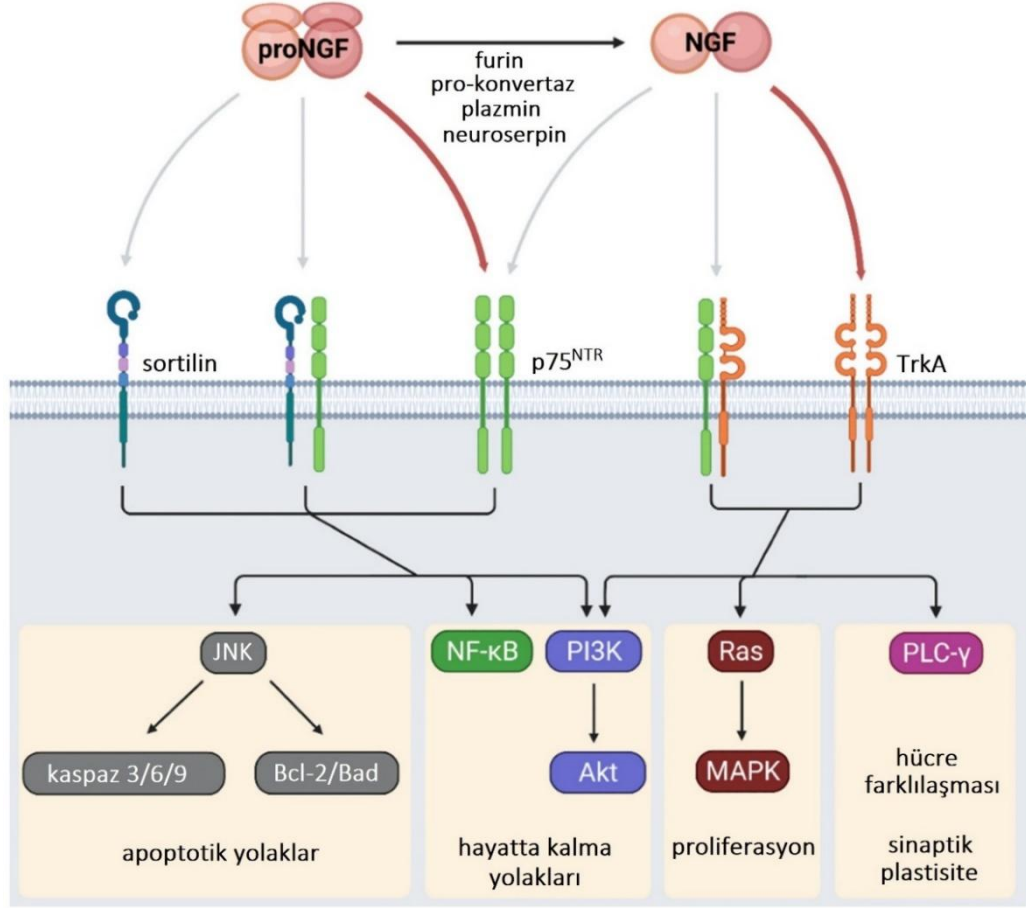
NGF, 1950'lerin başındaki keşfiyle ilk tanımlanan nörotrofindir. NGF,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere üç alt birim içeren yüksek molekül ağırlıklı bir kompleks olarak tanımlanır (Liu vd. 2021). Biyolojik aktivitesinden  $\beta$  alt birimi sorumludur.  $\alpha$  alt biriminin işlevi bilinmezken,  $\gamma$  alt birimi epidermal büyüme faktörü (EGF) bağlayıcı bir protein olup,  $\beta$  alt biriminin fonksiyonunda da görev almaktadır (Ozer ve Bayar, 2012). Endoplazmik retikulumda öncü formda sentezlenen NGF (proNGF) golgiye, oradan da ekzositozla salınmak üzere hücre yüzeyine aktarılır. proNGF, hücre içinde serin proteaz, furin konvertaz gibi enzimler ya da hücre dışında plazmin ve nöroserin gibi proteazlar tarafından kesilerek olgun NGF'yi açığa çıkarır. Olgunlaşma süreci ve salgılanan proNGF/NGF oranı, hücre tipi ve fizyolojik aktiviteyle ilişkilidir (Liu vd. 2021; Samario-Román vd. 2023). Öncü formu oluşturan pro kısmının uzun yıllar olgun formun katlanmasını kolaylaştıran şaperon benzeri bir molekül olduğu düşünülmektedirken, artık doğal biyolojik aktivite sergilediği kabul edilmektedir. İki formun nöronlar üzerinde zıt etkileri bulunmaktadır. NGF proliferasyonu uyarırken, proNGF apoptozu uyarır (Trabjerg vd. 2017).

NGF işlevlerini iki tip reseptöre bağlanarak gerçekleştirir. Biyolojik aktiviteler için primer sorumlu, reseptör tirozin kinazlardan olan tropomiyozin ile ilişkili kinaz A (TrkA) reseptörüdür. Diğeri ise pan-nörotrofin reseptörü p75 (p75NTR) olup, TNF reseptörleri ailesindedir ve diğer nörotrofinlere de bağlanır. NGF'nin TrkA ile bağlanma hızı p75NTR'ye göre yavaş, ancak afinitesi yüksektir. NGF'nin düşük

konsantrasyonda bulunduğu durumlarda p75NTR, NGF'nin TrkA reseptörüne bağlanma afinitesini artırır. NGF/TrkA kombinasyonu hücre farklılaşması ve sağ kalımında rol oynayan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), ve fosfolipaz C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) sinyal yollarının aktivasyonunu uyarır (Ceci vd. 2020; Zhou vd. 2023). p75NTR, NF $\kappa$ B ve seramid sinyalleri aracılığıyla hücre sağ kalımı, çoğalma, farklılaşma gibi temel biyolojik süreçlerin düzenlenmesine katılmakla birlikte, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve kaspaz 3, 6 ve 9'un aktivasyonu ile apoptozu uyarır. proNGF, p75NTR için daha yüksek bir afiniteye sahiptir ve eş reseptör sortilin varlığında hem nörotrofik hem de apoptotik sinyali aktive edebilir (Barker vd. 2020; Liu vd. 2021; Samario-Román vd. 2023). Apoptozun indüksiyonu için NGF'nin p75NTR ile pro kısmının ise sortilinle etkileşime girdiği varsayılmaktadır (Trabjerg vd. 2017). TrkA ve p75NTR farklı hücrelerde sinerjik, antagonistik veya birbirinden bağımsız yanıtlar üretebilmektedir. Bu durum, NGF veya proNGF'ye maruz kalma sonucu üretilen cevabın hücreye özgü olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Lorenzini vd. 2021) (Şekil 2.3).

NGF, sinir sisteminde sempatik ve sensörük nöronlar ile nöral krest kökenli hücreler için güçlü ve seçici bir büyüme faktörüdür (Aloe vd. 2012). Nöronların hayatta kalmasını, farklılaşmasını, mitozunu, onarımını, aksonal ve dendritik büyümeyi, sinaps oluşumunu düzenleyebilir (Lorenzini vd. 2021; Zhou vd. 2023). Dikkat, uyarılma, motivasyon, hafıza ve bilinç gibi bilişsel aktivitelerde rol alan kolinerjik nöronlar için kritik düzeyde koruyucu görev üstlenir. En yoğun olarak korteks, hipokampus, hipotalamus ve hipofiz bezinde üretilen NGF, bazal ganglionlar, talamus, omurilik ve retina gibi diğer alanlar ile glial hücreler tarafından da sentezlenir (Aloe vd. 2012; Ceci vd. 2020). NGF, nosiseptif ağrının ana düzenleyicisidir. TrkA reseptörüne bağlandığında oluşan kompleks endositozlanır ve nöron gövdesine taşınarak, nosisepsiyonda rol oynayan yüzey reseptörlerini düzenler. TRPV1 reseptöründe hızlı post translasyonel değişiklikler oluşturarak, santral ve periferik nöronlarda sürekli yoğunluk ve aktivite artışı nedeniyle hiperaljeziye yol açar (Seidel vd. 2013; Shang vd. 2017). NGF'nin insanlarda intravenöz, subkutan ve intradermal enjeksiyonu, hızla ortaya çıkıp haftalarca süren miyalji ile mekanik ve termal hiperaljeziye neden olur (Mizumura ve Murase, 2015). NGF dahil olmak üzere nörotrofik faktörlerin sentezi ya da salgılanmasındaki aksaklıkların, merkezi sinir sisteminin dejeneratif bozukluklarının patogenezinde yer aldığı düşünülmektedir

(Connor ve Dragunow, 1998). Bu hipotez, eksojen NGF uygulamasının dejenerasyon nöronları koruyup onarabildiğini gösteren farklı çalışmalarla desteklenmektedir (Aloe vd. 2015).



**Şekil 2.3.** NGF reseptörleri ve sinyalizasyon (Samario-Román vd. 2023).

NGF, sinir sistemi içinde ve dışında dikkat çekici derecede geniş bir hücre popülasyonu ve biyolojik işlev yelpazesinde etkili olan, karmaşık bir pleiotropik ajan olarak öne çıkmaktadır (Skaper, 2017). Ağırlıklı olarak sinir sisteminde salgılanan NGF'nin, epitel hücreleri, keratinositler, melanositler, düz kas hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar, lenfositler, pankreas β hücreleri, kornea ve konjunktiva epiteli, limbal kök hücreler, tükürük bezleri, tiroid, testis ve ovaryumlar gibi çok sayıda hücre ve doku tarafından sentezlendiği, sinir sistemi dışında birçok doku ve organda da fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynadığı tespit edilmiştir (Alastra vd. 2021; Liu vd. 2021; Lorenzini vd. 2021; Skaper, 2017). Pankreas adacıklarının tam gelişimi için NGF gereklidir. İnsülin homeostazında ve diyabet patogeneğinde rol oynar. Gonadal hormonların sentezini düzenler. Yağ dokuda lipoliz

ve termogenezin düzenlenmesinde görev alır. Adiposit sayısını, adipokin üretimini ve adipoz doku yangısını kontrol eder (Samario-Román vd. 2023). Bronşiyal düz kas hücrelerinin proliferasyonunu indükleyerek, astımın şiddetlenmesine neden olabilir (Zhou vd. 2023). Hepatositlerin TrkA ve p75NTR reseptörlerini eksprese ettiği, NGF'nin farklı hasar modellerinde hepatoprotektif rol oynadığı gösterilmiştir (Tsai vd. 2014, 2018; Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013). NGF, ekstraselüler matriks bileşenlerinin ekspresyonunu ve sekresyonunu, anjiyogenezi, miyofibroblast farklılaşmasını, fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu destekleyerek yara iyileşmesinde rol oynar. Deri yaralarının kenarlarındaki epitel hücreleri ve keratinositlerde NGF ekspresyon seviyeleri daha yüksektir. Eksojen NGF topikal uygulandığında, korneal, dermal ve oral yaralar üzerinde belirgin bir iyileştirici etki gösterir. FDA, nörotrofik keratitisin tedavisinde NGF'nin göz damlası olarak kullanımını onaylamıştır (Kanu ve Ciolino, 2021; Liu vd. 2021).

Sinir ve bağışıklık sistemlerinin ikisi de homeostazın korunmasından ve organizmanın çevreye uyum sağlamasından sorumludur. Bu amaca hizmet ederken karmaşık bir iş birliği içerisinde çalıştıkları kabul edilir. Nöronal hücre fonksiyonunu ve bağışıklık hücresi aktivitelerini etkileyebilen NGF'nin, iki sistem arasındaki çapraz etkileşimde kilit bir aracı olduğu düşünülmektedir (Minnone vd. 2017). Aynı şekilde dikkat çeken diğer bir kilit oyuncu da mast hücresidir (Skaper, 2017). Mast hücresi aktif NGF'yi eksprese ettiği, salgıladığı ve depoladığı gösterilen sinir doku dışındaki ilk hücre tipidir (Samario-Román vd. 2023). Yenidoğan ratlara NGF enjeksiyonu bağ doku ve mukozal mast hücrelerinde hiperplaziye neden olurken (Marshall vd. 1990), anti-NGF antikoru kullanıldığında peritoneal mast hücre sayıları azalmaktadır (Aloe, 1988). Mast hücrelerinden histamin ve serotonin salınımıyla birlikte, otokrin etkiyle kendi salınımını da uyarır. Ayrıca yangı yanıtına katkı olarak komşu nosiseptif nöronların duyarlılığını artırır ve ağrı algısını kolaylaştırır (McKelvey vd. 2013; Shang vd. 2017). Normalde düşük olan bazal NGF üretimi yangı sırasında büyük ölçüde artar. Multipl skleroz hastalarının beyin omurilik sıvısında, romatoid artritli hastaların sinovyal sıvılarında ve sistemik lupus eritematozus hastalarının kan serumlarında NGF konsantrasyonu yüksektir. Yangı bölgesinde açığa çıkan IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi sitokinler; kas hücreleri, epitel hücreleri, immun hücreler, fibroblastlar, adipositler, nöronlar ve glia gibi farklı hücre tiplerinde NGF üretimini uyarır. Apoptoz inhibisyonuyla mast hücrelerini, hematopoetik kök hücreleri, eozinofil, nötrofil, B

lenfosit ve monositleri hayatta kalmaya teşvik eder. Kemotaksisi aktive eder, nötrofil ve makrofajların fagositozunu uyarır. Eozinofillerin sitotoksik aktivitesini artırır. Bildirilen proinflamatuvar etkilerine karşılık, ağırlıklı etkisinin antiinflamatuvar yönde olduğu ileri sürülmektedir (Minnone vd. 2017). Serebral hasardan sonra, antioksidan enzim seviyelerini yükselterek serbest radikal oluşumunu azaltır. NGF ve IL-10 arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Her biri diğerinin seviyesini artırır (Ozer ve Bayar, 2012).

NGF ve reseptörleri karaciğer, akciğer, pankreas, ovaryum, meme, deri, mide ve tiroid malign neoplazmalarında aşırı düzeyde eksprese edilmektedir. Bu durum onkolojide ortaya çıkan sinir bağımlılığı kavramı bağlamında, NGF'nin tümör hücrelerinin büyümesi ve kanserin ilerlemesi için gerekli tümör nörogenesinde itici güç olarak öne sürülmesine neden olmuştur. Ayrıca, kanser ağrısında rol aldığı, farmakolojik müdahaleler için bir hedef ve potansiyel bir prognostik belirteç olabileceği düşünülmektedir (Griffin vd. 2018).

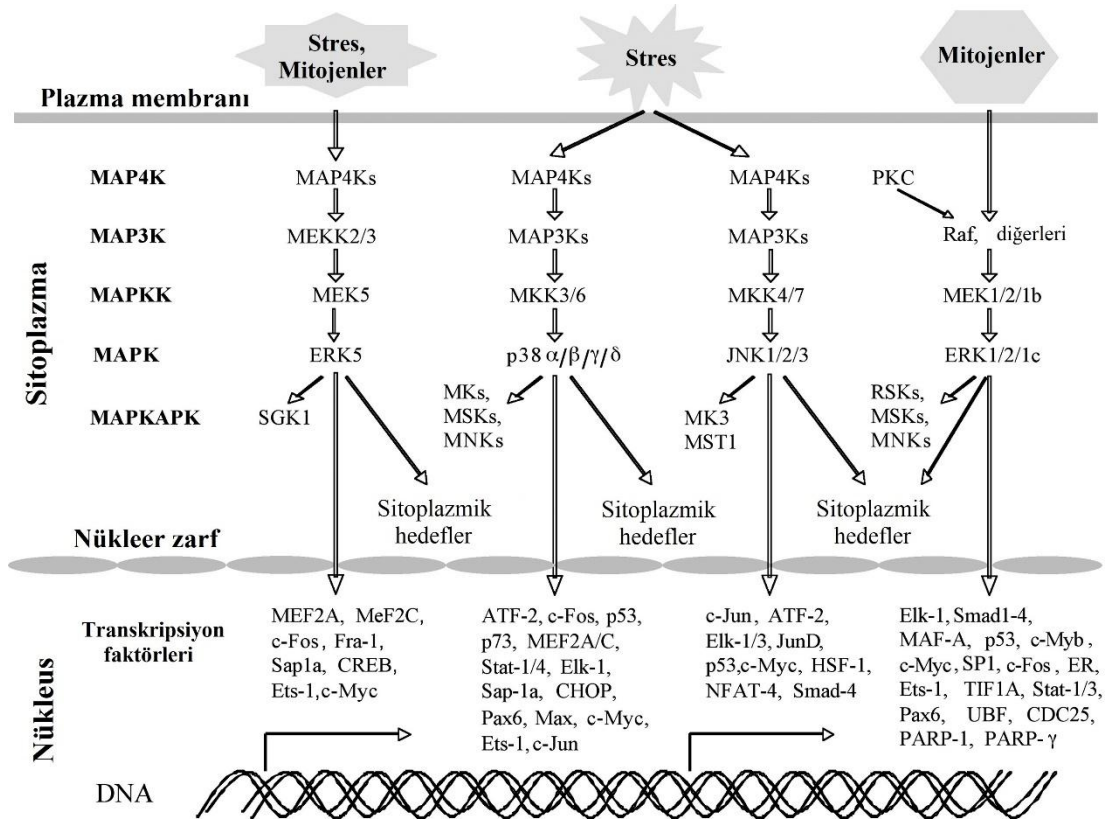
## **2.5. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolakları**

Organizmada homeostazın kontrolü, hücrelere ekstraselüler ve intraselüler fizikokimyasal ipuçlarını algılama, bilgiyi işleme ve uygun biyolojik tepkiyi verme yeteneği kazandıran, hücre sinyal iletiminde görevli biyokimyasal ağlara dayanır (Valls ve Esposito, 2022). Hücreler bu ağları oluşturan sinyal yolakları sayesinde, organizmanın gelişmesi ve bütünlüğünün korunması için büyüme faktörleri ve hormonlar gibi fizyolojik uyarılara verilen cevabın yanında, ksenobiyotikler, ozmolarite değişiklikleri, ısı, radyasyon, endoplazmik retikulum stresi ve oksidatif stres gibi iç ve dış uyarılara karşı da homeostazın sürdürülmesi, yeniden sağlanması ya da hücrenin ölüme sevki yönündeki hücresel yanıtı ortaya çıkarır (Cuenda ve Rousseau, 2007; Simmons vd. 2009). Bu noktada özellikle mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolakları stres ve büyüme faktörleri gibi hücre için olumlu ya da olumsuz uyarıları, adaptif ve programlanmış tepkilere (çoğalma, farklılaşma, yangı, apoptoz, vs.) dönüştürmek için özelleşmiştir (Peti ve Page, 2013). Üstlendikleri görevler bakımından hücresel sensörler ve anahtarlar olarak işlev gören MAPK'ler, hücrenin akıbetine ilişkin kararların ortaya çıkışında kritik rol oynar (Yue

ve López, 2020). MAPK'ler, embriyogenezi, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve ölümünü kontrol eden yolların ana bileşenleridir (Pearson vd. 2001).

MAPK'ler fosforilasyon kaskadları tarafından düzenlenir (Pearson vd. 2001). Önemli bir hücrel düzenleyici mekanizma olan protein fosforilasyonu, protein kinazlar aracılığıyla amino asitlerin polar R grubuna bir fosfat (PO<sub>4</sub>) grubunun eklenmesiyle gerçekleşir. Bu ekleme, proteinin niteliğini hidrofobik apolardan hidrofilik polara değiştirir ve proteinin diğer moleküllerle etkileşime girmesine izin verir. Kinazlarla zıt işleve sahip fosfatazlar, fosfat grubunu uzaklaştırarak proteini defosforile eder (Ardito vd. 2017). Tüm ökaryot hücrelerde bulunan MAPK sinyal yollarının omurgası, yukarıdan aşağıya doğru fosforilasyon sırasıyla MAP3K (MAPKKK), MAP2K (MAPKK) ve MAPK enzimlerini içeren, çekirdek sinyal modülü adı verilen üç katmanlı yapıdan oluşur. Bazı yollarda hücrelere ve uyarana göre değişebilen ek yukarı akış (MAP4K) ve aşağı akış bileşenleri de (MAPKAPK) sinyal iletimine katılır. Sinyal, kinazların sıralı aktivasyonlarıyla yayılır ve hedef substratların fosforilasyonuna yol açar (Guo vd. 2020; Kyriakis ve Avruch, 2012; Plotnikov vd. 2011).

MAPK'ler ya ligand reseptör etkileşimiyle (örneğin; büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler) ya da ligand bağımsız olarak radyasyon, ozmotik stres gibi stres faktörleri etkisi olmak üzere iki farklı yolla aktive edilir. MAPK sinyali, MAPK yollarına bağlı farklı membran reseptör ailelerinin (örneğin; reseptör tirozin kinazlar /RTK, G proteini kenetli reseptörler /GPCR, sitokin reseptörleri, serin/treonin kinaz reseptörleri ve membrana bağlı stres sensörleri) uyarılmasıyla tetiklenir. Uyarana bağlı olarak sinyal, klasik MAPK kaskadlarının yukarı akış aktivatörleri olan küçük G proteinleri, kinazlar veya adaptör proteinler yoluyla aşağı yönde iletilir (Nadal-Ribelles vd. 2019). Yukarı akış bileşenleri tarafından ilk katmanda aktive edilen MAP3K, aktivasyon döngüsündeki serin ve treonin kalıntıları üzerinde MAP2K'yi fosforiller. Aktive MAP2K, korunmuş bir Thr-X-Tyr motifi içinde hem treonin hem de tirozinin ikili fosforilasyonu ile MAPK'yi aktive eder. MAPK enzimleri, prolin tarafından takip edilen serin/treonin alanlarını tanıyarak substratlarını fosforiller. MAPK'lerin inaktivasyonları, çift özgülüklü fosfatazlar (Dual-specific phosphatases, DUSP) adıyla da bilinen MAPK fosfatazlar (MKP) tarafından katalizlenir (Kyriakis ve Avruch, 2012; Lawan ve Bennett, 2017; Nadal-Ribelles vd. 2019; Pearson vd. 2001).



**Şekil 2.4.** MAPK katmanları ve hedef substratlarının şematik gösterimi (Plotnikov vd. 2011).

Aktive MAPK enzimleri ve aşağı bileşenleri, protein fonksiyonunda ve uygun biyolojik yanıtı yürüten gen ifadesinde değişiklik meydana getirmek için, fosfolipaz A2 gibi membran proteinleri, akış aşağı kinazlar, hücre iskeleti proteinleri gibi sitoplazmik proteinler ve transkripsiyon faktörleri gibi nükleer proteinler dahil yüzlerce substratı hedefler. Çekirdeğe olan sinyal iletimine çoğunlukla nükleer translokasyonları aracılık eder. Bu karmaşa içerisinde yolak sinyalinin seçiciliği, yapı iskelesi proteinleri tarafından izlenir. İskele proteinleri belirli yolak elemanlarını ayırma görevi görür ve bu sayede, yolak bütünlüğü ile sinyal verimliliği korunur (Kyriakis ve Avruch, 2012; Morrison, 2012; Nadal-Ribelles vd. 2019; Pearson vd. 2001; Plotnikov vd. 2011; Yue ve López, 2020) (Şekil 2.4).

Memelilerde, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinaz (JNK), p38 MAPK ve ERK5 olarak adlandırılan tipik üç katmanlı bir modülde çalışan dört klasik MAPK alt grubu ile ERK3/4, ERK7/8 ve nemo benzeri kinaz (NLK) gibi klasik sinyal yapısını takip etmeyen üç atipik MAPK alt grubuyla birlikte, 7 alt gruba ayrılmış 14 MAPK üyesi tanımlanmıştır (Yue ve López, 2020).

Genel olarak bakıldığında, klasik MAPK grubundaki JNK ve p38 MAPK yolları öncelikli olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik stres uyaranlarına karşı aktive olurken, ERK1/2 modülü çoğunlukla büyüme faktörleri tarafından uyarılan sinyalleri işler (Yue ve López, 2020). Grubun daha az çalışılmış olan üyesi ERK5 ise diğerlerinden farklı olarak, hem stres hem de mitojenik uyaranlar tarafından eşit derecede aktive edilir (Plotnikov vd. 2011). ERK1/2 büyüme faktörleri, serum ve forbol esterleri gibi çoğalma ve hayatta kalma uyaranlarına, daha az ölçüde G proteini kenetli reseptörler (GPCR) ile sitokinlerin ligandlarına, ozmotik strese ve mikrotübül düzensizliğine karşı aktive olur. ERK5, büyüme faktörleri (örneğin; EGF, NGF, FGF-2 ve BDNF) ve sitokinlerin (örneğin; Lösemi inhibitör faktör-LIF) yanı sıra, ozmotik stres ve hidrojen peroksit gibi stres faktörlerine yanıt verir (Nadal-Ribelles vd. 2019). Erken embriyonik gelişimdeki gerekliliğiyle (Cargnello ve Roux, 2011) birlikte, kardiyovasküler sistemin normal gelişimi ve vasküler bütünlüğün korunmasında kritik rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Nithianandarajah-Jones vd. 2012). Üç izoformdan oluşan JNK yolağı (JNK1, 2, 3) ile dört izoformdan oluşan p38 MAPK yolağı (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$ ), işlevsel ilişkileri nedeniyle stresle aktive olan protein kinazlar (SAPK) olarak adlandırılırlar. Her ikisi de iyonize radyasyon, UV ışınları, hipoksi, oksidatif stres, ozmotik stres, DNA hasarı, sitokinler, büyüme faktörü yoksunluğu gibi stres etkenleri ile daha az oranda büyüme faktörleri ve bazı GPCR ligandları gibi çok sayıda stresten bağımsız uyaran tarafından aktive edilirler (Cargnello ve Roux, 2011; Kim ve Choi, 2010; Plotnikov vd. 2011; Westenberger vd. 2021). Ortak birçok uyarana sahip olmaları, yukarı akışta da çeşitli regülatörleri paylaşmalarına neden olur. Modüllerin ikinci katmanında, p38 için MKK3 ve MKK6, JNK için MKK4 ve MKK7 primer MAP2K rolünü üstlenir. JNK aktivatörü MKK4 aynı zamanda p38 yolağını da aktive edebilmektedir (Cargnello ve Roux, 2011; Hotamisligil ve Davis, 2016).

### **2.5.1. p38 MAPK Sinyal Yolağı**

Hücreler yaşamları boyunca hem homeostatik hem de patolojik koşullarda farklı streslere maruz kalır. Stresin etkin yönetimi hücre ve organizmanın hayatta kalabilmesi için esastır. Hücrelerin kesin ve koordineli şekilde farklı stres koşullarının altından kalkabilmeleri, çeşitli sinyal ağlarına bağlıdır. Bu bağlamda p38 (p38 MAPK)

sinyal yolağı, son 30 yılda öne çıkan araştırma konularından olmuştur (Canovas ve Nebreda, 2021). p38 yolağı stres yanıtındaki rolleriyle birlikte, adaptif bağışıklık, yangı, hücre yaşlanması, hücre siklusu kontrol noktalarının düzenlenmesi, DNA onarımı gibi süreçlerde merkezi roller üstlenir. p38 kontrolündeki strese uygun yanıt bazen, çevre dokuyu korumak için programlı hücre ölümünü (apoptoz) gerektirir. Önemli süreçlerdeki bu katılım, p38 sinyalindeki düzensizliklerin patolojik sonuçları olacağını öngörmektedir (Plotnikov vd. 2011; Whitaker ve Cook, 2021). Strese karşı bu koordinasyon yükünü, sıklıkla eş zamanlı olarak aktive edilen JNK sinyal yolağıyla birlikte üstlenir. İki yolak yukarı akışlarında çok sayıda aktivatörü paylaşır, ancak potansiyel olarak karşıt etkiler gösterebilirler. Yolaklar arasındaki farklar spesifik iskele proteinleri ve substratlarda yatmaktadır (Canovas ve Nebreda, 2021; Plotnikov vd. 2011). Aralarındaki çapraz etkileşimin kapsamı ve sonuçları, hücre tipine, dokuya ve organizmaya bağlıdır (Martínez-Limón vd. 2020). Çalışma konumuzu oluşturan asetaminofene bağlı akut karaciğer hasarında p38 ile JNK ekspresyon ve fosforilasyonları birlikte artmaktadır (Du vd. 2022; Zhou vd. 2019).

p38 MAPK ailesinin, substrat özgünlükleri, ekspresyon modelleri ve SB203580 gibi inhibitörlere duyarlılıklarında farklılık, amino asit dizilimlerinde ise yaklaşık %60 özdeşlik gösteren, p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$  adlarıyla tanımlanmış dört üyesi vardır (Cuenda ve Rousseau, 2007). p38 $\alpha$  tüm dokularda bulunan ve en fazla eksprese edilen aile üyesidir. Bu nedenle mevcut literatürün çoğunluğu bu izoformu ifade etmektedir (Cargnello ve Roux, 2011; Martínez-Limón vd. 2020). Ekspresyon dağılımı benzer olmakla birlikte p38 $\beta$ ,  $\alpha$  izoformuna kıyasla çok düşük seviyelerde eksprese edilir ve p38 $\alpha$  varlığında işlevsiz olduğu düşünülmektedir (Martínez-Limón vd. 2020). p38 $\gamma$  iskelet kasında ve p38 $\delta$  ise akciğer, böbrek, ince bağırsak ve testiste eksprese edilmektedir (Burton vd. 2021; Cuenda ve Rousseau, 2007). ATP bağlanmasını engelleyerek yolak inhibisyonuna neden olan SB203580 bileşiği, p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  aktivitesini seçici olarak bloke eder. p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$  izoformlarına karşı etkisi yoktur (Kyriakis ve Avruch, 2012). p38 ilgi çekici ancak, karmaşık ve zorlayıcı bir terapötik hedeftir. Aktivitesinin inhibisyonu, birçok yolak üzerinde bazıları arzu edilmeyen pleiotropik etkilere neden olabilir (Whitaker ve Cook, 2021).

p38 MAPK sinyal yolağı ısı şoku, ozmotik şok, oksidatif stres, inflamatuvar sitokinler, patojenle ve hasarla ilişkili moleküler paternler (PAMP ve DAMP), DNA'ya zarar veren ajanlar, UV ışık,  $\gamma$ -radyasyon, hipoksi ve iskemi gibi çok çeşitli

stres uyarıları tarafından aktive edilir (Cargnello ve Roux, 2011; Martínez-Limón vd. 2020). Mitojenler, stres ve sitokinlere kıyasla p38 yolağının zayıf aktivatörleridir (Canovas ve Nebreda, 2021). Uyarıların oluşturduğu sinyaller, genellikle JNK kaskadında işlev görenlere benzer şekilde, adaptör proteinler, küçük GTPazlar, MAP4K ve MAP3K bileşenleri tarafından p38 kaskadına iletilir (Plotnikov vd. 2011). Yukarı akış bileşenlerinin çeşitliliği, hücrelere farklı uyarılara yanıt verebilen çok sayıda mekanizma sağlar (Martínez-Limón vd. 2020). MAP2K katmanında bulunan MKK3 ve MKK6, p38'in aktif döngüsündeki treonin ve tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile primer aktivatör vazifesi görür. Bazı durumlarda JNK aktivatörü olan MKK4 de p38 fosforilasyonunu sağlayabilir. Ayrıca, TAB1 aracılığıyla ve T lenfositlere özgü ZAP70 aracılığıyla gerçekleştirilen p38 otofosforilasyonları, MAP2K'den bağımsız iki ayrı alternatif aktivasyon mekanizmasıdır (Burton vd. 2021). p38 sinyali MAPK fosfatazlar (MKP) tarafından Thr-X-Tyr motifinden fosfatların çıkarılmasıyla sona erer. Güçlü ve sürekli p38 aktivasyonu yaşlanma, apoptoz ve terminal hücre farklılaşmasıyla ilişkiliyken, düşük seviyede p38 aktivasyonu hücrede sağ kalım etkisine sahiptir (Martínez-Limón vd. 2020).

p38 sinyal yolağı aşağı akışında, JNK'de bulunmayan MAPKAPK2-5, MNK1/2 ve MSK1/2 gibi bileşenlere sahiptir. MNK1/2 ve MSK1, ERK1/2 sinyal yolağıyla ortaklıktır. Bu ortaklık iki yolak arasında bir sinyal entegrasyon noktasıdır (Plotnikov vd. 2011). p38 için geniş yanıt yelpazesine aracılık eden yüzden fazla substrat tanımlanmıştır. Bunlar arasında transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon faktörlerini aktive eden kinazlar, translasyon makinesi bileşenleri, metabolik enzimler, glikojen sentaz ve fosfolipaz A2 gibi proteinler sayılabilir. Substratlarının çoğu sitozolik olmakla birlikte, yaklaşık %30'u çekirdekte ve daha düşük oranlarda hücre iskeleti ve lizozomlar gibi selüler kompartmanlarda bulunur (Canovas ve Nebreda, 2021; Cuenda ve Rousseau, 2007).

p38, birçoğu için moleküler detayların hala eksik olduğu çok çeşitli hücrel aktiviteye katılır (Martínez-Limón vd. 2020). İmmun yanıtta ve yangıda yer alan sitokinler ile diğer faktörlerin ekspresyonlarını düzenleyen kinazların, transkripsiyon faktörlerinin ve mRNA stabilitesi düzenleyicilerinin fosforilasyonlarını kontrol eder. Bu yönüyle bağışıklık hücrelerinin yanı sıra epitel hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlarda IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini düzenler (Canovas ve Nebreda, 2021). COX-2, MMP9, iNOS ve VCAM-1 gibi doku

reorganizasyonu ve redoks düzenlemesinde rol oynayan mediyatörlerin ekspresyonunu uyarır (Han vd. 2020). IL-10 üretiminin düzenlenmesine katılım gibi yönleriyle antiinflamatuvar sinyalizasyonda da görev alır (Burton vd. 2021). Hipoksik koşullar tarafından aktive edilen p38, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) üretimine ve ayrıca anjiyogenez sürecinde aşağı akış sinyallemesine katılır. Romatoid artrit, Crohn, sedef, ankilozan spondilitis ve kronik astım gibi inflamatuvar hastalıkların patogenezinde kilit rol oynar (Cuenda ve Rousseau, 2007).

Strese bağlı yüksek p38 aktivitesi, hücre siklusunu G1/S ve G2/M kontrol noktalarında durdurur. Yine stres yanıtında, pro ve anti apoptotik üyelerden oluşan BCL2 ailesi arasındaki dinamik dengeye müdahale ederek apoptozu uyarır (Whitaker ve Cook, 2021). Bağışıklık yanıtı ve apoptoz üzerindeki fonksiyonları nedeniyle, virulensi artırmak, replikasyonu kolaylaştırmak, etken ve enfeksiyon lehine apoptozu önlemek ya da uyarmak gibi farklı amaçlarla, bazı patojenler tarafından hedef alınır (Canovas ve Nebreda, 2021; Gräb ve Rybniker, 2019). p38 sinyali, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyeti, telomer kısalması ve kronik onkogen aktivasyonu gibi uyaranlar tarafından indüklenen yaşlanmadan da sorumludur. Hücre yaşlanma onkogen aktivasyonuna karşı bir tür savunma olarak kabul edildiğinden, p38 tümör oluşumunda da önemli rol oynar (Han vd. 2020). Yaşlanmaya etkisi ve pro apoptotik fonksiyonu nedeniyle, p38 genel olarak antionkogenik bir yolak kabul edilmekte ise de diğer taraftan karsinogenezi teşvik ettiğine dair yayınların sayısı da artmaktadır (Martínez-Limón vd. 2020).

p38 sinyal yolağı hücre büyümesi ve hacminin düzenlenmesi, ekstraselüler matriks üretimi, iyon ve safra tuzu taşınması, glukoneogenez ve lipogenez dahil, karaciğerde çok sayıda fonksiyona katılır (Xu vd. 2008). Hepatosit spesifik p38 $\alpha$  delesyonlu farelerde oksidatif stres ve yangı şiddeti artar. Hepatik p38 ekstraselüler matriks sentezini ve stellat hücre farklılaşmasını uyararak, hepatik fibrozisi destekler (Westenberger vd. 2021). Non alkolik yağlı karaciğer hastalığındaki etkileri çelişkilidir. Erken aşamada zayıf şekilde aktive olan p38 karaciğeri steatozisten korur. Hastalık ilerledikçe ve yangıyla ilişkili hale geldikçe, yükselen p38 seviyesi steatohepatitisi şiddetlendirir (Hwang vd. 2020).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasına, Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 24.02.2022 tarihli ve 2022/1-10 sayılı kararla verilen etik açıdan uygunluk onayıyla (Ek-1) başlandı. Çalışma materyalini, Balıkesir Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 9-10 haftalık,  $30\pm 5$  gram ağırlığında, erkek, 64 adet BALB/c fare oluşturdu. Fareler, çalışma öncesi yedi gün boyunca, merkezin standart koşullarındaki  $22\pm 2$  °C sıcaklık ve %60-65 nemin muhafaza edildiği plastik kafeslerde, 12'şer saatlik karanlık/aydınlık periyodu altında barındırıldı. Bu süre zarfında şebeke suyu ve ticari yemle serbest olarak beslenen fareler, hepatosit GSH seviyelerinin azaltılması amacıyla deney öncesi son 12 saat aç bırakıldı.

