



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



**BAKIR SÜLFAT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
KARACİĞER HASARINDA SİNİR BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN p38 MAPK SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

MUSTAFA USTA

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı
Bilim Alan Kodu: 10102.16



BALIKESİR
2023

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

**BAKIR SÜLFAT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
KARACİĞER HASARINDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN
p38 MAPK SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

MUSTAFA USTA

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HASAN ÖZEN**

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı

Bilim Alan Kodu: 10102.16

Proje No: 2022/038-Balıkesir Üniversitesi BAP

BALIKESİR

2023



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ KABUL VE ONAY

Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde **Mustafa USTA** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

**“BAKIR SÜLFAT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL KARACİĞER HASARINDA
SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN p38 MAPK SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNDEKİ 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: 20 /10 / 2023

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Fatma İLHAN
Balıkesir Üniversitesi
(**Başkan**)

Prof. Dr. Hasan ÖZEN
Balıkesir Üniversitesi
Üye (**Danışman**)

Prof. Dr. Musa KARAMAN
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Ertan ORUÇ
Selçuk Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Özgür ÖZDEMİR
Selçuk Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Doktora/Yüksek Lisans Tezi,
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 17 /10 /2023 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Ziya İLHAN
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 kayıpları kabullendiğimi beyan ederim.

20/09/2023

İmza

Mustafa USTA

TEŞEKKÜR

Doktora tezi çalışmam süresince bana en iyi şekilde rehberlik eden, bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZEN'e; doktora eğitimim boyunca değerli görüş ve tecrübeleri ile bana ışık tutan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Musa KARAMAN, Sayın Prof. Dr. Fatma İLHAN, Sayın Doç. Dr. Gülay TURAN ve Sayın Doç. Dr. Figen ASLAN'a minnet ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca çalışmamın bir bölümünü laboratuvarlarında yürüttüğüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ziya İLHAN ve biyokimyasal analizlerdeki yardımlarından dolayı İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, çalışmamın bulgularının istatistiksel olarak incelenmesindeki yardımlarından dolayı Sağlık Bilimleri Fakültesi Dekan Yardımcısı Sayın Doç. Dr. Celalettin ÇEVİK'e, tez projemi destekleyen Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi ve çalışmamın deney hayvanları bölümünü yürüttüğüm Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına, doktora öğrenciliğim boyunca enstitü işlemlerinde yardımlarından dolayı Sağlık Bilimleri Enstitü Sekreteri Sayın Fatma İŞLER'e, aynı dönemde doktora başladığım ve çalışmamın her aşamasında desteğini eksik etmeyen Veteriner Hekim Asım AYZAZ'a, beni bugünlere getirirken hiçbir zaman maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen annem Rezan USTA, babam Fehim USTA ile abim Mesut USTA'ya ve çalışmalarım esnasında büyük katkı ve fedakarlıklarından dolayı sevgili eşim Şeniz UÇAR USTA ve oğlum Alp USTA'ya sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Bakır	4
2.1.1. Bakır Metabolizması.....	5
2.1.2. Bakır Toksikasyonu	8
2.2. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK)	17
2.2.1. Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz (ERK).....	18
2.2.2. c-Jun N-Terminal Kinazlar (JNK)	19
2.2.3. p38 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (p38 MAPK).....	19
2.2.3.1. Enfeksiyöz Etkenlere Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu.....	22
2.2.3.2. Sitokinlere Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu	22
2.2.3.3. ROT'ne Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu	23
2.2.3.4. Büyüme Faktörlerine Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu	24
2.2.3.5. p38 MAPK İnaktivasyonu	25
2.3. Sinir Büyüme Faktörü (NGF).....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Deney Grupları	28

3.2. Deneyin Sonlandırılması ve Numunelerin Toplanması.....	30
3.3. Örneklerin Analizleri	30
3.3.1. Histopatolojik Analiz	30
3.3.2. İmmunohistokimyasal Analiz	32
3.3.3. Biyokimyasal Analiz.....	34
3.3.3.1. Kan Serumlarının Analizi.....	34
3.3.3.2. Glutatyon (GSH) Analizi.....	34
3.3.3.3. Malondialdehit (MDA) Analizi	35
3.3.3.4. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi	35
3.3.3.5. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi.....	36
3.3.4. p38 MAPK mRNA Ekspresyon Analizi	37
3.3.4.1. cDNA Sentezi.....	37
3.3.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi	38
3.3.5. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR	41
4.1. Patolojik Bulgular.....	41
4.1.1. Makroskobik Bulgular	41
4.1.2. Histopatolojik Bulgular	45
4.1.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	54
4.1.4. p38 MAPK mRNA Ekspresyon Bulguları	72
4.1.5. Biyokimyasal Bulgular	74
5. TARTIŞMA	79
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ.....	108
EKLER.....	109
Ek-1. Etik Kurul Belgesi	109

ÖZET

BAKIR SÜLFAT İLE OLUŞTURULAN DENEYSSEL KARACİĞER HASARINDA SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN p38 MAPK SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ROLÜ

Farelerde CuSO₄ ile oluşturulan karaciğer doku hasarı modelinde eksojen Sinir Büyüme Faktörü (NGF) uygulamasının oluşan hasar üzerine etkisi p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden histopatolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle araştırıldı. Çalışmada 64 adet ergin erkek BALB/c fare rastgele 8 gruba ayrıldı ve aşağıda belirtilen dozlarda tüm uygulamalar 24 saat arayla 3 kez intraperitoneal olarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu: serum fizyolojik, NGF grubu: 10 µg/kg NGF, p38MAPKi grubu: 20 mg/kg p38 MAPK inhibitörü (SB203580), NGF+p38MAPKi grubu: 10 µg/kg NGF ve 20 mg/kg SB203580, Bakır grubu: 20 mg/kg CuSO₄, Bakır+NGF grubu: 20 mg/kg CuSO₄ ve 10 µg/kg dozda NGF, Bakır+p38MAPK grubu: 20 mg/kg dozda CuSO₄ ve 20 mg/kg SB203580, Bakır+NGF+p38MAPKi grubu: 20 mg/kg CuSO₄, 10 µg/kg NGF ve 20 mg/kg SB203580. Uygulamaların sonunda fareler dekapite edilerek kan ve karaciğer dokuları toplandı. Kan serumlarında ALT, AST ve GGT ile karaciğer dokularında MDA, GSH, TAS ve TOS seviyeleri biyokimyasal yöntemlerle belirlendi. Karaciğer dokularında histopatolojik ve immunohistokimyasal (NGF, iNOS, nitrotirozin, kaspaz 8, kaspaz 3, IL-1, IL-6 ve TNF-α) incelemeler gerçekleştirildi. Karaciğer dokularında p38 MAPK mRNA ekspresyonunun seviyesi moleküler yöntemlerle belirlendi. Kontrol grubuna oranla, sadece bakır uygulanan gruptaki deneklerde ALT, AST, MDA, TOS, iNOS ve nitrotirozin seviyelerinde artış ile GSH ve TAS seviyelerinde azalma gözlemlendi. Bakır ile birlikte NGF uygulanan deneklerde ise bu belirteçlerin seviyelerinin hücre homeostazisine yönelik anlamlı oranda (p<0.05) değiştiği tespit edildi. Eksojen olarak bakır ile birlikte NGF uygulaması, bakırın hepatositlerde neden olduğu akut yangısal cevabın (IL-1, IL-6 ve TNF-α) anlamlı oranda (p<0.05) azalmasına neden oldu. p38 MAPK inhibitörü olan SB203580, bakır ve NGF ile birlikte uygulandığında ise NGF'nin göstermiş olduğu iyileştirici etkinin ortadan kalktığı belirlendi. Bu bulgular NGF'nin bakırın neden olduğu oksidatif ve nitrozatif hasarlara karşı koruyucu etkisini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden yaptığını gösterdi. Bakırın karaciğer dokusunda hidropik dejenerasyon, fokal nekroz ve apoptoza neden olduğu tespit edildi. Bakır ile

birlikte NGF uygulanan gruptaki deneklerin karaciğerlerinde bakırın neden olduğu bu histopatolojik değişikliklerin şiddet ve seviyelerinin anlamlı oranlarda ($p<0.05$) azaldığı görüldü. Bakır+NGF grubundaki deneklerde Bakır+NGF+p38MAPKi grubundaki deneklere göre hidropik dejenerasyon ve fokal nekrozların şiddetinin anlamlı oranda ($p<0.05$) daha az olduğu, apoptotik hücre ölümü seviyesinde de (kaspaz 8 ve kaspaz 3) azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) görüldü. Bu bulgular, bakırın neden olduğu hasarda NGF'nin hepatositleri apoptozdan koruyucu etkisini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden yaptığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakır sülfat, hepatotoksisite, NGF, p38 MAPK, SB203580

ABSTRACT

ROLE OF NERVE GROWTH FACTOR ON p38 MAPK SIGNAL PATHWAY IN EXPERIMENTAL LIVER DAMAGE INDUCED BY COPPER SULPHATE

The effect of exogenous Nerve Growth Factor (NGF) application on the liver tissue damage model induced by CuSO₄ in mice was investigated by histopathological, immunohistochemical, biochemical and molecular means by the emphasis on p38 MAPK signal pathway. In the study, 64 adult male BALB/c mice were randomly divided into 8 groups and all applications were performed intraperitoneally 3 times at 24 hour intervals at the doses listed below. Control group: physiological saline, NGF group: 10 µg/kg NGF, p38MAPKi group: 20 mg/kg p38 MAPK inhibitor (SB203580), NGF+p38MAPKi group: 10 µg/kg NGF and 20 mg/kg SB203580, Copper group: 20 mg/kg CuSO₄, Copper+NGF group: 20 mg/kg CuSO₄ and 10 µg/kg dose NGF, Copper+p38MAPK group: 20 mg/kg dose CuSO₄ and 20 mg/kg SB203580, Copper+NGF+p38MAPKi group: 20 mg /kg CuSO₄, 10 µg/kg NGF and 20 mg/kg SB203580. At the end of the applications, the mice were decapitated and their blood and liver tissues were collected. ALT, AST and GGT levels in blood serum and MDA, GSH, TAS and TOS levels in liver tissues were determined by biochemical methods. Histopathological and immunohistochemical (NGF, iNOS, nitrotyrosine, caspase 8, caspase 3, IL-1, IL-6 and TNF- α) examinations were performed in liver tissues. The level of p38 MAPK mRNA expression in liver tissues was determined by molecular methods. Compared to the control group, increases in ALT, AST, MDA, TOS, iNOS and nitrotyrosine levels and decreases in GSH and TAS levels were observed in Copper group. It was determined that the levels of these markers changed significantly ($p < 0.05$) in favor of the cell homeostasis in the subjects that were given NGF together with copper. Exogenous administration of NGF with copper caused a significant ($p < 0.05$) decrease in the acute inflammatory response (IL-1, IL-6 and TNF- α) induced by copper in hepatocytes. When SB203580, a p38 MAPK inhibitor, was applied together with copper and NGF, it was determined that the healing effect of NGF disappeared. These findings showed that NGF exerts its protective effect against copper-induced oxidative and nitrosative damage via the p38

MAPK signaling pathway. It was determined that copper caused hydropic degeneration, focal necrosis and apoptosis in liver tissue. It was observed that the severity and levels of these histopathological changes caused by copper in the livers of the subjects in the group administered NGF together with copper decreased significantly ($p < 0.05$). The severity of hydropic degeneration and focal necrosis was significantly ($p < 0.05$) lower in Copper+NGF group as compared to Copper+NGF+p38MAPKi group, and the decrease in the level of apoptotic cell death (caspase 8 and caspase 3) was statistically significant ($p < 0.05$). These findings indicated that NGF exerts its protective effect on hepatocytes from apoptosis through the p38 MAPK signaling pathway in copper-induced damage.