#### 3.1. Deney Aşaması ve Gruplar

Çalışmada, her birinde rastgele seçilen 8 fare bulunan, 8 ayrı uygulama grubu oluşturuldu (Şekil 3.1). Gruplar ve yapılan uygulamalar **Tablo 3.1**'de gösterildi.



Şekil 3.1. Gruplara göre kafeslere ayrılmış fareler.

**Tablo 3.1.** Çalışma grupları ve uygulamalar.

<b>Grup Adı</b>	<b>Uygulama (intraperitoneal)</b>
<b>Kontrol</b>	Serum fizyolojik (%0.9 NaCl) 1 ml
<b>NGF</b>	NGF 10 µg/kg
<b>SB203580</b>	SB203580 20 mg/kg
<b>NGF+ SB203580</b>	NGF 10 µg/kg SB203580 20 mg/kg
<b>APAP</b>	APAP 150 mg/kg
<b>APAP+NGF</b>	APAP 150 mg/kg NGF 10 µg/kg
<b>APAP+SB203580</b>	APAP 150 mg/kg SB203580 20 mg/kg
<b>APAP+NGF+SB203580</b>	APAP 150 mg/kg NGF 10 µg/kg SB203580 20 mg/kg

Deneklere uygulanacak bileşiklerden APAP (Sigma-Aldrich, A7085) 10 mg/ml olacak şekilde 35°C'ye ısıtılmış %0.9 sodyum klorür çözeltisinde, SB203580 (AdooQ Bioscience, A10824) %5 Tween 80 + %30 PEG 300 + %4 DMSO + distile su içeren süspansiyonda, NGF (MedChem Express, Mouse, 120a.a, Cat. No.: HY-P7661) %0.9 sodyum klorür çözeltisi içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan bileşikler, **Tablo 3.1**'de hizalarında belirtilen dozlarda, tek doz olarak intraperitoneal yolla farelere uygulandı.

Uygulamaların 24. saati sonunda, isofluranla (Isoflurane Usp %100, ADEKA) oluşturulan inhalasyon anestezisi altında gerçekleştirilen dekapitasyon işlemiyle, çalışmanın hayvan deneyi aşaması sonlandırıldı. Bu esnada her bir denekten serum tüplerine kan örnekleri alındı ve +4°C'deki 30 dakikalık bekleme sonrası santrifüje

edilerek (10 dakika, 5000 rpm) kan serumları elde edildi. Elde edilen serumlar, analizler gerçekleştirilene kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Kan örneklerinin alınmasını takiben yapılan nekropsi esnasında gözlenen bulgular kaydedilerek, karaciğer dokularının bir kısmı biyokimyasal ve moleküler analizler için -80°C'de, kalan kısmı histopatolojik analizler için %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna alınarak, analizler gerçekleştirilene kadar muhafaza altına alındı.

### **3.2. Histopatolojik Analizler**

Nötral tamponlu %10'luk formaldehit solüsyonunda 48 saat tespit edilen karaciğer dokuları, akar haldeki şebeke suyu altında 16 saat süreyle yıkamaya bırakıldı. Yıkamanın ardından doku takip cihazında (Leica TP1020) alkol, ksilen ve parafin istasyonlarından geçirilen dokular, doku bloklama cihazı (Leica, HistoCore Arcadia H-C) vasıtasıyla parafin blok içerisine alındı. Bloklardan mikrotomla (Leica 2255) 4.5 µm kalınlığında alınan kesitler histopatolojik analizler için normal lamlara, immunohistokimyasal analizler için polilizin kaplı lamlara aktarıldı. Histopatolojik analiz için hazırlanan doku örneklerine Hematoksilen-Eozin (HE) boyaması yapılarak, ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse Ni-U) bulgular değerlendirildi.

Altmış dört deneği temsil eden her bir kesitten, 200x büyütmede 5 farklı alan seçilerek fotoğraflandı (DS-Ri2, Nikon). Fiji ImageJ (2.12.0) yazılımı kullanılarak, her alan fotoğrafında önce hasarlı daha sonra sağlıklı hepatositler sayıldı ve hasarlı hepatositlerin toplam hepatosit sayısına göre yüzdelik oranı hesaplandı. Beş farklı sahanın yüzdelik oranlarının ortalama değeri, o deneğin hasar skorunu oluşturdu.

### 3.3. Biyokimyasal Analizler

#### 3.3.1. Kan Serumu Analizleri

Deneklerin kan serumlarına ait ALT, AST ve GGT enzimlerine ilişkin ölçümler, rutin biyokimya cihazı (Randox RX Imola) kullanılarak gerçekleştirildi.

#### 3.3.2. Doku Analizleri

##### 3.3.2.1. Glutasyon Ölçümü

Buz üzerinde homojenize edilen doku örneği, +4 derecede, 15 dakika (3000 devir/dak) boyunca santrifüj edilerek, TCA çözeltisi ilavesinden sonra tekrar santrifüje edildi. Elde edilen içerikten Ellman yöntemine göre, **Tablo 3.2**'de açıklandığı şekilde GSH analizi gerçekleştirildi.

**Tablo 3.2.** GSH analizi.

<b>Bileşen</b>	<b>Numune</b>	<b>Kör</b>
%10'luk homojenat	500 µl	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-	500 µl

GSH miktarı, oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra spektrofotometrik olarak 410 nm'de okunarak belirlendi ve nmol/gram yaş doku (gyd) cinsinden kaydedildi.

### 3.3.2.2. Malondialdehit Ölçümü

Buz üzerinde bir dakika boyunca homojenize edilen karaciğer dokularındaki MDA miktarı, Uchiyama ve Mihara yöntemiyle belirlendi (**Tablo 3.3**).

**Tablo 3.3.** MDA analizi.

Bileşen	Numune
Homojenat	250 µl
%1'lik fosforik asit	1500 µl
%0.6'luk TBA	1500 µl

Çözeltiler deney tüplerine eklendikten sonra 1 saat kaynar suda bekletildi. N-butanol (2 ml) eklendikten sonra, 5 dakika vortekslendi. Örnekler 3000×g'de 10 dakika santrifüje edilip, 535 nm ve 520 nm'de absorbanları spektrofotometrede okundu. Malondialdehit miktarları 1,1', 3,3' tetrametoksiopropan ile hazırlanan standarda göre belirlendi ve nmol/gram yaş doku (gyd) cinsinden kaydedildi.

### 3.3.2.3. Toplam Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Ölçümleri

Buz üzerinde 1 dakika boyunca homojenize edilen dokular, 1 ml %0.9'luk sodyum klorür ilavesinden sonra 1 dakika boyunca vortekslendi. Ardından 5 dakika süreyle santrifüje edilerek (5000 rpm) elde edilen süpernatant TOS ve TAS analizlerinde kullanıldı. Ölçümlerde Rel Assay Diagnostics (Mega Tıp) markalı ticari kitlerden yararlanıldı. Süpernatant bulunan kuyucuklara kitlerin içerisinde bulunan 1. reaktifler eklendikten 30 saniye, 2. reaktifler eklendikten 10 dakika sonra TOS için 530 nm, TAS için 660 nm dalga boylarında spektrofotometrik ikişer ölçüm yapıldı. Üreticinin sunduğu formülden yararlanılarak ölçüm sonuçlarından TOS ve TAS miktarları µmol/L cinsinden hesaplandı.

### 3.4. İmmunohistokimyasal Analizler

Kesitlerin bulunduğu polilizinli lamalar boyamadan önceki gece boyu etüvde bekletildikten sonra, ksilen ve alkol aracılığıyla deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirildi. Fosfat buffer solüsyonuyla (PBS) yıkamanın ardından %0.3'lük hidrojen peroksitte 15 dakika bekletilerek, dokular üzerindeki endojen peroksidaz aktivitesi inaktive edildi. Tekrar PBS yıkamasını takiben lamalar sitrat buffer (pH 6.0) solüsyonu içerisine konularak, mikrodalga fırında (800 W) 15 dakika ısıya maruz bırakıldı. Tespit esnasında oluşan çapraz bağlar nedeniyle erişimi kısıtlanmış antijenlerin açığa çıkarılmasını amaçlayan bu işlem sonrasında, lamalar solüsyon içerisinde oda sıcaklığında soğutularak tekrar PBS ile yıkandı. İstenmeyen nonspesifik boyanmaları önlemek amacıyla damlatılan non immun serum (Ultra V Block, ThermoFisher, TA-125-UB) 30 dakika lamalar üzerinde bekletildi. **Tablo 3.4'**de gösterilen primer antikolar, hizalarında belirtilen dilüsyonlarda PBS içerisinde seyreltikten sonra kesitler üzerine damlatılarak, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkama işlemlerinin ardından dokular, oda sıcaklığında 30 dakika biyotinli sekonder antikorla (Biotinylated Goat anti Polyvalent, ThermoFisher, TP-125-BN) inkübe edildi. Diğer ara yıkamalarda olduğu gibi (3x5 dakika) tekrar PBS ile yıkanan kesitler, 30 dakika streptavidin peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, ThermoFisher, TS-125-HR) ile inkübe edildi. PBS ile yıkama işleminin ardından immun reaksiyonu göstermek amacıyla, lamalar üzerinde 2 dakika kromojen (DAB, Cell Signaling, 8090S) bekletildi. Distile suyla yapılan reaksiyon sonlandırmanın devamında kesitler 60 saniye Mayer's Hematoksilen içerisine daldırıldı. Şebeke suyuyla yapılan yıkamanın ardından lamalar sırayla derişimi artan alkol (%70-80-96-100-100) kapları ile iki farklı ksilen kabından geçirilerek, entellan vasıtasıyla lamelle kapatıldı.

Her deneğe ait kesitten, 200x büyütmede 5 farklı alan seçilerek fotoğraflandı (DS-Ri2, Nikon). Fiji ImageJ (2.12.0) yazılımı kullanılarak, immun reaksiyon gösteren pozitif alanın toplam alana yüzdelik oranı hesaplandı. Beş farklı sahanın yüzdelik oranlarının ortalama değeri, incelenen deneğin immunohistokimyasal skorunu oluşturdu.

**Tablo 3.4.** Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları.

<b>Antikor</b>	<b>Dilüsyon</b>	<b>Üretici</b>	<b>Ürün/Katalog No</b>
iNOS	1/500	İnvitrogen	PA5-16855
Nitrotirozin	1/400	Millipore	AB5411
TNF- $\alpha$	1/200	Solarbio	K108751P
IL-1 $\beta$	1/200	Bioss	bs-6319R
IL-6	1/200	Bioss	bs-4539R
IL-10	1/200	Solarbio	K009382P
Kaspaz 3	1/200	Abcam	ab13847
Kaspaz 8	1/200	Abcam	ab4052
NGF	1/200	Chemicon	AB1528SP

### 3.5. mRNA Ekspresyon Analizi

Çalışmamızda, normalizatör (housekeeping gen) olarak  $\beta$ -Aktin geni kullanılarak, deneklerin p38 MAPK mRNA ekspresyonu seviyeleri belirlendi. Bunun için önce karaciğer doku örneklerinden total RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ardından ters transkripsiyonla mRNA dizisinin karşı kopyası sentezlenerek, komplementer DNA (cDNA) elde edildi. Ekspresyon seviyesinin ölçümünde gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullanıldı.

**Tablo 3.5.** Primer dizileri.

<b>Gen</b>	<b>Dizi</b>
<i>p38 MAPK-F</i>	5'-CCGGATCCTGGAAGATGTCGCAGGAGAG-3'
<i>p38 MAPK-R</i>	5'-CCGGATCCCAGGTGCTCAGGACACCAT-3'
<i><math>\beta</math>-Aktin-F</i>	5'-CTGGCTCCTAGCACCATGA-3'
<i><math>\beta</math>-Aktin-R</i>	5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3'

### 3.5.1. Total RNA Ekstraksiyonu

Total RNA ekstraksiyonunda işlemler, kit (SanPrep Column MicroRNA Mini-Prep Kit, Bio Basic Inc., SK8811) üreticisinin talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirildi. Buna göre; takribi 50 mg karaciğer dokusu üzerine 1 ml ekstraksiyon sıvısı eklenerek, homojenizatörde 30 saniye doku homojenize edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilen eppendorf tüp içerisindeki dokuya, 0.2 ml kloroform eklendi. Otuz saniyelik vorteksleme sonrası, 10 dakika boyunca 4°C sıcaklık altında 12.000×g'de santrifüjlendi. Oluşan süpernatanttan 540 µl RNaz içermeyen tüpe aktarıldı. Üzerine 1.5 katı hacimde %100 etanol eklenerek, pipetleme yöntemiyle karışımları sağlandı. Karışımın tamamı spin kolona aktararak 12.000×g'de 2 dakika santrifüjlendi ve akışta kalan sıvı atıldı. Spin kolona RPE solüsyonundan 0.5 ml ekleyip, 12.000×g'de 30 saniye santrifüjlendikten sonra akışta kalan sıvı atıldı. Son işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra spin kolon yeni bir tüpe yerleştirildi. RNaz içermeyen sudan üzerine 30 µl eklenerek, 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 12000×g'de 30 saniye santrifüjlendi. Elde edilen total RNA solüsyonları -80°C'de korumaya alındı.

Sonraki aşamada kullanılacak RNA konsantrasyonlarını denekler arasında eşitlemek amacıyla, spektrofotometrede örneklerin RNA miktarı ölçüldü ve cihazın (Thermo Scientific, NanoDrop 1000) yazılımıyla ng/µL cinsinden hesaplanarak kaydedildi.

### 3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Gerçek zamanlı PZR döngü cihazında (Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM), ticari kit (OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit, abm, G236) üreticisinin tavsiye protokolüne uygun olarak yürütülen işlemlerle, ekstrakte edilen RNA'lardan ters transkripsiyonla cDNA sentezlendi.

**Tablo 3.6'**da gösterilen reaktif karışımı ile total RNA örnekleri birleştirilerek vorteksledi. PZR cihazında 54°C'de 15 dakika inkübe edilerek, cDNA sentezi gerçekleştirildi. Cihaz sıcaklığı 5 dakika 85°C'de tutularak revers transkriptaz

enziminin aktivitesi sonlandırıldı. Elde edilen cDNA ürünleri -80°C’de korumaya alındı.

**Tablo 3.6.** cDNA sentezinde kullanılan reaktifler.

<b>Bileşen</b>	<b>Miktarı</b>
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Random primer	1 µl
Oligo (dT)	1 µl
OneScript Plus RTase	1 µl
Nükleaz bulunmayan su	8 µl

### 3.5.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR cihazında cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak, SYBR Green boya içeren ticari kit (BlaTaq™ 2X qPCR MasterMix, abm, G891) aracılığıyla ekspresyon seviyeleri ölçüldü.

PZR cihazı, içeriği **Tablo 3.7**’de gösterilen karışımdan oluşan örneklerle, **Tablo 3.8**’de bildirilen döngü koşullarında çalıştırıldı. İncelenen DNA için amplifikasyon döngüleri sırasında alınan floresan ışımaya ait eşik değerini, normalize edilmiş housekeeping genin eşik değeriyle kıyaslayan karşılaştırmalı  $\Delta\Delta Ct$  ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) yöntemi kullanılarak, mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi.

**Tablo 3.7.** PZR için kullanılan karışımın bileşenleri.

<b>Bileşen</b>	<b>Miktarı</b>
BlaSTaq™ 2X qPCR MM	10 µl
Primer (forward)	0.5 µl
Primer (reverse)	0.5 µl
cDNA	1 µl
Nükleaz bulunmayan su	8 µl

**Tablo 3.8.** PZR cihazı döngü koşulları.

<b>İşlem</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Enzim Aktivasyonu	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Uzatma	60°C	1 dakika	

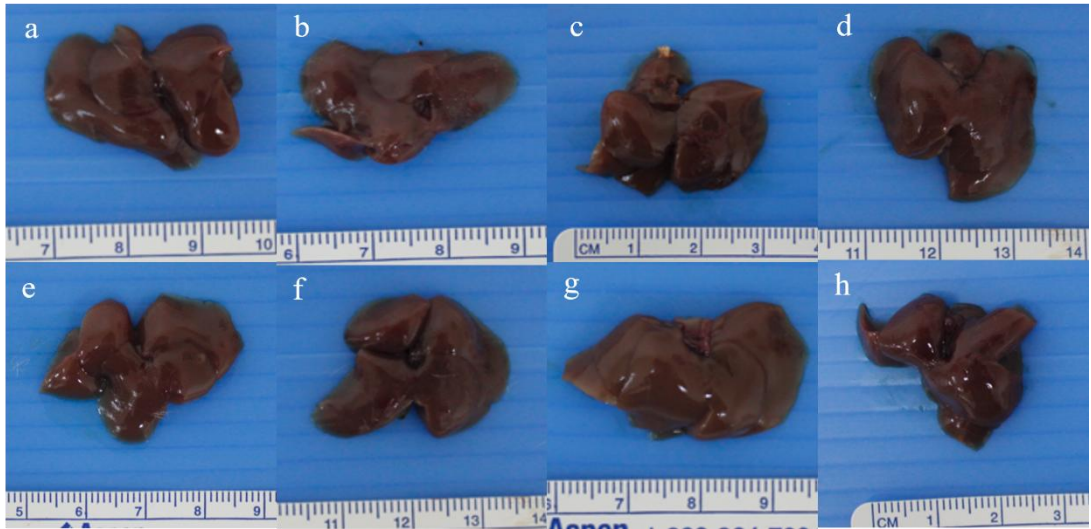
### **3.6. İstatistiksel Analizler**

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiki analizleri IBM SPSS Statistics v.26.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm veri setlerinin normal dağıldığının tespiti üzerine, grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkların bulunup bulunmadığı, tek yönlü varyans analiziyle (one way ANOVA) belirlendi. Anlamlı fark bulunan analizlerde, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını ortaya çıkarmak için post hoc Tukey HSD testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık eşiği  $p < 0.05$  olarak kabul edildi. Elde edilen sonuçlar, ortalama ve standart hata ( $\bar{X} \pm SE$ ) biçiminde bulgular bölümünde paylaşıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Makroskopik Bulgular

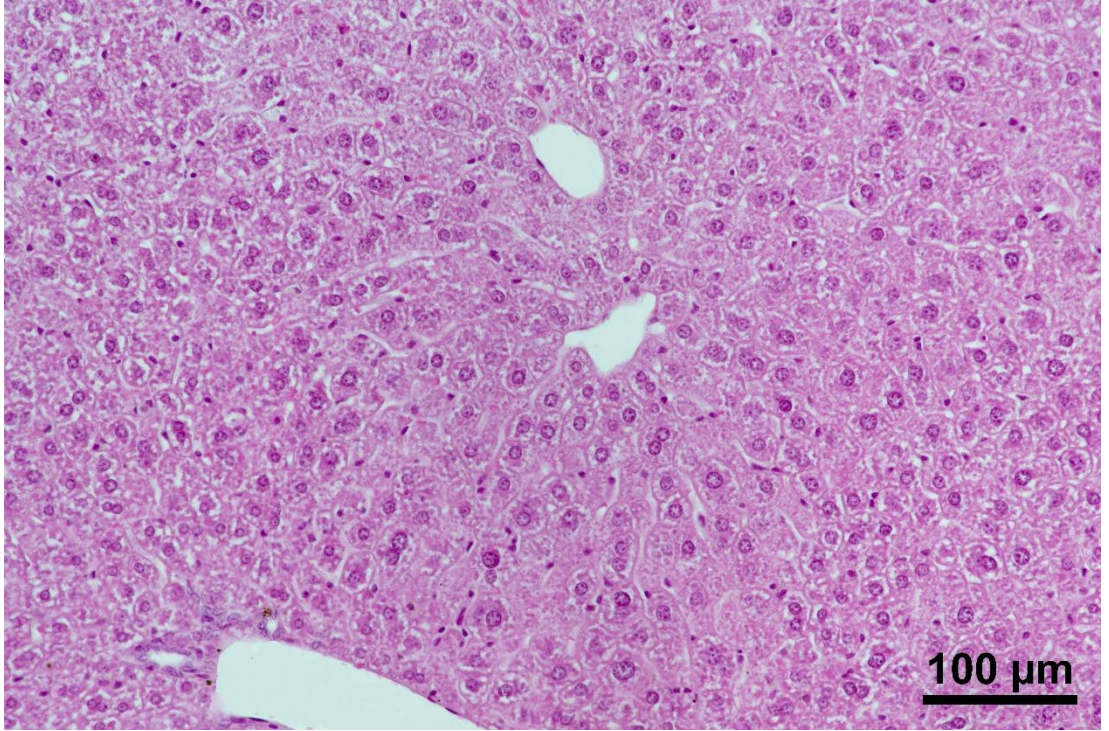
Çalışmanın 24. saatinde gerçekleştirilen ötenazi sonrası yapılan nekropside, deneklerin dış ve iç bakışında hayvanların genel görünüşleri normaldi. Tüm deneklerin karaciğerlerinin kontrol grubuna benzer şekilde normal görünüm ve boyutta olduğu, herhangi bir makroskopik bulgunun şekillenmediği dikkati çekti (Şekil 4.1).



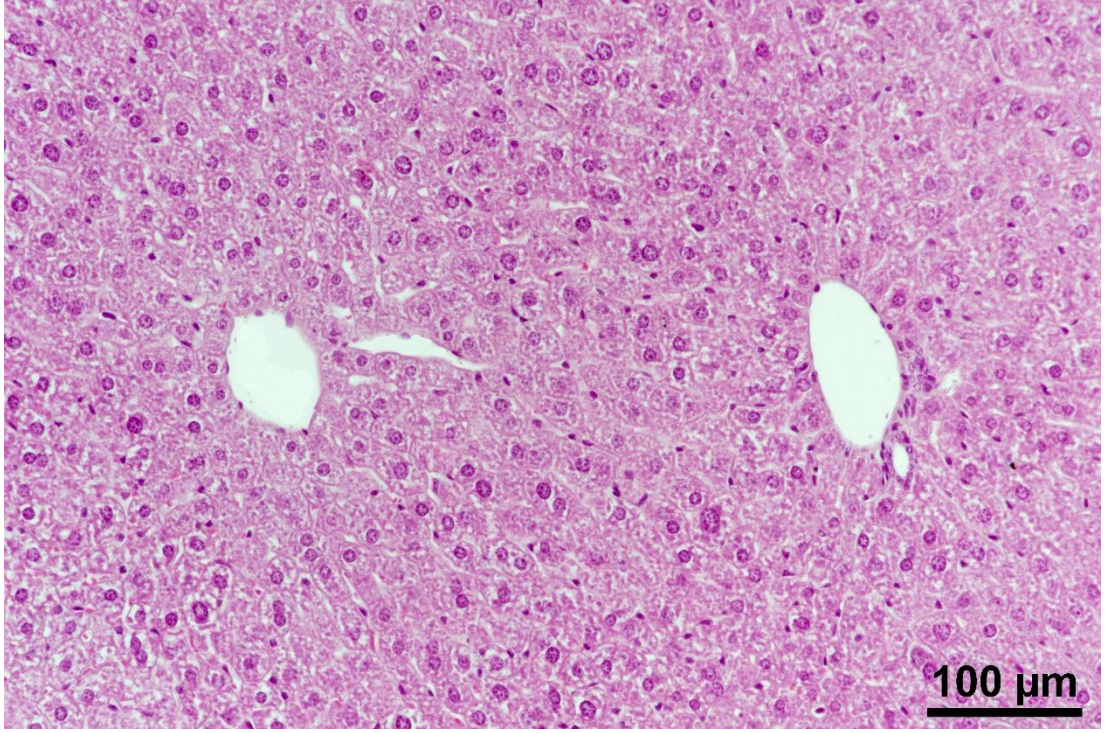
**Şekil 4.1.** Karaciğerlerin makroskopik görünüşleri. **a.** Kontrol, **b.** NGF, **c.** SB203580, **d.** NGF+SB203580, **e.** APAP, **f.** APAP+NGF, **g.** APAP+SB203580, **h.** APAP+NGF+SB203580 grupları.

## 4.2. Histopatolojik Bulgular

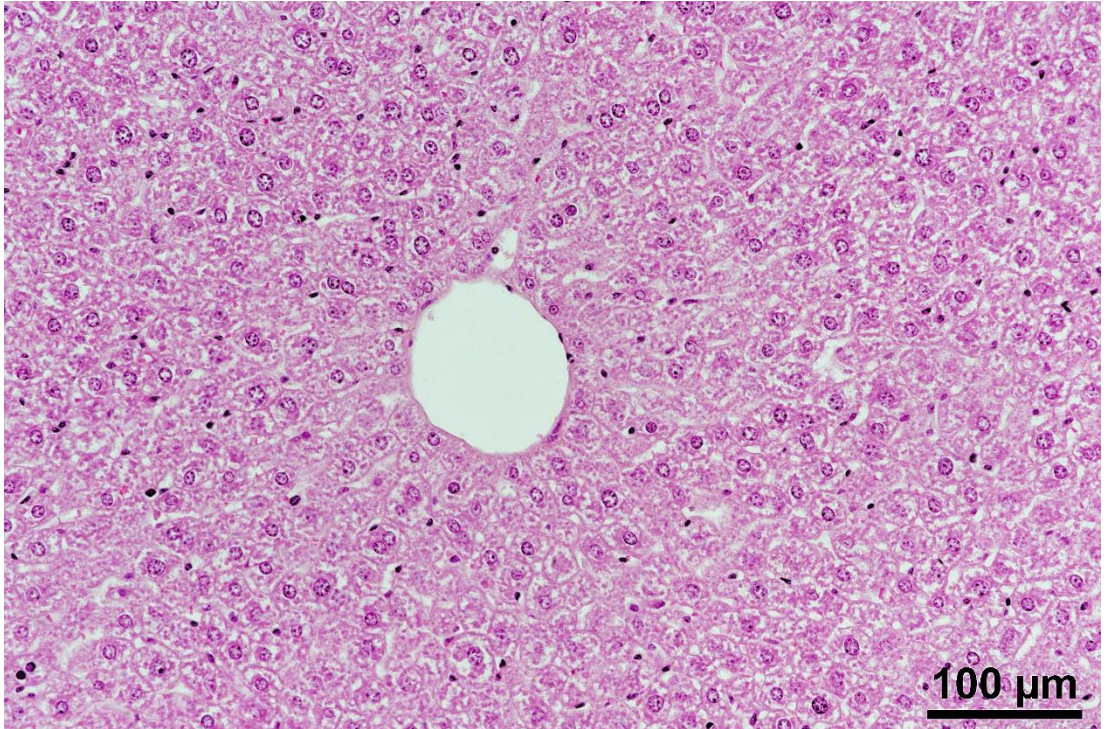
Çalışmayı oluşturan Kontrol, NGF, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında yapılan histopatolojik bakıda herhangi bir bulgu tespit edilmedi (Şekil 4.2-4.5).



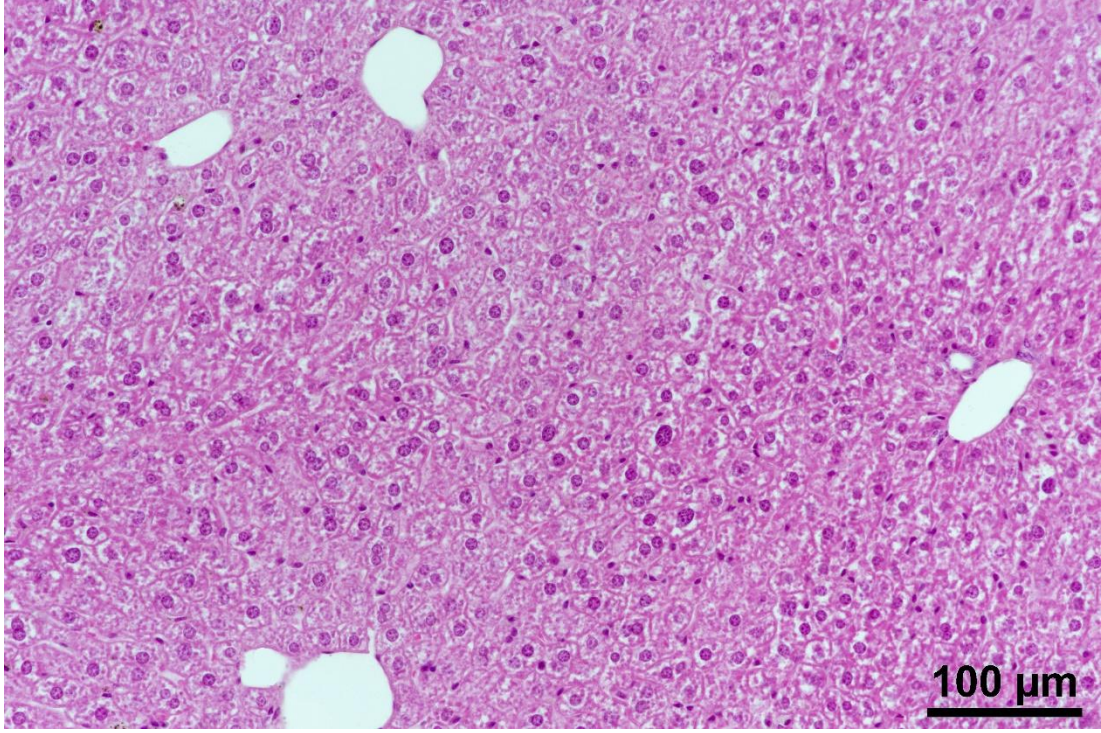
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait bir karaciğer. HE



Şekil 4.3. NGF grubuna ait bir karaciğer. HE

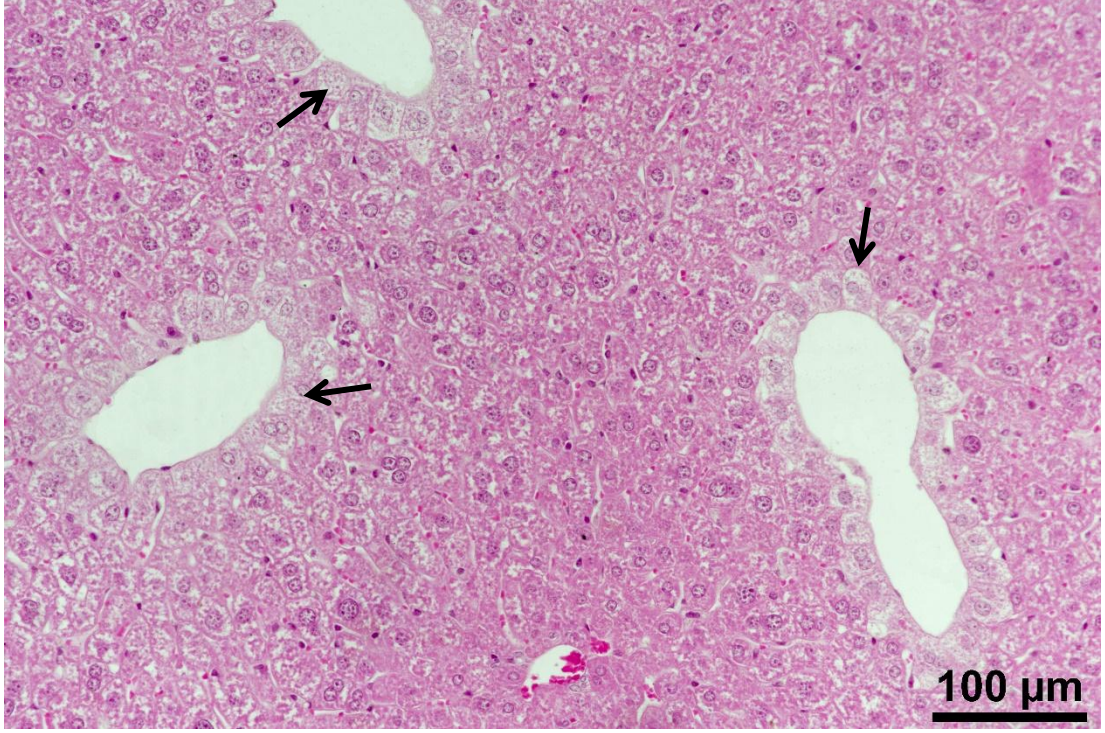


Şekil 4.4. SB203580 grubuna ait bir karaciğer. HE

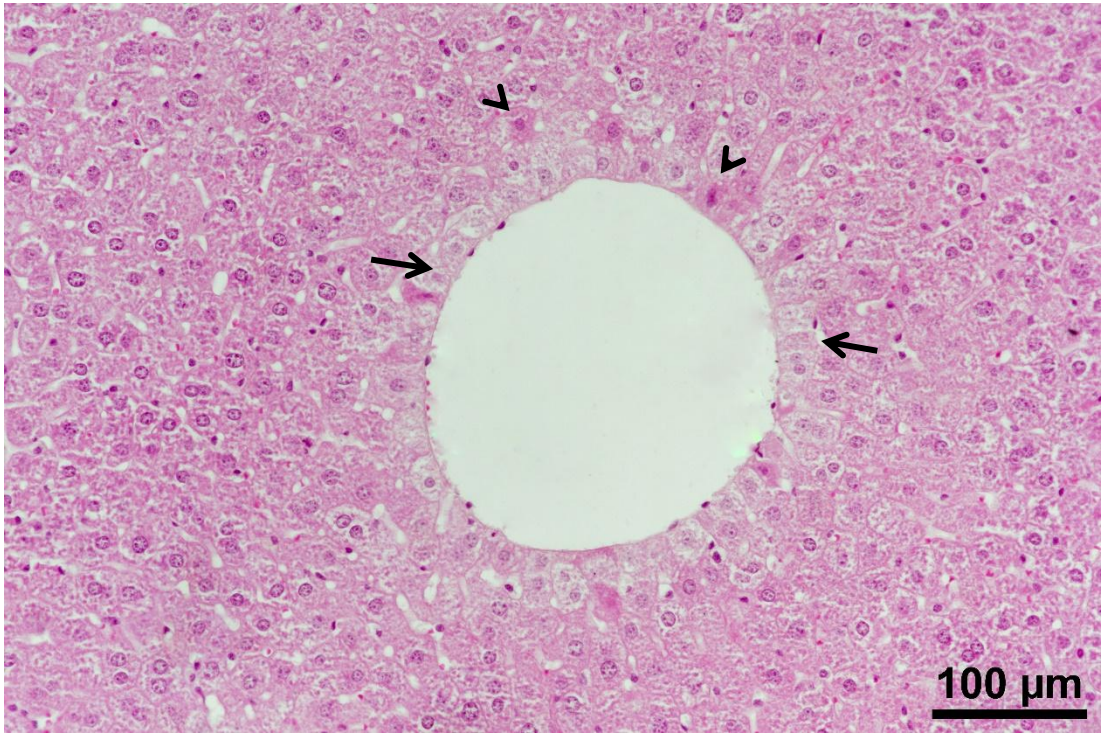


**Şekil 4.5.** NGF+SB203580 grubuna ait bir karaciğer. HE

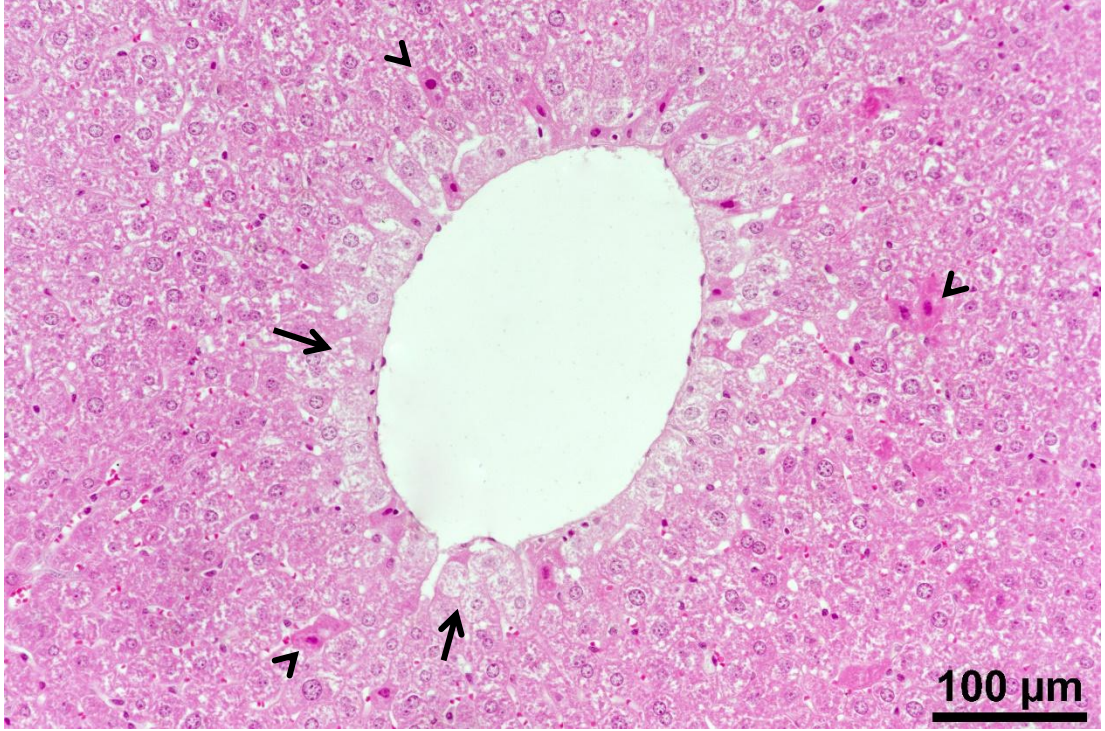
APAP uygulanan deneklerin karaciğerlerinde, gruplara göre değişmekle birlikte farklı derece ve şiddette dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Sentrilobüler bölgede gözlenen hidropik dejenerasyonun şiddetinin midzonal bölgede azaldığı, yer yer sentrilobüler bölgede görülen piknotik çekirdekli ve hipereozinofilik sitoplazmalı hepatositlerin seyrek olarak portal alana kadar yayıldığı görüldü. Lezyonların şiddetinin sırasıyla, APAP, APAP+NGF, APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarında artış gösterdiği görüldü. Tüm gruplardaki karaciğerlerde yangısal hücre infiltrasyonu ve nekroza rastlanmadı (Şekil 4.6-4.9).