Keywords: Copper sulfate, hepatotoxicity, NGF, p38 MAPK, SB203580

KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin Aminotransaminaz
AST	: Aspartat Aminotransaminaz
ATOX1	: Antioksidan 1 Bakır Şaperonu
BDNF	: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör
CCS	: Süper Oksit Dismutaz İçin Bakır Şaperonu
COX	: Siklooksijenaz
Cu	: Bakır
CuSO ₄	: Bakır Sülfat
CTR1	: Cu Taşıma Proteini 1
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ERK	: Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinazlar
GGT	: Gama-Glutamil Transferaz
GSH	: Glutatyon
HE	: Hematoksilen ve Eozin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
i.p.	: İntraperitoneal
IL	: İnterlökin
JNK	: c-Jun N-terminal Kinazlar
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MAP2K	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz
MAP3K	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz Kinaz
MDA	: Malondialdehit
MT	: Metalloprotein
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NT	: Nörotrofin
O ₂ •	: Süperoksit
OH•	: Hidroksil
ONOO ⁻	: Peroksinitrit

p38MAPKi	: p38 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz İnhibitörü
PBS	: Fosfat Solüsyonu
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
TAB1	: TGF β 'y1 Aktive Eden Kinaz 1'i Bağlayıcı Protein 1
TAS	: Toplam Antioksidan Seviyesi
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TOS	: Toplam Oksidan Seviyesi
Trk-A	: Tirozin Kinaz A

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Organizmadaki Cu Homeostazı (Li, 2020).....	6
Şekil 2.2. Hücre İçi Cu Homeostazı (Li, 2020).....	7
Şekil 2.3. MAPK Yolakları (Cuadrado ve Nebreda, 2010 ve Son vd. 2011'den modifiye edilmiştir).....	18
Şekil 3.1. Farelerin Gruplara Göre Kafeslere Yerleşimi a. Kontrol Grubu, b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu, e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu, h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu.....	29
Şekil 3.2. Hepatik Lobülün Zonal Bölgelerinin Şematik Görüntüsü (Mohty vd. 2015).....	31
Şekil 4.1. Kontrol Grubuna Ait Karaciğerlerin Normal Makroskobik Görüntüsü....	41
Şekil 4.2. NGF Grubuna Ait Karaciğerlerin Makroskobik Görüntüsü. Bu Gruptaki Hayvanların Karaciğerleri Herhangi Bir Patolojik Bulgu Göstermemesi Bakımından Kontrol Grubundaki Deneklerin Karaciğerleri İle Benzerlik Göstermektedir.....	42
Şekil 4.3. p38MAPKi Grubuna Ait Karaciğerlerin Makroskobik Görüntüsü. Bu Gruptaki Deneklerde Herhangi Bir Patolojik Lezyon Gözlenmemektedir.....	42
Şekil 4.4. NGF+p38MAPKi Grubuna Ait Karaciğerlerin Makroskobik Görüntüsü. Bu Gruptaki Deneklerin Karaciğerleri Kontrol, NGF ve p38MAPK Gruplarındaki Deneklerin Karaciğerleri İle Benzer Olarak Herhangi Bir Patolojik Değişiklik İçermemektedir.....	43
Şekil 4.5. Bakır Grubuna Ait Karaciğerlerin Makroskobik Görüntüsü. CE37, CE38 ve CE40 Denek Numaralı Farelere Ait Karaciğerlerin Diğer Karaciğerlere Göre Daha Soluk Renkte Olduğu Dikkati Çekmektedir...43	43
Şekil 4.6. Bakır+NGF Grubuna Ait Karaciğerlerin Makroskobik Görüntüsü. CF45 ve CF48 Denek Numaralı Farelerin Karaciğerlerinin Aynı Gruptaki Diğer Farelere Göre Daha Soluk Renkte Olduğu Dikkati Çekmektedir.....	44

Şekil 4.7. Bakır+p38MAPKi Grubuna Ait Karaciğerlerin Makroskobik Görüntüsü CG49 Denek Numaralı Farenin Karaciğerinin Daha Soluk Renkte Olduğu Dikkati Çekmekte.....	44
Şekil 4.8. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubuna Ait Karaciğerlerin Makroskobik Görüntüsü.....	45
Şekil 4.9. Kontrol Grubu; Karaciğerde Normal Histolojik Görüntü. HE	46
Şekil 4.10. NGF Grubu; Karaciğerde Normal Histolojik Görüntü, Herhangi Bir Histopatolojik Lezyon Gözlenmemektedir. HE	46
Şekil 4.11. p38MAPKi Grubu; Karaciğerde Normal Histolojik Görüntü, Herhangi Bir Histopatolojik Lezyon Gözlenmemektedir. HE.....	47
Şekil 4.12. NGF+p38MAPKi Grubu; Karaciğerde Normal Histolojik Görüntü, Herhangi Bir Histopatolojik Lezyon Gözlenmemektedir. HE.....	47
Şekil 4.13. Bakır Grubu; Sentral Ven Çevresi ve Midzonal Bölgede Hidropik Dejenerasyon (ok), Piknotik Çekirdekli (ok başı) ve Çekirdeklerini Yitirmiş Nekrotik Hepatositler (yıldızlar). HE.....	48
Şekil 4.14. Bakır Grubu; Şiddetli Hidropik Dejenerasyon. Çok Sayıda Eozinofilik Sitoplazmalı Piknotik Çekirdekli Hepatositler (oklar) Dikkati Çekmekte. HE.....	49
Şekil 4.15. Bakır+NGF Grubu; Sentral Ven Çevresindeki Hepatositlerde Hidropik (ok) ve Vakuoler Dejenerasyon (ok başı). HE.....	50
Şekil 4.16. Bakır+p38MAPKi Grubu; Sentral Ven Çevresi Hidropik Dejenerasyon ve Fokal Nekroz (ok). HE.....	51
Şekil 4.17. Bakır+p38MAPKi Grubu; Sentral Ven ve Portal Alan Arasında Vakuoler Dejenerasyon (oklar) ile Sinuzoidal Boşluğun Genişlemesi (ok başı). HE.....	51
Şekil 4.18. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu; Panlobüler Vakuoler Dejenerasyon (ok). HE.....	52
Şekil 4.19. Histopatolojik Bulguların Skorlamasının Grafiksel Gösterimi.....	53
Şekil 4.20. Karaciğer Dokularında NGF İmmunoreaktivitesinin Gruplara Göre Grafiksel Gösterimi.....	56
Şekil 4.21. Karaciğer Dokusunda NGF İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu, b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu, e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan	

Gruplardaki NGF İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepositlerde Daha Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte. Bakır+NGF Grubunda Diğer Cu Uygulanan Gruplara Göre Daha Az NGF İmmunoreaktivitesi Dikkati Çekmekte.....	57
Şekil 4.22. Karaciğer Dokularında iNOS İmmunoreaktivitesinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	58
Şekil 4.23. Karaciğer Dokusunda iNOS İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu, b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu, e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan Gruplardaki iNOS İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepatositlerde Daha Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte. Bakır+NGF Grubunda Diğer Cu Uygulanan Gruplara Göre Daha Az iNOS İmmunoreaktivitesi Dikkati Çekmekte.....	59
Şekil 4.24. Karaciğer Dokularında Nitrotirozin İmmunoreaktivitesinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	60
Şekil 4.25. Karaciğer Dokusunda Nitrotirozin İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu, b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu, e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan Gruplardaki Nitrotirozin İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepatositlerde Daha Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte. Bakır+NGF Grubunda Diğer Cu Uygulanan Gruplara Göre Daha Az Nitrotirozin İmmunoreaktivitesi Dikkati Çekmekte.....	61
Şekil 4.26. Karaciğer Dokularında Kaspaz 8 İmmunoreaktivitesinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	62
Şekil 4.27. Karaciğer Dokusunda Kaspaz 8 İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu, b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu,	

e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu	
h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan	
Gruplardaki Kaspaz 8 İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama	
Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu	
İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepatositlerde Daha	
Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte. Bakır+NGF Grubunda Diğer Cu	
Uygulanan Gruplara Göre Daha Az Kaspaz 8 İmmunoreaktivitesi	
Dikkati Çekmekte.....	63
Şekil 4.28. Karaciğer Dokularında Kaspaz 3 İmmunoreaktivitesinin Gruplara	
Göre Grafikselsel Gösterimi.....	64
Şekil 4.29. Karaciğer Dokusunda Kaspaz 3 İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu,	
b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu,	
e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu	
h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan	
Gruplardaki Kaspaz 3 İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama	
Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu	
İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepatositlerde Daha	
Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte. Bakır+NGF Grubunda Diğer Cu	
Uygulanan Gruplara Göre Daha Az Kaspaz 3 İmmunoreaktivitesi	
Dikkati Çekmekte.....	65
Şekil 4.30. Karaciğer Dokularında IL-1 İmmunoreaktivitesinin Gruplara Göre	
Grafikselsel Gösterimi.....	66
Şekil 4.31. Karaciğer Dokusunda IL-1 İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu,	
b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu,	
e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu,	
h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan	
Gruplardaki IL-1 İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama	
Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu	
İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepatositlerde Daha	
Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte. Bakır+NGF Grubunda Diğer Cu	
Uygulanan Gruplara Göre Daha Az IL-1 İmmunoreaktivitesi	
Dikkati Çekmekte.....	67
Şekil 4.32. Karaciğer Dokularında IL-6 İmmunoreaktivitesinin Gruplara Göre	
Grafikselsel Gösterimi.....	68

Şekil 4.33. Karaciğer Dokusunda IL-6 İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu, b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu, e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi grubu, h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan Gruplardaki IL-6 İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepatositlerde Daha Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte. Bakır+NGF Grubunda Diğer Cu Uygulanan Gruplara Göre Daha Az IL-6 İmmunoreaktivitesi Dikkati Çekmekte.....	69
Şekil 4.34. Karaciğer Dokularında TNF- α İmmunoreaktivitesinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	70
Şekil 4.35. Karaciğer Dokusunda TNF- α İmmunoreaktivitesi; a. Kontrol Grubu, b. NGF Grubu, c. p38MAPKi Grubu, d. NGF+p38MAPKi Grubu, e. Bakır Grubu, f. Bakır+NGF Grubu, g. Bakır+p38MAPKi Grubu h. Bakır+NGF+p38MAPKi Grubu. Bakır Uygulaması Yapılan Gruplardaki TNF- α İmmunoreaktivitesinin Genel Olarak Uygulama Yapılmayan Gruplara Oranla Daha Fazla Olduğu ve Bu İmmunoreaktivitenin Vena Sentralis Çevresindeki Hepatositlerde Daha Yoğun Olduğu Gözlemlenmekte.....	71
Şekil 4.36. mRNA'lerden Elde Edilen cDNA'larında <i>p38 MAPK</i> ve <i>β-Aktin</i> Genlerinin Çoğalma Eğrisi.....	72
Şekil 4.37. Gruplara göre <i>p38 MAPK</i> mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Grafikselsel Gösterimi.....	73
Şekil 4.38. Kan Serum ALT Seviyelerinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	76
Şekil 4.39. Kan Serum AST Seviyelerinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	76
Şekil 4.40. Kan Serum GGT Seviyelerinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	76
Şekil 4.41. Karaciğer Dokularında MDA Seviyelerinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	77
Şekil 4.42. Karaciğer Dokularında GSH Seviyelerinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	77
Şekil 4.43. Karaciğer Dokularında TOS Seviyelerinin Gruplara Göre Grafikselsel Gösterimi.....	77

Şekil 4.44. Karaciğer Dokularında TAS Seviyelerinin Gruplara Göre Grafikselleştirimi.....	78
--	----

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Histopatolojik Bulguların Değerlendirme Kriterleri.....	32
Tablo 3.2. İmmunohistokimyasal Analizde Kullanılan Antikorlar ve Sulandırma Oranları.....	33
Tablo 3.3. GSH Analizinin Yapılışı.....	34
Tablo 3.4. MDA Analizinin Yapılışı.....	35
Tablo 3.5. cDNA Sentez Reaksiyon Karışımı.....	38
Tablo 3.6. Gerçek Zamanlı PZR Master Reaksiyon Karışımı.....	39
Tablo 3.7. Termal Döngü ve Koşulları.....	39
Tablo 3.8. Primer Dizilimleri.....	39
Tablo 4.1. Gruplara Göre Karaciğerlerdeki Histopatolojik Bulguların Skorlamasının İstatistiksel Ortalamaları.....	53
Tablo 4.2. Gruplara Göre Karaciğerlerdeki İmmunohistokimyasal Skorlamannın İstatistiksel Ortalamaları.....	55
Tablo 4.3. Gruplara Göre Karaciğerlerdeki <i>p38 MAPK</i> mRNA Seviyelerinin Oranı.....	73
Tablo 4.4. Gruplara Göre Biyokimyasal Analiz Sonuçları ve İstatistiksel Değerleri.....	75

1. GİRİŞ

Bakır (Cu) yeryüzünde yaygın olarak bulunan bir metaldir. Bu metal kolay elektron alışverişi yapabildiği için canlı organizmaların biyolojik süreçlerinde enzimlerin elektron alışverişini katalizler (Borobia vd. 2022; Kaim vd. 1996). Bakır, hücre homeostazisinde bakır-çinko süperoksit dismutaz, seruloplazmin, ferroksidaz, lizil oksidaz, tirozinaz, dopamin- β monoksijenaz, bakır amin oksidaz ve hephaestin ferroksidaz gibi enzimlerin yapısına katılarak önemli roller oynar (Scheiber vd. 2013). İnsan ve hayvanlarda Cu metabolizması bağırsaktan emilim, karaciğerde depolanma ve fazlasının safra yoluyla atılımı ile sağlanır (Linder, 2013). Bu metal fizyolojik şartlarda çeşitli hücre içi sistemlerin modülasyonu altında tutulurken fazla miktarda dokularda bulunması toksikasyona neden olmaktadır (Kumar vd. 2016). Bakır toksikasyonundan en çok etkilenen organ Cu'nun metabolizması gereği karaciğerdir. Bu organda Cu'a bağlı olarak meydana gelen doku hasarının temelinde artmış reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) rol oynadığı bilinmektedir (Gaetke ve Chow, 2003; He vd. 2020). Bu reaktif moleküller hücre içi protein, membranal yapılar ve DNA ile etkileşime girerek onların yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadır (Nieves-Cordones vd. 2019). Örneğin, membranal yapılarda artmış lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak malondialdehit (MDA) seviyesinde artış olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Gao vd. 2020; Kumar vd. 2016). Oluşan lipid peroksidasyonu hücre hasarına o da doku hasarına ve nihayetinde organ hasarına neden olmaktadır. Karaciğer doku hasarının en önemli biyokimyasal göstergeleri, alanin aminotransaminaz (ALT), aspartat aminotransaminaz (AST) ve gama-glutamil transferaz (GGT) belirteçleridir (Barber vd. 2021; Hajimohammadi vd. 2022). Meydana gelen doku hasarının reaktif türlerin neden olduğu doku stresinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla sıklıkla Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) kullanılır (Aslan vd. 2014; Cakir vd. 2015; Zhao vd. 2021). Organizma bu strese karşı birçok hücre içi enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar geliştirmiştir. Bu korucuyucu sistemlerden biri de glutasyon (GSH) adı verilen bir molekül olup, bu etki GSH'nin glutasyon peroksidaz için bir kofaktör olmasından kaynaklanmaktadır. Glutasyon peroksidaz reaktif türleri

su ve hidrojen peroksite dönüştürerek hücreyi reaktif türlerin neden olduğu stresten korur (Pei vd. 2013). GSH bu özelliğinden dolayı reaktif türlerin rol oynadığı doku hasarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Cigremis vd. 2009; Karaman vd. 2010).

Nörotrofinler benzer yapı ve sekansa sahip bir grup hücre dışı moleküllerdir. Bilinen 6 çeşit nörotrofin vardır; Sinir Büyüme Faktörü (NGF), Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF), Nörotrofin (NT-3), Nörotrofin (NT-4/5), Nörotrofin (NT-6) ve Nörotrofin (NT-7) (Dechant ve Neumann, 2003; Kazak ve Yarım, 2014). Nörotrofinlerin ilk keşfedilen üyesi NGF'dir. Bu büyüme faktörü nöronların hayatta kalımında, büyümesinde, farklılaşmasında ve fonksiyonlarının yürütülmesinde önemli roller oynamaktadır (Kazak ve Yarım, 2014). NGF'nin ayrıca proapoptotik etkisinin olduğu da bilinmektedir (Ibáñez ve Simi, 2012; Sedel vd. 1999). Sinir dokusu haricinde deri ve mukozalarda yara iyileşmesinde, kornea epitelinin iyileşmesinde, sindirim sisteminde bağırsak hareketliliği ve mukus salgısının düzenlenmesi ile bağışıklık sisteminde mast hücreleri ve bazofilleri uyararak yangısal cevapların oluşturulması gibi pek çok süreçte de NGF'nin fonksiyon gösterdiği belirlenmiştir (Dechant ve Neumann, 2002; Kazak ve Yarım, 2014). NGF etki mekanizmasını hücre membranında bulunan kendilerine has TrkA reseptörüne bağlanarak gösterir. Bu bağlanma reseptörde tirozin fosforilasyonuna neden olur. Reseptördeki tirozin fosforilasyonu çeşitli adaptör proteinlerin aktivasyonuna ve böylece intrasitoplazmik yolların tetiklenmesine, sonunda da belli genlerin aktivasyonuna neden olur (Alastra vd. 2021; Wise vd. 2021). Hücre içerisinde NGF'nin Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) sinyal yolağını aktif ettiği bilinmektedir (Yung vd. 2008). Mayalardan insanlara kadar tüm ökaryotik canlılarda MAPK'ler hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü gibi hayati olaylarda önemli rol oynamaktadır (Cuadrado ve Nebreda, 2010). MAPK'ler büyüme faktörleri, sitokinler ve oksidatif stres ile aktif hale gelerek, hücrenin uyarana karşı en uygun cevabın oluşturmasını da sağlar. MAPK; memelilerde hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) ve p38 MAPK olarak 3 gruba ayrılmaktadır (Canovas ve Nebreda, 2021).

p38 MAPK sinyal yolağı büyüme faktörleri, çevresel stresler ve yangısal sitokinler tarafından uyarılmaktadır. Büyüme faktörlerinden biri olan NGF'nin de bu yolağı aktive ettiği bilinmektedir (Xing vd. 1998). Ancak bu etkileşimin hücre hasarını

arttırdığı mı yoksa azalttığı mı tam olarak bilinmemektedir. Bu kapsamda farelerde Cu ile deneysel olarak oluşturulan karaciğer doku hasarında NGF'nin rolünün p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakır

Bakır 63.55 dalton atomik kütleyle sahip, kolay şekil verilebilen, düşük korozyonlu, alaşım kabiliyeti yüksek, termal ve elektrik iletkenliği iyi olan bir metaldir (Barber vd. 2021; Barceloux, 1999). Bu özellikleri sayesinde makine, inşaat, ulaşım, silah, kozmetik ve takı sektörlerinde direk veya başka metallere ilave alaşımlar olarak yaygın kullanılır (Barceloux, 1999; Lucas ve Lemons, 1992; Winge ve Mehra, 1990).

Bakır doğal toprakta yaklaşık 50 ppm/m³, doğal sulara 4-10 µg/L ve atmosferde 5-20 ng/m³ konsantrasyonlarında bulunur (Barceloux, 1999). Bu elementin toprak, su ve atmosferdeki oranı her geçen gün volkan gazları, orman yangınları, demir çelik üreticilerinin baca gazları ve içerisinde Cu bulunan veya Cu'dan yapılan endüstriyel ürünlerin çevreyi kirletmesi sonucunda artmaktadır (Pohl vd. 2015). Bu artış insan ve hayvan sağlığı için bir risk faktörü oluşturabilir (de Romaña vd. 2011).

Bakır, tüm canlı organizmalarda oksitlenmiş Cu²⁺ ve indirgenmiş Cu⁺ hallerinde bulunan bir elementtir (Borobia vd. 2022). Yaklaşık 2-3 milyar yıl önce oksijen atmosferinin oluşmasıyla Cu⁺ daha kolay çözünür hali olan Cu²⁺ iyonuna dönüşerek tüm biyolojik türler için kullanılabilir hale gelmiştir (Crichton ve Pierre, 2001). Bakır bu iki form arasında kolay dönüşüm gösterebildiği için biyolojik işlevleri yerine getiren proteinler için redoks kimyasında önemli bir katalitik kofaktör olarak görev alır (Borobia vd. 2022; Kaim vd. 1996). Bu temel görevinden dolayı Cu tüm canlı organizmalar için hayati bir geçiş elementidir (Kaim vd. 1996).

Bakır, insan ve hayvanlarda en çok bulunan metallere biridir. Bu metal organizmada en fazla karaciğer, beyin ve böbrekte bulunur (Linder, 2013). Bakırın canlı organizmalar için gerekliliği ilk defa 1928 yılında sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan aneminin tedavisinde, içerisinde Cu bulunduğu bilinen bitki ve hayvan küllerinin rasyona eklenmesi ve aneminin tedavisinde başarılı olunmasıyla

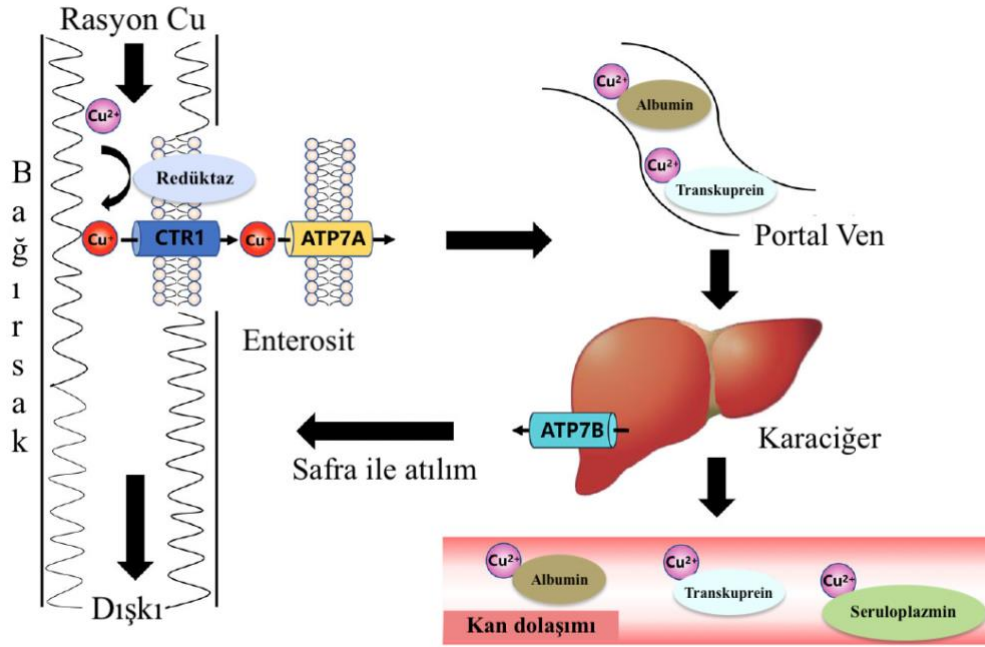
kanıtlanmıştır (Hart vd. 1928). Bakır, mitokondride sitokrom c oksidaz, bağ dokusunda lizil oksidaz, beyinde dopamin monooksijenaz ve seruloplazmin gibi aerobik metabolizmada yer alan enzimlerin aktivasyonu için olmazsa olmazdır (Scheiber vd. 2013). Ayrıca bakır-çinko süperoksit dismutaz için bir kofaktör olan Cu, proteinleri, zar lipidlerini ve nükleik asitleri serbest radikal hasarına karşı da korur (Boyd vd. 2020). Bakır eksikliğinde zeka geriliği, anemi, hipotermi, nötropeni, ishal, kalp hipertrofisi, kemik kırılabilirliği, zayıf bağ doku oluşumu, deri ve saç (hayvanlarda kürk) kaybı, bağışıklık ve merkezi sinir sisteminin fonksiyonlarında bozukluklar görülür (National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water, 2000). Bakır canlı organizmanın fizyolojik faaliyetlerini sürdürebilmesi için temel bir element olmasına rağmen organizmada aşırı miktarda bulunduğu toksik etki gösterir (de Romaña vd. 2011).

2.1.1. Bakır Metabolizması

Organizmalar, Cu da dahil metal iyonlarının hücre içine alınması, proteinlere bağlanması, hücre içi taşınması ve depolanması için çeşitli yolları kullanırlar. Bu yollar hücreleri Cu'nun eksikliği ya da fazlalığının olumsuz etkilerine karşı korur. Bakır homeostazı bağırsaktan emilim, karaciğerde depolanma ve safra yoluyla atılım gibi temel yollarla sağlanır (Turnlund vd. 1997; Uauy vd. 1998).

Diyetle alınan Cu'nun emilimi başta duodenum olmak üzere ince bağırsakta gerçekleşir (Gaetke vd. 2014). Bakırın emilimi rasyondaki oranına, kimyasal formuna, bireyin Cu ihtiyacına ve rasyonda bulunan Cu'nun emilimini arttıran ya da azaltan metallerin (Mo, S, Fe ve Zn) varlığına göre değişir. Memelilerde diyetle alınan Cu'nun yaklaşık olarak %30-50'si emilir (Hill ve Shannon, 2019; Turnlund vd. 1997). Bakırın bağırsak epitel hücreleri içerisine alınmasına, esas olarak enterositlerin apikal tarafında bulunan Cu Taşıma Proteini 1 (CTR1) aracılık eder. Bu işlem, Cu^{+2} 'ı Cu^{+} 'a indirgeyen metaloredüktaz 6-transmembran epitelyal prostat ve duodenal sitokrom b'nin aktiviteleri kullanılarak gerçekleştirilir (Dancis vd. 1992; Georgatsou vd. 1997). Bakır gastrointestinal sistem tarafından emildikten sonra, kan dolaşımında albümin, transkuprein, histidin ve makroglobulinlere bağlanarak karaciğere taşınır (**Şekil 2.1**) (Liu vd. 2007; Weiss ve Linder, 1985). Karaciğere gelen Cu hepatositlerin yüzeylerinde bulunan, CTR1 yoluyla sitoplazmaya giriş yapar. Bakır sitoplazmanın

içinde ya Cu şaperonları tarafından spesifik proteinlere iletilir ya da depolama için metallothionein (MT) ile şelatlanır (Linder, 2013). Hücre içi Cu şaperonları COX17 (Cu'ı sitokrom c oksijenaza iletir), CCS (Cu'ı süperoksit dismutaz 1'e ileten süperoksit dismutaz için Cu şaperonu) ve ATOX1 (Cu'ı ATP7A ve ATP7B 'ye ileten)'dir Karaciğerde, Cu-ATPazlar (hepatositlerde ATP7B) Cu iyonlarını başta seruloplazmin olmak üzere Cu şaperonlarına bağlayarak Cu'nın kana geçmesini ve organlara taşınmasına neden olur (Boyd vd. 2020; La Fontaine vd. 2010). Hedef dokuya ulaşan Cu, mitokondriyal enerji üretimi, tirozin ve nörotransmitter metabolizması, redoks homeostazı ve hücre dışı matrisin yeniden modellenmesi dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik süreçte aktif rol oynar (Lutsenko vd. 2007).

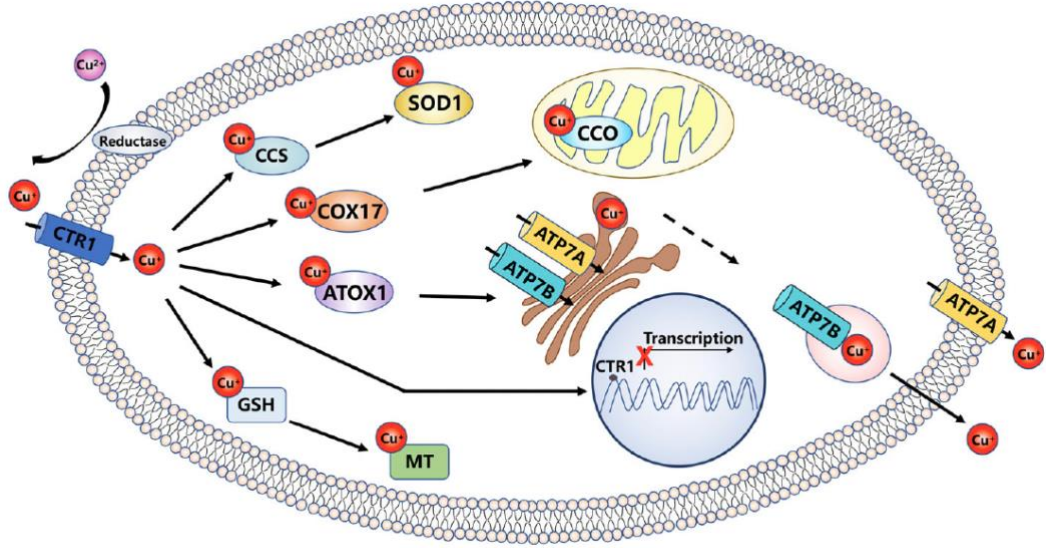


Şekil 2.1. Organizmadaki Cu homeostazı

(Li, 2020)

Organizmada Cu öncelikle karaciğerde depolanır. Hücre içerisindeki Cu depolanamayacak kadar fazla olursa ya endojen yolla hepatosit içerisindeki Cu safra yoluyla ya da eksojen yolla emilmemiş metal iyonları olarak dışkıda organizmadan uzaklaştırılır (Thiele, 2003). Organizmadaki fazla Cu az da olsa idrar, ter ve diğer vücut salgılarının içinde elimine edilir (Aggett, 1999).