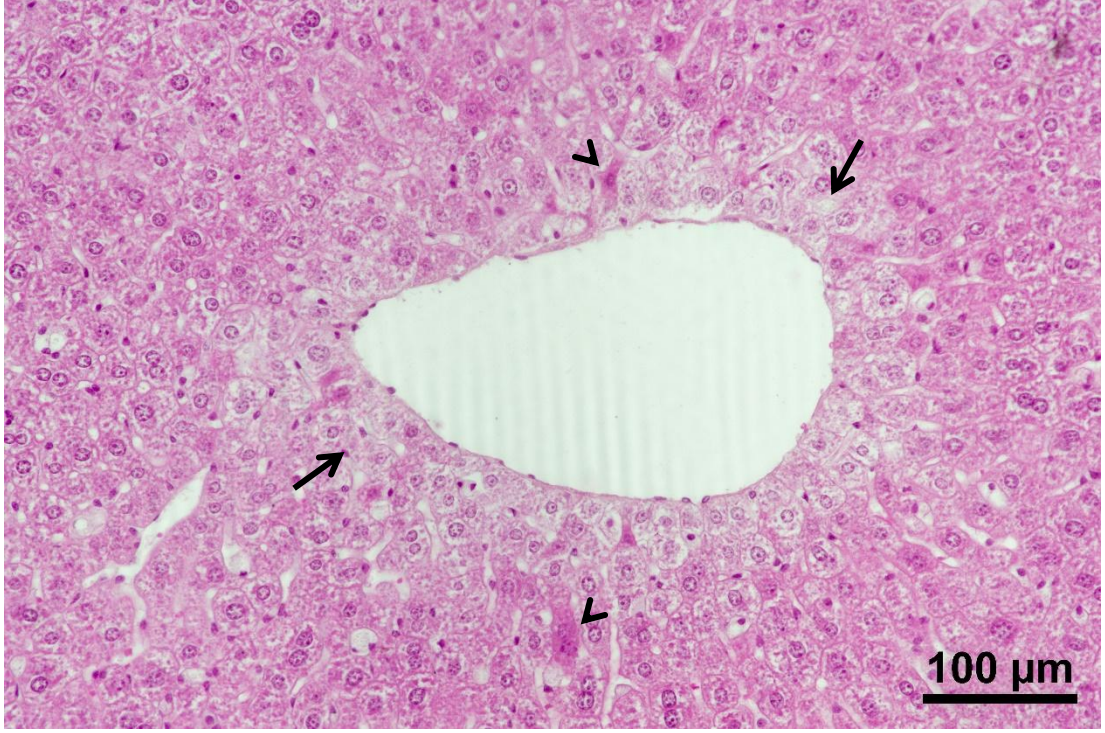
Şekil 4.6. APAP grubuna ait bir karaciğer. Hepatositlerde hidropik dejenerasyon (ok). HE



Şekil 4.7. APAP+NGF grubuna ait bir karaciğerde hidropik dejenerasyon (ok), piknotik çekirdekli ve hipereozinofilik sitoplazmalı hepatositler (ok başı). HE



**Şekil 4.8.** APAP+SB203580 grubuna ait bir karaciğer. Sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde hidropik dejenerasyon (ok), piknotik çekirdekli ve hipereozinofilik sitoplazmalı hepatositler (ok başı). HE



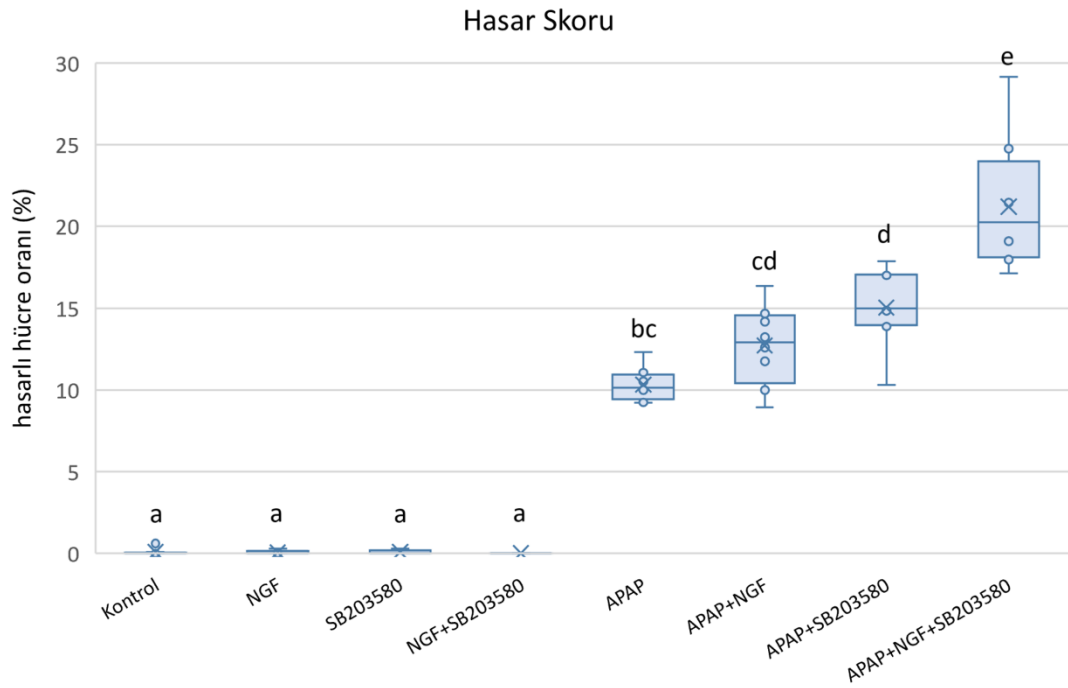
**Şekil 4.9.** APAP+NGF+SB203580 grubuna ait bir karaciğer. Sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde hidropik dejenerasyon (ok), piknotik çekirdekli ve hipereozinofilik sitoplazmalı hepatositler (ok başı). HE

Karaciğerde meydana gelen doku hasarını skorlandırmak için, Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanmış kesitlerin beş farklı alanından ışık mikroskopuyla elde edilen dijital fotoğraflardan, ImageJ yazılımı aracılığıyla hepatosit sayımı yapıldı. Fotoğraftaki alanın (200x büyütme) tamamında bulunan toplam hepatosit sayısı ve hasarlı hepatosit (hidropik dejenere hepatositler ile piknotik çekirdekli ve eozinofilik sitoplazmalı hepatositler) sayısı ve yüzdelik oranı belirlendi. Her denek için, beş farklı alan fotoğrafından elde edilen sonuçların ortalaması, o deneğin hasar skorunu oluşturdu. Gruplara göre elde edilen sonuçlar **Tablo 4.1** ile **Şekil 4.10**'da gösterildi. APAP uygulanan gruplara ait skorların, APAP uygulanmayan gruplardan yüksek seviyede ve anlamlı ölçüde farklı olduğu görüldü. En yüksek hasar skorunun APAP+NGF+SB203580 grubuna, en düşük skorun ise APAP grubuna ait olduğu ve aralarında anlamlı fark bulunduğu tespit edildi.

**Tablo 4.1.** Gruplara göre ortalama hasar skorları.

Grup	X ± SE
Kontrol	0.08 ± 0.07 <sup>a</sup>
NGF	0.06 ± 0.04 <sup>a</sup>
SB203580	0.08 ± 0.04 <sup>a</sup>
NGF+ SB203580	0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>
APAP	10.33 ± 0.36 <sup>bc</sup>
APAP+NGF	12.72 ± 0.87 <sup>cd</sup>
APAP+ SB203580	15.05 ± 0.85 <sup>d</sup>
APAP+NGF+ SB203580	21.22 ± 1.44 <sup>e</sup>

Harflendirme yöntemiyle oluşturulan üst simgeler, gruplar arası farkları ( $p < 0.05$ ) ve benzerlikleri ( $p \geq 0.05$ ) göstermektedir. X: ortalama, SE: standart hata.



**Şekil 4.10.** Gruplara göre hasar skorlarının dağılım grafiği.

### **4.3. Biyokimyasal Bulgular**

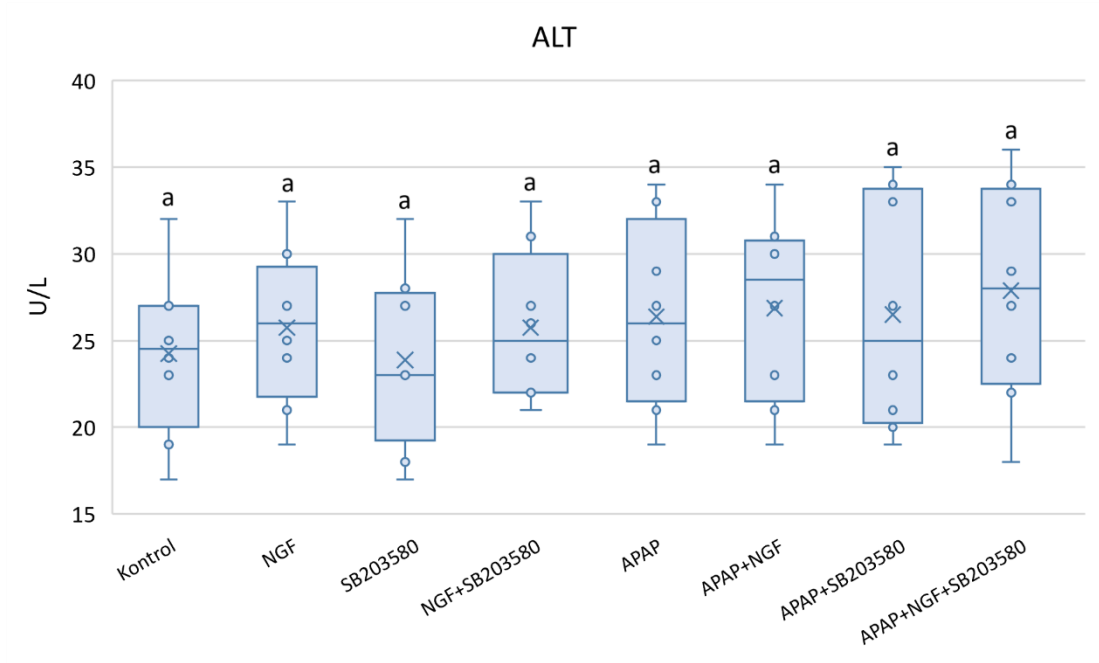
Çalışmamızda biyokimyasal yöntemler kullanılarak, kan serumlarından ALT, AST ve GGT ile karaciğer dokularından GSH, MDA, TOS ve TAS analizleri yapıldı. Analiz sonuçlarına ilişkin veriler **Tablo 4.2** ve **Şekil 4.11-17**'de gösterildi.

**Tablo 4.2.** Biyokimyasal analiz sonuçlarının gruplara göre dağılımı.

<b>Grup</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AST (U/L)</b>	<b>GGT (U/L)</b>	<b>GSH nmol/gr</b>	<b>MDA nmol/gr</b>	<b>TOS µmol/L</b>	<b>TAS µmol/L</b>
<b>Kontrol</b>	24.25 ± 1.68 <sup>a</sup>	74.63 ± 3.06 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.45 <sup>a</sup>	2934.19 ± 173.08 <sup>a</sup>	88.03 ± 6.14 <sup>ab</sup>	22.44 ± 0.15 <sup>a</sup>	4.01 ± 0.21 <sup>abcde</sup>
<b>NGF</b>	25.75 ± 1.60 <sup>a</sup>	75.38 ± 4.04 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.49 <sup>a</sup>	3432.41 ± 263.49 <sup>a</sup>	105.25 ± 12.35 <sup>a</sup>	22.47 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.33 ± 0.09 <sup>abcde</sup>
<b>SB203580</b>	23.88 ± 1.78 <sup>a</sup>	78.75 ± 4.63 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.58 <sup>a</sup>	3352.55 ± 247.53 <sup>a</sup>	98.97 ± 2.92 <sup>ab</sup>	22.43 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.55 ± 0.14 <sup>ac</sup>
<b>NGF + SB203580</b>	25.75 ± 1.56 <sup>a</sup>	76.75 ± 2.80 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.61 <sup>a</sup>	3280.83 ± 106.95 <sup>a</sup>	73.33 ± 2.96 <sup>b</sup>	22.11 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.17 <sup>c</sup>
<b>APAP</b>	26.38 ± 1.92 <sup>a</sup>	78.75 ± 4.73 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.48 <sup>a</sup>	3478.32 ± 197.21 <sup>a</sup>	100.07 ± 11.08 <sup>ab</sup>	22.57 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.95 ± 0.25 <sup>abcde</sup>
<b>APAP + NGF</b>	26.88 ± 1.88 <sup>a</sup>	75.50 ± 3.57 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.44 <sup>a</sup>	3744.32 ± 142.02 <sup>a</sup>	82.18 ± 2.08 <sup>ab</sup>	22.09 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.97 ± 0.18 <sup>abcde</sup>
<b>APAP + SB203580</b>	26.50 ± 2.36 <sup>a</sup>	74.75 ± 3.80 <sup>a</sup>	2.09 ± 0.42 <sup>a</sup>	3301.24 ± 145.93 <sup>a</sup>	86.81 ± 1.60 <sup>ab</sup>	22.22 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.28 <sup>d</sup>
<b>APAP + NGF +SB203580</b>	27.88 ± 2.23 <sup>a</sup>	79.75 ± 4.02 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.59 <sup>a</sup>	3041.80 ± 92.31 <sup>a</sup>	98.96 ± 5.55 <sup>ab</sup>	22.41 ± 0.13 <sup>a</sup>	4.68 ± 0.17 <sup>b</sup>

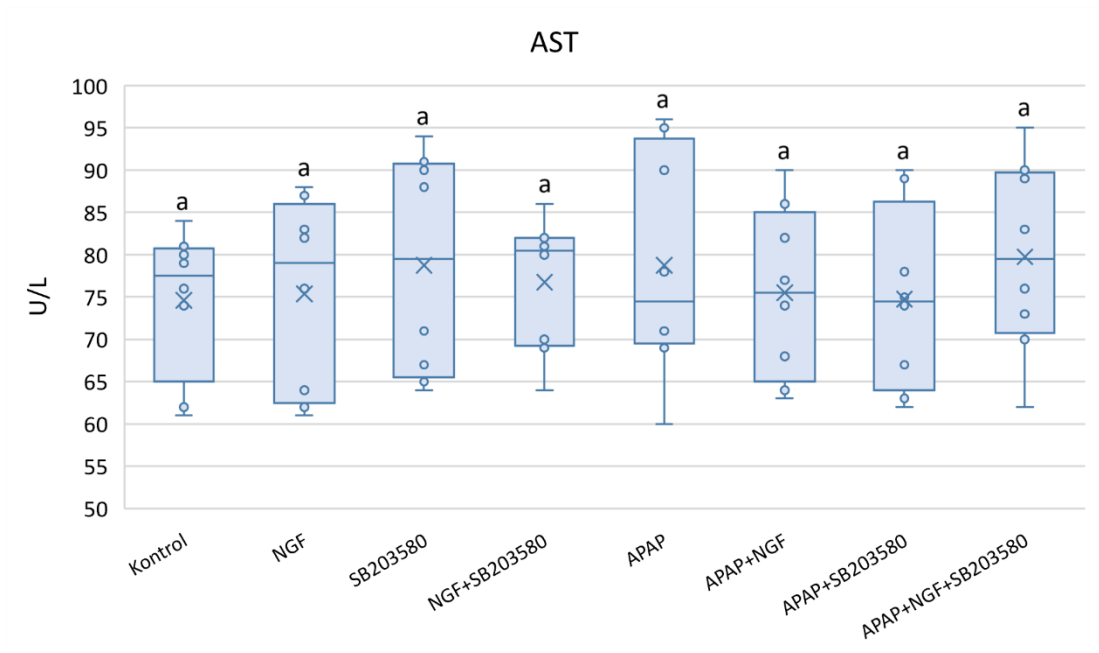
Veriler ortalama (X) ± standart hata (SE) olarak verilmiştir. Harflendirme yöntemiyle oluşturulan üst simgeler, gruplar arası farkları (p<0.05) ve benzerlikleri (p≥0.05) göstermektedir.

Kan serumlarından yapılan ALT analizi sonuçlarına göre gruplar arasında fark tespit edilmedi (Şekil 4.11).



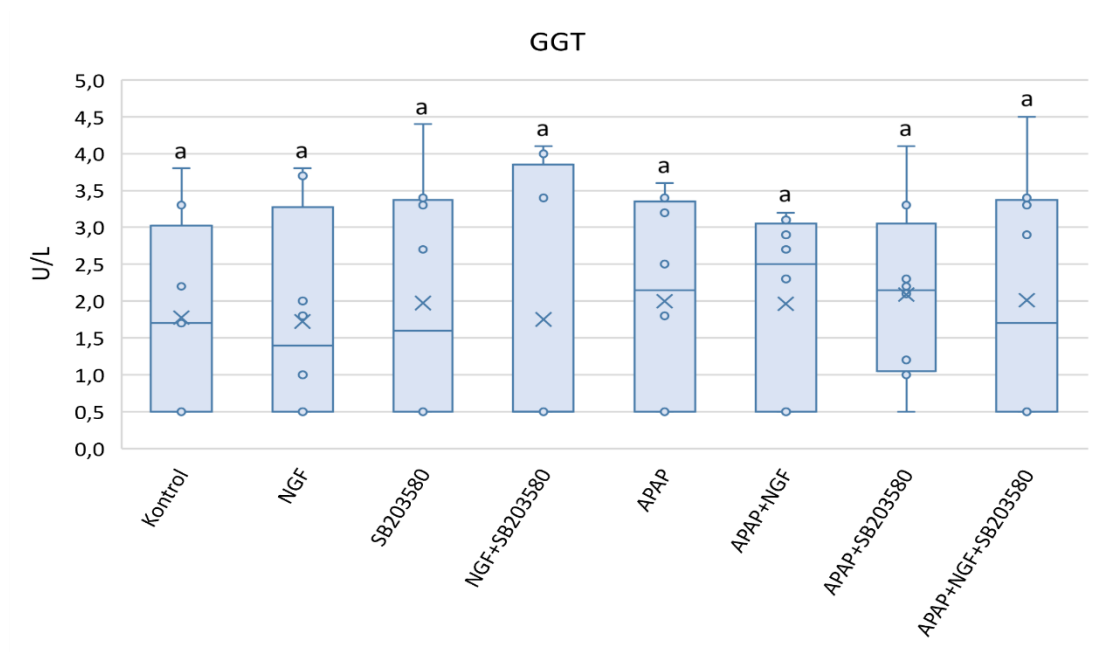
Şekil 4.11. Gruplara göre ALT analiz sonuçları.

Kan serumlarından yapılan AST analizi sonuçlarına göre gruplar arasında fark tespit edilmedi (Şekil 4.12).



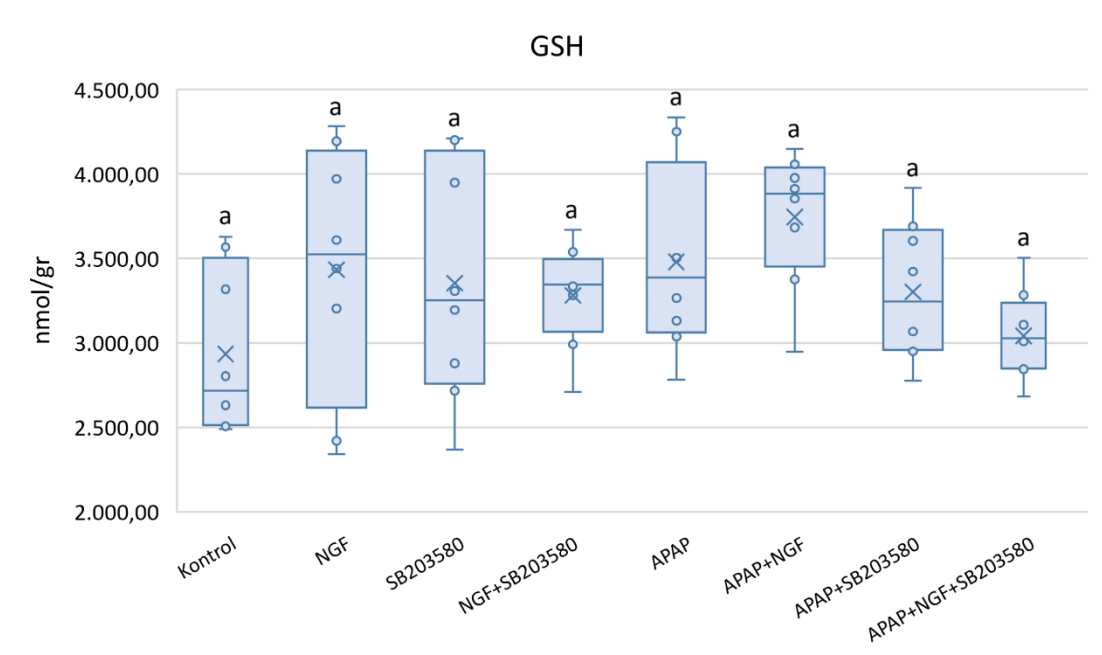
Şekil 4.12. Gruplara göre AST analiz sonuçları.

Kan serumlarından yapılan GGT analizi sonuçlarına göre gruplar arasında fark tespit edilmedi (Şekil 4.13).



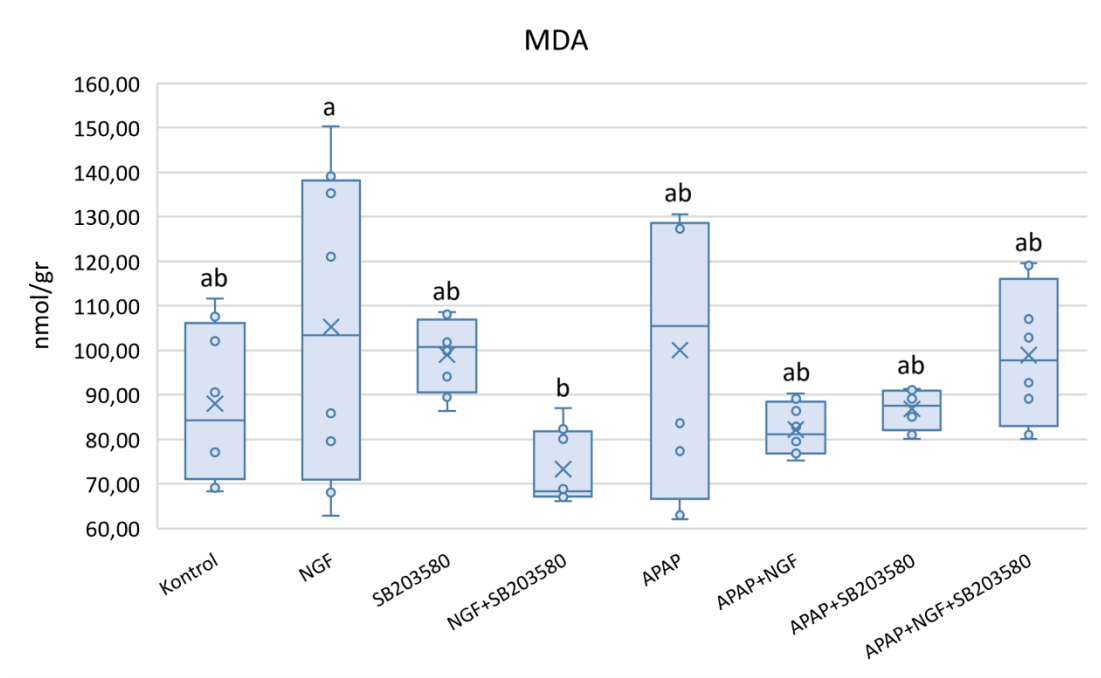
Şekil 4.13. Gruplara göre GGT analiz sonuçları.

Karaciğer doku örneklerinden yapılan GSH analizi sonuçlarına göre gruplar arasında fark tespit edilmedi (Şekil 4.14).



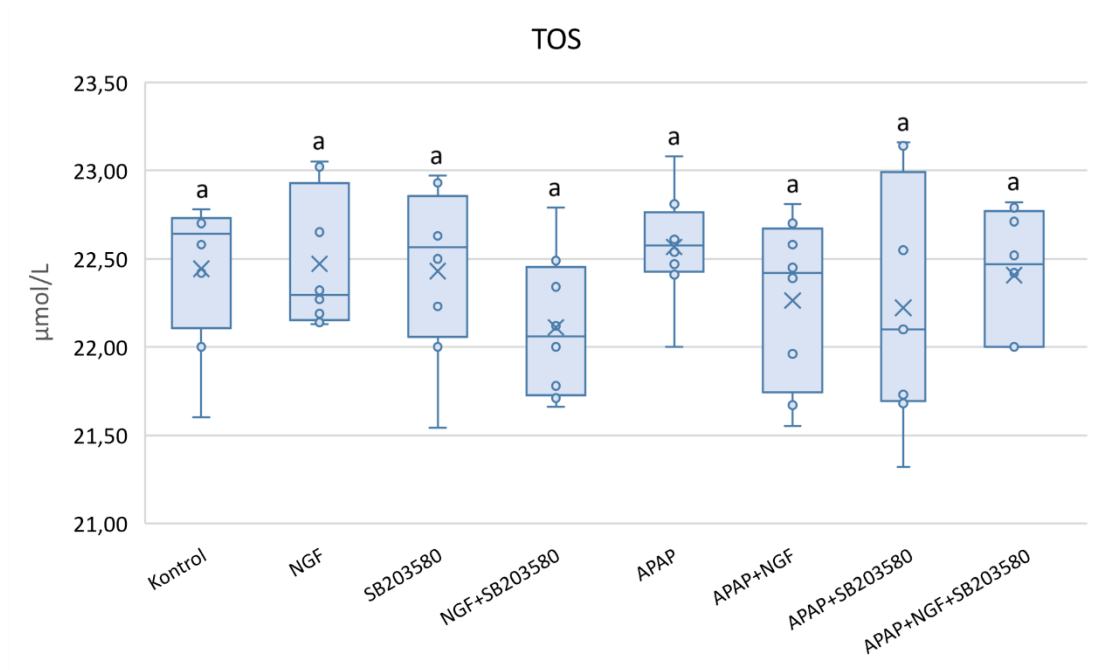
Şekil 4.14. Gruplara göre GSH analiz sonuçları.

Karaciğer doku örneklerinden yapılan MDA analizi sonuçları **Şekil 4.15'**de gösterildi. NGF grubu MDA seviyesinin NGF+SB203580 grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü.



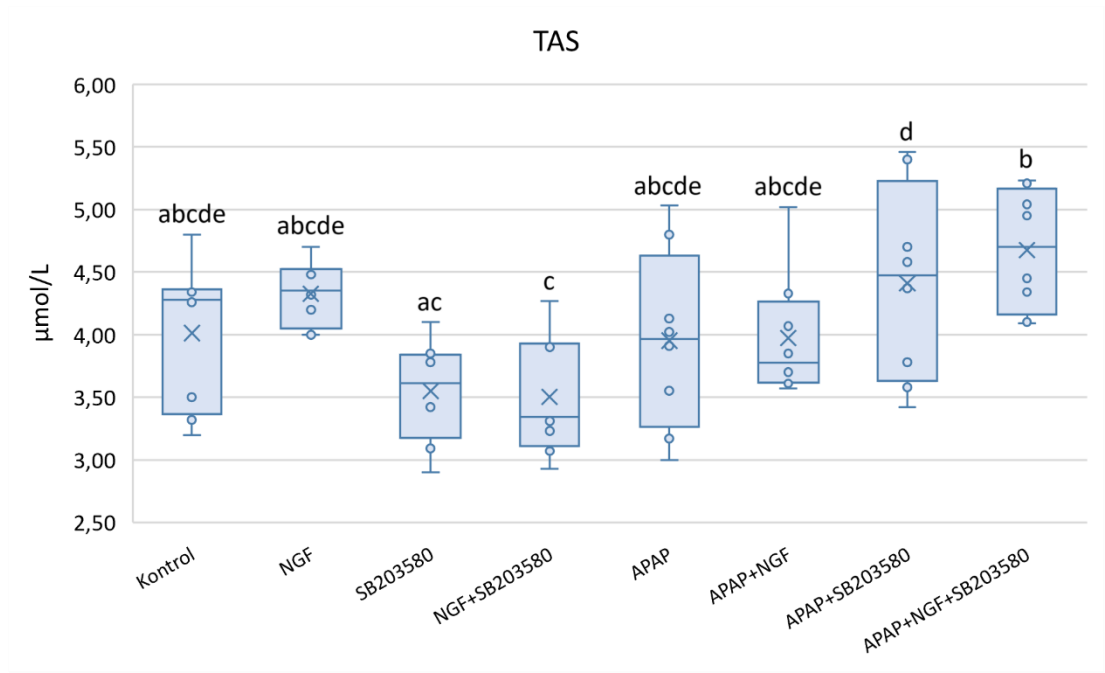
**Şekil 4.15.** Gruplara göre MDA analiz sonuçları.

Karaciğer doku örneklerinden yapılan TOS analizi sonuçları **Şekil 4.16'**da gösterildi. Gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.



**Şekil 4.16.** Gruplara göre TOS analiz sonuçları.

Karaciğer doku örneklerinden yapılan TAS analizi sonuçları **Şekil 4.17**'de gösterildi. En yüksek TAS seviyesinin APAP+NGF+SB203580 grubunda bulunduğu ve onu takip eden APAP+SB203580 grubundan farklı seviyede olduğu, bu gruplarda tespit edilen seviyelerin aynı grupların APAP uygulanmamış karşılıkları olan NGF+SB203580 ve SB203580 gruplarından yüksek düzeyde ve anlamlı derecede farklı oldukları görüldü.



**Şekil 4.17.** Gruplara göre TAS analiz sonuçları.

#### 4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

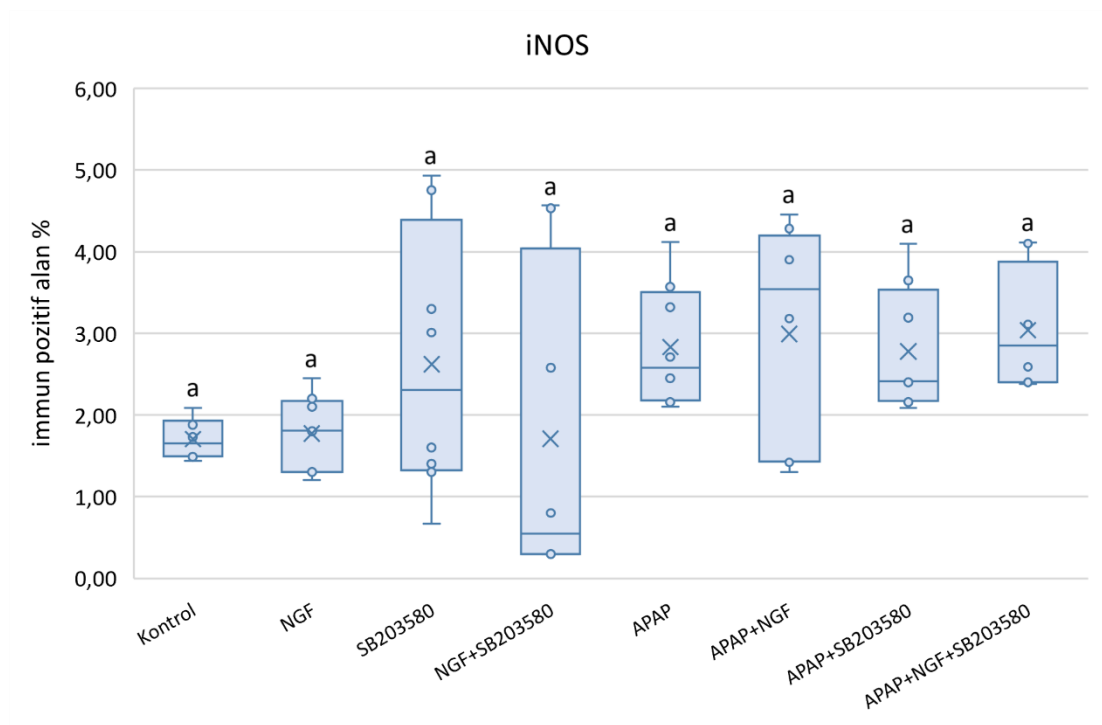
Bu tez çalışmasında streptavidin-biotin yöntemiyle karaciğer dokusundaki iNOS, Nitrotirozin, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve NGF ekspresyonları immunohistokimyasal olarak incelendi. Elde edilen sonuçlar ImageJ yazılımıyla analiz edilerek, pozitif reaksiyonların toplam alana oranı yüzdelik değerler halinde skorlandırıldı. Skorlandırma sonuçlarına göre belirlenen grup ortalamaları **Tablo 4.3**'de gösterildi.