Her hücre kendi Cu homeostazını sıkı bir şekilde düzenler. Hücrelerde Cu homeostazı enzimler, şaperonlar ve zar taşıyıcılarından oluşan karmaşık bir Cu'a bağımlı protein ağı tarafından düzenlenir (Şekil 2.2). Bu proteinler, Cu'ın hücre içine alımını, hücre içi kullanımını ve hücre dışına atılımını koordine etmek için birlikte çalışır, böylece hücrel Cu seviyelerini belirli bir aralıkta tutar, bu da Cu'ın aşırı yüklenmesi ya da Cu eksikliğinin olumsuz sonuçlarını önlemeye yardımcı olur (Scheiber vd. 2013).



Şekil 2.2. Hücre içi Cu homeostazı

(Li, 2020)

Hücre zarı proteini olan CTR1 tarafından hücre içine alınan Cu'ın hücre içi dağılımı Cu şaperon ağları tarafından sıkı bir şekilde koordine edilir (Puig ve Thiele, 2002). ATOX1 şaperonu, Cu'ın trans golgi ağında ATP7A ve ATP7B'ye aktarılmasından sorumludur ve lizil oksidaz, tirozinaz ve seruloplazmin gibi kuproenzimlerin (bileşiminde Cu bulunan enzimler) sentezinde rol oynar (Lutsenko vd. 2007). Ana Cu bağlayıcı protein olan seruloplazmin hem indirgenmiş hem de yükseltgenmiş hallerinde sekiz adet Cu atomu içerir. Bu yüksek bağlanma kapasitesi sayesinde kanda dolaşan Cu'ın %60-90'ı seruloplazmin formundadır (Harris, 1990).

Bakırın kuproenzimlerle birleşmesi ya da ayrılması ATOX1 şaperonunun düzgün bir şekilde çalışması ile gerçekleştirilir (Boal ve Rosenzweig, 2009; Prohaska, 2008). Bu şaperon ayrıca CCS ve COX17 sentez yollarına da Cu taşır (Kelner vd. 2000). Şaperon CCS, ROT'ni detoksifiye etmek ve Cu homeostazını sürdürmek için Cu'ı süperoksit dismutaz 1'e (SOD1) iletir (Gralla ve Valentine, 1991). Mitokondride Cu hem oksidatif fosforilasyonun hem de mitokondriyal fonksiyonların sürdürülmesinde görev alır. Mitokondride bulunan Cu şaperonu COX17, Cu'nun sitozolden mitokondriye taşınmasından sorumludur (Prohaska, 2008). Mitokondride Cu⁺, COX17'ye bağlanır ve COX2 alt ünitesine transfer için sitokrom c oksidaz 1'in şaperon sentezine veya COX1 alt ünitesine teslimat için COX11'e iletilir (Banci vd. 2008).

Cu-ATPazlar (ATP7A ve ATP7B), hücrel Cu'ı dışa aktarmak için ana taşıyıcı görevi görür. ATP7A/7B lokalizasyonu ve fonksiyonu hücre için önemlidir (Palmgren ve Nissen, 2011). Bu taşıyıcılar fizyolojik süreçte Cu'ı sitozolden golginin lümenine pompalar. Hücre içi Cu miktarı arttığında, bu taşıyıcılar golgiden veziküllere geçerek Cu'ı dışarı aktarmak için plazma zarıyla birleşir. Hücre içi Cu fizyolojik seviyelere döndüğünde, bu şaperonlar golgiye geri dönerler (Boal ve Rosenzweig, 2009; Prohaska, 2008). ATP7A ve ATP7B, her dokuda farklı ekspresyon modellerine sahiptir. Organizmada çoğu doku ve organda bulunan ATP7A ve ATP7B'nin en yoğun olarak bulunduğu yer karaciğerde hepatositlerdir (Lutsenko vd. 2007).

2.1.2. Bakır Toksikasyonu

Bakır hayvanlar için temel bir mikro elementtir. Bakır bağ dokusunun oluşumunda, demir metabolizmasında, hücrel solunumda, oksidatif strese karşı korunmada, miyelin, melanin ve keratin üretiminde yer alan enzimlerin temel bileşimine katılarak birçok biyolojik süreçte önemli roller oynamaktadır (Gaetke vd. 2014; Suttle, 2012). Bu temel görevlerinden dolayı evcil ve çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde mama ve yemlere rutin olarak Cu ilavesi yapılmaktadır (López-Alonso vd. 2017). Rasyona eklenen Cu'nun miktarı fazla olduğunda hem insan hem de hayvanlarda toksikasyona neden olur (Gaetke vd. 2014; Scheiber vd. 2013). Hayvan türlerine göre Cu toksikasyonuna duyarlılık değişmektedir. Bunun başlıca sebebi türlerin Cu'ı metabolize edebilme kapasitelerinin farklı olmasıdır. Monogastrik türler

Cu toksikasyonuna ruminantlara göre daha dirençlidir. Koyun ise ruminantlar içerisinde Cu toksikasyonuna en duyarlı türdür (Clarkson vd. 2020; Suttle, 2012).

Bakıra duyarlılık koyun ırkları arasında değişkenlik gösterir, bu durumun safrada Cu salgılama yeteneği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Wiener vd. 1978; Woolliams vd. 1983). En duyarlı ırk North Ronaldsay koyunu iken en dirençli ırk Merinos koyunudur (Haywood vd. 2005; Wiener vd. 1978). Cambridge ırkı koyunlar Suffolk, Texel, Bluefaced Leicester ve Charollais ırklarına göre Cu toksikasyonuna daha dirençlidir (van der Berg vd. 1983; Haywood vd. 2005; Wiener vd. 1978). Domuz, kümes hayvanları ve at gibi diğer türler Cu toksikasyonuna koyunlara göre daha dayanıklıdır (Duncan, 1997). Örneğin domuzlar temel ihtiyaçlarını karşılamak için yemlerine katılan 250 mg/kg düzeyindeki Cu'ı tolere edebilirlerken koyunlarda 25 mg/kg Cu toksik etkilerin ortaya çıkması için yeterlidir (Duncan, 1997; Gao vd. 2020). Bu durum koyunlarda Cu'a bağlı toksikasyonlarda ölüm oranının yüksek olmasına neden olmaktadır (Duncan, 1997). Yetiştiriciler için özellikle çiftlik hayvanlarındaki ölüm oranının yüksek olması, tedavi ve üretimin azalması nedeniyle ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir. Ekonomik kayıpların büyüklüğü nedeniyle, bazı ülkelerde Cu toksikasyonu koyunculuk endüstrisini etkileyen en önemli hastalıklardan biri olarak kabul edilir (Gooneratne vd.1989; Minervino vd. 2018).

Hayvanlarda Cu toksikasyonu akut ve kronik olmak üzere iki şekilde meydana gelebilir. Akut Cu toksikasyonu tedavi amacıyla verilen Cu'ın aşırı miktarda parenteral veya oral uygulanması, kontamine gıdalardan veya diğer Cu kaynaklarından toksik miktarlarda Cu alınması nedeniyle yüksek miktarda maruz kalma ile ilişkilidir (Hill ve Shannon, 2019; Minervino vd. 2018). Kronik Cu zehirlenmesi ise diyet gereksiniminin üzerindeki dozlara veya toksik olmayan Cu dozlarına uzun süreli maruz kalmanın (haftalardan aylara kadar) sonucu olarak gelişir (Gooneratne vd. 1989; Minervino vd. 2018).

Çiftlik hayvanlarında toksikasyona neden olan Cu'ın en önemli kaynağı karma yemler ve mineral takviyeleridir. Bunlara en iyi örnek içerisinde mineral takviyesi yapıldıktan sonra iyi homojenize edilmeyen karma yemler (Tuzcu vd. 2022), veya domuz ve kümes hayvanları için hazırlanan özellikle Cu bakımından zengin yemlerin

duyarlı türler tarafından kaza ile tüketilmesidir (Borobia vd. 2022). Ayrıca tarımda göz taşı (CuSO_4) ve Bordo bulamacı gibi Cu içeren bileşiklerin püskürtüldüğü asma ve zeytin yapraklarının yedirilmesi (Eroksuz vd. 2021), küflenmeyi önlemek için Cu içeren fungusit püskürtülen yemlerin tüketilmesi, hayvanların sanayi ve madencilik faaliyetleri sonucunda kontamine olmuş bitki örtüsünde otlatılması, Cu içeren ayak banyoları, yosun öldürücüleri, yumuşakça öldürücüleri ile kontamine olmuş suların tüketilmesi, Cu telli ruminal bolusların kullanılması, domuz ve kanatlı gübresinin kullanıldığı arazilerdeki silaj ve kök bitkileri ile beslenilmesi, at, sığır, domuz ve kümes hayvanları için hazırlanmış vitamin-mineral takviyeleri ve yalama taşlarının koyunlarda kullanılması, Cu silolarda beklemiş tahıl tanelerinin yedirilmesi, Mo, S, Fe ve Zn gibi Cu antagonistlerinin rasyonda yetersiz miktarda bulunması, Cu eksikliğinin önlenmesi veya sindirim sistemi parazitleri tedavisi için kullanılan Cu tuzlarının oral veya parenteral aşırı dozda verilmesi Cu toksikasyonuna neden olur (Borobia vd. 2022; Duncan, 1997; Oruc vd. 2009; Sargison, 2009).

Hayvanlarda olduğu gibi insanlarda da Cu toksikasyonu akut veya kronik olarak oluşabilir. Bakır ile ilişkili akut toksikasyon vakaları genellikle intihar niyetiyle oral yoldan yüksek miktarda Cu yutulması ile ilişkilidir. Tek seferde oral alınan 10-20 gr Cu yetişkin bir insanın ölümüne neden olabilir (Deng vd. 2023; Han vd. 2021; Hajimohammadi vd. 2022; Royer ve Sharman, 2020). İnsanlarda akut Cu toksikasyonuna örnek olarak Hindistan ve İran'da içerisinde yüksek oranda Cu bulunan suların tüketilmesi gösterilebilir (Royer ve Sharman, 2020; Han vd. 2021). Bakırın kontrolsüz kullanımı sadece doğu ülkelerine has değildir. Avrupa'da 1960 yılında piyasaya sürülen ve içerisinde Cu bulunan tabletler çocuk ve yetişkinlerde bir süre emetik ilaç olarak kullanıldı. Ancak bu ilaçların kullanımı ortaya çıkan toksikasyon vakalarından kısa bir süre sonra durduruldu (Hajimohammadi vd. 2022; Royer ve Sharman, 2020). İnsanlardaki kronik Cu toksikasyonu ise genellikle su ve gıda maddelerine karışan düşük dozdaki Cu'a uzun süre maruz kalma ile ilişkilidir. İnsanlarda kronik Cu toksikasyonun belirtilerinin ortaya çıkması yıllar alabilir (Uriu-Adams ve Keen, 2005). Kronik Cu toksikasyonunda klinik belirtiler karın ağrısı, kusma, kas krampları veya spazmları, ishal, sarılık ve anemi gibi spesifik olmayan belirti ve semptomlarla kendini gösterir. Bakır alımı kesilir ve destekleyici tedavi uygulanırsa hastalar iyileşebilir (Perestrelo vd. 2021).

Ayrıca insanlarda iki farklı genetik mutasyona bağlı Cu metabolizmasının bozulmasıyla karakterize Menkes ve Wilson hastalıkları tanımlanmıştır (Gaetke vd. 2014). Menkes hastalığı ATP7A geninde mutasyon sonucu oluşan bir hastalıktır. Bu mutasyon ATP7A'yı hücre içindeki Cu'ı sürekli dışarıya atan bir kanala dönüştürür. Bu durum Cu ile ilişkili enzimlerin üretilmemesi sonucu hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Chen vd. 2022). Menkes'in aksine Wilson hastalığı hücre içinde aşırı Cu birikmesi ile ilişkilidir. Wilson hastalığı ATP7B geninde mutasyon sonucu oluşur. Bu mutasyon sonucunda hücre içine giren Cu bir daha dışarıya atılamaz. Bu durum hücre içinde aşırı miktarda serbest Cu birikimine neden olur. Hücre içinde serbest haldeki Cu hücreler için toksiktir (Chen vd. 2022; Scheiber vd. 2013).

Sıçan ve fareler Cu toksikasyonuna insanlar ve evcil hayvanlara göre daha dirençlidir (National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water, 2000). Bu hayvanlardaki Cu toksikasyonları bilimsel araştırmalarda deneysel olarak oluşturulmaktadır (Kumar vd. 2016; Tian vd. 2015). Erkek sıçanlarda oral LD₅₀ dozu 42 mg/kg iken dişi sıçanlarda LD₅₀ dozu 37 mg/kg'dır (Alman vd. 2022). Bakırın farelerdeki LD₅₀ dozu Shiraishi vd. (1991) tarafından 29,5 mg/kg olarak bildirilirken Kadammatil vd. (2018) tarafından 39,8 mg/kg, Kanada iş sağlığı ve güvenliği merkezi (2022) tarafından ise 61 mg/kg olarak bildirilmektedir.

Bakır parenteral veya oral yolla organizmaya yüksek miktarda girdiğinde karaciğerde birikir. Bu birikme Cu'nun depolama ve taşıma kapasitesini etkiler (Sternlieb, 1980). Organizmada Cu miktarının yüksek olması serbest radikal kaynaklı oksidatif stres hasarı ile ilişkili hepatotoksisite nedeniyle karaciğer yetersizliğine bağlı ölüme neden olur (Floriańczyk, 2003).

Oksidatif stres, hücresel metabolizma sırasında oluşan ve hücreye zararlı etkileri olduğu bilinen serbest radikaller (oksidanlar) ile bu radikallerin temizlenmesinde rol alan antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin antioksidanlar aleyhine bozulmasıdır (Palipoch ve Koomhin, 2015). Hücrede oksidan hasarına sebep olan bu radikaller reaktif oksijen türleri (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksil radikali) ve reaktif nitrojen türlerinden (nitrik oksit ve peroksinitrit) oluşur (Young ve Woodside, 2001).

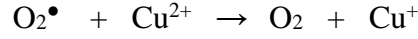
Yüksek organizmalarda metabolik faaliyetler veya çeşitli faktörler sonucu birçok hastalığın patogeneğinde rol oynayan serbest radikal olarak adlandırılan bileşikler oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Palipoch ve Koomhın, 2015). Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran, oldukça kısa ömürlü moleküller olarak tanımlanmaktadır (Mahatesh vd. 2012).

Antioksidanlar, oksidatif hasarı geciktiren veya engelleyen maddelerdir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Bu bileşikler; oksidanların biyolojik hedeflerle reaksiyona girmesini, radikal zincir reaksiyonları oluşturmalarını ya da oksijenin oldukça reaktif ürünlere dönüşmesini önleyerek serbest radikallerin vereceği hasarı en aza indirirler (Duarte ve Lunec, 2005; Mahatesh vd. 2012).

Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki hassas denge organizmaların metabolik faaliyetlerini sorunsuz bir şekilde yürütmeleri ve canlılıklarını devam ettirebilmelerinde oldukça önemlidir. Bu dengenin sağlanması “redoks regülasyonu” olarak da adlandırılmaktadır (Young ve Woodside, 2001). Redoks regülasyonu organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur ve *in vivo* redoks durumunu kontrol ederek redoks homeostazisinin sürdürülmesini sağlar (Dröge, 2002). Dengenin, serbest radikaller tarafındaki artış ya da antioksidan tarafındaki yetersizliğe bağlı bozulması oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Palipoch ve Koomhın, 2015).

Serbest radikaller kısa yaşam ömürlerine ve miktarca düşük konsantrasyonlarda üretilmelerine rağmen çok reaktif yapılı olmaları nedeniyle organizma için oldukça zararlı bileşiklerdir. Bu radikaller hücre içerisinde protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Young ve Woodside, 2001).

Bakır toksisitesinin temel mekanizması oksidatif stres hasarı ile ilişkilendirilmektedir (Gaetke vd. 2014). Süperoksit (O_2^\bullet), askorbik asit veya GSH gibi indirgeyici ajanların varlığında Cu^{2+} , Haber–Weiss reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksitten hidroksil (OH^\bullet) radikallerinin oluşumunu katalize edebilen Cu^+ ’ya indirgenebilir (Gaetke ve Chow 2003; Kadiiska ve Mason 2002).



Yukarıda verilen mekanizma ile meydana gelen OH^\bullet reaktif oksijen türleri arasında tüm biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilen en reaktif ve zararlı radikaldir (Valko vd. 2005). Hidroksil radikali karbon merkezli bir protein radikali oluşturmak için amino taşıyan karbondan bir hidrojeni ve bir lipid radikali oluşturmak için doymamış bir yağ asidinden hidrojeni ayırarak oksidatif hasarı başlatma yeteneğine sahiptir. Bu radikal protein ve lipidlerin yanı sıra bazıları da oksidasyona uğratarak DNA sarmalının kırılmasına neden olur. Ayrıca, nitrik oksit (NO) ve süperoksitin reaksiyon ürünü olan peroksinitrit, seruloplazmin gibi protein kompleksinden Cu iyonlarını ayırarak serbest Cu miktarının ve oksidatif hasarın artmasına neden olur (Gaetke vd. 2014; Gaetke ve Chow, 2003).

Oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” adı verilir (Karabulut ve Gülay, 2016; Young ve Woodside, 2001). Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek oksidanların biyolojik hedeflerle reaksiyona girmesini, radikal zincir reaksiyonları oluşturmalarını ya da oksijenin oldukça reaktif ürünlere dönüşmesini önleyerek serbest radikallerin vereceği hasarı en aza indirmeye çalışırlar (Kabel, 2014). Antioksidanlar, kaynağına göre endojen ve eksojen; aktivitelerine göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler (Nimse ve Pal, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazdır. Bu enzimler hücresel seviyede reaktif türlerle mücadele eden birincil derecede antioksidanlardır. Bu antioksidanlar Cu, Zn, Mn ve Fe gibi kofaktörlerin varlığında çok aşamalı bir işlemle tehlikeli oksidatif ürünleri hidrojen peroksit ve suya dönüştürür (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Enzim yapısında olmayan doğal antioksidanlar, bitki veya hayvan dokularında bulunan ya da bitkisel veya hayvansal kaynaklı bileşiklerin pişirilmesi veya işlem görmesi sonucu oluşan maddelerdir. Hemen hemen tüm mikroorganizmalar ile bitkisel ve hayvansal

dokularda bulunurlar (Townsend vd. 2003). Enzimatik olmayan antioksidan türleri arasında mineraller (çinko ve selenyum), vitaminler (vitamin C, vitamin A, vitamin K ve vitamin E), karotenoidler (likopen ve lutein), organosülfür bileşikleri (allilsülfür), polifenoller, düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (ürük asit), antioksidan kofaktörler (koenzim Q10), GSH, melatonin ve indol türevleri yer alır (Nimse ve Pal, 2015).

Organizmada Cu toksikasyonunda en çok etkilenen organ Cu metabolizması gereği karaciğerdir. Karaciğerdeki histopatolojik değişiklikler organizmaya alınan Cu miktarına göre değişmektedir (Liu vd. 2020b). Akut Cu toksikasyonunda özellikle sentral ven çevresindeki hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve fokal nekroz görülürken hasarın daha şiddetli olduğu olgularda ise şekillenen histopatolojik değişiklikler panlobülerdir. Akut olgularda yangısal değişiklikler minimal seviyede olabilirken kronik olgularda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize fokal nekroz odaklarına kadar değişen varyasyonlarda şekillenebilir. Ayrıca kronik Cu toksikasyonlarında hepatositlerin yerini fibroblast ve fibrositlerin aldığı fibrotik değişiklikler de görülebilir (Eroksuz vd. 2021; Helman vd. 1985; Huster, 2010).

Hepatositlerde Cu toksikasyonuna bağlı oluşan dejenerasyonlar karaciğer enzimlerinden ALT, AST ve GGT'nin kan serumundaki seviyelerinde belirgin derecede artışa neden olur (Barber vd. 2021; Hajimohammadi vd. 2022; Liu vd. 2020a). Bu enzimler hepatosellüler hasarın kan serum belirteçleri olarak kabul edilmektedir (Lala vd. 2022). Karaciğer hasar belirteçlerinden ALT hepatosit sitoplazmasında kan serumuna oranla 3000 kat daha fazla bulunur (Sherman, 1991). Fizyolojik koşullarda L-alanin a-ketolutarat ile bileşimini katalizleyerek son ürün olarak L-glutamat ile piruvat oluşumunu sağlar. Hepatositte meydana gelen en ufak dejenerasyonda sitoplazmada bulunan ALT hücre dışına sızar ve kan serumuna geçer (Yanai vd. 2005; Yang vd. 2009). AST ise fizyolojik koşullarda, amino asitleri katalizleyerek protein sentezini kolaylaştıran bir enzimdir. Bu enzim de ALT gibi hepatositlerde hasar meydana geldiğinde hücre dışına sızar. AST karaciğer haricinde iskelet ve kalp kasında, böbrek, dalak, pankreas, beyin ve eritrositlerde bulunur. Bu enzim karaciğerden farklı dokularda da bulunduğu için tek başına artmış olması karaciğer hasarının göstergesi değildir. Bu nedenle serumda ALT ve AST'nin birlikte yükselmesi karaciğer hasarının belirteci olarak yorumlanır (Mason vd. 2010). GGT bir

diğer karaciğer hasar belirteçidir. Fizyolojik koşullarda GGT glutatyonun yıkımlanmasından sorumludur. Bu enzim AST gibi sadece karaciğere özgü değildir. Pankreas, böbrek ve damar endotel hücrelerinde de bulunur. ALT ve AST ile birlikte serumda GGT'nin artışı karaciğer hasarının belirteci olarak yorumlanır (Mason vd. 2010). Bakır toksikasyonunda insan (Barber vd. 2021), ruminant (Borobia vd. 2022; Tuzcu vd. 2022) ve deney hayvanlarında (Liu vd. 2020a; Tian vd. 2015) ALT, AST ve GGT'nin kan serum seviyelerinin artışı bildirilmektedir.

Oksidatif hücre hasarının bir göstergesi olarak dokularda ve serumda MDA'nın belirlenmesi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Hücre hasarı sırasında oluşan serbest radikaller hücre membranlarında bulunan doymamış glikolipit ve fosfolipitlerle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonu bir takım zincir reaksiyonlar sonucunda lipit hidroperoksitler (LOOH) ve konjuge dienler oluşmasına neden olur. Lipit peroksidasyonunun son ürünü MDA'dır. Hücre hasarı sırasında artmış lipit peroksidasyonundan dolayı artmış MDA seviyesi hücre hasarının bir göstergesi olarak kullanılır (Tsikas, 2017).

Nitrik oksit, bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan, yörüngesinde çiftlenmemiş elektron içeren ve dolayısıyla bir radikal olan azot monoksit gazıdır (Olson ve Garbán, 2008). Bu radikalın her ne kadar fizyolojik süreçlerde kan akımı ve basıncının düzenlenmesi, düz kas gevşemesi, nörotransmitter madde, savunma mekanizmaları ve immun yanıtın oluşması gibi görevleri olsa da hücre içindeki miktarının artması nitrozatif stres olarak adlandırılan duruma neden olmaktadır. Nitrozatif stres, oksidatif strese benzer olarak hücre içindeki yağ, protein ve DNA'nın yapısını değiştirerek hücrenin normal fonksiyonlarını inhibe eden nitrozilasyon reaksiyonlarına yol açabilir. Nitrik oksit ayrıca ROT'larla birleşerek lipit oksidasyonuna neden olan peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturur (Aladağ vd. 2000; Ridnour vd. 2004).

Nitrik oksit L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. Bu enzimin indüklenebilir NOS (iNOS), nöronal NOS (nNOS) ve endotelial NOS (eNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Bu enzimlerden nNOS ve eNOS dokularda fizyolojik süreçlerde, iNOS ise patolojik durumlarda NO sentezinden sorumludur (Karakaya vd. 2009; Türköz ve Özerol, 1997).

Nitrik oksit sentaz enzimleri tarafından sentezlenen NO fizyolojik seviyesinin üstüne çıktığında nitrozatif doku hasarına neden olur. Sentezlenen NO hücre sitoplazmasında bulunan tirozin amino asidi ile birleşerek nitrotirozin adı verilen, 3N içeren yapıyı oluşturur. Bu molekül, özellikle biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalarda nitrozatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilir ve bu stresin hücreler üzerindeki etkisini araştırmak için kullanılır (Bandoowala ve Sengupta, 2020; Özen vd. 2014; Thomson, 2015).

Glutasyon karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. Hücre içinde GSH'nin %85-90'ı sitoplazma da bulunur. Geri kalan kısmı sitoplazmada sentezlendikten sonra mitokondri, çekirdek, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda bulunabilir (Townsend vd. 2003). Glutasyon serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan önemli enzimatik olmayan bir antioksidandır (Pei vd. 2013). Bu özelliğinden dolayı oksidatif stres araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Cigremis vd. 2009; Karaman vd. 2010).

Kan ve dokularda antioksidan ve oksidan maddelerin miktarını değerlendirmek için kullanılan diğer bir yöntem TAS ve TOS testleridir (Erel, 2004; Ghiselli vd. 2000; Tarpey vd. 2004). Toplam antioksidan seviyesi, antioksidan savunma sistemlerinin gücünü ölçmek için kullanılan bir testtir. Yüksek TAS seviyesi vücudun serbest radikallere karşı güçlü bir savunmaya sahip olduğunu, düşük TAS seviyesi ise oksidatif stresin artmış olabileceğini göstermektedir. Toplam oksidan seviyesi ise oksidan maddelerin doku ve kanda mevcut olan miktarını ölçmek için kullanılan bir testtir. Yüksek TOS seviyesi, dokuda oksidatif stresin arttığını ve hücrelerin oksidatif hasara maruz kaldığını bir göstergesidir (Aslan vd. 2014; Cakir vd. 2015; Zhao vd. 2021).