**Tablo 4.3.** Gruplara göre immunohistokimyasal skorlandırma sonuçları.

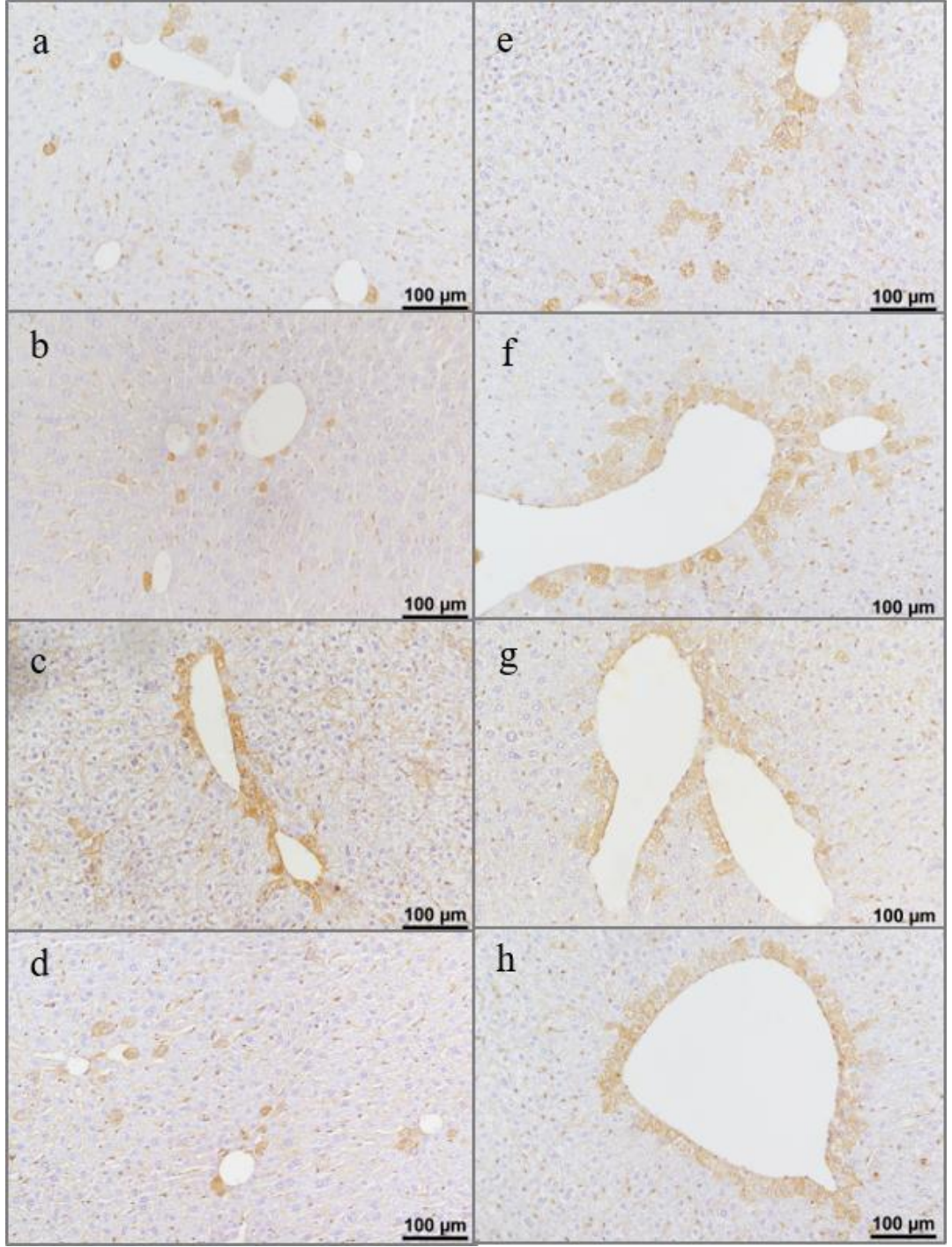
Grup	iNOS	Nitrotirozin	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	Kaspaz 3	Kaspaz 8	NGF
<b>Kontrol</b>	1.71 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.66 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.85 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
<b>NGF</b>	1.77 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.66 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.91 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	1.13 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.51 $\pm$ 0.21 <sup>ac</sup>	0.91 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
<b>SB203580</b>	2.62 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.70 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	0.78 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.19 $\pm$ 0.11 <sup>ad</sup>	1.98 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
<b>NGF + SB203580</b>	1.71 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.06 <sup>ac</sup>	0.54 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.53 $\pm$ 0.26 <sup>ab</sup>	0.75 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.16 <sup>ad</sup>	2.48 $\pm$ 0.22 <sup>ac</sup>	0.88 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
<b>APAP</b>	2.83 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	3.03 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 0.18 <sup>bc</sup>	1.08 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	4.06 $\pm$ 0.54 <sup>bc</sup>	1.01 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	2.87 $\pm$ 0.26 <sup>bde</sup>	4.24 $\pm$ 0.31 <sup>bcd</sup>	2.87 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>
<b>APAP + NGF</b>	2.99 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	2.25 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	4.88 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup>	1.17 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	4.32 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>	3.87 $\pm$ 0.63 <sup>cd</sup>	2.49 $\pm$ 0.43 <sup>bc</sup>
<b>APAP + SB203580</b>	2.78 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	1.86 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	1.52 $\pm$ 0.23 <sup>ce</sup>	1.88 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	7.90 $\pm$ 0.44 <sup>d</sup>	0.77 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	4.70 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	4.89 $\pm$ 0.40 <sup>d</sup>
<b>APAP + NGF + SB203580</b>	3.04 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	2.67 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>	1.83 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	8.57 $\pm$ 0.43 <sup>d</sup>	0.96 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	3.31 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>	6.80 $\pm$ 0.41 <sup>e</sup>	3.95 $\pm$ 0.59 <sup>bde</sup>

Veriler ortalama (X)  $\pm$  standart hata (SE) olarak verilmiştir. Harflendirme yöntemiyle oluşturulan üst simgeler, gruplar arası farkları ( $p < 0.05$ ) ve benzerlikleri ( $p \geq 0.05$ ) göstermektedir.

Karaciğer dokularındaki iNOS ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.18**'de gösterildi. Kontrol, NGF ve NGF+SB203580 gruplarında bireysel olarak lobül geneline dağılmış haldeki hepatositlerde intrasitoplazmik immün pozitif reaksiyonlar gözlemlendi (**Şekil 4.19 a, b, d**). APAP, APAP+NGF, APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 grupları ile APAP uygulanmayan SB203580 grubunda ise sentrilobüler bölgeyi çevreleyen hepatositlerde daha yoğun bir boyanmayla birlikte, Kupffer hücrelerinin sitoplazmalarında pozitif reaksiyon tespit edildi (**Şekil 4.19 c, e-h**). Ancak gözlenen yoğunluk artışı, gruplar arasında anlamlılık derecesinde farka neden olmadı.

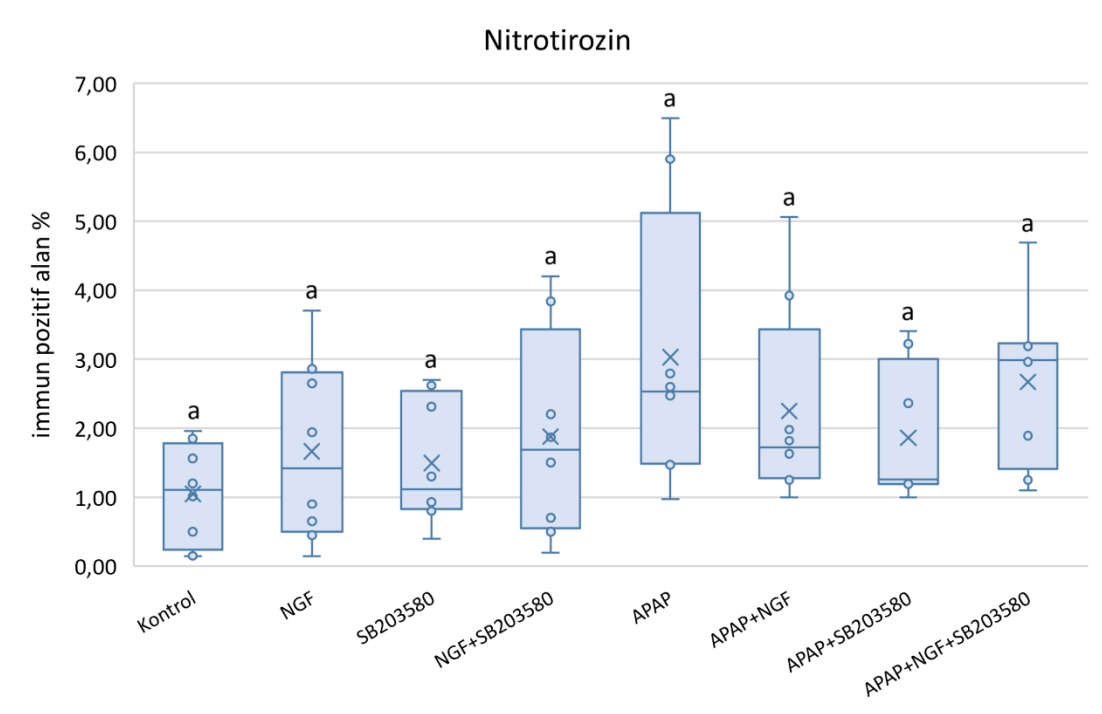


**Şekil 4.18.** Anti-iNOS antikor immunohistokimyasal boyama sonuçları.

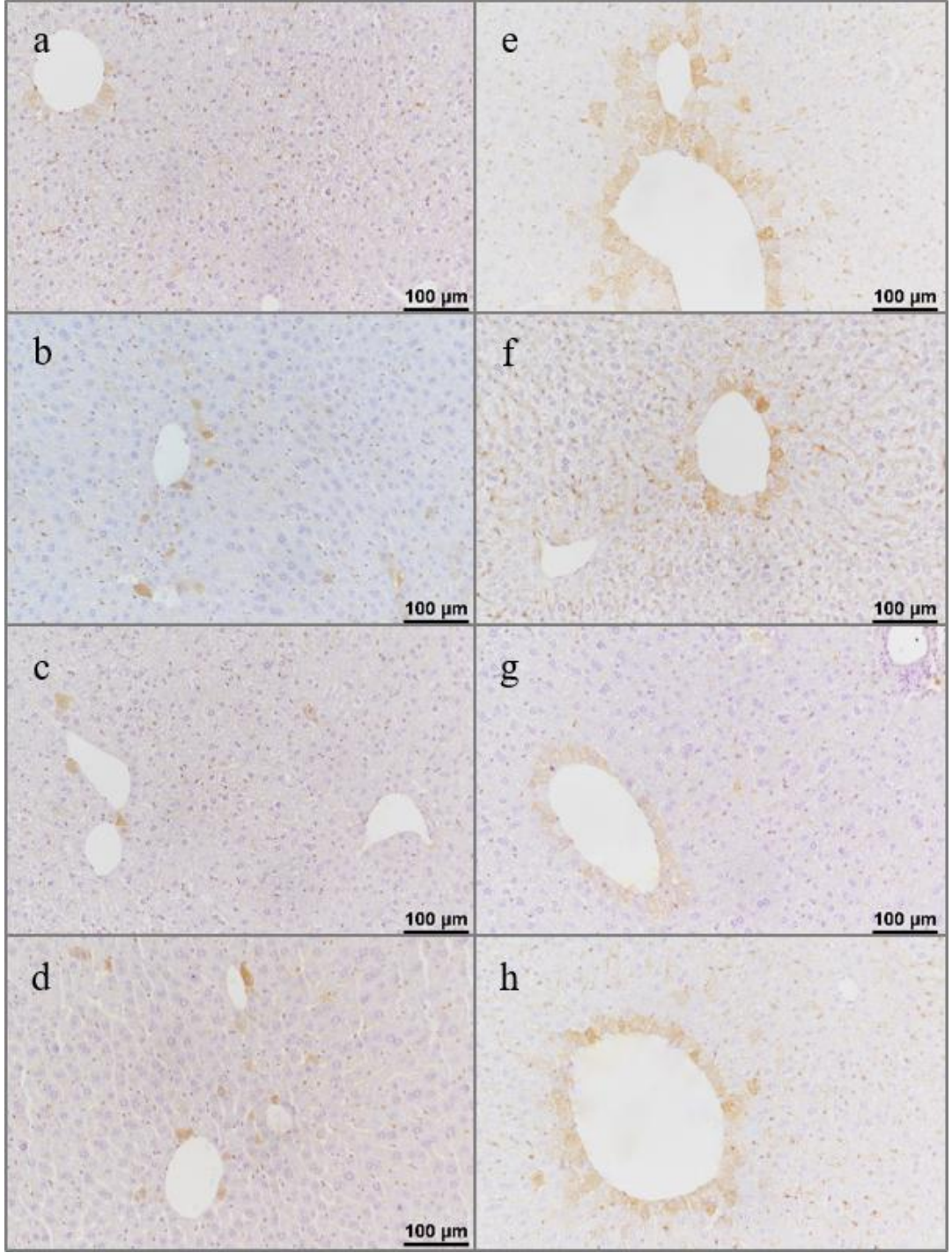


**Şekil 4.19.** Anti-iNOS immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki nitrotirozin ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.20**'de gösterildi. Kontrol, NGF, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında lobüllerin farklı lokalizasyonlarına dağılık ve lobül başına 1-5 hepatositte intrasitoplazmik boyanma gözlemlendi (**Şekil 4.21 a-d**). APAP, APAP+NGF, APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarında ise sentrilobüler bölge hepatositlerinde intrasitoplazmik reaksiyon tespit edildi (**Şekil 4.21 e-h**). Boyanma yoğunluğu küçükten büyüğe sırasıyla APAP+SB203580, APAP+NGF, APAP+NGF+SB203580 ve APAP gruplarında artış gösterdi. Ancak gözlenen artış gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadı.

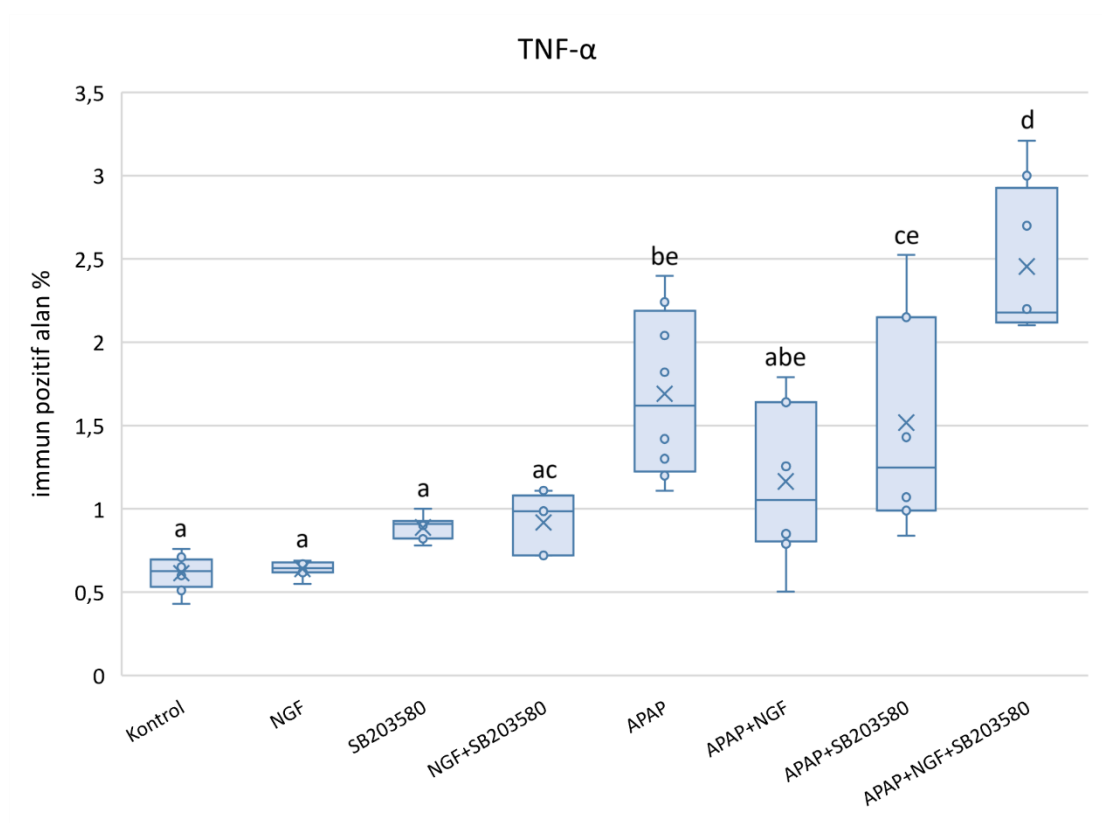


**Şekil 4.20.** Anti-Nitrotirozin antikoru immunohistokimyasal boyama sonuçları.

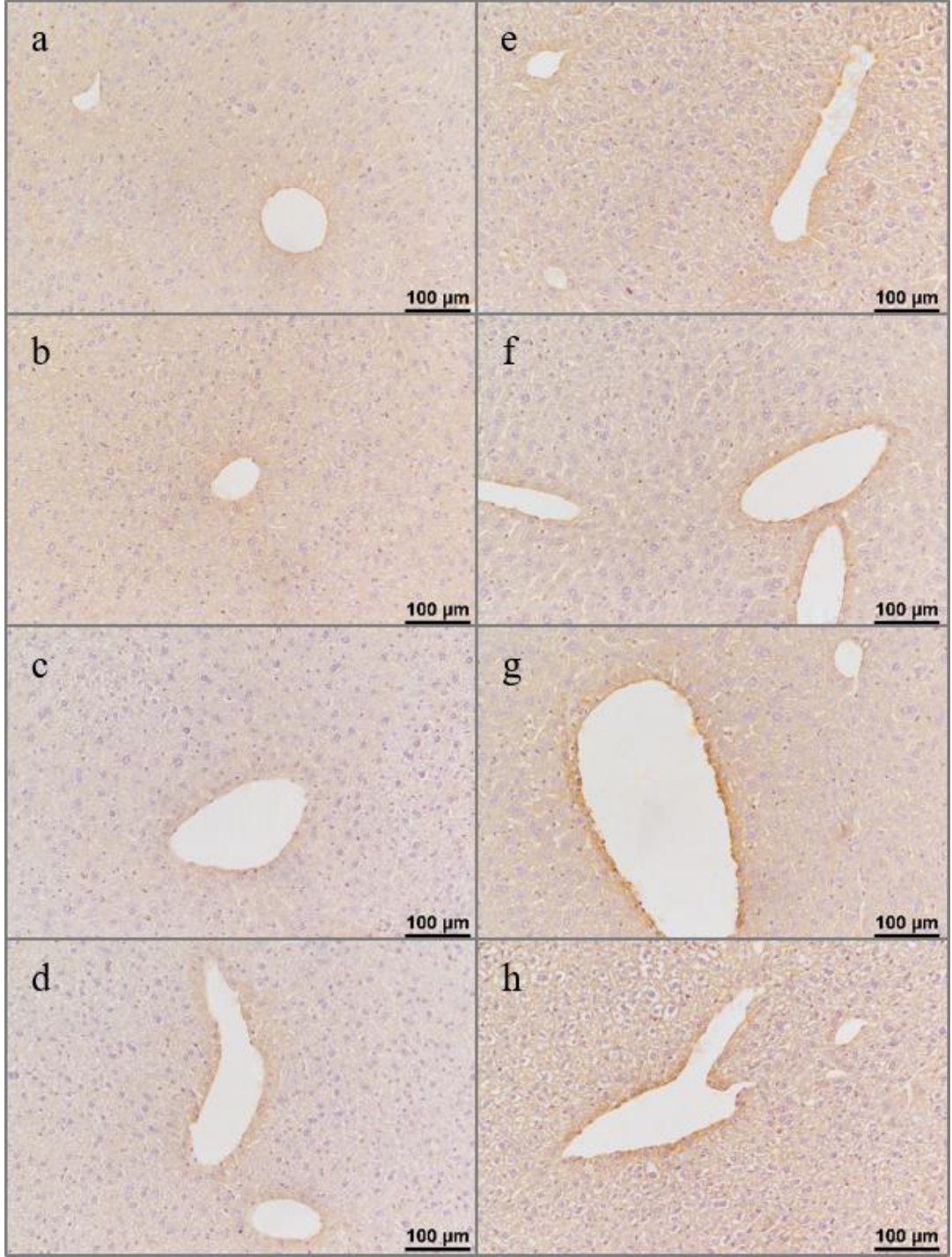


**Şekil 4.21.** Anti-Nitrotirozin immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki TNF- $\alpha$  ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.22**'de gösterildi. Kontrol, NGF, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında sentrilobüler alanlarda bulunan hepatositlerin sitoplazmalarında zayıf immün reaksiyon gözlemlendi (**Şekil 4.23 a-d**). APAP, APAP+NGF, APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarında ise sentrilobüler bölge hepatositlerinde, APAP uygulanmayan gruplara göre daha yoğun intrasitoplazmik reaksiyon tespit edildi (**Şekil 4.23 e-h**). Reaksiyonun en fazla görüldüğü APAP+NGF+SB203580 grubu, diğer grupların tamamından anlamlı derecede farklıydı.

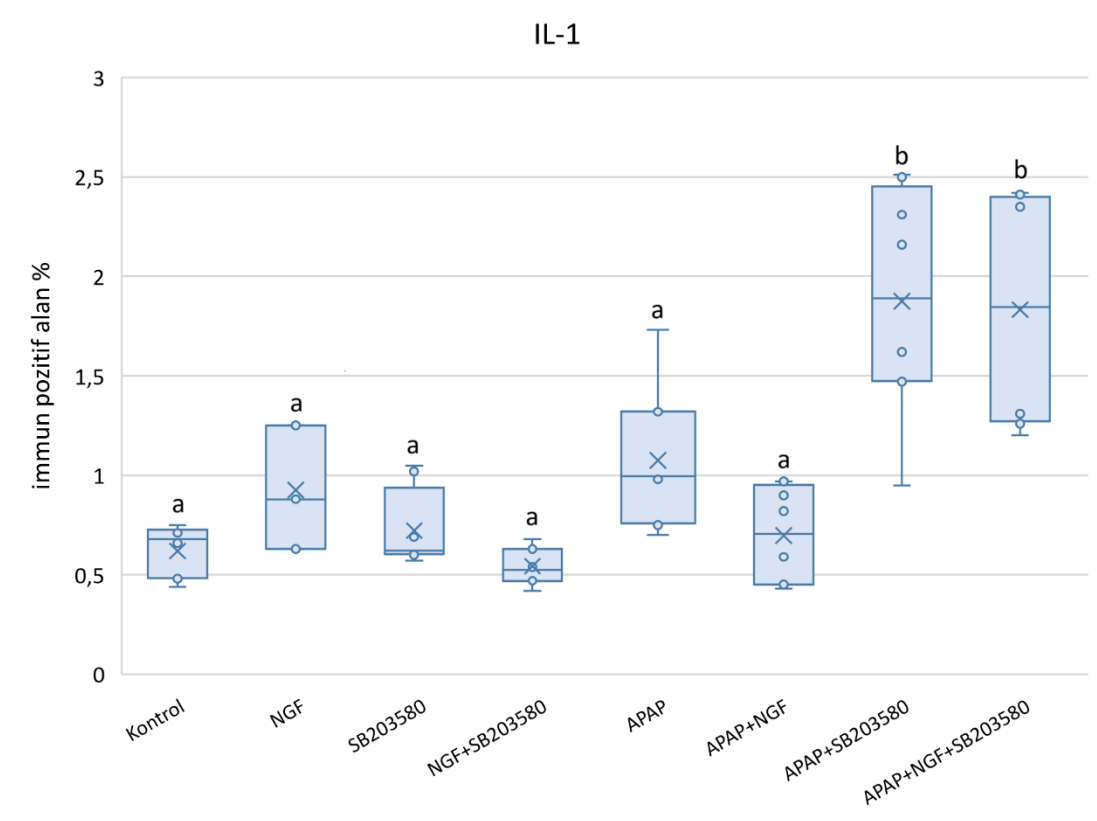


**Şekil 4.22.** Anti-TNF- $\alpha$  antikoruna immunohistokimyasal boyama sonuçları.

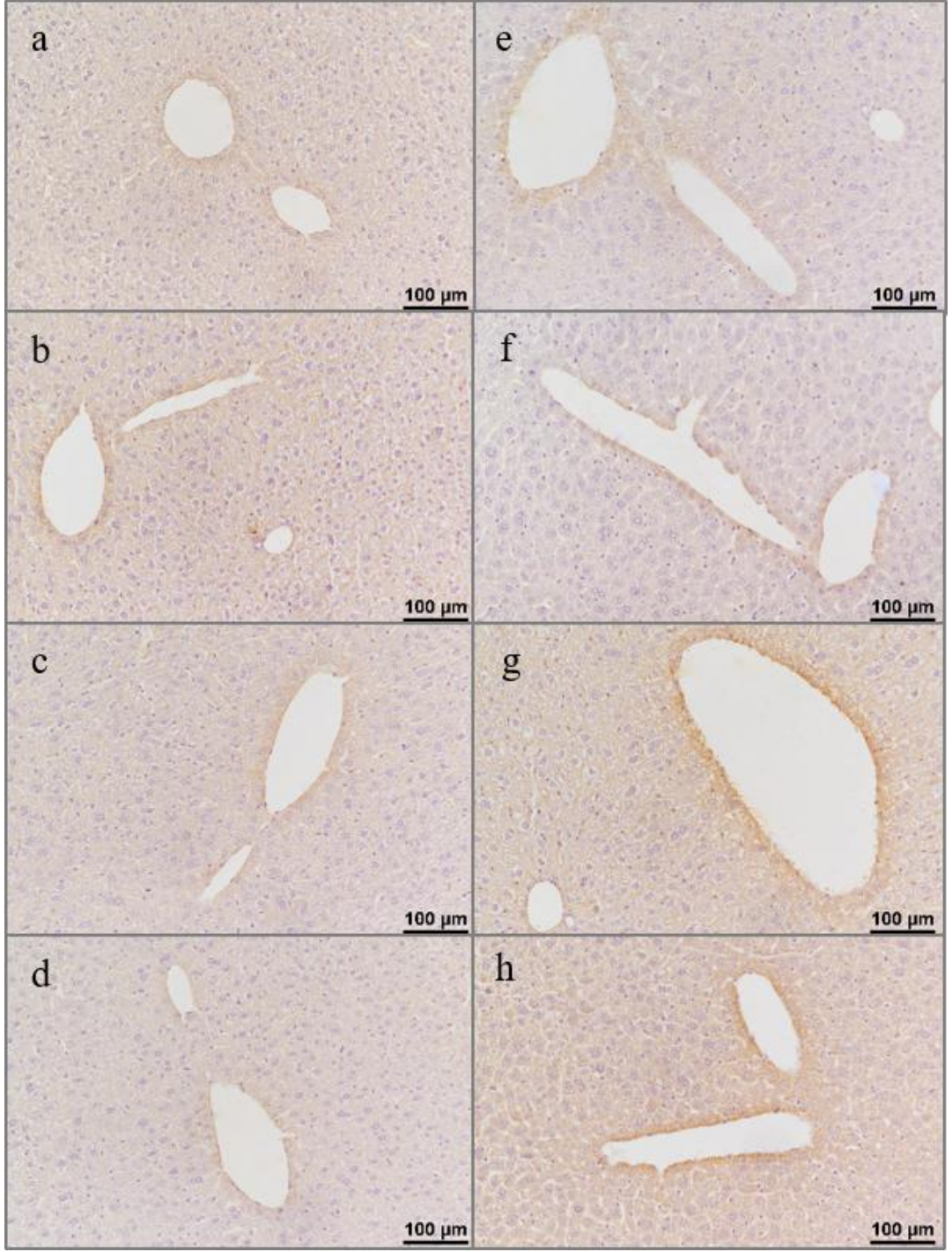


**Şekil 4.23.** Anti- TNF- $\alpha$  immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki IL-1 $\beta$  ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.24**'de gösterildi. APAP uygulanmayan Kontrol, NGF, SB203580 ve NGF+SB203580 grupları ile APAP uygulanan APAP ve APAP+NGF gruplarında benzer seviyelerde, sentrilobüler alanlarda bulunan hepatositlerde yer yer zayıf immun reaksiyon gözlemlendi (**Şekil 4.25 a-f**). APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarında sentrilobüler bölgede gözlenen boyanma ise diğer gruplardan anlamlı derecede daha yoğundu (**Şekil 4.25 g-h**).

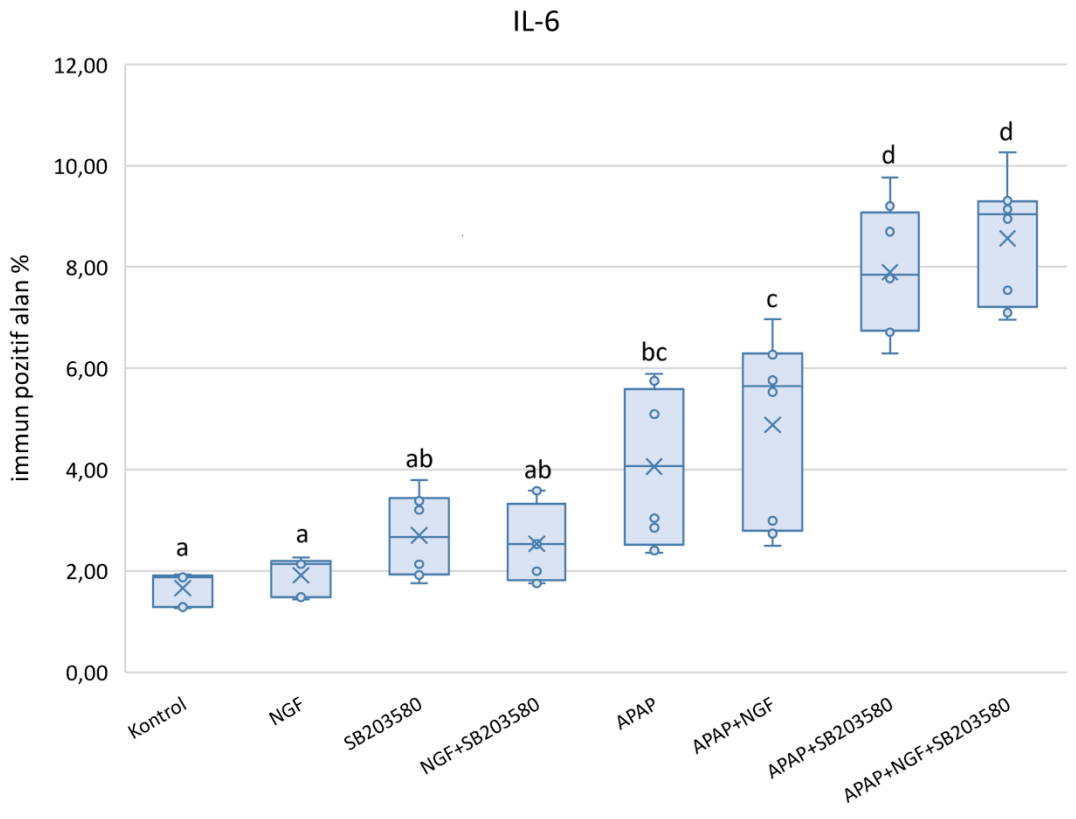


**Şekil 4.24.** Anti-IL-1 $\beta$  antikoruna immunohistokimyasal boyama sonuçları.

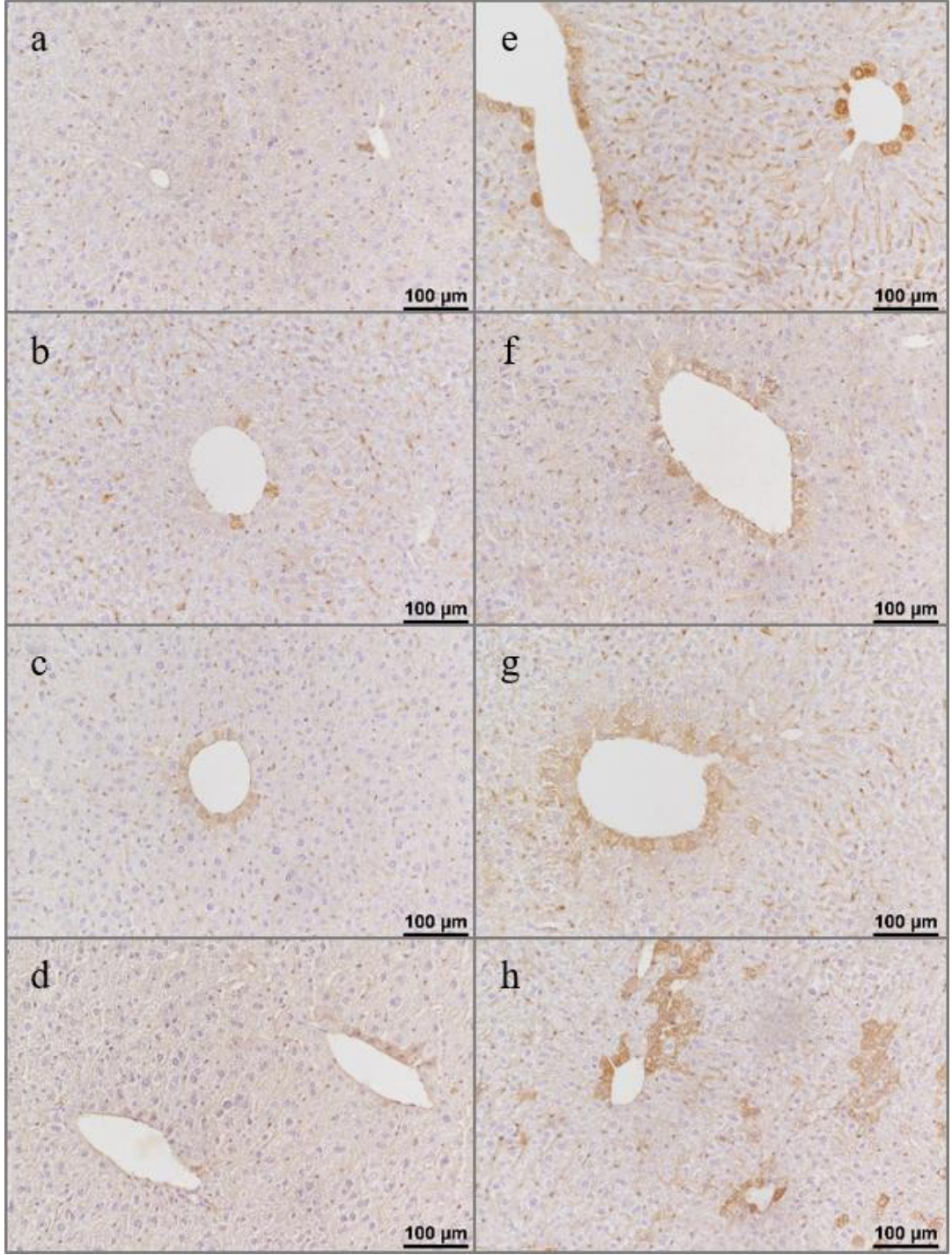


**Şekil 4.25.** Anti- IL-1 $\beta$  immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki IL-6 ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.26**'da gösterildi. Kontrol ve NGF gruplarında 1-2 hepatositin intrasitoplazmik boyanmasıyla tespit edilen IL-6 pozitifliği, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında sentrilobüler bölgede artış gösterdi (**Şekil 4.27 a-d**). APAP uygulanan APAP ve APAP+NGF gruplarında artmaya devam eden reaksiyon, p38 MAPK yolağının inhibe edildiği APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarındaki boyanma ise diğer grupların tamamından anlamlı derecede yüksekti (**Şekil 4.27 e-h**).