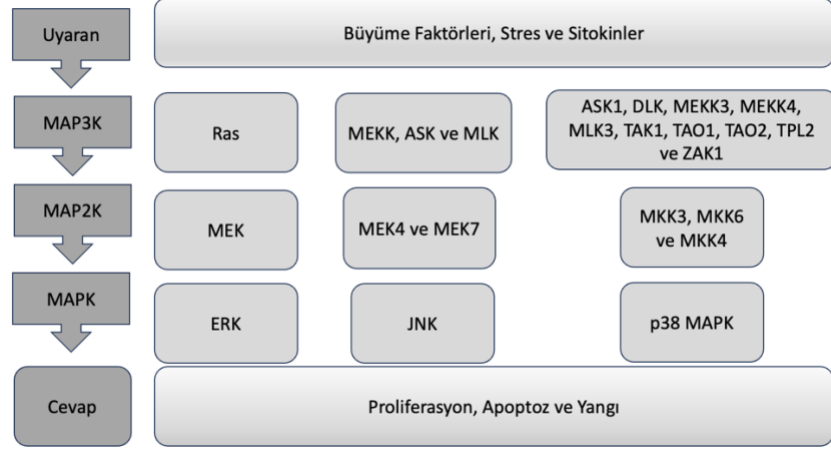
Oksidatif hasara uğrayan hücrelerde çeşitli bileşikler ortaya çıkar ve bu bileşikler hücrenin kaderinin belirlenmesinde kritik rol oynar. Hücrenin oksidatif hasara olan tepkisi hücre tipine göre değişmekle birlikte genelde farklılaşma, çoğalma ya da hücre ölümüdür. Hücrenin kaderi açığa çıkan ROT miktarına göre değişmektedir. ROT miktarının düşük olduğu durumlarda hücreler hayatta kalır,

farklılaşır veya çoğalırlarken, ROT miktarının yüksek olduğu durumlarda hücreler ölür (Matsuzawa ve Ichijo, 2008). Hasara uğramış olan hücrenin kaderinin belirlenmesinde hücre içi bazı aracı moleküller rol oynar. Bu moleküllerin en önemlisi Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar (MAPK'ler)'dir. MAPK'ler hücre içi sinyal iletimine aracılık ederek hücrenin büyümesi, farklılaşması, gelişmesi, hayatta kalması ve ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerde temel rol oynayan evrimsel olarak korunmuş düzenleyici proteinlerdir (Ravingerová vd. 2003).

2.2. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK)

Hücreler hayatta kalabilmek ya da çeşitli uyaranlara karşı uyum sağlayabilmek için hücre içi ve dışı ortamdaki değişiklikleri sürekli olarak algılamalıdır. Hücreler bu farklılıkları algılamak, sinyalleri almak, bilgileri iletmek ve uygun yanıtları düzenlemek için karmaşık mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmaların en iyi bilineni MAPK'lerdir (Cuadrado ve Nebreda, 2010). MAPK'ler fizyolojik ve patolojik bir çok süreçte önemli rolleri olan hücre içi ana sinyal iletim yolunun üyeleridir. MAPK'lerin mayalardan insanlara kadar tüm ökaryot canlılarda hücrelerin farklılaşması, çoğalması ve ölümü gibi hayati fonksiyonlarında görev aldığı bilinmektedir (Plotnikov vd. 2011).

MAPK'lerin yolları, hücre yüzeyi reseptörleri ve hücre içi sinyal molekülleri arasında kinazların sıralı fosforilasyonu ve sıralı aktivasyonu ile yönetilen iyi organize olmuş basamaklardan oluşur (**Şekil 2.3**). Büyüme faktörleri, oksidatif stres ve sitokinler gibi uyaranlara karşı ilk cevap olarak MAPK Kinaz Kinaz (MAP3K) seviyesinde fosforilasyon gerçekleşir. Fosforile olmuş aktif MAP3K, MAPK Kinaz'ı (MAP2K) fosforile ederek aktif hale getirir. Aktif MAP2K iki adet fosfor ekleyerek MAPK'yi aktifleştirir (Keshet ve Seger, 2010; Kyriakis ve Avruch, 2012). Memelilerde iyi tanımlanmış 3 adet MAPK alt grubu vardır: ERK, JNK ve p38 MAPK. Bu üç sinyal iletim kinazı kendilerine ait yollarla hücrelerin büyümesinden ölümüne kadar pek çok süreçte rol alır (Plotnikov vd. 2011).



Şekil 2.3. MAPK yolakları

(Cuadrado ve Nebreda, 2010 ve Son vd. 2011'den modifiye edilmiştir)

2.2.1. Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz (ERK)

Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar, hücre dışı sinyalleri hücre içi hedeflere ileten sinyal yoluna ait MAPK'lerdir. Bu kinazın ERK1 ve ERK2 olarak isimlendirilen iki izoformu vardır. Hücrelerde bu iki izoform birbirleriyle benzer görevleri üstlenirler. Bu kinazlar, hücre büyümesi, bölünme, farklılaşma, hareketlilik ve apoptoz gibi birçok hücreyel süreci etkileyen proteinleri fosforile ederek hücre yapısında işlevsel değişiklikler yaparlar (Keshet ve Seger, 2010; Plotnikov vd. 2011).

ERK, hücre dışındaki faktörlere cevap olarak bir dizi enzimatik reaksiyonla aktive olur ve hücre içindeki çeşitli hedeflere fosforilasyon yoluyla sinyal ileterek bir dizi hücreyel cevabı başlatır. ERK aktivasyonu, hücre dışında bulunan sinyal moleküllerinin (çoğunlukla büyüme faktörleri) hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanması ile başlar (Guo vd. 2020; Roberts, 2012). Hücre dışındaki sinyal molekülleri, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlandığında, reseptörler fosforile edilir. Bu fosforilasyon Ras, RAF ve MEK proteinlerinin sıralı aktivasyonunu başlatır. Bu kinaz yolağında bir protein kinaz diğerini fosforile ederek sinyalin ilerlemesini sağlar. MEK fosforile olarak ERK aktivasyonu gerçekleşir. Bu aktivasyon sonucunda sitoplazmada bulunan ERK çekirdeğe girer, transkripsiyon faktörü aktivitesini ve gen ekspresyonunu düzenler (Mebratu ve Tesfaigzi, 2009).

2.2.2. c-Jun N-Terminal Kinazlar (JNK)

c-Jun N-Terminal Kinazlar (JNK) MAPK ailesine ait hücre sinyal moleküllerinden biridir. Bu kinaz molekülü üç izoformdan (JNK1, JNK2 ve JNK3) oluşur. Bu izoformlar hücre içi ve hücre dışı uyaranlara karşı hücrel cevabın düzenlenmesinde rol oynar. JNK'ler da diğer MAPK'ler gibi proteinlere fosfat ekleyerek onları aktive veya inhibe ederek hücre içi haberleşmeyi sağlar (Davies ve Tournier, 2012; Karin ve Gallagher, 2005).

JNK aktivasyonu, çeşitli hücrel stres faktörleri tarafından tetiklenir. Hücrelerdeki stres faktörleri arasında UV ışınları, toksinler, oksidatif stres, sitokinler ve DNA hasarı sayılabilir. Bu stres faktörleri, hücre içindeki sinyal iletim yolu boyunca bir dizi reaksiyonu tetikleyerek JNK aktivasyonuna neden olurlar. Öncelikle, stres faktörü hücredeki ilgili reseptörler tarafından algılanır ve bu reseptörler aracılığıyla birincil sinyal MAP3K'in aktivasyonu ile başlar. MAP3K seviyesinde MEKK, ASK ve MLK'nın fosforile olması sonucunda MAP2K seviyesinde MEK4 ve MEK7 aktif olur. Bu iki kinazın fosforile olması JNK'yi aktifleştirir. Aktive olan JNK hücre içindeki birçok hedef proteine fosfat ekler (Dhanasekaran ve Reddy, 2008; Liu ve Lin, 2005). Bu nedenle, JNK aktivasyonu, hücre içindeki sinyal iletim yollarının bir dizi reaksiyonunu içeren bir kompleks süreçtir. Bu süreç, hücrelerin stres faktörlerine adaptasyonunu ve hücrel homeostazın korunmasını sağlar (Karin ve Gallagher, 2005).

2.2.3. p38 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (p38 MAPK)

MAPK ailesinin bir üyesi olan p38 MAPK, hücrelerde strese bağlı oluşan yanıtların sinyalizasyonunu düzenleyen bir proteindir. Bu protein büyüme faktörleri, DNA hasarı, yangı, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, hipoksi, oksidatif stres, ozmotik stres ve diğer streslere yanıt olarak aktif hale gelir ve hücrede bir dizi biyokimyasal reaksiyonları başlatarak hücrenin hayatta kalmasını, yenilenmesini ya da apoptoz gibi hücrenin ölüm süreçlerine girmesini sağlar (Han vd. 2020).

Memelilerde p38 MAPK ilk olarak birbirinden bağımsız dört çalışmada; (1) insan hücrelerinde lipopolisakkarit ile oluşturulan hücre hasarında tirozin ile fosforile

edilmiş 38-kDa ağırlığında bir protein (Han vd. 1994), (2) arsenik toksikasyonu ile indüklenen ozmotik stresle aktive olmuş küçük boyutlu bir ısı şoku protein kinaz (RK: Reaktif Kinaz) (Rouse vd. 1994), (3) Hsp27 hücrelerinde IL-1'e yanıt olarak aktif hale gelen bir protein (p40) (Freshney vd. 1994) ve (4) insan monositlerinde IL-1 ve TNF- α 'yı inhibe etmek için uygulanan SB203580'in inhibe ettiği bir protein (CSBP2) (Lee vd. 1994) rapor edilmiştir. Bu çalışmalardaki p38, RK, p40 ve CSBP2 proteinlerinin hepsinin, günümüzde p38 α olarak kabul edilen molekül olduğu ortaya çıkmıştır (Canovas ve Nebreda, 2021).

Şimdiye kadar p38 α , p38 β , p38 γ ve p38 δ olmak üzere dört farklı p38 MAPK izoformu tanımlanmıştır (Kyriakis ve Avruch, 2012). Bu dört izoform, birbirleriyle %60'tan fazla amino asit dizisinde benzerlik gösterirler. Amino asit dizisi bakımından p38 α ile p38 β %75 özdeşken, p38 γ ile p38 δ %75 özdeştir. Birbirleri ile özdeş yapıya sahip olmaları nedeniyle dokulardaki ekspresyon seviyeleri de benzerlik göstermektedir. Örneğin p38 α ve p38 β , olgun sinir sisteminde diğer iki izoforma göre daha fazla eksprese edilirken, p38 γ ve p38 δ ekspresyonu iskelet kası ve endokrin bez hücrelerinde diğer iki izoforma göre daha yüksektir (Kyriakis ve Avruch, 2001; Nebreda ve Porras, 2000). p38 MAPK izoformlarının dokulara göre ekspresyon seviyelerinin farklılık göstermesinin fizyopatolojisi hala belirsizliğini korumaktadır (Canovas ve Nebreda, 2021). p38 MAPK izoformlarının rol aldıkları görevlerde belirsizlikler olmasına rağmen bazı izoformlar arasındaki fonksiyonel farklılıklar bilinmektedir. Özellikle p38 α , plasentayı oluşturan hücrelerin gelişiminde sahip olduğu kritik işlevi nedeniyle fare embriyo gelişimi için gerekli olan tek p38 MAPK'dir (Beardmore vd. 2005; Greenblatt vd. 2010). p38 β her ne kadar p38 α 'nın yedeği olarak görülse de hücre kültürlerinde yapılan deneyler sadece p38 β tarafından gerçekleştirilebilen bazı işlevleri tanımlamıştır (Arriazu vd. 2020). p38 α ve p38 β kalp gelişimi (del Barco Barrantes vd. 2011), cinsiyet tayini (Warr vd. 2012), mitozun düzenlenmesi ve yardımcı T lenfositlerinin aktivasyonunda (Hayakawa vd. 2017) birlikte görev alırlar. Birbirine yakın amino asit dizilimine sahip olan p38 γ ve p38 δ , doku rejenerasyonu ve bağışıklık tepkilerinde (Escós vd. 2016) birbirine benzer işlevleri yerine getirirler. Fakat p38 γ veya p38 δ 'nın p38 α işlevlerini gerçekleştirip gerçekleştirmediği henüz bilinmemektedir. Bu nedenle, bu sinyal yolunun biyolojik rollerini tam olarak anlamak için bu dört p38 MAPK'nin hem bireysel davranışı hem

de fonksiyonel etkileşimleri hakkında daha çok araştırmaya ihtiyaç olduğu ifade edilmiştir (Canovas ve Nebreda, 2021).

p38 MAPK aktivitesi birbirleriyle farklı basamaklarda kesişen özel kinazların aktivasyonu, birkaç fosfataz tipi tarafından pasifizasyonu ve post-translasyonel modifikasyonlar ile sıkı bir şekilde düzenlenir. p38 MAPK sırayla bir MAP3K tarafından fosforile edilen bir MAP2K tarafından ikili fosforilasyon (bir alt basamaktaki kinaza iki adet fosfor eklenmesi) yoluyla aktive edilir (Canovas ve Nebreda, 2021). Bu yolak p38 MAPK'nin standart yolağı olarak adlandırılır ve MAP3K seviyesinde ASK1, DLK, MEKK3, MEKK4, MLK3, TAK1, TAO1, TAO2, TPL2 ve ZAK1'in fosforile olarak aktif hale gelmesiyle başlar. Farklı MAP3K'ların farklı sinyaller tarafından aktive edilmesi, p38 MAPK yolağının yukarı akışında çeşitliliğe neden olmaktadır. Bu çeşitlilik farklı uyarılara karşı hücrenin verdiği cevapların çok yönlü olmasını sağlar. MAP3K'lerin fosforile olarak aktifleşmesinden sonra, MAP2K seviyesinde birbirleri ile amino asit dizilimi bakımından %80 benzerlik gösteren MKK3, MKK6 ve MKK4 (daha çok JNK'leri etkinleştirir) fosforile olur. Her MAP2K'in p38 MAPK aktivasyonuna katkısı, hücre tipine ve uyarana bağlı değişkenlik gösterir (Cuadrado ve Nebreda, 2010; Kyriakis ve Avruch, 2012).

p38 MAPK, standart fosforilasyon yolağının yanı sıra, iki farklı alternatif yolla da aktive edilebilir. Yolaklardan biri, Transforme Edici Büyüme Faktörü β 'yi Aktive Eden Kinaz 1'i Bağlayıcı Protein 1'in (TAB1) p38 α 'ya bağlanması ile gerçekleşir. TAB1, p38 α 'yı fosforile ederek aktif hale getirir (Ge vd. 2002). Bu mekanizma, miyokard iskemi hasarında (De Nicola vd. 2018; Tanno vd. 2003), T lenfositlerinin yaşlanmasında (Lanna vd. 2014), dermatitlerde (Theivanthiran vd. 2015) ve triiyodotironin uygulanan adipositlerde (Matesanz vd. 2017) bildirilmektedir. Diğer p38 MAPK aktivasyonu mekanizması, yalnızca T Hücre Reseptörü aracılığıyla uyarılan T lenfositlerde görülmektedir. Bu yolak hem p38 α hem de p38 β 'nin ZAP70 tarafından fosforilasyonu sonucunda gerçekleşir (Salvador vd. 2005).