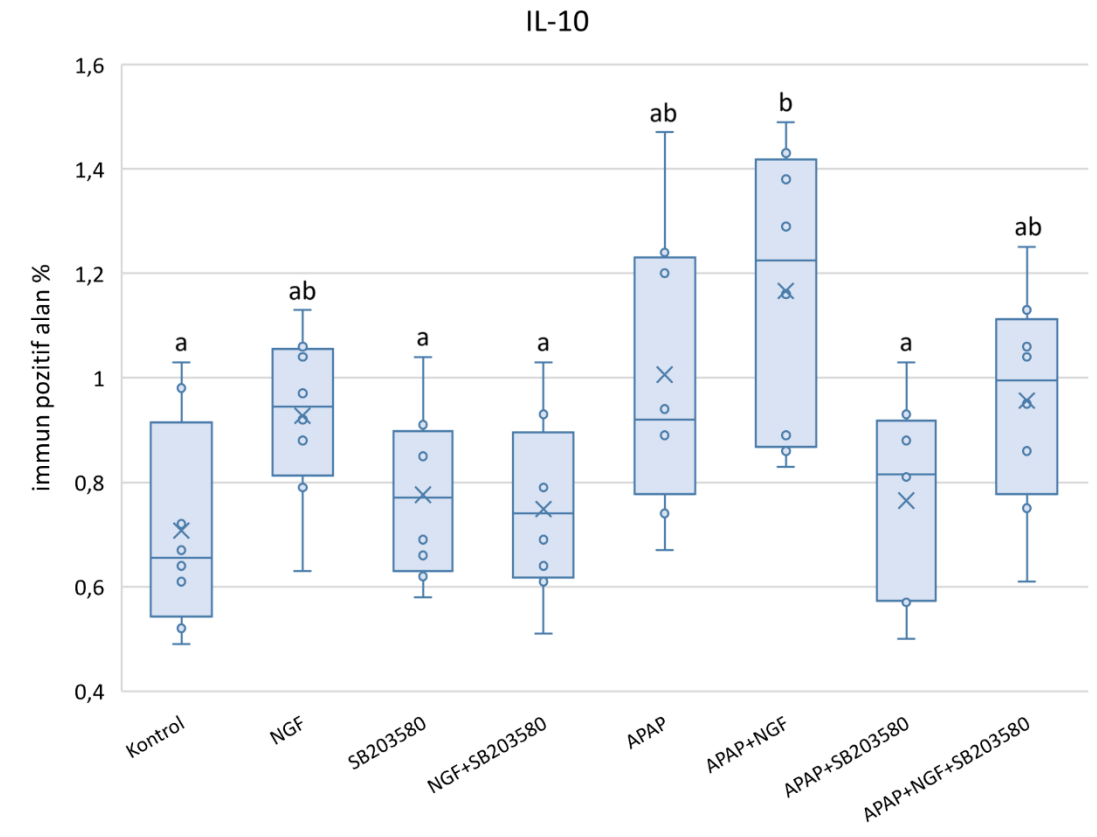


**Şekil 4.26.** Anti-IL-6 antikorlu immunohistokimyasal boyama sonuçları.

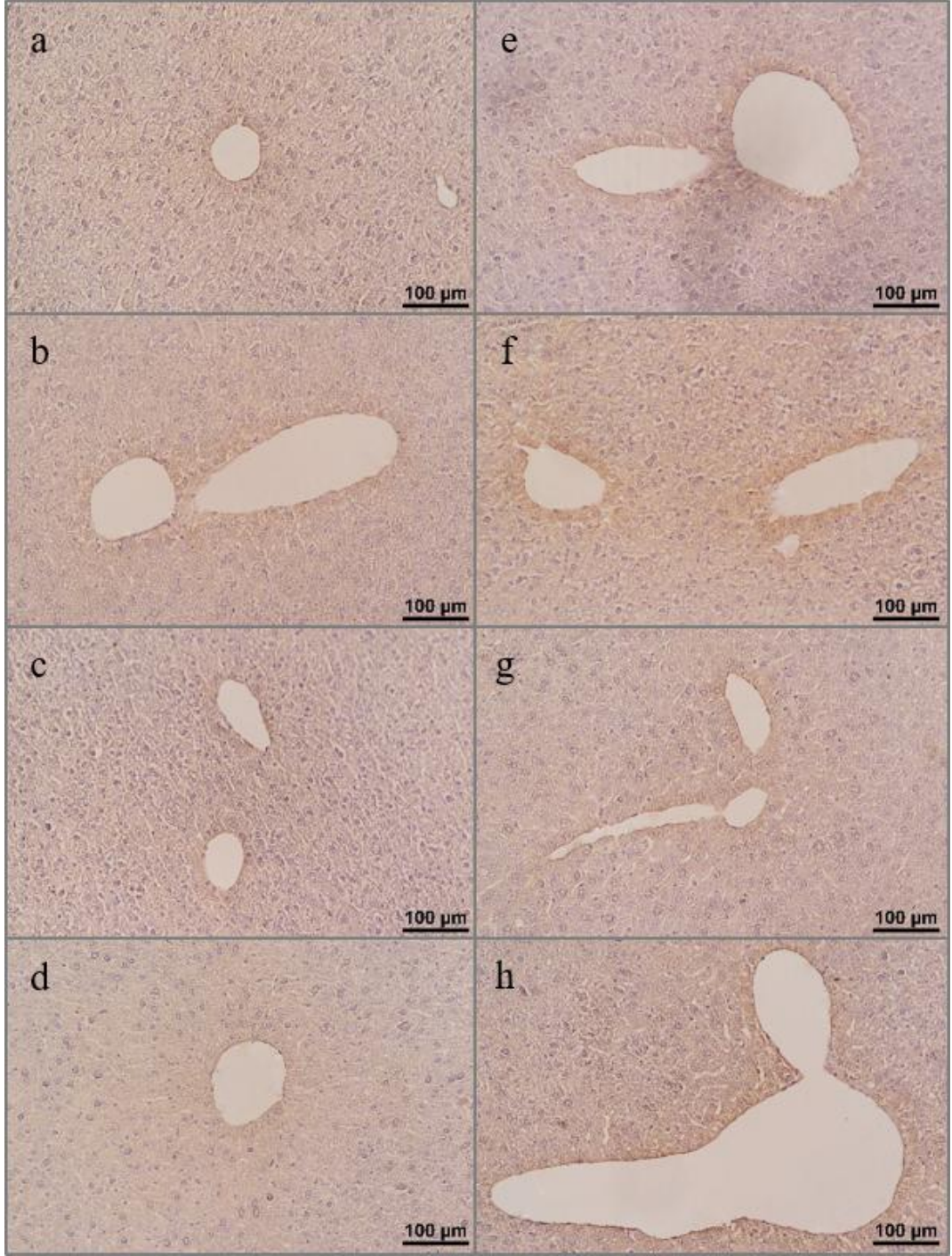


**Şekil 4.27.** Anti- IL-6 immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki IL-10 ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.28**'de gösterildi. Kontrol, SB203580, NGF+SB203580 ve APAP+SB203580 gruplarında zayıf boyanma reaksiyonu görüldü (**Şekil 4.29 a, c, d, g**). APAP+NGF grubunda gözlenen intrasitoplazmik reaksiyon (sentrilobüler bölge hepatositleri), bu gruplardan anlamlı derecede fazlaydı (**Şekil 4.29 f**). NGF, APAP ve APAP+NGF+SB203580 gruplarında da boyanma yoğunluğunda artış gözlenmesine rağmen, artış gruplar arasında fark oluşturmadı (**Şekil 4.29 b, e, h**).

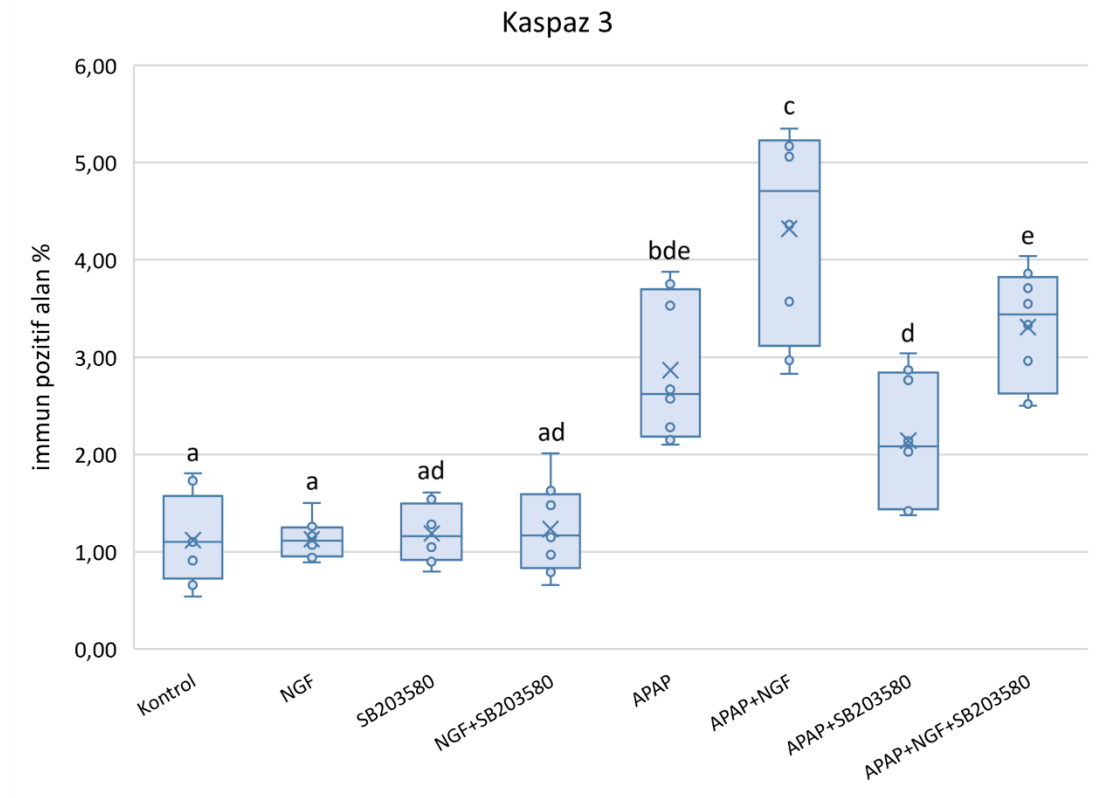


**Şekil 4.28.** Anti-IL-10 antikoruna immunohistokimyasal boyama sonuçları.

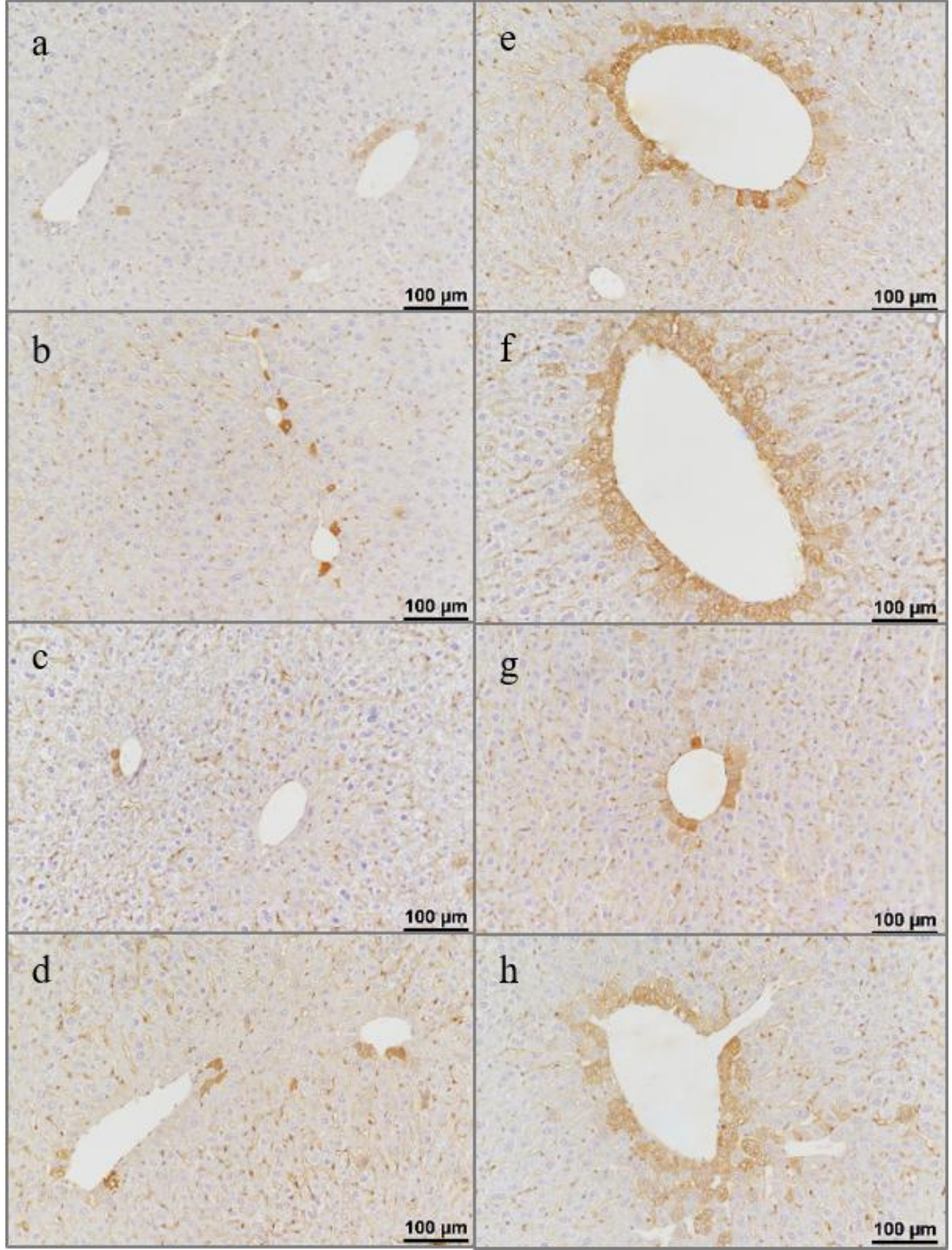


**Şekil 4.29.** Anti- IL-10 immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki kaspaz 3 ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.30**'da gösterildi. APAP uygulanmayan Kontrol, NGF, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında lobülün farklı lokalizasyonlarında birkaç hepatositte gözlenen kaspaz 3 pozitifliği yönünden gruplar arasında anlamlı fark yoktu (**Şekil 4.31 a-d**). APAP uygulanan gruplarda sentrilobüler bölgede artış gösteren reaksiyon, eksojen NGF uygulanan APAP+NGF grubunda diğer grupların tamamından anlamlı derecede yüksek seviyede, ona en yakın boyanma yoğunluğu gözlenen APAP+NGF+SB203580 grubunda ise APAP grubuna benzerlik göstermekle birlikte diğer gruplardan farklıydı (**Şekil 4.31 e-h**).

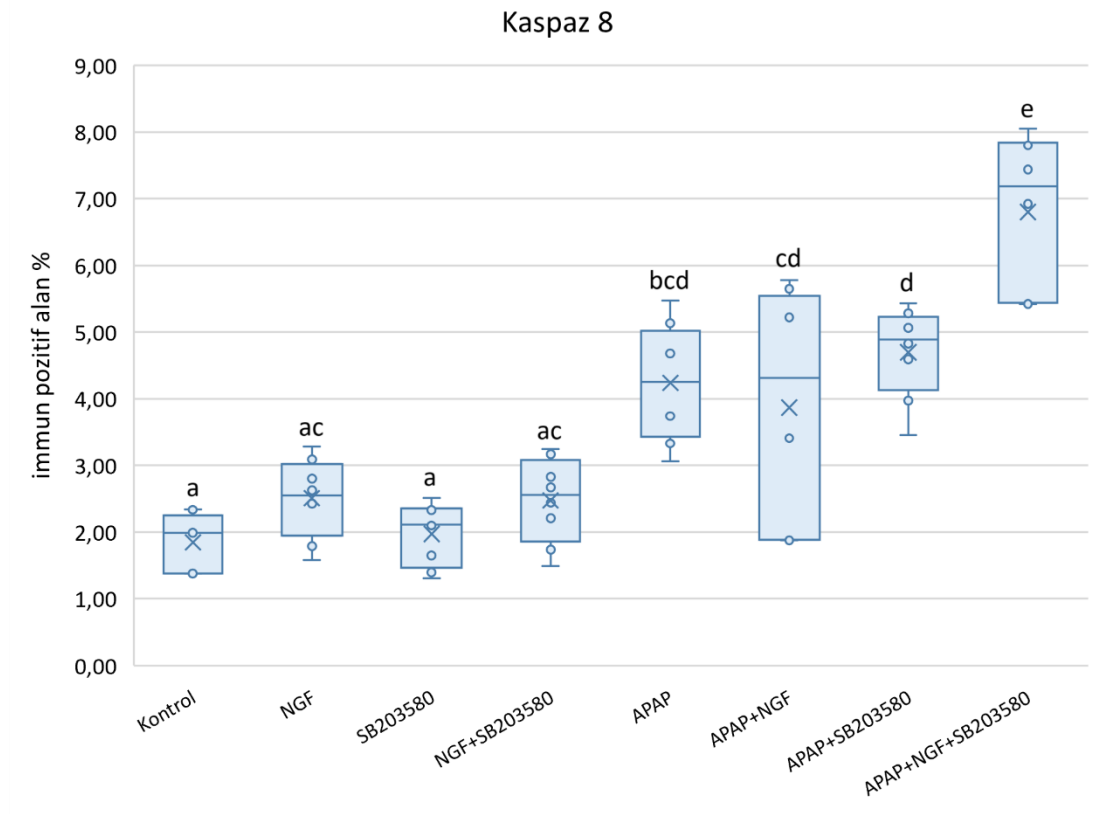


**Şekil 4.30.** Anti-Kaspaz 3 antikoru immunohistokimyasal boyama sonuçları.

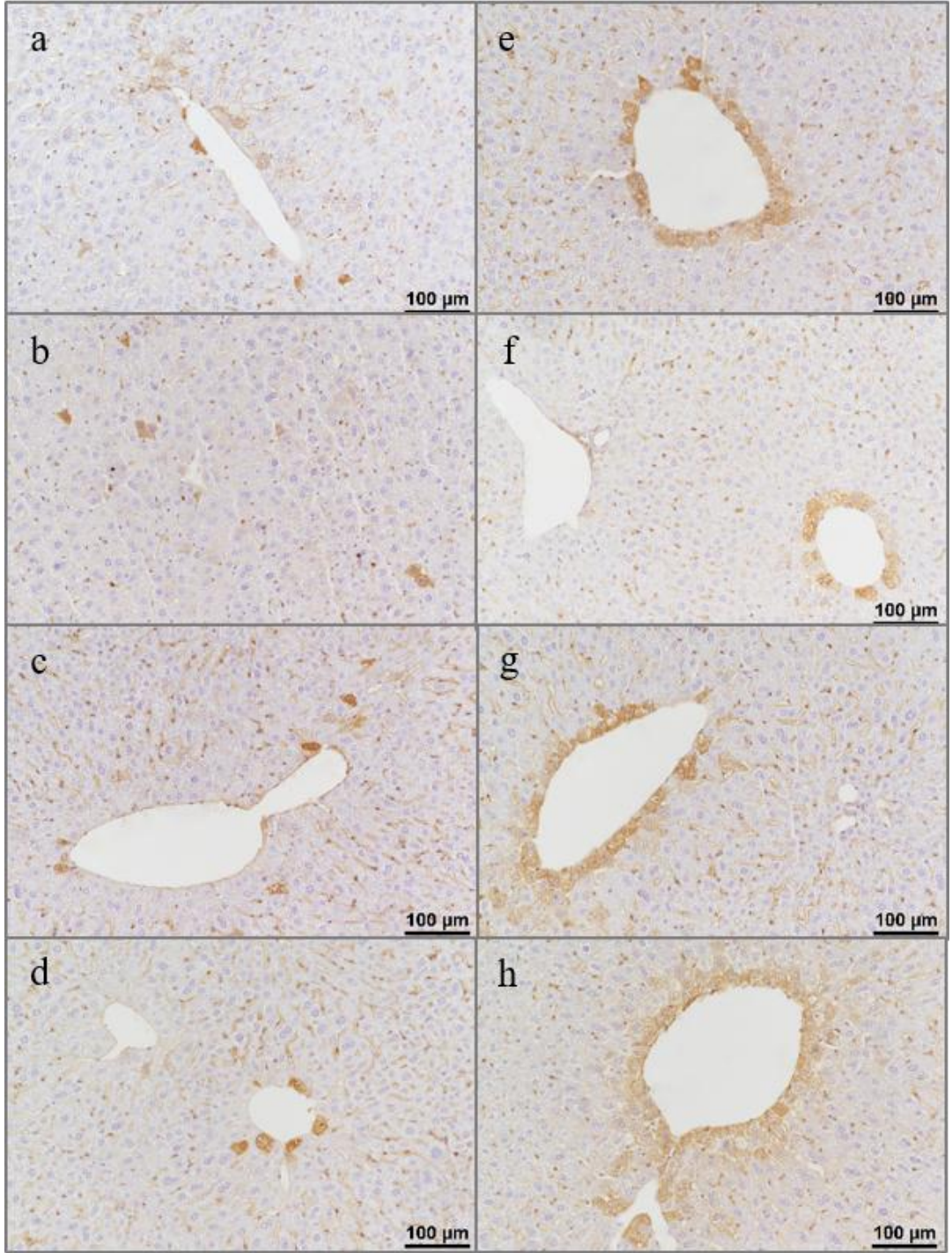


**Şekil 4.31.** Anti-Kaspaz 3 immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki kaspaz 8 ekspresyonunu tespit etmek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.32**'de gösterildi. APAP uygulanmayan Kontrol, NGF, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında lobülün farklı lokalizasyonlarında birkaç hepatositte gözlenen kaspaz 8 pozitifliği yönünden gruplar arasında anlamlı fark yoktu (**Şekil 4.33 a-d**). APAP uygulanan gruplarda sentrilobüler bölgede boyanma yoğunluğunun arttığı gözlemlendi (**Şekil 4.33 e-h**). APAP, APAP+NGF ve APAP+SB203580 grupları arasında benzerlik gösteren reaksiyon, eksojen NGF ile birlikte SB203580 uygulanan hasar grubunda en yüksek seviyede ve diğer gruplardan anlamlı derecede farklıydı.

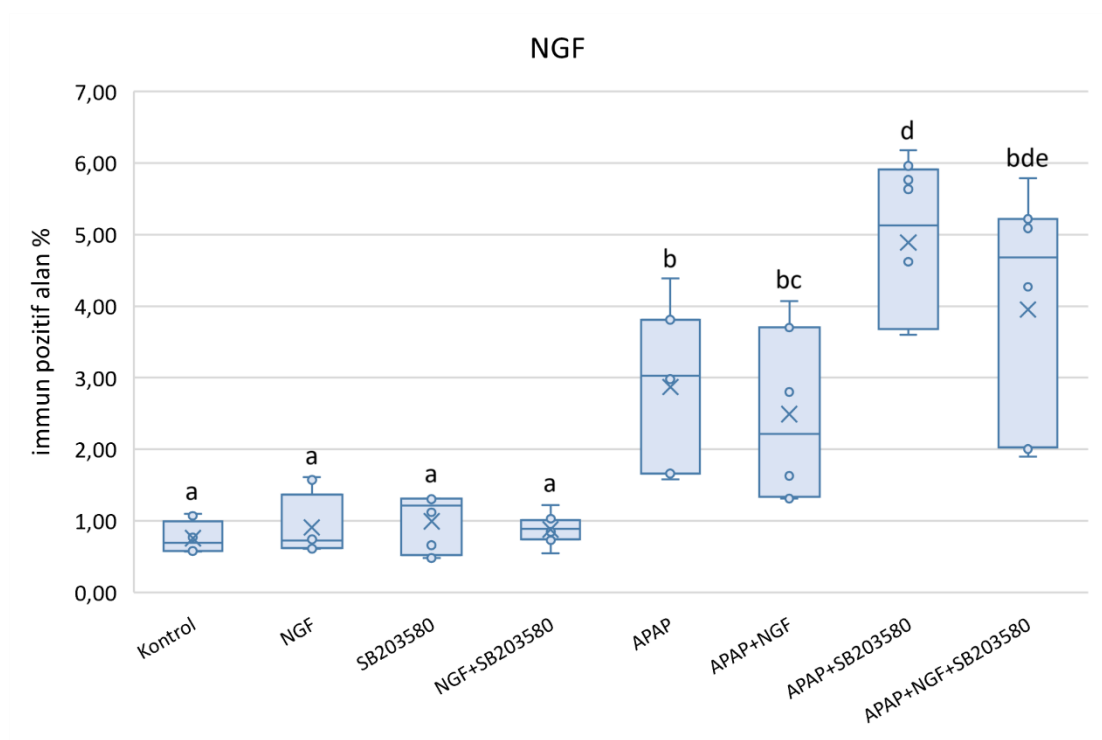


**Şekil 4.32.** Anti-Kaspaz 8 antikoru immunohistokimyasal boyama sonuçları.

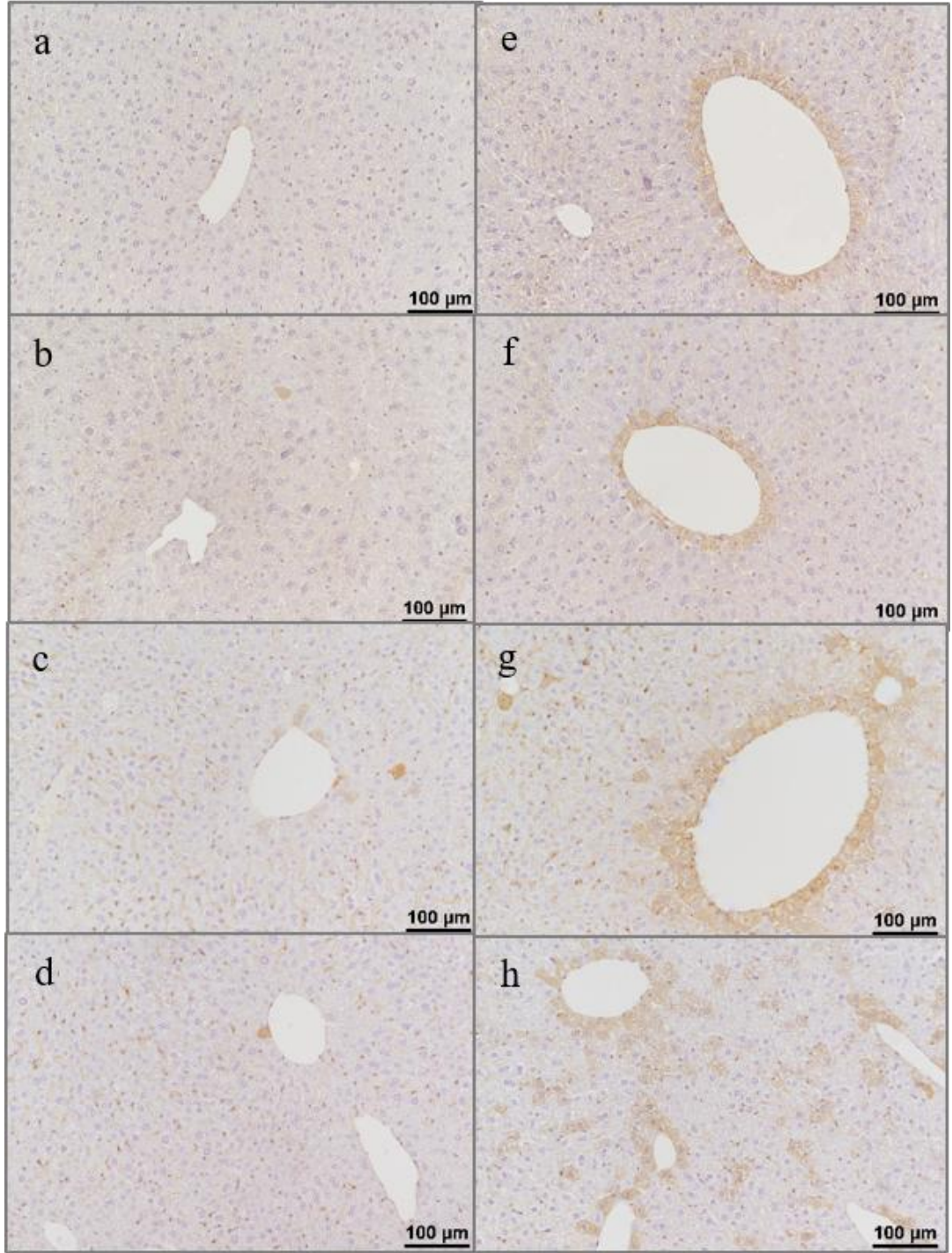


**Şekil 4.33.** Anti-Kaspaz 8 immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

Karaciğer dokularındaki NGF ekspresyonunu belirlemek için yapılan immunohistokimyasal analiz sonuçlarına ait veriler **Şekil 4.34**'de gösterildi. Boyanmanın sadece hepatositlerin sitoplazmalarında şekillenmesi dikkat çekti. Kontrol, NGF, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında lokalizasyon gözetmeksizin, lobül başına 1-3 hepatositte boyanma gözlemlendi (**Şekil 4.35 a-d**). APAP uygulanan APAP, APAP+NGF, APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarında ise boyanmanın sentrilobüler bölgede yoğunlaştığı ve APAP uygulanmayan gruplara göre reaktivitede anlamlı artış olduğu görüldü (**Şekil 4.35 e-h**). APAP+SB203580 grubunda gözlenen reaksiyon APAP+NGF+SB203580 grubuyla benzer seviyede olmakla birlikte, diğer gruplardan anlamlı ölçüde yüksekti.



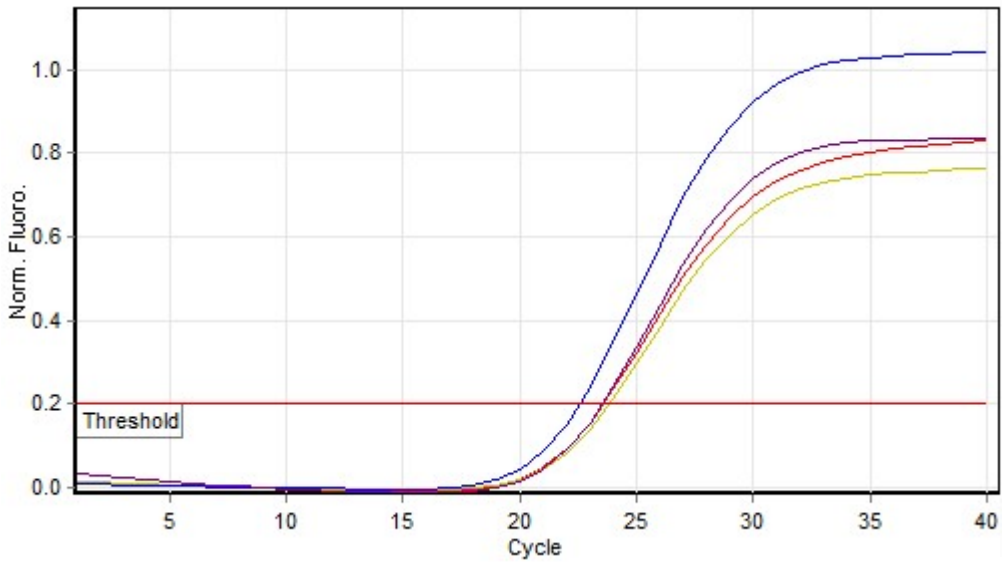
**Şekil 4.34.** Anti-NGF antikoruna immunohistokimyasal boyama sonuçları.



**Şekil 4.35.** Anti-NGF immunohistokimyasal boyanma paternleri. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** SB203580 grubu, **d.** NGF+SB203580 grubu, **e.** APAP grubu, **f.** APAP+NGF grubu, **g.** APAP+SB203580 grubu, **h.** APAP+NGF+SB203580 grubu.

#### 4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Termal döngü cihazı vasıtasıyla yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analiziyle, karaciğer dokularındaki *p38 MAPK* ile referans olarak kullanılan  *$\beta$ -Aktin* genine ait Ct (cycle threshold) değerleri belirlendi. Elde edilen değerler kullanılarak, karşılaştırmalı  $\Delta\Delta Ct$  ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) yöntemiyle *p38 MAPK* mRNA ekspresyon seviyeleri saptandı ve gruplara göre sonuçlar **Tablo 4.4** ve **Şekil 4.37**'de sunuldu. APAP uygulanmayan gruplarda NGF uygulamasının *p38 MAPK* mRNA ekspresyonunu artırdığı, NGF grubunda ekspresyonun Kontrol ve SB2053580 gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu, APAP uygulamasının *p38* ekspresyonunu artırdığı, APAP+NGF, APAP+SB203580, APAP+NGF+SB203580 gruplarındaki ekspresyon seviyelerinin APAP uygulanmayan gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu görüldü.

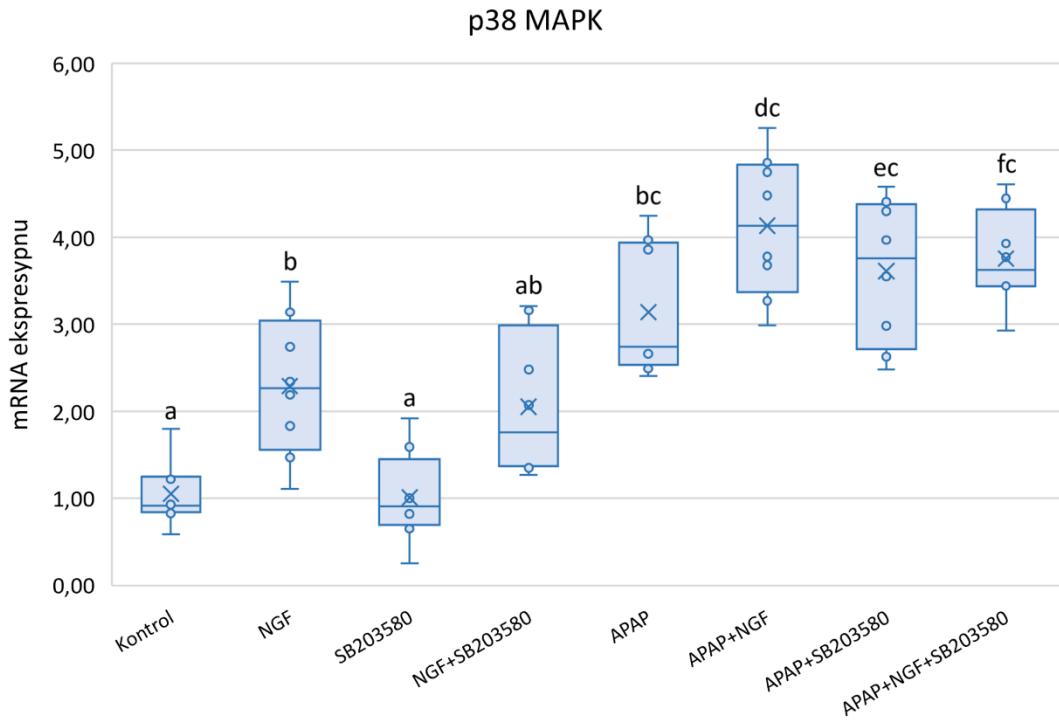


**Şekil 4.36.** *p38 MAPK* ve  *$\beta$ -Aktin* genine ait örnek çoğalma eğrisi.

**Tablo 4.4.** p38 MAPK mRNA ekspresyon seviyelerinin gruplara göre dağılımı.

Grup	X ± SE
Kontrol	1,05 ± 0,13 <sup>a</sup>
NGF	2,29 ± 0,29 <sup>b</sup>
SB203580	1,01 ± 0,19 <sup>a</sup>
NGF+ SB203580	2,05 ± 0,29 <sup>ab</sup>
APAP	3,14 ± 0,27 <sup>bc</sup>
APAP+NGF	4,13 ± 0,29 <sup>dc</sup>
APAP+ SB203580	3,61 ± 0,29 <sup>ec</sup>
APAP+NGF+ SB203580	3,76 ± 0,20 <sup>fc</sup>

Harflendirme yöntemiyle oluşturulan üst simgeler, gruplar arası farkları ( $p < 0.05$ ) ve benzerlikleri ( $p \geq 0.05$ ) göstermektedir. X: ortalama, SE: standart hata.



**Şekil 4.37.** Gruplara göre p38 MAPK mRNA ekspresyon seviyeleri.

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde analjezik ve antipiretik ilaç olarak sıklıkla kullanılan APAP büyük oranda faz II reaksiyonlarıyla metabolize edilir. Yüzde beşten daha azı değişmeden idrarla atılırken, yaklaşık %10'luk bir kısmı sitokrom P450 sistemiyle oksidasyona uğrayarak toksik metabolit NAPQI'ya (N-asetil-p-benzokinonimin) dönüştürülür. Toksik doza ulaşıldığında faz II yolları doyararak oksidasyona giren APAP oranı ve açığa çıkan NAPQI miktarı artar. Konjugasyonla NAPQI'yı detoksifiye etmekten sorumlu olan GSH stokları, doz aşımında yetersiz kalır. Oldukça reaktif olan NAPQI GSH tarafından tamponlanamadığında, hücredeki proteinlerle kovalent bağlar kurarak eklentiler oluşturur ve protein fonksiyonlarını bozar. NAPQI, öncelikli hedefi olan mitokondriyal proteinlere bağlanarak, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif strese neden olur. Artan reaktif oksijen türleri JNK aktivasyonuna, JNK aktivasyonu da elektron taşıma zincirinin inhibisyonuyla oksidatif stres artışına yol açar ve böylece kendi kendini sürdüren bir döngü oluşur. Bu döngü, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin (MPTP) açılmasıyla sonuçlanır. Aktive olan MPTP, mitokondriyal depolarizasyon, oksidatif fosforilasyonun bozulması, ATP sentezinin durması, mitokondriyal iyon ve metabolitlerin salınması, matriksin şişmesi ile sonunda mitokondri dış membranının rupturuna neden olur. Endonükleaz G ve AIF gibi proteinlerin mitokondriden sitozole salınması nekrozu başlatır. Nekroz, sitokrom P450 enziminden daha zengin olan sentrilobüler bölgeden başlar ve hasar şiddetlendikçe genişleyerek masif nekroza kadar ilerleyebilir. Nekrotik hücrelerden açığa çıkan DAMP'lar da Kupffer hücreleri üzerindeki Toll-like reseptörlerine bağlanarak steril yangıyı başlatır (Han vd. 2013; Jaeschke vd. 2018b; Mazaleuskaya vd. 2015; Moles vd. 2018; Qiu vd. 1998; Ramachandran ve Jaeschke, 2017, 2019; Yan vd. 2018).

NGF'nin farklı karaciğer hasarı modellerinde hepatoprotektif etkili olduğu ve APAP hasarında da aynı potansiyeli taşıdığı (Tsai vd. 2014, 2018; Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013), hemen her türlü stres tarafından uyarılan p38 MAPK sinyal yolağının da APAP hasarında ekspresyon ve fosforilasyonunun arttığı, hasarın patogeneze katılmadığı, dolayısıyla potansiyel olarak koruyucu olabileceği öne

sürülmektedir. (Zhang vd. 2017). Bu bilgilerden yola çıkarak tasarlanan çalışmamızda, APAP ile oluşturulan karaciğer hasarında p38 MAPK sinyal yolağının rolü, NGF uygulamasının p38 sinyaliyle etkileşime girip girmediği ve aynı yolak üzerinden NGF'nin koruyucu rolü araştırılmıştır.

Çalışmamızın bitimi olan 24. saatte ötenazi sonrası nekropsileri yapılan deneklerin hiçbirinin karaciğerinde makroskobik bulguya rastlanmamıştır. Histopatolojik incelemede, APAP uygulanmayan gruplarda karaciğer dokuları normal histolojik görünümünü korurken, APAP uygulananlarda gruplara göre değişmekle birlikte sentrilobüler bölgeyi çevreleyen hepatositlerde hidropik dejenerasyon olduğu, nekroz ve yangı şekillenmediği görülmüştür. APAP grubundaki deneklerde gözlenen dejeneratif değişikliklerin kontrol grubu deneklerinde bulunmaması, çalışmada akut karaciğer hasarının oluşturulduğunu göstermektedir. APAP uygulanan gruplarda sitokrom p450 içeriği daha yüksek olan sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde şekillenen hidropik dejenerasyonlar, literatürde bildirilen hasar lokalizasyonu ile uyumludur (Blazka vd. 1996; Roberts vd. 1991). Nekroz, yangı ve kan dolaşımı dinamiklerinin değiştiğine dair mikroskobik bulguların bulunmaması, denek karaciğerlerinde makroskobik bulgu tespit edilememesini açıklamaktadır.

Farelerde akut karaciğer hasarı modeli oluşturulurken, literatürün büyük çoğunluğunda 300 mg/kg ve bazen de üzeri dozlarda APAP kullanımı tercih edilmekte, izah edilen genel mekanizmalarla oluşan sentrilobüler bölgeden başlayan hepatoselüler nekroz ve diğer bulguların şekillendiği bildirilmektedir (Jaeschke vd. 2014; Mossanen ve Tacke, 2015; Taguchi vd. 2015). Bu konuda yapılan çalışmalarda kullanılan doz ve deney sonlandırma zamanına göre değişmekle birlikte, hidropik dejenerasyon, glikojen kaybı, sinüzoidal dilatasyon, sentrilobüler konjesyon, kanama, yangısal hücre infiltrasyonu, mikroveziküler steatozis ve erken dönemde apoptoz bildirilen diğer histopatolojik bulgulardır (Antoine vd. 2009; Blazka vd. 1996; Roberts vd. 1991; Shahid ve Subhan, 2014). JNK aktivasyonu ile oksidatif stres arasında oluşan birbirini uyaran döngüye bağlı olarak mitokondriden sitozole endonükleazların geçişinin gerçekleşmesi, hücrenin nekroza gidişinde dönüşü olmayan noktayı temsil etmektedir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c). Diğer taraftan, APAP insanlarda ve farelerde 150 mg/kg ve üzeri dozlarda akut karaciğer hasarını başlatabilmektedir (McGill ve Jaeschke, 2019). Bu dozla yapılan bazı çalışmalarda nekroz ve yangı bildirilirken (Gamal vd. 2017), bazılarında ise nekroz ve yangı oluşmadığı

kaydedilmektedir (Ward vd. 2012). Aralarında oldukça dikkat çekici olan Hu ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, farelerde 150 mg/kg dozda APAP uygulamasının ardından mitokondriyal proteinlerde NAPQI eklentileri olduğu, JNK fosforilasyonu ile mitokondri depolarizasyonunun gerçekleştiği, ancak JNK aktivasyonu ile mitokondri depolarizasyonunun geçici süreli ve geri dönüşlü olduğu, uygulamanın nekrozla sonuçlanmadığı bildirilmiştir (Hu vd. 2016).

Çalışmamızın asıl amacının NGF'nin APAP toksikasyonundaki koruyucu etkinliğini araştırmak olması sebebiyle, çalışmada uygulanacak APAP dozu şiddetli hasar oluşturması beklenmeyen 150 mg/kg olarak tercih edilmiştir. Bu tercihte etkili diğer bir faktör de yüksek toksik dozlara göre terapötik doza daha yakın olması nedeniyle, insanlarda APAP toksikasyonu insidansının 150 mg/kg seviyesinde daha yüksek olabileceği düşüncesidir.

Gruplar arası muhtemel farklılıkları değerlendirebilecek nicel veriyi elde etmek amacıyla, hasar kıyaslamalarında nekrotik hücrelerin toplam alana yüzdelik oranını temel alan çalışmalar (Bhushan vd. 2014; Hu vd. 2016; Lawson vd. 2000) referans alınarak, her bir denek için hasarlı hepatositlerin (hidropik dejenerasyonlu hepatositler ile piknotik çekirdekli ve eozinofilik sitoplazmalı hepatositler) oranını ifade eden hasar skoru hesaplanmış ve grup ortalamaları belirlenmiştir. Hasar skorlarının APAP uygulanan gruplarda uygulanmayanlara göre yüksek ve farkın istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) olduğu görülmüştür. APAP grupları arasında ise APAP+NGF+SB203580 grubunun en yüksek skorla diğerlerinden farklı ve en çok etkilenen grup olduğu tespit edilmiştir. Ardından gelen p38 MAPK sinyalinin inhibe edildiği APAP+SB203580 grubu ile APAP grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıyken, ortalarında değer alan APAP+NGF grubunun değeri iki gruba da benzer seviyede oluşmuştur. Bu farklılık ve benzerliklerin olası sebepleri, ölçümü yapılan parametreler üzerinden tartışmanın devamında irdelenecektir.

Akut karaciğer hasarında serum ALT ve AST seviyelerinde belirgin, GGT seviyesinde orta derecede artış şekillenmektedir (Larrey, 2000). Aynı şekilde APAP hepatotoksitesinde de ALT ve AST seviyeleri yükselmektedir (Cigremis vd. 2009). Çalışmamızda ise her üç enzimin serum seviyelerinde, gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık oluşmadığı görülmüştür. APAP uygulanan gruplarda, uygulanmayan gruplara göre ALT seviyelerinde bir miktar artış gözlenirse de artışlar istatistiksel

anlamlılık oluşturmak için yeterli olmamıştır. ALT ve AST hepatik sızıntı enzimleridir. Hepatosit nekrozu ya da geçirgenliğin arttığı durumlarda membran hasarı sonucu kana salınırlar (Ramaiah, 2007). Çalışmamızda hepatositlerde nekroz oluşmadığı, dolayısıyla membran bütünlüklerinin bozulmadığı görülmektedir. Serum enzim seviyelerinde anlamlı artış görülmemesi sebebi, hepatositlerde hidropik dejenerasyon oluşmasına rağmen, transaminaz sızıntısına neden olacak derecede hepatosit membranlarında hasar gerçekleşmemesine yorumlanmıştır. Aynı dozda APAP (150 mg/kg) kullanılan iki çalışmanın sonuçları da düşüncemizi desteklemektedir. Gamal vd. (2017) çalışmalarında transaminaz artışı ve nekroz bildirirken, Hu vd. (2016) transaminaz artışı ve nekroz gözlemediklerini ifade etmişlerdir. GGT hepatositlerde eksprese edilmekle birlikte, karaciğerde en yoğun konsantrasyonda safra kanalı epitelinde bulunmaktadır. Bu nedenle daha çok kolestatik hasarın yorumlanmasında transaminazlarla birlikte değerlendirilir (Poynard ve Imbert-Bismut, 2012). Transaminaz seviyelerinde anlamlı artış gözlenmeyen çalışmamızda, GGT'nin de bu duruma uyum sağlaması olağandır.

NAPQI'nın mitokondriyal proteinlere bağlanmasıyla oluşan mitokondriyal disfonksiyon ve ardından gelişen oksidatif stres, APAP kaynaklı hepatoselüler nekroz için kritiktir. Oksidatif stresin patogenezdaki rolü kabul görmüş, ancak reaktif oksijen türlerinin hücre içi kaynakları ve doğası gibi bazı konular halen tartışılmaktadır (Du vd. 2016; Jaeschke ve Ramachandran, 2020c).

Mitokondriyal proteinleri modifiye eden NAPQI, elektron taşıma zincirine müdahale ederek süperoksit oluşumunu artırır. Süperoksit, dismutazlar aracılığıyla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülebilir veya nitrik oksitle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir. Hidrojen peroksit Fenton reaksiyonuyla hidroksil radikale indirgenerek lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Oksidatif stresle sonlanan bu farklı süreçlerin birçok noktasında tamponlayıcı olan glutatyonun tükenmesi, APAP hasarının başlangıcındaki kilit noktadır (Du vd. 2016; Jaeschke ve Ramachandran, 2020c). Çalışmamızda APAP grubu ve APAP uygulanan diğer gruplarda karaciğer GSH seviyelerinin azalmadığı, gruplar arasında farklılık oluşmadığı gözlenmiştir. Literatürde 150-200 mg/kg APAP dozlarının ardından GSH seviyelerinin 1. saat sonunda normalin 28 katına kadar azaldığı, 6-24. saat sonunda normal seviyelere döndüğü bildirilmiştir (Ramachandran vd. 2011; Soga vd. 2006; Y. Q. Wang vd. 2021). Aynı doz aralığında APAP uygulanan çalışmamızda da

hepatositlerin 24. saat sonunda GSH rezervlerini yenilediği düşünülmüştür. Farklı bir araştırmada bu düşüncüyü destekler mahiyette, APAP toksisitesinde doz azaldıkça GSH yenilenme hızının arttığı ve bu durumun hücreyi ölüme karşı önemli ölçüde koruduğu ifade edilmiştir (Hu vd. 2016). Kontrolle kıyaslandığında APAP gruplarında benzer seviyede bulunduğu görülen GSH'nin, çalışmamızda da hepatositleri nekrozdan koruyan ana etken olduğu düşünülmüştür.

Karaciğer hasarını takiben ve hasar şiddetiyle orantılı biçimde, hepatositler ve bağışıklık hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin uyarısıyla iNOS eksprese edilmektedir (Kaibori vd. 2015; Taylor vd. 1998). APAP hasarında da ekspresyonu artan iNOS'un (Cigremis vd. 2009) patogenezdaki rolü tartışmalıdır. Çalışmalar APAP toksisitesinde etkili olan peroksinitrit oluşumuna iNOS'un katılmadığını göstermektedir (Hinson vd. 2010; Ramachandran ve Jaeschke, 2017). Çalışmamızda APAP uygulanan gruplarda sentrilobüler bölge hepatositlerinde göze çarpan immunreaktivite artışı görülmesine rağmen, gruplar arasında anlamlı fark tespit edilememiştir. Gruplar arasında fark oluşmaması, uyguladığımız APAP dozunun nispi düşük seviyesi, karaciğerde yangı şekillenmemesi ile deneyi sonlandırma zamanımızdan kaynaklanmış olabileceğine bağlanmıştır. Açıklamamızla uyumlu görünen bir çalışmada, 300 mg/kg APAP dozuyla oluşturulan hasarda orta düzeyde ve anlamlı olmayan iNOS artışı gözlemlendiği, uygulamanın 6. saatinden itibaren iNOS seviyesinin düşüşe geçtiği bildirilmiştir (Knight vd. 2001).

Artan süperoksitin nitrik oksitle spontan reaksiyona girmesi sonucu peroksinitrit oluşumu, APAP hasarında diğer bir kritik noktadır. Peroksinitrit proteinlerin tirozin kalıntılarını nitratlayarak, protein fonksiyonlarını değiştiren 3-nitrotirozin oluşumuna neden olur. APAP hasarında artış gösteren nitrotirozin, oksidatif/nitrozatif stresin belirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Hinson vd. 2010; Ramachandran ve Jaeschke, 2017). Çalışmamızda nitrotirozin immunoreaktivitesi APAP grubu ve diğer APAP uygulanan gruplarda gözle görülür bir artış göstermiş, ancak gruplar arasında anlamlı bir farka yol açmamıştır. Bu sonuç, uygulanan APAP dozu, çalışmanın süresi ve hepatositlerdeki GSH seviyelerine bağlanmıştır. Zira, GSH peroksinitritin etkili bir temizleyicisidir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c). GSH stoklarının 150-200 mg/kg APAP dozlarının ardından 6-24 saat sonunda yenilenebilmesi (Ramachandran vd. 2011; Soga vd. 2006; Wang vd. 2021), APAP dozu azaldıkça artan stok yenilenme hızı (Hu vd. 2016) ve çalışmamızda

GSH seviyelerinin tüm gruplarda kontrol grubuyla benzer olduğu dikkate alındığında, nitrotirozin seviyelerinin GSH etkisiyle kontrol altına alınmış olabileceği düşünülmüştür.

APAP'a bağlı hepatoselüler hasar sürecinde, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu sebebiyle artan süperoksit üretimi, hidrojen peroksitin hidroksil radikaline indirgenmesi sonucu lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedir. Peroksidasyonun sekonder ürünlerinden olan MDA, oksidatif hasarın belirlenmesinde LPO belirteci olarak kullanılmaktadır. APAP hasarında MDA seviyeleri artmasına rağmen, LPO patogeneizde etkili bir faktör olarak kabul edilmemektedir. Hasarın sebeplerinden ziyade sonuçları arasında tartışılmaktadır (Du vd. 2016; Jaeschke ve Ramachandran, 2020c). Çalışmamızda APAP grubu ve diğer APAP uygulanan gruplarda, MDA seviyeleri açısından kontrole göre bir farklılık oluşmamıştır. Bu durumun doz ve zaman etkisi nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Düşüncemize referans olarak kullanılabilir iki farklı çalışmadan ilkinde, APAP 150 mg/kg dozda uygulandığında hepatic MDA seviyesi 2 saat sonra artmış ve 6. saatte normal seviyeye inmiş (Wang vd. 2021), ikincisinde APAP 300 mg/kg dozda uygulandığında MDA seviyesi 12. saatte artarak 24 saat sonunda normal seviyeye dönmüştür (Shen vd. 2023). Ayrıca çalışmamızdaki GSH stoklarının mevcut durumu, glutatyon peroksidazın GSH aracılığıyla hidrojen peroksiti indirgeyerek (Jaeschke ve Ramachandran, 2020c), MDA artışını önlemiş olabileceğini düşündürmüştür. Verilerimizde dikkati çeken farklı bir bulgu, en yüksek MDA seviyesine sahip NGF grubu ile en düşük seviyedeki NGF+SB203580 grupları arasındaki farkın anlamlı çıkması olmuştur. Tartışmayı APAP hasarı dışına çıkarmamak adına, APAP uygulanmayan gruplardaki bu bulgu değerlendirme dışı bırakılmıştır.

APAP hasarında karaciğer dokularında TOS seviyesinin arttığı, TAS seviyesinin ise düştüğü bildirilmiştir (Kamış ve Karabağ Çoban, 2019; Kuru ve Karabağ Çoban, 2019). Çalışmamızda TOS seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığı görülmüştür. Oksidatif strese ilişkin diğer parametrelere ait verilerimiz, hücrelerdeki oksidan molekül yükünün 24 saatlik süre sonunda tamponlanarak kontrol altına alındığını düşündürmektedir. Toplam antioksidan durumuna bakıldığında ise APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarının, SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarından anlamlı olarak daha yüksek TAS seviyelerine sahip oldukları gözlenmiştir. p38 MAPK'nin işlevlerinden biri de

antioksidan genlerin transkripsiyonunu uyararak, hücrenin oksidatif strese karşı direncini artırmaktır (Gutiérrez-Uzquiza vd. 2012). Oksidatif stres baskısı oluşturulmamış SB203580 ve NGF+SB203580 gruplarında uygulanan p38 inhibisyonu, antioksidan genlerin transkripsiyonunu engelleyerek hücrelerin bazal antioksidan rezervlerini düşük seviyede tutmuş olabilir. APAP'ın hepatotoksik dozlarının ardından oksidatif strese yanıt olarak p38 dışında birçok kompenzatuvar sinyal yolağı da devreye girer. Bunlardan biri olan Nrf2'nin (nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2) aktivasyonu, antioksidan enzimlerin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar (Li vd. 2023; Yan vd. 2018). APAP+SB203580 ve APAP+NGF+SB203580 gruplarında da Nrf2 veya benzeri bir sinyalle antioksidan genlerin transkripsiyonu uyarılarak, tehdit altındaki hücrelerin antioksidan kapasitelerinin artırılmış olabileceği düşünülmüştür.

Gruplardaki olası oksidatif stresin seviyelerini belirlemeyi amaçlayan GSH, iNOS, nitrotirozin, MDA, TAS ve TOS ölçümlerimize ait veriler literatürle kıyaslanarak topluca incelendiğinde, 24 saatlik deney süresi sonunda karaciğer dokularının oksidatif stresle başa çıkmış olduğu düşünülmüştür. Parametreler ayrı ayrı yorumlandıklarında, APAP'ın nispi düşük dozu ile deney sonlandırma zamanının bu parametrelerin sonuçları üzerinde belirleyici ortak etkenler olarak öne çıktıkları görülmektedir. APAP hasarında hücreyi ölüme sürükleyen kırılma noktası, oksidatif stresle uyarılan JNK'nin kalıcı olarak aktive olması ve bunun gittikçe şiddeti artan mitokondriyal oksidatif strese neden olmasıdır. APAP'ın 150 mg/kg dozda uygulandığında JNK aktivasyonu ve mitokondriyal disfonksiyonun geçici süreli ve geri dönüşlü olduğu bildirilmiştir (Hu vd. 2016). Çalışmamızda da 150 mg/kg dozun uygulanması sonrası aynı mekanizmayla mitokondriyal fonksiyonların geri kazanılabildiği, 24 saatlik sürenin hücrenin oksidan molekülleri temizlemesi için yeterli olduğu ve bu nedenle belirgin oksidatif stres bulgularının ortadan kalktığı düşünülmüştür.

APAP hepatotoksitesinde oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonu takip eden olaylar sonrası gelişen nekroz, membran bütünlüğü bozulan hepatositlerden salınan DAMP'ların etkisiyle Kupffer hücrelerini aktive etmektedir. Aktive olan Kupffer hücrelerinin salgıladığı sitokin ve kemokinler aracılığıyla başlayan steril yangı, diğer bağışıklık hücrelerinin alana toplanmasına neden olur. Bölgede görev alan her hücre, işlevi çerçevesinde yangının modülasyonuna yönelik mediyatörleri eksprese

eder. Proinflamatuvar sitokinler olarak bilinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 seviyelerinin APAP hasarında belirgin derecede yükseldiği bildirilmektedir (Li vd. 2022; Yang vd. 2022). Çalışmamızda da söz konusu sitokinlerin ekspresyonunda artış gözlenmiştir, ancak bahsedilen literatürden ayrılan yönleri bulunmaktadır. Deney gruplarımızda proinflamatuvar sitokin antikörlerine karşı Kupffer hücrelerinde immunreaktivite gözlenmemiş, reaksiyon hasarlı hepatositlerle sınırlı kalmıştır. Ek olarak, nekrotik hücre ve yangısal hücre infiltrasyonuna da rastlanmamıştır. Steril yangının oluşmadığını gösteren bu durum, nekrotik hücrelerin yokluğu ve halen bütünlüğü korunan hücre membranları nedeniyle, Kupffer hücrelerini uyarıp aktive edecek olan DAMP'ların hücre dışına salınmamış olmasına bağlanabilir. Anlamlı farklılık oluşmayan iNOS ile transaminaz seviyelerine ilişkin verilerimiz de bu açıklamayı destekler niteliktedir.

Sitokin üretimi hepatositlerin ana işlevlerinden biri değildir. Ancak diğer birçok hücrede olduğu gibi hepatositler de stres altında proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinleri eksprese ederler (Neuman, 2003; Vodovotz vd. 2017). Çalışmamızda da bu bilgiyle uyumlu olarak, yangı gözlenmemesine rağmen hasarın olduğu sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde gruplara göre değişken seviyelerde TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. APAP grubunda TNF- $\alpha$  ve IL-6 ekspresyonları kontrol grubuna göre anlamlı biçimde artmış, IL-1 $\beta$  ekspresyonu ise artma eğilimi göstermiş olsa da oluşan fark istatistiki anlam kazanmamıştır. Literatürde, APAP hasarında her üç sitokinin ekspresyonlarının arttığı, ancak IL-1 $\beta$  artışının diğerlerine nazaran minimal düzeyde olduğu bildirilmektedir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020b). APAP grubumuzda gözlenen TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerindeki artışlar APAP hasarıyla uyumludur. Daha düşük seviyeli bir artış beklenen IL-1 $\beta$ 'nin diğerlerine benzememesi ise muhtemelen çalışmada tercih ettiğimiz APAP dozundan kaynaklanmıştır.

APAP uygulanan gruplar birlikte değerlendirildiğinde, IL-1 $\beta$  ve IL-6 ekspresyonları benzer değerleri alan APAP+NGF+SB203580 ve APAP+SB203580 gruplarında diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artmışken, TNF- $\alpha$  ekspresyonundaki artış ise sadece APAP+NGF+SB203580 grubunda anlamlı olmuştur. Diğerlerinden anlamlı olarak ayrılan gruplarda ortak faktörün SB203580 uygulaması olduğu görülmektedir. Bu durum p38 MAPK inhibisyonunun bahsedilen proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını artırdığını göstermektedir.

p38 MAPK ile proinflamatuvar sitokinler arasında çift yönlü etkileşim bulunmaktadır. Bir taraftan proinflamatuvar sitokinler p38 MAPK aktivasyonuna neden olurken, diğer taraftan p38 MAPK aktivasyonu proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarmaktadır. İnhibe edildiğinde ise proinflamatuvar sitokin ekspresyonu baskılanmaktadır (Clark vd. 2009; Cuenda ve Rousseau, 2007). Çalışmamızda ise bildirilenin aksine, p38 inhibisyonu TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 ekspresyonlarını artırmıştır. Proinflamatuvar sitokin üretiminde p38'den başka sinyal yolları da görev almakta (Clark vd. 2009; Yang vd. 2022) ve APAP hepatotoksitesinde JNK, ERK, nükleer transkripsiyon faktörü kappa-B (NF-kB), Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) gibi çeşitli inflamatuvar yollar da aktive olmaktadır (Gong vd. 2021). Ayrıca p38 diğer yollarla çapraz etkileşim halindedir ve bu etkileşim nedeniyle, p38 inhibitörleri JNK gibi diğer proinflamatuvar yolları güçlendirebilmektedir (Clark vd. 2009). Tehditle baş etmeye çalışan hücrede mevcut alternatif yollar ve aralarındaki karmaşık etkileşim göz önüne alındığında, uyguladığımız p38 blokajının farklı bir sinyalin aktivasyonuna neden olarak ya da aktivasyonunu güçlendirerek proinflamatuvar sitokin üretimini artırmış olabileceği düşünülmüştür.

APAP hasarında, antiinflamatuvar karakteriyle bilinen IL-10 ekspresyonu da artmakta ve APAP hasarına karşı hepatoprotektif olarak kabul edilmektedir (Jaeschke ve Ramachandran, 2020b; Li vd. 2022). Çalışmamızda APAP grubunda IL-10 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre yükselmiş, ancak anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bu durumun yine APAP uygulama dozundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Göze çarpan bulgu, APAP+NGF grubunda IL-10 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı artışı olmuştur. Eksojen NGF uygulamasına bağlı IL-10 artışının, çeşitli çalışmalarla (Ma vd. 2003; Miller vd. 2002) bildirilmiş olan NGF ve IL-10 arasındaki pozitif korelasyonla açıklanması muhtemel görünmektedir.

APAP hasarında hücre ölüm biçiminin nekroz olduğu kabul görmesine rağmen, apoptozla ilgili devam eden bildirimler tartışmaların sonlanmasını engellemektedir. Oluşturduğumuz hasarda apoptoza ilişkin değerlendirme yapabilmek amacıyla immunohistokimyasal yöntemle kaspaz 3 ve kaspaz 8 enzimlerinin immun reaksiyon seviyeleri belirlenmiştir. Kontrol ile APAP grupları kıyaslandığında, APAP uygulamasının kaspaz 3 ve kaspaz 8 seviyelerini anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür. NGF uygulaması APAP+NGF grubunu en yüksek kaspaz 3 seviyesine

ulaştırarak, diğer gruplardan anlamlı biçimde ayırmıştır. p38 inhibisyonu uygulanan APAP+SB203580 grubu ise APAP grupları arasında en düşük seviyededir. Bu uygulamaya eklenen NGF, APAP+NGF+SB203580 grubunda seviyeyi anlamlı şekilde yükseltmiştir. APAP ile birlikte NGF uygulaması aktive kaspaz 3 seviyesinin artmasına, p38 inhibisyonu ise azalmasına sebep olmaktadır. Kaspaz 8 immün reaksiyonu en yüksek ve anlamlı olarak APAP+NGF+SB203580 grubunda gözlenmiş, APAP uygulanan diğer gruplardaki reaksiyonlar birbirlerine benzer seviyelerde olmuştur. Kaspaz 3'ten farklı olarak, NGF uygulaması p38 inhibe edildiği zaman (APAP+NGF+SB203580 grubu) kaspaz 8 immün reaksiyonunu anlamlı derecede artırmaktadır. NGF ve p38 sinyalinin kaspazlarla etkileşim halinde oldukları görölmekte olup, muhtemel etkiler kaspazlardaki değişimler irdelendikten sonra kendi bölümlerinde tartışılacaktır.

Uyaranın niteliğine göre değişen proteaz kaskadı nedeniyle, apoptoz ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki yolak üzerinden yürütölmektedir. Her iki yolakta da süreç, kararlı durumda inaktif olup bölündüğünde aktiveleşen kaspazların proteolizleriyle ilerletilir. Sinyal alındıktan sonra apoptozun ilerleyerek DNaz'ların aktive edilmesine kadar görev alan enzimler, başlatıcı (2, 8, 9, 10) ve efektör kaspazlar (3, 6, 7) olarak sınıflandırılır. Hepatositlerin de dahil olduğu tip 2 hücreler, ekstrinsik yolakta efektör kaspazları doğrudan aktive etmeye yetecek konsantrasyona ulaşamadıklarından, apoptoz için kaspaz 8 üzerinden mitokondriye bağımlıdır (Guicciardi vd. 2013; Malhi vd. 2010).

APAP hasarında toksikasyonun nekrozla sonuşlandığı kabul edilmiştir. Hasarda apoptozun da yer aldığını belirten alışmalar (Cao vd. 2018; Dong vd. 2014; Hong vd. 2012; Li vd. 2013; Sharma vd. 2011) ise çeşitli nedenlerle kabul görmemektedir. Apoptoz bildirimlerinin reddi için öne sürölen argümanlar arasında; DNA zincir kırıklarını tespit eden analizlerin apoptoz ve nekrozun ikisi için de pozitif olması nedeniyle sonuçların yanlış yorumlandığı, morfolojinin apoptozla uyumlu olmadığı, sunulan çalışma verilerinin apoptoza spesifik parametrelerden oluşmadığı bulunmaktadır. Mitokondriyal Bax translokasyonuna ve mitokondriden sitokrom c ile Smac/DIABLO gibi apoptotik uyaranların salınmasına rağmen apoptozun neden uyarılmadığı sorusunun cevabı aranmakta, kaspazların aktive olmadığı, bu nedenle kaspaz inhibitörlerinin koruyucu olmadığı ifade edilmektedir. Kaspaz aktivasyonunun apoptoza spesifik bir parametre olduğu kabul edilmekte, ancak aktif kaspaz bildiren

çalışmalar ikna edici bulunmamaktadır (Du vd. 2019; Gujral vd. 2002; Hinson, 2013; Hodgman ve Garrard, 2012; Iorga vd. 2017; Jaeschke vd. 2014; Jaeschke vd. 2018a; Jaeschke ve Ramachandran, 2020a; McGill vd. 2012). Kaspazların etkinliğine ilişkin bildirimlerde immunohistokimyasal boyama yönteminin daha az tercih edildiği görülmektedir. Bu örneklerden biri olan 500 mg/kg APAP ile hasar oluşturulan çalışmada, kaspaz 3 aktivasyonu gösterilmiştir (Helal ve Samra, 2020). Fakat, APAP hepatotoksitesi konusunda literatüre büyük katkıları bulunan araştırmacılar Hartmut Jaeschke ve Anup Ramachandran, boyanma kalitesinin düşük ve boyanan hücre sayısının az olduğu gerekçesiyle, çalışmanın verilerini yeterli ve güvenilir bulmamışlardır (Jaeschke ve Ramachandran, 2020a).

Çalışmamızda, 150 mg/kg dozla oluşturulan APAP hasarında kaspaz 3'ün aktive olduğu immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Aktif enzime spesifik antikörle gösterilen reaksiyonun gözlemlendiği alan APAP hasarının lokalizasyonu ile uyumlu, az sayıda tek hücre boyanmasından ziyade vena sentralis etrafında bir veya daha fazla halkayı oluşturan hepatositlerde (gruplara göre değişken) intrasitoplazmik immun boyanma oldukça net görünümündedir. Tespit ettiğimiz kaspaz 3 aktivasyonunun, APAP dozu, oksidatif strese ilişkin süreç ve mitokondri fonksiyonlarının kayıp derecesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Kaspazlar oksidatif strese duyarlı olup, aktivasyonları ve işlevsellikleri uygun bir hücrel redoks ortamı gerektirir (Hanawa vd. 2008; Moles vd. 2018). Mitokondriyal oksidatif stres bir MnSOD mimesi olan Mito-Tempo ile kısmi olarak tamponlandığında, APAP toksitesinde kaspaz 3 aktivitesi ve apoptozun gözlemlendiği, nekroz oluşumunun önemli ölçüde önlenildiği bildirilmiştir (Du vd. 2019). Çalışmamızda hücre redoks durumunun optimal sınırlara çekilmiş olduğunu gösteren oksidatif strese ilişkin veriler, kaspaz 3 aktivasyonu için uygun şartların sağlandığını düşündürmektedir. Bu durum yüksek olasılıkla, APAP toksitesinde oksidatif stresi sürekli artırarak hücrenin nekroza gidişinde kritik olan kalıcı JNK aktivasyonu ile MPTP açılmasına bağlı mitokondri disfonksiyonunun, 150 mg/kg dozda geçici süreli ve geri dönüşlü olarak şekillenmesine (Hu vd. 2016) bağlıdır. Bu bağlamda histopatolojik bulgularımız da mitokondriyal fonksiyonların, hidropik dejenerasyona rağmen hücre membran bütünlüğünün korunması için yeterli ATP üretimini sağlayacak düzeyde olduğunu göstermektedir. Apoptoz enerji gerektiren bir süreçtir (Lemasters, 1998). Hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı ve nekrozun şekillenmediğini gösteren

histopatolojik verilerimiz, hepatositlerde halen üretimi sağlanabildiği anlaşılan ATP'nin, apoptozun yürütülmesi için ihtiyaç duyulan enerjiyi kısmen ya da tamamen karşılayabileceğini akla getirmektedir. Bu fikrimizi destekleyen bir çalışmada, MPTP inhibisyonu ile birlikte ATP üretimi için glikolitik bir substrat (fruktoz) kullanılması ve glisin ile hücre membran stabilizasyonu sağlanması halinde, APAP hasarına bağlı nekrozun geçici olarak engellendiği, kaspaz 3'ün aktive olduğu ve apoptotik hücre ölümünün gözlemlendiği bildirilmiştir (Kon vd. 2004).

Çalışmamız APAP karaciğer hasarında primer hücre ölüm biçiminin nekroz olduğu bilgisine karşı çıkmamakla birlikte, aktivasyonu kabul edilmeyen ya da net olarak gösterilemeyen kaspaz 3'ün doza bağlı olarak aktive olabileceğini göstermektedir. Terminolojik karışıklıkları önlemek amacıyla, çeşitli toksikolojik patoloji derneklerinin ortaklığında yürütülen INHAND (Uluslararası Adlandırma ve Tanı Kriterlerinin Uyumlaştırılması) projesi kapsamında, apoptoz ve nekrozun Hematoksilen-Eozin boyalı kesitlerde ayırımına ilişkin apoptoz/nekroz çalışma grubunun önerileri yayınlanmıştır (Elmore vd. 2016). Buna göre, bulgular bölümünde bahsettiğimiz hipereozinofilik sitoplazmalı ve piknotik çekirdekli hepatositler ile kılavuzda apoptotik olarak tanımlanması önerilen hepatositler, morfolojik olarak uyumlu görünmektedir. Bu durum ve kaspaz 3 gibi efektör kaspazların aktivasyonunda apoptozdan dönülemeyeceğine dair genel kabul (Nano vd. 2023; Schwabe ve Luedde, 2018) göz önüne alındığında, çalışmamızdaki pozitif hücrelerin apoptoza sevk edildikleri söylenebilir. Diğer taraftan, HeLa hücrelerinin kaspaz 3 aktivasyonundan sağ kurtulabildikleri (Nano vd. 2023), fare primer hepatositlerinin artan kaspaz 3 aktivitesine rağmen ölmedikleri, kaspaz 3'ün LDL (low density lipoprotein) reseptörlerini artırarak lipid metabolizmasında görev alabileceği gösterilmiştir (Pham vd. 2016). Bu nedenle, aktivasyonunu gösterdiğimiz kaspaz 3'ün apoptoz dışında ya da apoptozla birlikte farklı bir fonksiyona da katılma ihtimali vardır.