2.2.3.1. Enfeksiyöz Etkenlere Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu

Bakteriyel ve viral ajanlar konak hücrede klasik, TAB1 ve ZAP70 yolları aracılığıyla p38 MAPK aktivasyonunu tetiklerler (Cheng vd. 2020; Gräß ve Rybniker, 2019; Hölscher vd. 2020). Enfeksiyöz ajanlara bağlı aktivasyon bazen direk olurken bazen de enfekte hücrede açığa çıkan ikincil moleküller aracılığıyla olmaktadır. Örneğin *Salmonella typhimurium* ve *Mycobacterium tuberculosis* etkenleri kendilerinin direk etkilerinden ziyade hücrelerde artan ROT aracılığıyla p38 MAPK'yi aktive ederler (Lee vd. 2016; Takizawa vd. 2017). Viral ajanlardan influenza virüsü, enterovirüs, insan immun yetmezlik virüsü, Dang virüsü ve hepatit B virüsü gibi birçok virüsün p38 MAPK'yi aktive ettiği bilinmektedir (Cheng vd. 2020). Ayrıca 7 Kasım 2019 tarihinde Çin'in Hubei bölgesinin başkenti olan Vuhan'da ortaya çıkan ve pandemiye neden olan SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücrelerde p38 MAPK aktivasyonunun MKK3 ve MKK6 fosforilasyonu ile gerçekleştiği bilinmektedir (Bouhaddou vd. 2020). Enfeksiyöz etkenlere bağlı konak hücrede p38 MAPK'nin aktivasyonu yukarı akışta apoptoz mekanizmasını tetikler ve enfekte hücre ölür (Gräß ve Rybniker, 2019). Fakat her enfeksiyöz etken p38 MAPK'yi aktif hale getirmez, bazı etkenler p38 MAPK'nin direk kendisini ya da yollarını inaktive eder. Örneğin *Bacillus anthracis* sahip olduğu proteazlar sayesinde standart fosforilasyon yolağında bulunan proteinleri parçalayarak p38 MAPK aktivasyonunu bloke ederken (Arthur vd. 2013), *Salmonella enterica* ise MAP2K seviyesinde inaktivasyona neden olarak p38 MAPK'yi bloke eder (Cherla vd. 2018).

2.2.3.2. Sitokinlere Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu

Proinflamatuvar sitokinler olan Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- α), interlökin 1 (IL-1) ve IL-6, p38 MAPK'nin aktivatörleridir. Bu sitokinler, ilgili yüzey reseptörleri aracılığıyla MAP3K seviyesinde fosforilasyonu başlatarak p38 MAPK'yi aktifleştirirler. Proinflamatuvar sitokinlerin aşağı akışındaki sinyallerinin çoğu TAK1'e az bir kısmı ise diğer MAP3K'ler üzerinden MAP2K'lere iletilir (Sabio ve Davis, 2014). Sitokin aracılığı ile aktive olan p38 MAPK hücrelerde farklılaşmayı modüle etmektedir. Bu farklılaşma sayesinde hücrelerin yangının olumsuz etkilerine karşı dirençli hale geldikleri düşünülmektedir (Arthur vd. 2013; Lin vd. 2015).

Sitokinler yangının düzenlenmesinde rol alan moleküllerdir. Bu moleküller etkilerinin bir kısmını p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden yaparlar (Hollenbach vd. 2004; Johnson ve Bailey, 2003). Sitokinler ile aktive olmuş p38 MAPK'nin yukarı akışında COX-2, iNOS, VCAM-1, GM, CSF, EPO, CSF ve CD-40 gibi yangı ile ilişkili moleküllerin ekspresyonu artmaktadır (Zarubin ve Han, 2005).

2.2.3.3. ROT'ne Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu

p38 MAPK ve JNK, kinaz proteinleri içerisinde “stresle aktive olan kinazlar” olarak tanımlanır (Canovas ve Nebreda, 2021). Oksidatif stresin p38 MAPK'yi hangi yollar üzerinden aktifleştirdiği hakkında henüz çok az bilgi vardır. ROT aracılı p38 MAPK aktivasyonunda en iyi bilinen yolak MAP3K seviyesinde ASK1'in aracılık ettiği yolaktır (Sakauchi vd. 2017). ASK1, ROT'ne yanıt veren bir kinaz olarak tanımlanmaktadır (Fujisawa vd. 2007). ASK1, N- ve C- terminal sarmal alanları ile çevrelenmiş molekülün orta kısmında bir serin/treonin kinaz alanına sahiptir. Trx, ASK1'in bağlayıcı bir proteindir (Matsuzawa ve Ichijo, 2008). Kısaca Trx, ASK1'in N-terminal bölgesine doğrudan bağlanmasıyla ASK1'in kinaz aktivitesini inhibe eder. Trx, iki sistein tortusunun Trx'e bağlı indirgeme aktivitesi ile ilişkili sülfhidril gruplarını ürettiği bir redoks-aktif bölgeye sahiptir. İndirgenmiş form, p38 MAPK'nin inaktif olduğu hücrelerde ASK1'e bağlanırken, hidrojen peroksit gibi reaktif moleküller, Trx'i oksitlenmiş forma dönüştürür ve Trx'i ASK1'den ayırır (Fujisawa vd. 2007; Matsuzawa ve Ichijo, 2008). Böylece ASK1 aktive edilir ve ASK1'in kinaz alanı içindeki kritik bir treonin tortusunun fosforilasyonunu indükler. Trx-ASK1 kompleksi, ASK1'in ROT'ye bağlı aktivasyonuna yetkin bir sinyal kompleksi olarak işlev gördüğünden “ASK1 sinyalozomu” olarak adlandırılmaktadır (Fujisawa vd. 2007). ROT tarafından p38 α aktivasyonu, hücre sel canlılığın düzenlenmesi için önemlidir, ancak ROT'ye bağlı p38 α MAPK aktivasyonunun hangi transkripsiyonel tepkilere yol açtığı henüz net değildir (Canovas ve Nebreda, 2021).

Bakır, hücre içinde serbest radikal üretimini artırarak oksidatif stres oluşturabilir. Bu durum, hücrelerde DNA hasarı, protein hasarı ve lipit peroksidasyonu gibi hücre sel hasarlara yol açabilir. Bu süreçte p38 MAPK yolağında meydana gelen

reaksiyonlar tam olarak bilinmemektedir. p38 MAPK yolağının aktive olması hücrelerin hayatta kalması, hasarlı proteinlerin onarımı ve hücre döngüsü kontrolünün sağlanması için gerekli olabilir (Boilan vd. 2013; He vd. 2020). Ancak, p38 MAPK yolları aşırı aktive olursa, apoptoz gibi diğer hücre ölümü süreçlerine de neden olabilir (Yue ve López, 2020).

Bakır toksisitesi ile ilişkili olarak, p38 MAPK yolları aynı zamanda yangısal yanıtların düzenlenmesinde de rol oynayabilir. Bakır toksikasyonu, yangıyı arttırarak p38 MAPK yollarının aktivasyonuna neden olabilir. Bu durum, hücrelerde daha fazla oksidatif stres oluşmasına ve hasarın artmasına yol açabilir (Boilan vd. 2013; Grubman ve White, 2014; He vd. 2020). Ancak, Cu'ın p38 MAPK yolları üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılamamıştır ve daha fazla araştırma gerekmektedir.

2.2.3.4. Büyüme Faktörlerine Bağlı p38 MAPK Aktivasyonu

Büyüme faktörleri hücrel farklılaşmayı uyaran, mitozu teşvik ya da inhibe eden biyolojik olarak aktif moleküllerdir. Büyüme faktörleri, spesifik hücre yüzeyi reseptörleri üzerinden hücre içi büyüme sinyallerini aktifleştirerek hücrel yanıtı başlatır. Büyüme sinyallerinin iletilmesinde protein fosforilasyon basamakları kilit rol oynar. Bu sinyallerin iletim sürecinde kinaz veya fosfataz aktivitesi olan enzimler önemlidir (Koganti vd. 2018; Stone vd. 2017).

Büyüme faktörleri hücre üzerindeki etkilerinin bir kısmını p38 MAPK üzerinden yapmaktadır. Büyüme faktörlerinin hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanması sonucunda ilgili reseptör fosforile olur ve MAP3K seviyesinde aktivasyonu başlatır (Koul vd. 2013; Liao vd. 2001). Her büyüme faktörü kendine özgü fosforilasyon yolundan p38 MAPK'yi aktive eder. Örneğin TGF- β MAP3K seviyesinde TAK1 ve ASK1 fosforilasyonunun ardından MAP2K seviyesinde MKK4 yolağı üzerinden (Koul vd. 2013), FGF MAP3K seviyesinde MLK3, MAP2K seviyesinde MEK6 yolağı üzerinden (Tan vd. 1996), NGF, MAP3K seviyesinde TAK1 ve ASK1, MAP2K seviyesinde MKK3 ve MKK6 üzerinden p38 MAPK'yi aktive eder (Dai vd. 2020; Takeda ve Ichijio, 2002). Bazı büyüme faktörlerinin hangi kinaz basamaklarını kullanarak p38 MAPK'yi aktifleştirdiği belirsizdir. Örneğin,

VEGF ile uyarılan hücrelerde p38 MAPK aktivasyonu aracılığıyla hücrelerde apoptozun şekillendiği bilinirken, bunu hangi kinazlar üzerinden yaptığı henüz ortaya konulmamıştır (Gomes ve Rockwell, 2008). Benzer olarak HGF'nün p38 MAPK aktivasyonu aracılığı ile hücrelerde proliferasyon uyarımını hangi MAP3K ve MAP2K üzerinden yaptığı bilinmemektedir (Garajová vd. 2015).

2.2.3.5. p38 MAPK İnaktivasyonu

p38 MAPK'nin hiperaktivasyonu genellikle hücre için zararlıdır. p38 MAPK sinyallerinin aktive olması kadar sinyallerin sonlandırılması da oldukça önemlidir ve sinyal sonlanmasını sağlayan mekanizmalar hücrel homeostazis için gereklidir. Hücrelerde p38 MAPK inaktivitesi fosfataz enzimleri tarafından sağlanmaktadır. Bu enzimler DUSP/MKP ailesinin serin/treonin fosfatazları, tirozin fosfatazları ve çift özgülük fosfatazlarıdır. Bu enzimler aktif haldeki p38 MAPK'den fosfatları ayırarak bu molekülü etkisiz hale getirirler (Ambrosino vd. 2003; Dickinson vd. 2006; Tomida vd. 2015; Torchia vd. 2018).

Lee ve arkadaşları insan monositinde IL-1 ve TNF- α 'yı inhibe etmek için uyguladıkları SB203580 adlı kimyasalın aynı zamanda CSBP2 adlı bir proteini (güncel adıyla p38 MAPK) inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Lee vd. 1994). Daha sonra yapılan çalışmalarda SB203580'in inhibitör etkisini p38 MAPK'nin ATP bağlanma yuvasına bağlanarak gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Lee vd. 2000). Bu bağlanma p38 MAPK'nin substrat bağlanma bölgesine yakın bir bölgede yer alarak bu kinazın katalitik aktivitesini engeller. Böylece, p38 MAPK'nin hedef proteinleri fosforile etme yeteneği azalır veya ortadan kalkar (Yong vd. 2009). Günümüzde başka sentetik p38 MAPK inhibitörleri bulunmasına rağmen hala SB203580'in p38 MAPK'yi inhibe etme kabiliyetinden dolayı bu inhibitör p38 MAPK'nin fonksiyonlarını ve sinyal yollarını incelemek için araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang vd. 2023; Sase vd. 2023; Yong vd. 2009).

2.3. Sinir Büyüme Faktörü (NGF)

Sinir büyüme faktörü, merkezi sinir sistemi ve diğer dokular üzerinde hem büyüme hem de yetişkinlik döneminde güçlü biyolojik etkileri olan biyoaktif molekül sınıfında yer alan nörotrofin ailesinin bir üyesidir (Alastra vd. 2021). Nörotrofinler kısaca hücre dışı büyüme faktörleri olarak tanımlanabilir. Nörotrofin ailesi NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6 ve NT7'den oluşur (Kazak ve Yarım, 2014). Nörotrofinler merkezi ve periferik sinir sisteminde nöronların hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve büyümesini desteklemektedir. Nörotrofinlerin ayrıca öğrenme ve hafıza ile ilgili görevleri vardır (Greenberg vd. 2009; Roux ve Barker, 2002; Szegezdi vd. 2008).