Kaspaz 8, apoptozun ekstrinsik yolağındaki başlatıcı kaspazlar arasındadır (Orning ve Lien, 2021). APAP toksikasyonunda aktivasyonunu bildiren çalışmalara (Hamid Boulares vd. 2002; Noda vd. 2022; Wang vd. 2017), kaspaz 3 bölümünde bahsedilen literatürde aynı gerekçelerle karşı çıkmaktadır. Çalışmamızda APAP uygulamasının kaspaz 8 enzim immün reaksiyonunu anlamlı derecede artırdığı, en yüksek seviyenin APAP+NGF+SB203580 grubunda olduğu görülmüştür. Kaspaz 8 seviyelerinde gözlenen artışlara, kaspaz 3 bölümünde izah etmeye çalıştığımız APAP

dozu, oksidatif stres ve mitokondri fonksiyonları arasındaki neden sonuç ilişkilerinin etkili olabileceği düşünülmüştür. APAP+NGF+SB203580 grubu, INHAND kılavuzunda (Elmore vd. 2016) önerilen apoptotik hücre morfolojisiyle uyumlu hücrelerin göreceli olarak daha fazla olduğu, hasar skorunun ve proapoptotik sitokin TNF- $\alpha$  ekspresyonunun en yüksek seviyede tespit edildiği gruptur. Bu durum ile APAP uygulanan gruplarda kaspaz 8 ve TNF- $\alpha$  ölçümlerini gösteren grafiklerin benzer dağılımda olmaları, TNF- $\alpha$  aracılı hepatosit apoptozunun uyarılmış olabileceğini akla getirmektedir. Ancak çalışmamızda kullanılan antikör bölünmüş (aktif) kaspaz 8 enzimine spesifik olmadığından, enzimin ekspresyon ya da aktivasyonuna bağlı hangi yönde artış gösterdiği konusunda ayırım yapılamamıştır. Ayrıca kaspaz 8'in apoptoz dışında piroptoz ve otofaji modülasyonuna katılması, nekroptoz için inhibitör olması, çeşitli inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonuna aracılık etmesi gibi birçok farklı olayda görev alabileceği bildirildiğinden (Orning ve Lien, 2021; Salvesen ve Walsh, 2014), bu hususta kesin bir kanıya varılamamıştır.

APAP hepatotoksitesinde hücre ölüm türünün nekroz olduğu kabul edilmekte, apoptozun gözlendiğini bildiren çalışmalar tatmin edici veriler sunmadıkları gerekçesiyle reddedilmektedir. Tartışmaların dikkat çeken tarafı, mitokondriyal Bax translokasyonuna, mitokondriden sitokrom c ve Smac/DIABLO gibi apoptotik uyarıcılar ile apoptozu indükleyen faktör (AIF) gibi kaspaz bağımsız ölüm uyarıcıları salınmasına rağmen, apoptozun ya da nekroz harici diğer bir ölüm türünün neden uyarılmadığı sorusunun cevapsız bırakılmasıdır. Spesifik antikörlerle gösterdiğimiz kaspaz 3 aktivasyonu ve az sayıdaki apoptotik morfolojiyle uyumlu hepatositler, APAP hasarında doza bağlı olarak apoptotik hücre ölümünün görülebileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, yeni keşiflerle birlikte hücre ölümü terminolojisi sürekli genişlemektedir. Bu alandaki gelişmeleri değerlendiren Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi (NCCD - Nomenclature Committee on Cell Death) tarafından, genetik, biyokimyasal ve işlevsel kriterlere dayalı hücre ölüm türlerine dair bir sınıflandırma oluşturulmuştur (Galluzzi vd. 2018). Ancak sınıflandırmada yer almayan yeni ölüm türlerinin keşfi, bir taraftan aydınlatılmaya çalışılan sinyal yolları ile diğer moleküler detaylar, bu alandaki karmaşayı çözmek için yeterli olmamıştır. Artan bilgiyle birlikte, farklı hücre ölümü süreçlerinin moleküler mekanizmaları birbirleriyle bağlantı halinde olduğu ve bazı durumlarda birlikte etkinleştirilebildiği anlaşılmıştır (Park vd. 2023). APAP hasarı literatüründeki

tartışmaların cevapsız bıraktığı sorular, çalışmamızda kaspazlara ilişkin sunduğumuz veriler ile hücre ölümü alanındaki dinamik gelişmeler göz önüne alındığında, ileri bir tarihte APAP hepatotoksitesinde doza bağlı olarak apoptozun ya da nekroz dışında farklı bir veya birden fazla hücre ölüm türünün ortaya konulması mümkün olabilir.

NGF, nöronal farklılaşma ve hayatta kalmanın önemli düzenleyicilerindedir. Sinir doku dışındaki işlevleri yeni yeni ortaya çıkarılmaktadır. Karaciğerde oluşturulan kolestatik hasar, APAP'ın da dahil olduğu kimyasal hasar ve fibrozis modellerinde NGF ekspresyonu artmaktadır. Çeşitli karaciğer hasarı modellerinde antioksidatif, antiapoptotik özellikleriyle hepatoprotektif rol oynadığı, fibrozisi artırıcı ya da azaltıcı etkilerinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Atorrasagasti vd. 2021; Oakley vd. 2003; Tsai vd. 2014, 2018; Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013).

Çalışmamızda NGF ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemle ölçülmüştür. Kontrol ve APAP grupları karşılaştırıldığında yukarıdaki literatür bilgisiyle uyumlu olarak, APAP uygulamasının hepatositlerde NGF ekspresyonunu anlamlı biçimde artırdığı görülmüştür. APAP uygulanan gruplar arasında APAP+SB203580 grubundaki NGF ekspresyonunun, APAP ve APAP+NGF grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, hasar sırasında hepatositlerde NGF ekspresyonunun artış gösterdiğine dair literatür göz önüne alındığında olağan görünmektedir. Çalışmamızda hasar skoru da benzer şekilde artış göstermiş, p38 inhibisyonu hasar skorunu artırmıştır. APAP+NGF+SB203580 grubunda artma eğilimi gösterse de eksojen NGF uygulanan APAP gruplarında, NGF ekspresyonunda anlamlı bir artış görülmemiştir. Bu sonuç, eksojen büyüme faktörü uygulamasının faktörün endojen ekspresyonunu etkilemesine (Hashimoto vd. 2000; Lu vd. 2004) ya da çalışma süresinin ekspresyon üzerinde etkili olmasına bağlanmıştır.

Amaçlarından biri APAP hasarında potansiyel NGF etkilerini incelemek olan çalışmamızın sonunda, eksojen NGF uygulamasının 150 mg/kg dozla oluşturulan APAP hasarında koruyucu etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. APAP+NGF grubunun hasar skoru APAP grubuyla farklılık göstermemiştir. Eksojen NGF p38 inhibisyonu ile birlikte uygulandığında (APAP+NGF+SB203580 grubu) ise hasar skoru anlamlı biçimde en yüksek değere ulaşmıştır. Bu son durumdan, muhtemel ilişkisi nedeniyle p38 bölümünde bahsedilecektir.

APAP hasarına karşı NGF'nin etkilerini araştıran literatürde bulabildiğimiz tek çalışmada, NGF'nin antioksidan genlerin transkripsiyonunu uyararak APAP hasarına karşı koruyucu olabileceği bildirilmiştir (Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013). Sonucu bakımından uyumsuz görünen çalışma, tasarım biçimiyle de çalışmamızdan oldukça farklıdır. Söz konusu çalışmada 300 mg/kg APAP kullanımı ve 3. saat sonunda deneyin sonlandırılması ile eksojen NGF uygulaması yerine antikorla NGF blokajı tercih edilmiştir. Ayrıca, karaciğer hasarının derecesini ve koruyuculuğu değerlendirebilecek histopatolojik bulgular ile kan transaminaz seviyeleri gibi veriler sunulmamıştır. Dolayısıyla, tasarımı ve verileri itibariyle iki çalışma karşılaştırılabilir durumda değildir.

Çalışmamızda eksojen NGF uygulamasının dikkat çekici etkisi kaspaz 3 aktivasyonu üzerinde olmuştur. APAP uygulamasına bağlı aktivasyonunu gösterdiğimiz kaspaz 3 seviyesi, APAP+NGF grubunda diğer gruplardan anlamlı biçimde yüksek ölçülmüştür. p38 blokajı uyguladığımız APAP+NGF+SB203580 grubunda ise aktif kaspaz 3 seviyesinin düştüğu görülmüştür. Eksojen NGF uygulanmayan APAP+SB203580 grubunda ekspresyon seviyesi daha aşağıya düşmüştür. Bu bulgulara dayanarak, APAP hasarında eksojen NGF uygulamasının aktive kaspaz 3 seviyesinin artışına neden olduğu ve bu artışa p38 MAPK sinyal yolağının aracılık ettiği düşünölmüştür. Düşüncemizi destekleyen in vitro bir çalışmada, NGF'nin hepatositlerde p75NTR uyarımıyla p38 MAPK fosforilasyonuna ve devamında kaspaz 3 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Kaspaz 3 aktivasyonunun apoptozla sonuçlanmadığı, lipid metabolizmasında yer alan genleri düzenleyen sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2'yi (SREBP2) aktive ederek LDL (low density lipoprotein) reseptörlerinin ekspresyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Pham vd. 2016). Ortak araştırmacıları içeren diğer bir çalışmada da NGF'nin aynı reseptör ve p38 sinyal yolağı üzerinden kaspaz 3 ile kompleks halindeki kaspaz 2'nin aktivasyonuna da neden olduğu gösterilmiştir (Pham vd. 2019).

Hücresinin yanıtını yönlendirmek üzere çeşitli stres uyaranlarına karşı aktive olan p38 MAPK, karaciğerde aynı zamanda hücre büyümesi ve hacim düzenlemesi, ekstraselöler matriks üretimi, glukoneogenez, lipogenez, iyon ve safra tuzu taşınması dahil çok sayıda fonksiyona katılmaktadır. Karaciğerin farklı hasar modellerinde koruyucu ya da hasarı üstlenici rolleri bildirilmiştir (Fortier vd. 2019; Klintman vd. 2005; Rius-Pérez vd. 2019; Sreekanth vd. 2016; Westenberger vd. 2021; Xu vd. 2008).

APAP hepatotoksitesinde de aktivasyonu artan p38 sinyalinin toksisitenin patogenezinde yer almadığı, MAPK ailesinin diğer üyesi JNK yolağının hasardan doğrudan sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Nakagawa vd. 2008; Ramachandran ve Jaeschke, 2017; Zhang vd. 2017).

Çalışmamızda, karaciğer örneklerinden yapılan gerçek zamanlı PZR analizi vasıtasıyla, p38 MAPK'nin mRNA ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre APAP grubunda tespit ettiğimiz anlamlı artış, p38 MAPK'nin APAP doz aşımına transkripsiyonel olarak yanıt verdiğini göstermektedir. APAP uygulanan gruplar arasında ise p38 inhibisyonu uygulanan iki grup da dahil, anlamlı fark oluşmamıştır. Çalışmada kullandığımız p38 inhibitörü SB203580, ATP bağlanmasını bloke ederek proteinin fosforilasyonla aktive olmasını engellemektedir (Kyriakis ve Avruch, 2012). Dolayısıyla, blokaj etkisi proteinin aktivasyon sonrası ortaya çıkan fonksiyonlarına yöneliktir. Bu nedenle, aktivasyonu engellenen proteinin transkripsiyonel olarak benzer seviyede yanıtlar vermesi şaşırtıcı bulunmamıştır. Bu açıklamayla uyumlu biçimde SB203580 uygulamasının, p38 mRNA ekspresyonlarındaki benzerliğe rağmen hasar skoru üzerinde anlamlı farklılıklara neden olduğu belirlenmiştir.

APAP+SB203580 grubunun hasar skoru APAP grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Eksojen NGF uygulanan APAP+NGF+SB203580 grubunda skor daha da yükselmiştir. p38 sinyalinin inhibe edildiği APAP gruplarında hasarlı hücre oranının anlamlı düzeyde artması, p38 MAPK'nin APAP hasarına karşı koruyucu rol üstlenmekte olduğunu düşündürmüştür. Buna paralel olarak, APAP hasarında primer sorumlu olarak JNK yolağını işaret eden bir çalışmada, p38 sinyalinin koruyucu potansiyeli bulunduğu bildirilmiştir (Zhang vd. 2017). Aynı gruplarda benzer şekilde anlamlı artışlar gösteren TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 ekspresyonlarına ilişkin verilerimiz de p38 sinyalinin koruyuculuğunu destekler niteliktedir. APAP hasarında p38 MAPK aktivasyonu JNK ve ERK yolaklarıyla birlikte gerçekleşir (Cai vd. 2022; Shen vd. 2023). p38 sinyalinin engellenmesi halinde JNK aktivasyonunun güçlendiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Henklova vd. 2008; Zhang vd. 2017). Bununla birlikte p38, Na<sup>+</sup> geçirgen iyon kanallarının kontrolüyle hücre hacminin düzenlenmesine de katılır (Feranchak vd. 2001). Dolayısıyla p38 aktivitesinin engellenmesi, JNK veya farklı bir yolağın aktivitesinde değişime ya da hücre membranının hacim düzenleyici fonksiyonlarında aksamaya neden olarak, hasar skorunu artırmış olabilir. Bu nedenle

p38 inhibisyonuna bağlı skor artışının, bahsedilen olası etkiler ya da sinyalin henüz ortaya çıkarılmamış başka bir özelliğinden mi kaynaklandığına dair çıkarım yapılamamıştır. Benzer belirsizlik, inhibisyonla birlikte uygulandığında hasarın derecesini artıran NGF etkileri için daha fazladır. Literatürde bu konuda yönlendirici bilgi eksikliği bulunan NGF'nin, epitelyal ve nöronal hücrelerde hücre sıvısı ve iyon değişiminin düzenlenmesinde rol aldığı ortaya konulmuştur (Boonstra vd. 1983; Shimko vd. 2014). Farklı reseptörleri üzerinden farklı yolları uyarabilen NGF'nin, p38 inhibisyonu ile oluşan hasara additif etkiyle ya da p38 bağımsız bir mekanizmayla katılarak hasar skorunu artırmış olabileceği düşünülmüştür.

Tartışmanın sonuna gelindiğinde, bir dipnot düşmenin yararlı olacağı düşünülmüştür. Çalışmamızdaki SB203580 bileşiminin uygulamaya hazırlanmasında kullanılan çözücüler arasında dimetil sülfoksit (DMSO) bulunmaktadır. DMSO, bir sitokrom p450 inhibitörüdür. Hepatotoksisite çalışmalarında DMSO bulunmasının APAP hasarını bloke edebileceğini ve bu nedenle sonuçların yorumlanmasını zorlaştırabileceğini bildiren yayınlar mevcuttur (Jaeschke vd. 2018b; Zhang vd. 2017).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, APAP hepatotoksitesine karşı eksojen NGF uygulamasının koruyucu etkisinin bulunup bulunmadığı, olası etkisine p38 MAPK sinyal yolağının aracılık edip etmediği ve p38 sinyalinin APAP toksitesinde potansiyel koruyucu rolü araştırılmıştır. Bu amaçla 9-10 haftalık erkek BALB/c farelerde 150 mg/kg APAP ile oluşturulan akut karaciğer hasarı modelinde;

Yirmi dört saatlik deney süresi sonunda, APAP metabolizmasının yoğun olduğu sentrilobüler bölge hepatositlerinde hidropik dejenerasyonla karakterize hasar oluşmuş, nekroz ve yangı gözlenmemiştir. Ayrıca, dejenere hepatositlerin arasına serpiştirilmiş tek hücreler halinde, piknotik çekirdekli ve hipereozinofilik sitoplazmalı hepatositler görülmüştür. Karaciğer dokularının deney süresi sonunda oksidatif stresle başa çıkabildikleri tespit edilmiştir. GSH rezervlerinin yenilenebilmiş ya da korunabilmiş durumunun, oksidatif stresin kontrolünde ve nekroz ile yangı oluşumunun engellenmesinde etkili ana faktör olduğu kanaatine varılmıştır. Yüz elli mg/kg APAP dozunda hepatositlerde JNK aktivasyonu ve mitokondri disfonksiyonunun geri dönüşlü oluşu, muhtemelen sonucu belirleyen diğer faktörler olarak düşünülmüştür.

APAP hasarına dair literatürün ağırlıklı kısmında, hepatositlerde apoptozun varlığına ve kaspazların aktivasyonuna karşı çıkmaktadır. Çalışmamızda, kaspaz 3'ün 150 mg/kg dozla oluşturulan APAP hasarında hepatositlerde aktive olduğu immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Aktivasyonun gösterilebilmesi, oksidan moleküllerin tamponlanarak hücre redoks durumunun korunabilmiş olmasına bağlanmıştır. Kaspaz 3 aktivasyonu gösterilmiş ve apoptotik morfolojiyle uyumlu hepatositler tespit edilmiş olmasına rağmen, hücrelerin akıbetinin apoptozla sonlanıp sonlanmadığı ortaya konulamamıştır.

Güncel literatür ışığında çalışmamız verilerinden yola çıkılarak, hasarın patogeneziyle ilişkin şu varsayımda bulunmak mümkün görünmektedir: APAP hepatotoksitesinde kaspaz 3 enzimi, 150 mg/kg ya da daha düşük seviyeli doz

aşımında aktive olur. Muhtemelen, JNK aktivasyonunun ve mitokondriyal disfonksiyonun kalıcı hale geldiği doza erişildiğinde, hücrenin oksidan temizleme kapasitesi aşılır. Bu noktadan sonra, oksidatif strese duyarlı ve ATP varlığına ihtiyaç duyan kaspazların aktivasyonu engellenerek, hasarlı hepatositler nekroza yönelir. Bu varsayıma göre, çalışmanın 150 mg/kg'dan başlayarak artan dozlarla tasarlanıp, mitokondriyal fonksiyonların kalıcı kaybı ve nekrozun başladığı doz seviyesinin tespiti ile moleküler olayların bu seviyenin alt ve üstünde farklılık gösterip göstermediğine odaklanılması, literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda, çeşitli karaciğer hasarı modellerinde hepatoprotektif etkisi ortaya konulan ve APAP hasarında da aynı yönde etki gösterdiği öne sürülen NGF'nin, eksojen olarak uygulandığında APAP hasarına karşı koruyucu etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. Eksojen NGF, p38 sinyali bloke edildiğinde hasarın artışına neden olmuştur. NGF'nin bu hasar artırıcı etkisinin p38'den bağımlı ya da bağımsız gerçekleştiğine dair çıkarım yapmaya, çalışma verilerimiz ve mevcut literatür bilgileri yeterli olmamıştır. Eksojen NGF uygulaması için elde ettiğimiz dikkat çekici bulgu ise kaspaz aktivasyonu üzerinde olmuştur. Verilerimize göre, APAP hasarında uygulanan eksojen NGF, p38 MAPK sinyali aracılığıyla aktive kaspaz 3 seviyesini artırmaktadır.

Literatüre göre p38 MAPK sinyal yolağı APAP karaciğer hasarının patogeneze katılmamakla beraber, hasara karşı koruyucu potansiyel taşımaktadır. Çalışmamızda, SB203580 kullanılarak sinyal inhibe edildiğinde hasarın arttığı ve sinyal blokajına eksojen NGF eklendiğinde hasarın daha da artış gösterdiği gözlenmiştir. Buradan yola çıkılarak, oksidatif stresin kontrol edilebildiği ve henüz nekrozun gözlenmediği APAP dozlarında, p38 MAPK sinyalinin koruyucu olduğu düşünülmüştür. Ancak sinyal inhibisyonunda gözlenen hasardaki artışın, p38'in etkileşimde olduğu JNK veya başka bir hücre içi sinyal yolağının aktivitesindeki değişimle mi ilişki olduğu ya da p38'in hücre hacim düzenlemesi gibi homeostaza yönelik herhangi bir fonksiyonundaki aksamaya mı bağlı olduğuna dair fikir yürütülememiştir. Konunun aydınlığa çıkarılması amacıyla, p38 sinyaliyle birlikte JNK, ERK, vb. diğer hücre içi sinyallerin de izlenmesi yerinde olacaktır. Ayrıca, çalışmanın farklı zaman dilimlerine ayrılmış şekilde tasarlanıp, PZR'ye ek olarak Western blot gibi teknikler yardımıyla eksprese edilen proteinin ne kadarının aktive olduğunun da gösterilmesi, patogeneze moleküler olayların etkileşim ve değişimlerini ortaya çıkarmak açısından değerli görünmektedir.

## KAYNAKLAR

Agarwal, R., MacMillan-Crow, L. A., Rafferty, T. M., Saba, H., Roberts, D. W., Fifer, E. K., James, L. P., and Hinson, J. A. (2011). Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(1), 110–116. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.176321>

Akakpo, J. Y., Ramachandran, A., Orhan, H., Curry, S. C., Rumack, B. H., and Jaeschke, H. (2020). 4-methylpyrazole protects against acetaminophen-induced acute kidney injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 409, 115317. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115317>

Alastra, G., Aloe, L., Baldassarro, V. A., Calzà, L., Cescatti, M., Duskey, J. T., Focarete, M. L., Giacomini, D., Giardino, L., Giraldo, V., Lorenzini, L., Moretti, M., Parmeggiani, I., Sannia, M., and Tosi, G. (2021). Nerve Growth Factor Biodelivery: A Limiting Step in Moving Toward Extensive Clinical Application? *Frontiers in Neuroscience*, 15, 695592. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.695592>

Allameh, A., Niayesh-Mehr, R., Aliarab, A., Sebastiani, G., and Pantopoulos, K. (2023). Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants*, 12(9), 1653. <https://doi.org/10.3390/antiox12091653>

Aloe, L. (1988). The effect of nerve growth factor and its antibody on mast cells in vivo. *Journal of Neuroimmunology*, 18(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(88\)90129-4](https://doi.org/10.1016/0165-5728(88)90129-4)

Aloe, L., Rocco, M., Balzamino, B., and Micera, A. (2015). Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. *Current Neuropharmacology*, 13(3), 294–303. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150403231920>

Aloe, L., Rocco, M. L., Bianchi, P., and Manni, L. (2012). Nerve growth factor: From the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-239>

Anderson, B. J. (2008). Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. *Paediatric Anaesthesia*, 18(10), 915–921. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x>

Antoine, D. J., Williams, D. P., Jenkins, A. K., Regan, S. L., Sathish, J. G., Kitteringham, N. R., and Park, B. K. (2009). High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicological Sciences*, 112(2), 521–531. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp235>

Aranda-Rivera, A. K., Cruz-Gregorio, A., Arancibia-Hernández, Y. L., Hernández-Cruz, E. Y., and Pedraza-Chaverri, J. (2022). RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. *Oxygen*, 2(4), 437–478. <https://doi.org/10.3390/oxygen2040030>

Araújo, R. F. de, Martins, D. B. G., and Borba, M. A. C. S. M. (2016). Oxidative Stress and Disease. In *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2* (pp. 185–199). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/65366>

Arauz, J., Ramos-Tovar, E., and Muriel, P. (2016). Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annals of Hepatology*, 15(2), 160–173. <https://doi.org/10.5604/16652681.1193701>

Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., and Muzio, L. Lo. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 271–280. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>

- Arzuk, E., Tokdemir, M., and Orhan, H. (2022). Mitochondrial versus microsomal bioactivation of paracetamol by human liver and kidney tissues. *Toxicology Letters*, 363, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.05.005>
- Atorrasagasti, C., Piccioni, F., Borowski, S., Tirado-González, I., Freitag, N., Cantero, M. J., Bayo, J., Mazzolini, G., Alaniz, L. D., Blois, S. M., and Garcia, M. G. (2021). Acceleration of TAA-Induced Liver Fibrosis by Stress Exposure Is Associated with Upregulation of Nerve Growth Factor and Glycopattern Deviations. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22105055>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., and Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Ayoub, S. S. (2021). Paracetamol (acetaminophen): A familiar drug with an unexplained mechanism of action. *Temperature*, 8(4), 351–371. <https://doi.org/10.1080/23328940.2021.1886392>
- Barker, P. A., Mantyh, P., Arendt-Nielsen, L., Viktrup, L., and Tive, L. (2020). Nerve growth factor signaling and its contribution to pain. *Journal of Pain Research*, 13, 1223–1241. <https://doi.org/10.2147/JPR.S247472>
- Bartesaghi, S., and Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biology*, 14, 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009>
- Bessems, J. G. M., and Vermeulen, N. P. E. (2001). Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(1), 55–138. <https://doi.org/10.1080/20014091111677>
- Bhushan, B., and Apte, U. (2019). Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *American Journal of Pathology*, 189(4), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.12.006>
- Bhushan, B., and Apte, U. (2023). Regeneration and Recovery after Acetaminophen Hepatotoxicity. *Livers*, 3(2), 300–309. <https://doi.org/10.3390/livers3020021>
- Bhushan, B., Walesky, C., Manley, M., Gallagher, T., Borude, P., Edwards, G., Monga, S. P. S., and Apte, U. (2014). Pro-regenerative signaling after acetaminophen-induced acute liver injury in mice identified using a novel incremental dose model. *American Journal of Pathology*, 184(11), 3013–3025. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.07.019>
- Blakely, P., and McDonald, B. R. (1995). Acute renal failure due to acetaminophen ingestion. *Journal of the American Society of Nephrology*, 6(1), 48–53. <https://doi.org/10.1681/asn.v6i148>
- Blazka, M. E., Elwell, M. R., Holladay, S. D., Wilson, R. E., and Luster, M. I. (1996). Histopathology of Acetaminophen-Induced Liver Changes: Role of Interleukin 1 $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *Toxicologic Pathology*, 24(2), 181–189. <https://doi.org/10.1177/019262339602400206>
- Boonstra, J., Moolenaar, W. H., and Harrison, P. H. (1983). Ionic Responses and Growth Stimulation Induced by Nerve Growth Factor and Epidermal Growth Factor in Rat Pheochromocytoma (PC12) Cells. *Journal of Cell Biology*, 97(1), 92–98. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.1.92>
- Boschen, K. E., and Klintsova, A. Y. (2017). Neurotrophins in the Brain: Interaction With Alcohol Exposure During Development. In G. Litwack (Ed.), *Vitamins and Hormones* (Vol. 104, pp. 197–242). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.008>
- Bruderer, R., Bernhardt, O. M., Gandhi, T., Miladinović, S. M., Cheng, L. Y., Messner, S., Ehrenberger, T., Zanotelli, V., Butscheid, Y., Escher, C., Vitek, O., Rinner, O., and Reiter, L. (2015). Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. *Molecular and Cellular Proteomics*, 14(5), 1400–1410. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044305>
- Burton, J. C., Antoniadis, W., Okalova, J., Roos, M. M., and Grimsey, N. J. (2021). Atypical p38 signaling, activation, and implications for disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4183. <https://doi.org/10.3390/ijms22084183>

- Cai, X., Cai, H., Wang, J., Yang, Q., Guan, J., Deng, J., and Chen, Z. (2022). Molecular Pathogenesis of Acetaminophen-Induced Liver Injury and its Treatment Options. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 23(4), 265–285. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2100977>
- Canovas, B., and Nebreda, A. R. (2021). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(5), 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>
- Cao, P., Sun, J., Sullivan, M. A., Huang, X., Wang, H., Zhang, Y., Wang, N., and Wang, K. (2018). Angelica sinensis polysaccharide protects against acetaminophen-induced acute liver injury and cell death by suppressing oxidative stress and hepatic apoptosis in vivo and in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 1133–1139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.139>
- Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/mubr.00031-10>
- Ceci, F. M., Ferraguti, G., Petrella, C., Greco, A., Ralli, M., Iannitelli, A., Carito, V., Tirassa, P., Chaldakov, G. N., Messina, M. P., Ceccanti, M., and Fiore, M. (2020). Nerve Growth Factor in Alcohol Use Disorders. *Current Neuropharmacology*, 19(1), 45–60. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200429003239>
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., and Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13926–13931. <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>
- Cigremis, Y., Turel, H., Adiguzel, K., Akgoz, M., Kart, A., Karaman, M., and Ozen, H. (2009). The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 323(1–2), 31–38. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9961-8>
- Clark, A. R., Dean, J. L. E., and Saklatvala, J. (2009). The p38 MAPK pathway mediates both antiinflammatory and proinflammatory processes: Comment on the article by Damjanov and the editorial by Genovese. *Arthritis and Rheumatism*, 60(11), 3513–3514. <https://doi.org/10.1002/art.24919>
- Coles, B., Wilson, I., Wardman, P., Hinson, J. A., Nelson, S. D., and Ketterer, B. (1988). The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: A stopped-flow kinetic study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 264(1), 253–260. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90592-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90592-9)
- Connor, B., and Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research Reviews*, 27(1), 1–39. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00004-6)
- Corsini, A., and Bortolini, M. (2013). Drug-induced liver injury: The role of drug metabolism and transport. *Journal of Clinical Pharmacology*, 53(5), 463–474. <https://doi.org/10.1002/jcph.23>
- Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1358–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Deister, C., and Schmidt, C. E. (2006). Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. *Journal of Neural Engineering*, 3(2), 172–179. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/3/2/011>
- Dong, D., Xu, L., Han, X., Qi, Y., Xu, Y., Yin, L., Liu, K., and Peng, J. (2014). Effects of the Total Saponins from Rosa laevigata Michx Fruit against Acetaminophen-Induced Liver Damage in Mice via Induction of Autophagy and Suppression of Inflammation and Apoptosis. *Molecules*, 19(6), 7189–7206. <https://doi.org/10.3390/molecules19067189>

- Du, K., Ramachandran, A., and Jaeschke, H. (2016). Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology*, *10*, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>
- Du, K., Ramachandran, A., Weemhoff, J. L., Woolbright, B. L., Jaeschke, A. H., Chao, X., Ding, W. X., and Jaeschke, H. (2019). Mito-Tempo Protects against Acute Liver Injury but Induces Limited Secondary Apoptosis during the Late Phase of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, *93*(1), 163–178. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2331-8>
- Du, K., Williams, C. D., McGill, M. R., and Jaeschke, H. (2014). Lower susceptibility of female mice to acetaminophen hepatotoxicity: Role of mitochondrial glutathione, oxidant stress and c-jun N-terminal kinase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *281*(1), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.09.002>
- Du, Z., Ma, Z., Lai, S., Ding, Q., Hu, Z., Yang, W., Qian, Q., Zhu, L., Dou, X., and Li, S. (2022). Atractylenolide I Ameliorates Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury via the TLR4/MAPKs/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 797499. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.797499>
- Elmore, S. A., Dixon, D., Hailey, J. R., Harada, T., Herbert, R. A., Maronpot, R. R., Nolte, T., Rehg, J. E., Rittinghausen, S., Rosol, T. J., Satoh, H., Vidal, J. D., Willard-Mack, C. L., and Creasy, D. M. (2016). Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicologic Pathology*, *44*(2), 173–188. <https://doi.org/10.1177/0192623315625859>
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, *37*(4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, *38*(12), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>
- Fang, Y. Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, *18*(10), 872–879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Feranchak, A. P., Berl, T., Capasso, J., Wojtaszek, P. A., Han, J., and Fitz, J. G. (2001). p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na<sup>+</sup> permeability. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(10), 1495–1504. <https://doi.org/10.1172/jci12190>
- Flower, R. J., and Vane, J. R. (1972). Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the antipyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature*, *240*(5381), 410–411. <https://doi.org/10.1038/240410a0>
- Fortier, M., Cadoux, M., Boussetta, N., Pham, S., Donné, R., Couty, J. P., Desdouets, C., and Celton-Morizur, S. (2019). Hepatospecific ablation of p38 $\alpha$  MAPK governs liver regeneration through modulation of inflammatory response to CCl<sub>4</sub>-induced acute injury. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51175-z>
- Freo, U., Ruocco, C., Valerio, A., Scagnol, I., and Nisoli, E. (2021). Paracetamol: A review of guideline recommendations. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(15). <https://doi.org/10.3390/jcm10153420>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ...and Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, *25*(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gamal, W., Treskes, P., Samuel, K., Sullivan, G. J., Siller, R., Srsen, V., Morgan, K., Bryans, A., Kozłowska, A., Koulovasilopoulos, A., Underwood, I., Smith, S., Del-Pozo, J., Moss, S., Thompson, A. I., Henderson, N. C., Hayes, P. C., Plevris, J. N., Bagnaninchi, P. O., and Nelson, L. J. (2017). Low-dose acetaminophen induces early disruption of cell-cell tight junctions in human hepatic cells and mouse liver. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep37541>
- Goldman, J. A. and Poss, K. D. (2020). Gene regulatory programmes of tissue regeneration. *Nature Reviews Genetics*, *21*(9), 511–525. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0239-7>

- Gong, L., Liao, L., Dai, X., Xue, X., Peng, C., and Li, Y. (2021). The dual role of immune response in acetaminophen hepatotoxicity: Implication for immune pharmacological targets. *Toxicology Letters*, *351*, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.08.009>
- Gräb, J., and Rybniker, J. (2019). The Expanding Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Programmed Host Cell Death. *Microbiology Insights*, *12*, 1–3. <https://doi.org/10.1177/1178636119864594>
- Green, R. M., and Flamm, S. (2002). AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*, *123*(4), 1367–1384. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36061>
- Griffin, N., Faulkner, S., Jobling, P., and Hondermarck, H. (2018). Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacological Research*, *135*, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.019>
- Grotto, D., Santa Maria, L., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., Pomblum, V. J., Rocha, J. B. T., and Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, *32*(1), 169–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>
- Gu, R., Liang, A., Liao, G., To, I., Shehu, A., and Ma, X. (2022). Roles of Cofactors in Drug-Induced Liver Injury: Drug Metabolism and Beyond. *Drug Metabolism and Disposition*, *50*(5), 646–654. <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000457>
- Gu, X., and Manautou, J. E. (2012). Molecular Mechanisms Underlying Chemical Liver Injury. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *14*, e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
- Guicciardi, M. E., Malhi, H., Mott, J. L., and Gores, G. J. (2013). Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Comprehensive Physiology*, *3*(2), 977–1010. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120020>
- Gujral, J. S., Knight, T. R., Farhood, A., Bajt, M. L., and Jaeschke, H. (2002). Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: Apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicological Sciences*, *67*(2), 322–328. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.2.322>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., and Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *19*(3), 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Gutiérrez-Uzquiza, Á., Arechederra, M., Bragado, P., Aguirre-Ghiso, J. A., and Porras, A. (2012). p38 $\alpha$  Mediates Cell Survival in Response to Oxidative Stress via Induction of Antioxidant Genes: EFFECT ON THE p70S6K PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(4), 2632–2642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323709>
- Hamid Boulares, A., Zoltoski, A. J., Stoica, B. A., Cuvillier, O., and Smulson, M. E. (2002). Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-xL sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes. *Pharmacology and Toxicology*, *90*(1), 38–50. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2002.900108.x>
- Han, D., Dara, L., Win, S., Than, T. A., Yuan, L., Abbasi, S. Q., Liu, Z. X., and Kaplowitz, N. (2013). Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: Critical role of mitochondria. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(4), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.01.009>
- Han, J., Wu, J., and Silke, J. (2020). An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling. *F1000Research*, *9*, 1–20. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22092.1>
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D., and Kaplowitz, N. (2008). Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(20), 13565–13577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708916200>
- Hashimoto, Y., Kamioka, T., Hosaka, M., Mabuchi, K., Mizuchi, A., Shimazaki, Y., Tsunoo, M., and Tanaka, T. (2000). Exogenous 20K growth hormone (GH) suppresses endogenous 22K GH secretion in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *85*(2), 601–606. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.2.6377>

- Helal, M. G., and Samra, Y. A. (2020). Irbesartan mitigates acute liver injury, oxidative stress, and apoptosis induced by acetaminophen in mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(12), e22447. <https://doi.org/10.1002/jbt.22447>
- Henklova, P., Vrzal, R., Papouskova, B., Bednar, P., Jancova, P., Anzenbacherova, E., Ulrichova, J., Maurel, P., Pavek, P., and Dvorak, Z. (2008). SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *European Journal of Pharmacology*, 593(1–3), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.007>
- Hinson, J. A. (2013). Mechanisms of acetaminophen-induced liver disease. In N. Kaplowitz and L. D. DeLeve (Eds.), *Drug-Induced Liver Disease* (3rd ed., pp. 305–329). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387817-5.00019-4>
- Hinson, J. A., Pike, S. L., Pumford, N. R., and Mayeux, P. R. (1998). Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 11(6), 604–607. <https://doi.org/10.1021/tx9800349>
- Hinson, J. A., Roberts, D. W., and James, L. P. (2010). Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Necrosis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 196(196), 369–405. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_12)
- Hodgman, M. J., and Garrard, A. R. (2012). A Review of Acetaminophen Poisoning. *Critical Care Clinics*, 28(4), 499–516. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.006>
- Högestätt, E. D., Jönsson, B. A. G., Ermund, A., Andersson, D. A., Björk, H., Alexander, J. P., Cravatt, B. F., Basbaum, A. I., and Zygmunt, P. M. (2005). Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31405–31412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501489200>
- Hong, S. W., Lee, H. S., Jung, K. H., Lee, H., and Hong, S. S. (2012). Protective effect of fucoidan against acetaminophen-induced liver injury. *Archives of Pharmacal Research*, 35(6), 1099–1105. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0618-5>
- Hotamisligil, G. S., and Davis, R. J. (2016). Cell signaling and stress responses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006072>
- Hu, J., Ramshesh, V. K., McGill, M. R., Jaeschke, H., and Lemasters, J. J. (2016). Low Dose Acetaminophen Induces Reversible Mitochondrial Dysfunction Associated with Transient c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Mouse Liver. *Toxicological Sciences*, 150(1), 204–215. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv319>
- Hwang, S., Wang, X., Rodrigues, R. M., Ma, J., He, Y., Seo, W., Park, S. H., Kim, S. J., Feng, D., and Gao, B. (2020). Protective and Detrimental Roles of p38 $\alpha$  Mitogen-Activated Protein Kinase in Different Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*, 72(3), 873–891. <https://doi.org/10.1002/hep.31390>
- Iorga, A., Dara, L., and Kaplowitz, N. (2017). Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1–25. <https://doi.org/10.3390/IJMS18051018>
- Ito, Y., Bethea, N. W., Abril, E. R., and McCuskey, R. S. (2003). Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirculation*, 10(5), 391–400. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800204>
- Jaeschke, H. (2019). Emerging novel therapies against paracetamol (acetaminophen) hepatotoxicity. *EBioMedicine*, 46, 9–10. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.054>
- Jaeschke, H., Bajt, M. L., and Ramachandran, A. (2018a). Mechanisms of Acetaminophen Hepatotoxicity: Cell Death Signaling Mechanisms in Hepatocytes. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology* (Third, pp. 460–482). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.02108-5>

- Jaeschke, H., Duan, L., Akakpo, J. Y., Farhood, A., and Ramachandran, A. (2018b). The Role of Apoptosis in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, *118*, 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.025>
- Jaeschke, H., and Ramachandran, A. (2018). Oxidant Stress and Lipid Peroxidation in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Reactive Oxygen Species*, *5*(15), 145–158. <https://doi.org/10.20455/ros.2018.835>
- Jaeschke, H., and Ramachandran, A. (2020a). Acetaminophen-induced apoptosis: Facts versus fiction. *Journal of Clinical and Translational Research*, *6*(2), 36–47. <https://doi.org/10.18053/jctres.06.202002.002>
- Jaeschke, H., and Ramachandran, A. (2020b). Mechanisms and Pathophysiological Significance of Sterile Inflammation During Acetaminophen Hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, *138*, 111240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111240>
- Jaeschke, H., and Ramachandran, A. (2020c). The Role of Oxidant Stress in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Current Opinion in Toxicology*, 20–21, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.03.003>
- Jaeschke, H., and Ramachandran, A. (2024). Acetaminophen Hepatotoxicity: Paradigm for Understanding Mechanisms of Drug-Induced Liver Injury. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *19*, 453–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051122-094016>
- Jaeschke, H., Williams, C. D., Ramachandran, A., and Bajt, M. L. (2012). Acetaminophen hepatotoxicity and repair: The role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver International*, *32*(1), 8–20. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02501.x>
- Jaeschke, H., Xie, Y., and McGill, M. R. (2014). Acetaminophen-Induced Liver Injury: From Animal Models to Humans. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, *2*(3), 153–161. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00014>
- Jozwiak-Bebenista, M., and Nowak, J. Z. (2014). Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, *71*(1), 11–23.
- Kaibori, M., Okumura, T., Sato, K., Nishizawa, M., and Kon, M. (2015). Inducible nitric oxide synthase expression in liver injury: Liver protective effects on primary rat hepatocytes. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, *14*(2), 77–83. <https://doi.org/10.2174/1871528114666160330113227>
- Kamiş, N., and Karabağ Çoban, F. (2019). Parasetamol İndüklü Hepatotoksisite Modelinde Kafeik Asit Fenil Ester' in İnflamasyon ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, *14*(3), 290–298. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.552207>
- Kanu, L. N., and Ciolino, J. B. (2021). Nerve Growth Factor as an Ocular Therapy: Applications, Challenges, and Future Directions. *Seminars in Ophthalmology*, *36*(4), 224–231. <https://doi.org/10.1080/08820538.2021.1890793>
- Kendall, T. J., Henedige, S., Aucott, R. L., Hartland, S. N., Vernon, M. A., Benyon, R. C., and Iredale, J. P. (2009). P75 neurotrophin receptor signaling regulates hepatic myofibroblast proliferation and apoptosis in recovery from rodent liver fibrosis. *Hepatology*, *49*(3), 901–910. <https://doi.org/10.1002/hep.22701>
- Kim, E. K., and Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1802*(4), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>
- Klintman, D., Li, X., Santen, S., Schramm, R., Jeppsson, B., Thorlacijs, H., Eggermont, Senninger, and Clavien. (2005). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Chemokine Production, Leukocyte Recruitment, and Hepatocellular Apoptosis in Endotoxemic Liver Injury. *Annals of Surgery*, *242*(6), 830–839. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000189132.86878.f7>
- Knight, T. R., Ho, Y. S., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2002). Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: Protection by glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *303*(2), 468–475. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.038968>

- Knight, T. R., Kurtz, A., Bajt, M. L., Hinson, J. A., and Jaeschke, H. (2001). Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: Role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicological Sciences*, *62*(2), 212–220. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.212>
- Kon, K., Kim, J. S., Jaeschke, H., and Lemasters, J. J. (2004). Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology*, *40*(5), 1170–1179. <https://doi.org/10.1002/hep.20437>
- Kowalczyk, P., Sulejczak, D., Kleczkowska, P., Bukowska-Oško, I., Kucia, M., Popiel, M., Wietrak, E., Kramkowski, K., Wrzosek, K., and Kaczyńska, K. (2021). Mitochondrial oxidative stress—a causative factor and therapeutic target in many diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13384. <https://doi.org/10.3390/ijms222413384>
- Kuru, B., and Karabağ Çoban, F. (2019). Effect of boron on trace element level and oxidative stress in paracetamol induced hepatotoxicity model. *Journal of Boron*, *4*(2), 92–99. <https://doi.org/10.30728/boron.518606>
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. *Physiological Reviews*, *92*(2), 689–737. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>
- Larrey, D. (2000). Drug-induced liver diseases. *Journal of Hepatology*, *32*(SUPPL.1), 77–88. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)80417-1](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)80417-1)
- Lawan, A., and Bennett, A. M. (2017). Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation in Hepatic Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *28*(12), 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.007>
- Lawson, J. A., Farhood, A., Hopper, R. D., Bajt, M. L., and Jaeschke, H. (2000). The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: Role of neutrophils. *Toxicological Sciences*, *54*(2), 509–516. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.2.509>
- Lehman-McKeeman, L. D., and Ruepp, S. U. (2018). Biochemical and Molecular Basis of Toxicity. In M. A. Wallig, W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, and B. Bolon (Eds.), *Fundamentals of Toxicologic Pathology: Third Edition* (Third, pp. 15–33). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809841-7.00002-2>
- Lemasters, J. J. (1998). The Mitochondrial Permeability Transition: From Biochemical Curiosity to Pathophysiological Mechanism. *Gastroenterology*, *115*(3), 783–786. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70160-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70160-X)
- Li, G., Chen, J. B., Wang, C., Xu, Z., Nie, H., Qin, X. Y., Chen, X. M., and Gong, Q. (2013). Curcumin protects against acetaminophen-induced apoptosis in hepatic injury. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(42), 7440–7446. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7440>
- Li, Q., Chen, F., and Wang, F. (2022). The immunological mechanisms and therapeutic potential in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Cell and Bioscience*, *12*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00921-4>
- Li, R., Wu, H., Xu, Y., Xu, X., Xu, Y., Huang, H., Lv, X., Liao, C., Ye, J., and Li, H. (2025). Underlying mechanisms and treatment of acetaminophen-induced liver injury (Review). *Molecular Medicine Reports*, *31*(4), 106. <https://doi.org/10.3892/mmr.2025.13471>
- Li, R., Zia, Z., and Trush, M. A. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species*, *1*(1), 9–21. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- Li, X., Ni, J., and Chen, L. (2023). Advances in the Study of Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Frontiers in Pharmacology*, *14*, 1239395. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1239395>
- Liao, J., Lu, Q., Li, Z., Li, J., Zhao, Q., and Li, J. (2023). Acetaminophen-Induced Liver Injury: Molecular Mechanism and Treatments from Natural Products. *Frontiers in Pharmacology*, *14*, 1122632. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1122632>
- Liu, Z., Wu, H., and Huang, S. (2021). Role of NGF and its receptors in wound healing (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *21*(6). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10031>

Lorenzini, L., Baldassarro, V. A., Stanzani, A., and Giardino, L. (2021). Nerve Growth Factor: The First Molecule of the Neurotrophin Family. In L. Calzà, L. Aloe, and L. Giardino (Eds.), *Recent Advances in NGF and Related Molecules* (Vol. 1331, pp. 3–10). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-74046-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-74046-7_1)

Lu, J.-B., Liu, Y., Ye, Z.-R., and Shi, J.-Y. (2004). Exogenous basic fibroblast growth factor enhances expression of endogenous basic fibroblast growth factor in a rat brain ischemia model. *Chinese Journal of Neuroscience*, *20*, 290–294.

Ma, D., Wolvers, D., Stanisz, A. M., and Bienenstock, J. (2003). Interleukin-10 and nerve growth factor have reciprocal upregulatory effects on intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *284*(5), R1323–R1329. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00756.2002>

Malhi, H., Gores, G. J. and Lemasters, J. J. (2006). Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Hepatology*, *43*(2 SUPPL. 1), 31–44. doi:10.1002/hep.21062

Malhi, H., Guicciardi, M. E., and Gores, G. J. (2010). Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiological Reviews*, *90*(3), 1165–1194. <https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2009>

Mallet, C., Desmeules, J., Pegahi, R., and Eschalier, A. (2023). An Updated Review on the Metabolite (AM404)-Mediated Central Mechanism of Action of Paracetamol (Acetaminophen): Experimental Evidence and Potential Clinical Impact. *Journal of Pain Research*, *16*, 1081–1094. <https://doi.org/10.2147/JPR.S393809>

Marañón, P., Isaza, S. C., Rey, E., Rada, P., García-García, Y., Dear, J. W., García-Monzón, C., Valverde, Á. M., Egea, J., and González-Rodríguez, Á. (2025). BMP6 participates in the molecular mechanisms involved in APAP hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, *99*(3), 1187–1202. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03954-5>

Marshall, J. S., Stead, R. H., McSharry, C., Nielsen, L., and Bienenstock, J. (1990). The role of mast cell degranulation products in mast cell hyperplasia. I. Mechanism of action of nerve growth factor. *The Journal of Immunology*, *144*(5), 1886–1892. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.144.5.1886>

Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., and de Nadal, E. (2020). The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>

Mazaleuskaya, L. L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., Fitzgerald, G. A., Altman, R. B., and Klein, T. E. (2015). PharmGKB summary: Pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenetics and Genomics*, *25*(8), 416–426. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000150>

McGill, M. R., and Hinson, J. A. (2020). The Development and Hepatotoxicity of Acetaminophen: Reviewing Over a Century of Progress. *Drug Metabolism Reviews*, *52*(4), 472–500. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1832112>

McGill, M. R., and Jaeschke, H. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*, *30*(9), 2174–2187. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1007-6>

McGill, M. R., and Jaeschke, H. (2019). Animal Models of Drug-Induced Liver Injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1865*(5), 1031–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.037>

McGill, M. R., Sharpe, M. R., Williams, C. D., Taha, M., Curry, S. C., and Jaeschke, H. (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1574–1583. <https://doi.org/10.1172/JCI59755>

McKelvey, L., Shorten, G. D., and O’Keeffe, G. W. (2013). Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. *Journal of Neurochemistry*, *124*(3), 276–289. <https://doi.org/10.1111/jnc.12093>

- McLaughlin, S. D., Amaral, J. Z., Thomas, J., Amaral, K. Z., and Scalzo, A. (2025). Acute Liver Failure: Is Acetaminophen the Only Culprit? *Cureus*, *17*(1), e77068. <https://doi.org/10.7759/cureus.77068>
- Mészáros, P., Kovács, S., Kulcsár, G., Páskuj, M., and Almási, A. (2022). Investigation of Intestinal Absorption and Excretion of Paracetamol in Streptozotocin-Induced Hyperglycemia. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19), 11913. <https://doi.org/10.3390/ijms231911913>
- Miller, L. J., Fischer, K. A., Goralnick, S. J., Litt, M., Burleson, J. A., Albertsen, P., and Kreutzer, D. L. (2002). Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology*, *59*(4), 603–608. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(01\)01597-7](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(01)01597-7)
- Minnone, G., De Benedetti, F., and Bracci-Laudiero, L. (2017). NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(5), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms18051028>
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., and Brodie, B. B. (1973). Acetaminophen induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *187*(1), 211–217. <https://europepmc.org/article/med/4746329>
- Mizumura, K., and Murase, S. (2015). Role of nerve growth factor in pain. In H.-G. Schaible (Ed.), *Pain Control* (Vol. 227, pp. 57–77). Springer Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_4)
- Moles, A., Torres, S., Baulies, A., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J. C. (2018). Mitochondrial-Lysosomal Axis in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 369124. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00453>
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Moss, M. J., Hinchman, B., Lambson, J. E., Scott, J. W., Hinckley, P., Wylie, S. J., and Dorey, A. (2024). Assessment of high-dose acetylcysteine in acute high-risk paracetamol (acetaminophen) ingestion. *Clinical Toxicology*, *62*(8), 519–525. <https://doi.org/10.1080/15563650.2024.2377268>
- Mossanen, J., and Tacke, F. (2015). Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Laboratory Animals*, *49*, 30–36. <https://doi.org/10.1177/0023677215570992>
- Nadal-Ribelles, M., Solé, C., Martínez-Cebrián, G., Posas, F., and de Nadal, E. (2019). Shaping the Transcriptional Landscape through MAPK Signaling. In *Gene Expression and Control* (pp. 1–22). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80634>
- Nakagawa, H., Maeda, S., Hikiba, Y., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., Sakamoto, K., Ogura, K., Noguchi, T., Karin, M., Ichijo, H., and Omata, M. (2008). Deletion of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Attenuates Acetaminophen-Induced Liver Injury by Inhibiting c-Jun N-Terminal Kinase Activation. *Gastroenterology*, *135*(4), 1311–1321. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.006>
- Nam, T. G. (2011). Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological Research*, *27*(1), 1–6. <https://doi.org/10.5487/TR.2011.27.1.001>
- Nano, M., Mondo, J. A., Harwood, J., Balasanyan, V., and Montell, D. J. (2023). Cell survival following direct executioner-caspase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *120*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2216531120>
- Neuman, M. G. (2003). Cytokines—Central Factors in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Research and Health*, *27*(4), 307–316. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16668870/>
- Ni, H. M., Bockus, A., Boggess, N., Jaeschke, H., and Ding, W. X. (2012). Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology*, *55*(1), 222–232. <https://doi.org/10.1002/hep.24690>
- Ni, H. M., Williams, J. A., Jaeschke, H., and Ding, W. X. (2013). Zonated induction of autophagy and mitochondrial spheroids limits acetaminophen-induced necrosis in the liver. *Redox Biology*, *1*(1), 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.08.005>

- Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilm, B., Goldring, C. E. P., Müller, J., and Cross, M. J. (2012). ERK5: Structure, regulation and function. *Cellular Signalling*, 24(11), 2187–2196. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.07.007>
- Noda, T., Kato, R., Hattori, T., Furukawa, Y., Ijiri, Y., and Tanaka, K. (2022). Role of caspase-8 and/or -9 as biomarkers that can distinguish the potential to cause toxic- and immune related-adverse event, for the progress of acetaminophen-induced liver injury. *Life Sciences*, 294, 120351. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120351>
- Oakley, F., Trim, N., Constandinou, C. M., Ye, W., Gray, A. M., Frantz, G., Hillan, K., Kendall, T., Benyon, R. C., Mann, D. A., and Iredale, J. P. (2003). Hepatocytes Express Nerve Growth Factor during Liver Injury: Evidence for Paracrine Regulation of Hepatic Stellate Cell Apoptosis. *American Journal of Pathology*, 163(5), 1849–1858. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63544-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63544-4)
- Ogemdi, I. K. (2019). A Review on the Properties and Uses of Paracetamol. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, 5(3), 31–35. <https://doi.org/10.11648/j.ijpc.20190503.12>
- Ohashi, N., and Kohno, T. (2020). Analgesic Effect of Acetaminophen: A Review of Known and Novel Mechanisms of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 580289. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580289>
- Orning, P., and Lien, E. (2021). Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(1), 121–141. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0420-305R>
- Ozer, A. B., and Bayar, M. (2012). Nerve Growth Factor and Sepsis. In L. Azevedo (Ed.), *Sepsis - An Ongoing and Significant Challenge* (pp. 105–118). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50532>
- Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Park, W., Wei, S., Kim, B. S., Kim, B., Bae, S. J., Chae, Y. C., Ryu, D., and Ha, K. T. (2023). Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Experimental and Molecular Medicine*, 55(8), 1573–1594. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01078-x>
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
- Peti, W., and Page, R. (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Science*, 22(12), 1698–1710. <https://doi.org/10.1002/pro.2374>
- Pham, D. D., Bruelle, C., Thi Do, H., Pajanoja, C., Jin, C., Srinivasan, V., Olkkonen, V. M., Eriksson, O., Jauhainen, M., Lalowski, M., and Lindholm, D. (2019). Caspase-2 and p75 neurotrophin receptor (p75NTR) are involved in the regulation of SREBP and lipid genes in hepatocyte cells. *Cell Death and Disease*, 10(7), 537. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1758-z>
- Pham, D. D., Do, H. T., Bruelle, C., Kukkonen, J. P., Eriksson, O., Mogollón, I., Korhonen, L. T., Arumäe, U., and Lindholm, D. (2016). p75 Neurotrophin Receptor Signaling Activates Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 in Hepatocyte Cells via p38 Mitogen-activated Protein Kinase and Caspase-3. *Journal of Biological Chemistry*, 291(20), 10747–10758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.722272>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., and Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>
- Poynard, T., and Imbert-Bismut, F. (2012). Laboratory Testing for Liver Disease. In T. D. Boyer, M. P. Manns, and A. J. Sanyal (Eds.), *Zakim and Boyer's Hepatology* (Sixth, pp. 201–215). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0881-3.00014-0>
- Przybyła, G. W., Szychowski, K. A., and Gmiński, J. (2021). Paracetamol – An old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(1), 3–19. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13392>

- Qiu, Y., Benet, L. Z., and Burlingame, A. L. (1998). Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17940–17953. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.28.17940>
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(2), 481–487. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90224-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90224-7)
- Raffa, R. B., Pergolizzi, J. V., Taylor, R., Decker, J. F., and Patrick, J. T. (2014). Acetaminophen (paracetamol) oral absorption and clinical influences. *Pain Practice*, 14(7), 668–677. <https://doi.org/10.1111/papr.12130>
- Ramachandran, A., and Jaeschke, H. (2017). Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *Journal of Clinical and Translational Research*, 3(1), 157–169. <https://doi.org/10.18053/jctres.03.2017s1.002>
- Ramachandran, A., and Jaeschke, H. (2019a). Acetaminophen hepatotoxicity: A mitochondrial perspective. In A. Ramachandran and H. Jaeschke (Eds.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 85, pp. 195–219). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.01.007>
- Ramachandran, A., and Jaeschke, H. (2019b). Acetaminophen Hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease*, 39(2), 221–234. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679919>
- Ramachandran, A., Lebofsky, M., Baines, C. P., Lemasters, J. J., and Jaeschke, H. (2011). Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radical Research*, 45(2), 156–164. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.520319>
- Ramaiah, S. K. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1551–1557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.007>
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1473), 1545–1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Rius-Pérez, S., Tormos, A. M., Pérez, S., Finamor, I., Rada, P., Valverde, Á. M., Nebreda, A. R., Sastre, J., and Taléns-Visconti, R. (2019). p38 $\alpha$  deficiency restrains liver regeneration after partial hepatectomy triggering oxidative stress and liver injury. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39428-3>
- Roberts, D. W., Bucci, T. J., Benson, R. W., Warbritton, A. R., McRae, T. A., Pumford, N. R., and Hinson, J. A. (1991). Immunohistochemical Localization and Quantification of the 3-(cystein-S-yl)-Acetaminophen Protein Adduct in Acetaminophen Hepatotoxicity. *American Journal of Pathology*, 138(2), 359–371. [/pmc/articles/PMC1886188/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1886188/)
- Robles-Díaz, M., Medina-Caliz, I., Stephens, C., Andrade, R. J., and Lucena, M. I. (2016). Biomarkers in DILI: One more step forward. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 267. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00267>
- Roy, J. (2011). The top five most common or long-selling drugs. In J. Roy (Ed.), *An Introduction to Pharmaceutical Sciences* (pp. 231–296). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781908818041.231>
- Salvesen, G. S., and Walsh, C. M. (2014). Functions of Caspase 8: the Identified and the Mysterious. *Seminars in Immunology*, 26(3), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.03.005>
- Samario-Román, J., Larqué, C., Pánico, P., Ortiz-Huidobro, R. I., Velasco, M., Escalona, R., and Hiriart, M. (2023). NGF and Its Role in Immunoendocrine Communication during Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1957. <https://doi.org/10.3390/ijms24031957>
- Schwabe, R. F. and Luedde, T. (2018). Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(12), 738–752. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0065-y>

- Seidel, M. F., Wise, B. L., and Lane, N. E. (2013). Nerve growth factor: An update on the science and therapy. *Osteoarthritis and Cartilage*, *21*(9), 1223–1228. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.06.004>
- Shahid, M., and Subhan, F. (2014). Comparative histopathology of acetaminophen induced hepatotoxicity in animal models of mice and rats. *Pharmacologyonline*, *3*, 32–43.
- Shang, X., Wang, Z., and Tao, H. (2017). Mechanism and therapeutic effectiveness of nerve growth factor in osteoarthritis pain. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *13*, 951–956. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S139814>
- Sharma, S., Singh, R. L., and Kakkar, P. (2011). Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(4), 770–779. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.11.041>
- Sharma, C. V., and Mehta, V. (2014). Paracetamol: Mechanisms and updates. Continuing Education in Anaesthesia, *Critical Care and Pain*, *14*(4), 153–158. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkt049>
- Shen, X. L., Guo, Y. N., Lu, M. H., Ding, K. N., Liang, S. S., Mou, R. W., Yuan, S., He, Y. M., and Tang, L. P. (2023). Acetaminophen-induced hepatotoxicity predominantly via inhibiting Nrf2 antioxidative pathway and activating TLR4-NF- $\kappa$ B-MAPK inflammatory response in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *252*, 114590. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114590>
- Shi, S., Wang, L., Van der Laan, L. J. W., Pan, Q., and Versteegen, M. M. A. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in liver transplantation and underlying diseases: new insights and therapeutics. *Transplantation*, *105*(11), 2362–2373. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003691>
- Shimko, M. J., Zaccone, E. J., Thompson, J. A., Schwegler-Berry, D., Kashon, M. L., and Fedan, J. S. (2014). Nerve growth factor reduces amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> transport in human airway epithelial cells. *Physiological Reports*, *2*(7), e12073. <https://doi.org/10.14814/phy2.12073>
- Simmons, S. O., Fan, C. Y., and Ramabhadran, R. (2009). Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicological Sciences*, *111*(2), 202–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp140>
- Skaper, S. D. (2017). Nerve growth factor: a neuroimmune crosstalk mediator for all seasons. *Immunology*, *151*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/imm.12717>
- Slitt, A. L., Dominick, P. K., Roberts, J. C., and Cohen, S. D. (2004). Standard of care may not protect against acetaminophen-induced nephrotoxicity. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *95*(5), 247–248. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2004.pto950508.x>
- Soga, T., Baran, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T., and Tomita, M. (2006). Differential Metabolomics Reveals Ophthalmic Acid as an Oxidative Stress Biomarker Indicating Hepatic Glutathione Consumption. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(24), 16768–16776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601876200>
- Sreekanth, G. P., Chuncharunee, A., Sirimontaporn, A., Panaampon, J., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P. T., and Limjindaporn, T. (2016). SB203580 modulates p38 MAPK signaling and Dengue virus-induced liver injury by reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 phosphorylation. *PLoS ONE*, *11*(2), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149486>
- Sturgill, M. G., and Lambert, G. H. (1997). Xenobiotic-induced hepatotoxicity: Mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical Chemistry*, *43*(8), 1512–1526. <https://doi.org/10.1093/clinchem/43.8.1512>
- Taguchi, K., Tokuno, M., Yamasaki, K., Kadowaki, D., Seo, H., and Otagiri, M. (2015). Establishment of a model of acetaminophen-induced hepatotoxicity in different weekly-aged ICR mice. *Laboratory Animals*, *49*(4), 294–301. <https://doi.org/10.1177/0023677215573041>
- Taylor, B. S., Alarcon, L. H., and Billiar, T. R. (1998). Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry*, *63*(7), 766–781. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9721329/>
- Toussaint, K., Yang, X. C., Zielinski, M. A., Reigle, K. L., Sacavage, S. D., Nagar, S., and Raffa, R. B. (2010). What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, *35*(6), 617–638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2009.01143.x>

- Trabjerg, E., Kartberg, F., Christensen, S., and Rand, K. D. (2017). Conformational characterization of nerve growth factor- reveals that its regulatory pro-part domain stabilizes three loop regions in its mature part. *Journal of Biological Chemistry*, 292(40), 16665–16676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.803320>
- Trim, N., Morgan, S., Evans, M., Issa, R., Fine, D., Afford, S., Wilkins, B., and Iredale, J. (2000). Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *American Journal of Pathology*, 156(4), 1235–1243. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64994-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64994-2)
- Tsai, M. S., Lee, P. H., Sun, C. K., Chiu, T. C., Lin, Y. C., Chang, I. W., Chen, P. H., and Kao, Y. H. (2018). Nerve growth factor upregulates sirtuin 1 expression in cholestasis: A potential therapeutic target. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(1), e426. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.235>
- Tsai, M. S., Lin, Y. C., Sun, C. K., Huang, S. C., Lee, P. H., and Kao, Y. H. (2014). Up-Regulation of Nerve Growth Factor in Cholestatic Livers and Its Hepatoprotective Role against Oxidative Stress. *PLoS ONE*, 9(11), e112113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112113>
- Utkarsh, D., Loretz, C., and Li, A. P. (2016). In vitro evaluation of hepatotoxic drugs in human hepatocytes from multiple donors: Identification of P450 activity as a potential risk factor for drug-induced liver injuries. *Chemico-Biological Interactions*, 255, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.013>
- Valdovinos-Flores, C., and Gonsebatt, M. E. (2013). Nerve growth factor exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic, and acetaminophen. *Free Radical Research*, 47(5), 404–412. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.783210>
- Valls, P. O., and Esposito, A. (2022). Signalling dynamics, cell decisions, and homeostatic control in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 75, 102066. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2022.01.011>
- Vodovotz, Y., Simmons, R. L., Gandhi, C. R., Barclay, D., Jefferson, B. S., Huang, C., Namas, R., El-Dehaibi, F., Mi, Q., Billiar, T. R., and Zamora, R. (2017). “Thinking” vs. “Talking”: Differential Autocrine Inflammatory Networks in Isolated Primary Hepatic Stellate Cells and Hepatocytes Under Hypoxic Stress. *Frontiers in Physiology*, 8, 1104. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01104>
- Walker, R. M., Racz, W. J., and McElligott, T. F. (1985). Acetaminophen-Induced hepatotoxic congestion in mice. *Hepatology*, 5(2), 233–240. <https://doi.org/10.1002/hep.1840050213>
- Wang, H., Burke, L. J., Patel, J., Tse, B. W. C., Bridle, K. R., Cogger, V. C., Li, X., Liu, X., Yang, H., Crawford, D. H. G., Roberts, M. S., Gao, W., and Liang, X. (2020). Imaging-based vascular-related biomarkers for early detection of acetaminophen-induced liver injury. *Theranostics*, 10(15), 6715–6727. <https://doi.org/10.7150/thno.44900>
- Wang, Y. Q., Geng, X. P., Wang, M. W., Wang, H. Q., Zhang, C., He, X., Liang, S. M., Xu, D. X., and Chen, X. (2021). Vitamin D deficiency exacerbates hepatic oxidative stress and inflammation during acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *International Immunopharmacology*, 97, 107716. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107716>
- Wang, Z., Hu, J. N., Yan, M. H., Xing, J. J., Liu, W. C., and Li, W. (2017). Caspase-Mediated Anti-Apoptotic Effect of Ginsenoside Rg5, a Main Rare Ginsenoside, on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(42), 9226–9236. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03361>
- Ward, J., Bala, S., Petrasek, J., and Szabo, G. (2012). Plasma microRNA profiles distinguish lethal injury in acetaminophen toxicity: A research study. *World Journal of Gastroenterology*, 18(22), 2798–2804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i22.2798>
- Westenberger, G., Sellers, J., Fernando, S., Junkins, S., Han, S. M., Min, K., and Lawan, A. (2021). Function of Mitogen-Activated Protein Kinases in Hepatic Inflammation. *Journal of Cellular Signaling*, 2(3), 172–180. <https://doi.org/10.33696/signaling.2.049>

- Whitaker, R. H., and Cook, J. G. (2021). Stress relief techniques: P38 MAPK determines the balance of cell cycle and apoptosis pathways. *Biomolecules*, *11*(10), 1444. <https://doi.org/10.3390/biom11101444>
- Win, S., Than, T. A., Min, R. W. M., Aghajan, M., and Kaplowitz, N. (2016). c-Jun N-terminal kinase mediates mouse liver injury through a novel Sab (SH3BP5)-dependent pathway leading to inactivation of intramitochondrial Src. *Hepatology*, *63*(6), 1987–2003. <https://doi.org/10.1002/hep.28486>
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., and Turner, N. D. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *Journal of Nutrition*, *134*(3), 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
- Xing, M., Gao, M., Li, J., Han, P., Mei, L., and Zhao, L. (2022). Characteristics of peripheral blood Gamma-glutamyl transferase in different liver diseases. *Medicine*, *101*(1), E28443. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028443>
- Xu, J. J., Hendriks, B. S., Zhao, J., and de Graaf, D. (2008). Multiple effects of acetaminophen and p38 inhibitors: Towards pathway toxicology. *FEBS Letters*, *582*(8), 1276–1282. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.063>
- Yan, M., Huo, Y., Yin, S., and Hu, H. (2018). Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Injury and its Implications for Therapeutic Interventions. *Redox Biology*, *17*, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.019>
- Yang, T., Wang, H., Wang, X., Li, J., and Jiang, L. (2022). The Dual Role of Innate Immune Response in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Biology*, *11*(7), 1057. <https://doi.org/10.3390/biology11071057>
- Yoon, E., Babar, A., Choudhary, M., Kutner, M., and Prysopoulos, N. (2016). Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: A Comprehensive Update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, *4*(2), 131–142. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00052>
- Yue, J., and López, J. M. (2020). Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>
- Zhang, J., Min, R. W. M., Le, K., Zhou, S., Aghajan, M., Than, T. A., Win, S., and Kaplowitz, N. (2017). The role of MAP2 kinases and p38 kinase in acute murine liver injury models. *Cell Death and Disease*, *8*(6), e2903. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2017.295>
- Zhou, H. C., Wang, H., Shi, K., Li, J. M., Zong, Y., and Du, R. (2019). Hepatoprotective effect of baicalein against acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Molecules*, *24*(1), 131. <https://doi.org/10.3390/molecules24010131>
- Zhou, N., Gu, T. W., Xu, Y., Liu, Y., and Peng, L. H. (2023). Challenges and progress of neurodrug: bioactivities, production and delivery strategies of nerve growth factor protein. *Journal of Biological Engineering*, *17*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13036-023-00392-2>

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
<b>Adı Soyadı</b>	Asım AYZ
Eğitim	
<b>Lise</b>	İstanbul Selimiye Veteriner Sağlık Meslek Lisesi (1997)
<b>Lisans</b>	Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2000-2006)
<b>Yüksek Lisans</b>	-
<b>Doktora</b>	Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı (2019-2025)

## EKLER

### Ek-1. Yerel Etik Kurulu Kararı



**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**  
**Çağış Yerleşkesi, (Bigadiç yolu üzeri 17. km) 10145, BALIKESİR-TÜRKİYE**  
**ARAŞTIRMA BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN ADI	"Asetaminofen ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarında Sinir Büyüme Faktörünün Etkisi ve p38 MAPK Sinyal Yolağının Rolü"	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Musa KARAMAN BAÜN Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Patoloji AD.	
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Doktora Öğrencisi Asım AYZAZ Balıkesir Tarım ve Orman İl Müdürlüğü	
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doktora	
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01/04/2022 – 01/04/2024	
KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	FARE – 64 ADET		
<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>		<b>Tarihi</b>
	HADYEK BAŞVURU FORMU		17/02/2022
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No : 2022/1-10</b>		<b>Tarih :24/02/2022</b>
	<p>Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması,</li> <li>2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması,</li> <li>3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması,</li> <li>4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.</li> </ol>		

#### ETİK KURUL BİLGİLERİ

#### ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza
Doç. Dr. Elif AKSÖZ Başkan	Tıbbi Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ali BAYRAKDAR Başkan Vekili	Veteriner Histoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ziya İLHAN Üye	Veteriner Mikrobiyoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Gülten ERKEN Üye	Tıbbi Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM Üye	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Muharrem EROL Üye	Veteriner Cerrahi	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Dr. Öğr. Üyesi Fatih UĞUN Üye	Tıp - Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Dr. Öğr. Üyesi Özgür BULMUŞ Üye	Tıbbi Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Hacer ERDEN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Serap URAS Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Vet. Hek. Mustafa H. YARANOĞLU Üye	Veteriner Hekim	BAUNDEHAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	

(\*) Başvurulan Projelerde Proje Sahibi veya Yardımcı Araştırmacılardan birinin Yerel Etik Kurul Üyesi veya 1. Derece Akrabası olması halinde ilgili üye proje kurulu görüşmesine katılmaz.



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası  
Çalış Yerleşkesi/BALIKESİR



(0 266) 612 14 62  
sagbilen@balikesir.edu.tr  
<http://www.balikesir.edu.tr>