NGF nörotrofin ailesinin ilk keşfedilen üyesidir. Günümüzde NGF tüm nörotrofinler arasında en ayrıntılı şekilde bilinendir. Bu faktör ilk defa 1950'li yıllarda Rita Levi-Montalcini ve Hamburger tarafından tavuk ganglionlarından nöron büyümesini uyaran bir madde olarak tanımlandı (Levi-Montalcini ve Hamburger, 1951). Bu molekül NGF α , NGF β ve NGF γ olarak adlandırılan üç alt birimden oluşur (Wise vd. 2021).

NGF, kromozom 1'de bulunan tek bir genin ürünüdür. İlk olarak proNGF olarak sentezlenir. proNGF daha sonra proteazlar tarafından işlenir ve olgun NGF oluşturulur. NGF ve proNGF arasında belirgin bir yapısal fark vardır. Olgun NGF, üçüncü bir disülfid köprüsünün bulunduğu iki disülfür köprüsünün oluşturduğu bir halka yapısındadır. Bu yapısal fark görevsel farklılıkların olmasına neden olur. proNGF, pasif bir öncü değildir, genellikle olgun NGF formuna zıt etkiler üreten bir faktördür (Trabjerg vd. 2017).

NGF etkisini hücre yüzeyinde bulunan tirozin kinaz A (TrkA) ve p75^{NTR} reseptörleri aracılığıyla gösterir. Her iki reseptör de aynı biyolojik fonksiyonları yerine getirebilmesine rağmen NGF'in affinitesi TrkA'ya daha fazla olduğu için TrkA NGF'nin ana reseptörü olarak kabul edilir (Trabjerg vd. 2017; Wise vd. 2021). NGF TrkA ile birleşerek reseptörde tirozin fosforilasyonu sonucunda hücre içi sinyal yollarından MAPK, fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI3K-Akt) ve fosfolipaz C gama (PLC- γ) aktivasyonu gerçekleşir (Kazak ve Yarım, 2014). p38 MAPK aktivasyonu Ras aktivasyonunu takiben MAP3K seviyesinde TAK1 ve ASK1, MAP2K

seviyesinde MKK3 ve MKK6 üzerinden gerçekleşir (Dai vd. 2020; Takeda ve Ichiijo, 2002).

İnsan ve hayvanlarda NGF'nin hedef hücre yelpazesi oldukça geniştir. NGF'nin primer etkileri her ne kadar nöronlar üzerine olsa da organizmada pek çok hücre hem NGF sentezler hem de sahip oldukları NGF'nin yüksek ve düşük affiniteli reseptörleri sayesinde bu moleküle bir cevap oluşturur (Alastra vd. 2021). NGF sinir sisteminde nöronlar hariç astrosit ve mikroglia hücrelerinde yangı, doku hasarı ve sitokine cevap olarak sentezlenir (Pöyhönen vd. 2019). Makrofajlar, lenfositler ve mast hücrelerinde NGF reseptörleri bulunur. Bu hücreler, NGF'yi sentezler, depolar ve salgılar, bu da NGF'nin immun yanıtların düzenlenmesinde rol oynadığının göstergesidir (Aarão vd. 2018). Hipofiz, tiroid, testis ve ovaryum gibi endokrin dokulardan da NGF sentezlenir (Sofroniew vd. 2003). NGF ayrıca tüm epitel hücrelerinden de sentezlenmektedir (Liu vd. 2021; Tsai vd. 2018).

Son yıllarda NGF'nin sinir dokusu haricindeki klinik kullanımını giderek artmaktadır. Deri, göz ve ağız mukoza hasarlarında NGF'nin lokal olarak kullanılması iyileşmeyi hızlandırmaktadır (Liu vd. 2021). Bazı tedaviler ise NGF'nin bloke edilmesi üzerine kurgulanmaktadır. Bunlara en güzel örnek ise sırt ve diz ağrılarında NGF'nin direk kendisinin ya da sentezinin bloke edilerek ağrının azaltılmasıdır (Aloe vd. 2012).

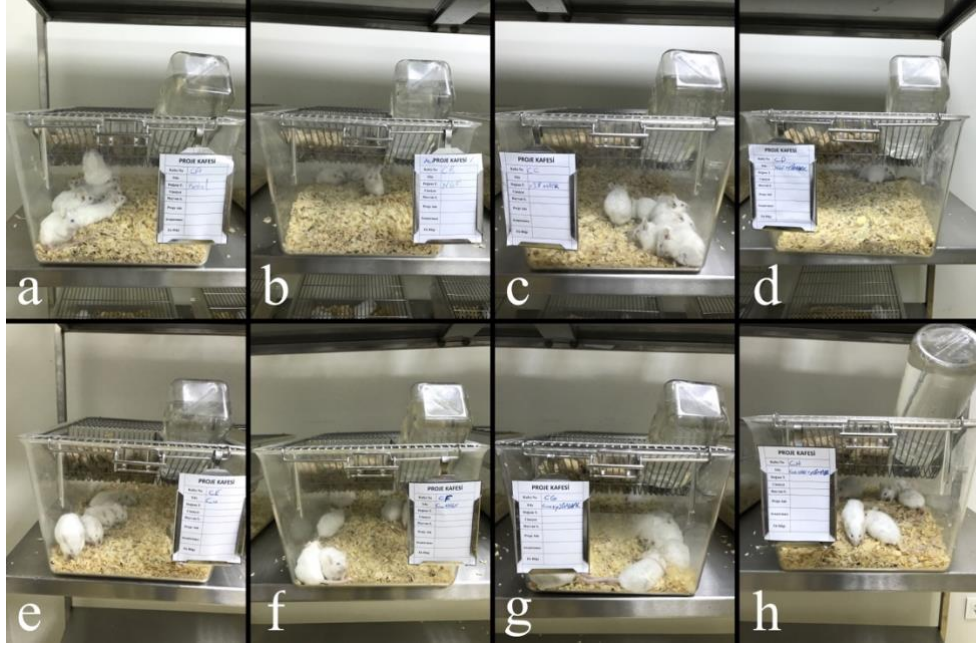
Karaciğer hasarında hepatositlerde NGF'nin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Tsai ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada bu artışın hepatositler üzerinde koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Tsai vd. 2018). Fakat karaciğer hasarında NGF ekspresyonundaki artışın koruyucu mu yoksa hasarı arttırıcı mı etkisi olduğu hakkında yeterli bilgi yoktur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 64 adet ergin erkek BALB/c farede (ağırlıkları 30 ± 5 gr) Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerele Etik Kurulu'nun 24.02.2022 tarihli 2022/1-9 sayılı kurul kararı onayı ile yürütüldü. Çalışmaya başlamadan bir hafta önce fareler sıcaklığın 22°C ve nemin %60-65 arasında kontrol altında tutulduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00) 12 saat karanlık devridaiminin uygulandığı bir odaya alındı. Fareler *ad libitum* olarak standart fare yemiyle beslendi ve normal musluk suyu içtiler. Çalışma sonlandırılıncaya kadar bu ortam durumu ve besleme sabit tutuldu.

3.1. Deneysel Grupları

Fareler her bir grupta 8 adet olarak; Kontrol grubu, NGF grubu, p38MAPK inhibitör grubu, NGF + p38MAPK inhibitör grubu, Bakır grubu, Bakır + NGF grubu, Bakır + p38MAPK inhibitör grubu ve Bakır + NGF + p38MAPK inhibitör grubu olmak üzere randomize 8 gruba ayrıldı (**Şekil 3.1**).



Şekil 3.1. Farelerin gruplara göre kafeslere yerleşimi. **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPKi grubu, **d.** NGF+p38MAPKi grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPKi grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPKi grubu.

Her bir grup için yapılan deneysel uygulamalar aşağıda belirtilmiştir:

Kontrol Grubu (Kontrol): Farelere, üç gün boyunca her gün 1 ml serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) yolla uygulandı (**Şekil 3.1.a**).

NGF Grubu (NGF): Farelere, üç gün boyunca her gün 10 µg/kg dozda NGF (Mouse NGF, Katalog No: 120a.a, MedChem Express) serum fizyolojik içerisinde hazırlanarak i.p. yolla uygulandı (**Şekil 3.1.b**).

p38 MAPK İnhibitör Grubu (p38MAPKi): Farelere, üç gün boyunca her gün 20 mg/kg dozda p38 MAPK inhibitörü (SB203580) i.p. yolla uygulandı (**Şekil 3.1.c**). p38 MAPK inhibitörü SB203580 (Katalog No: A10824, AdooQ Bioscience) %4 DMSO + %30 PEG 300 + %5 Tween 80 + distile su süspansiyonunda çözdürülerek hazırlandı.

NGF + p38 MAPK İnhibitör Grubu (NGF+p38MAPKi): Farelere, üç gün boyunca her gün 10 µg/kg dozda NGF ve 20 mg/kg dozda p38 MAPK inhibitörü (SB203580) i.p. yolla uygulandı (**Şekil 3.1.d**).

Bakır Grubu (Bakır): Bu gruptaki farelere, üç gün boyunca her gün 20 mg/kg CuSO₄ serum fizyolojik içerisinde hazırlanarak i.p. yolla uygulandı (Şekil 3.1.e).

Bakır + NGF Grubu (Bakır+NGF): Farelere, üç gün boyunca her gün 20 mg/kg CuSO₄ ve 10 µg/kg dozda NGF i.p. yolla uygulandı (Şekil 3.1.f).

Bakır + p38 MAPK İnhibitör Grubu (Bakır+p38MAPKi): Farelere, üç gün boyunca her gün 20 mg/kg CuSO₄ ve 20 mg/kg dozda p38 MAPK inhibitörü (SB203580) i.p. yolla uygulandı (Şekil 3.1.g).

Bakır + NGF + p38 MAPK İnhibitör Grubu (Bakır+NGF+p38MAPKi): Farelere, üç gün boyunca her gün 20 mg/kg CuSO₄, 10 µg/kg dozda NGF ve 20 mg/kg dozda p38 MAPK inhibitörü (SB203580) i.p. yolla uygulandı (Şekil 3.1.h).

3.2. Deneyin Sonlandırılması ve Numunelerin Toplanması

Bu çalışmanın hayvan deneyi bölümü tüm farelere 3. gün uygulamaları yapıldıktan 24 saat sonra sonlandırıldı. Sonlandırma, tüm farelerin isoflurane (Isoflurane USP, ADEKA) ile gaz anestezisine alındıktan sonra giyotinle dekapitasyon yapılarak gerçekleştirdi. Kan numuneleri dekapitasyon işlemi sırasında antikoagülan içermeyen tüplere alındı. Alınan kanlar +4°C’de 30 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edildi. Serumlar analizler yapılincaya kadar -20°C’de saklandı.

Çalışmadaki karaciğer dokuları makroskobik olarak incelendi ve gözlemlenen lezyonlar kaydedildikten sonra bir kısmı histopatolojik analizler için %10’luk tamponlu nötral formaldehite alındı, geri kalan karaciğer dokuları moleküler ve biyokimyasal analizler yapılana kadar -80°C’de saklandı.

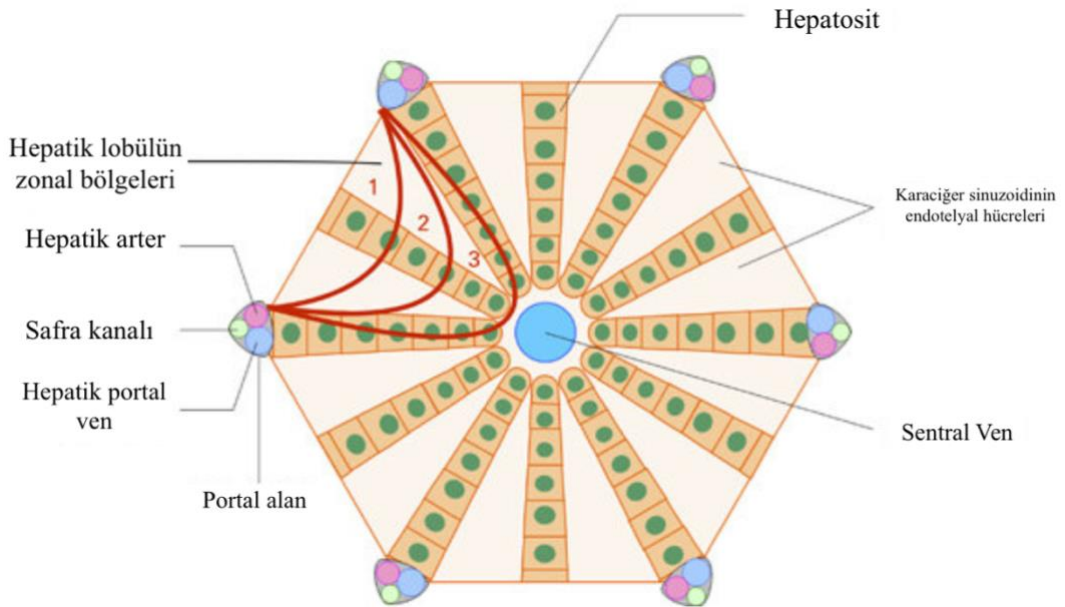
3.3. Örneklerin Analizleri

3.3.1. Histopatolojik Analiz

Histopatolojik analiz için alınan karaciğer dokuları %10’luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 48 saat tespit edildikten sonra, akan çeşme suyunda 16 saat

yıkandı. Yıkama sonunda dokular rutin doku takip cihazında alkol (%50, %70, %80, %90, %96, %96, %100 ve %100) ve iki istasyon ksilen serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Her bloktan 4.5 µm kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobunda (ECLİPSE Ni, Nikon) incelendi.

Her olgunun histopatoloji skoru zonal değişikliklerin bölgelerine göre; sentrilobüler (periasiner veya 3. bölge), midzonal (sentrilobüler ve periportal alanlar arasında veya 2. bölge) veya periportal (sentroasiner veya 1. bölge) olarak **Şekil 3.2** ve **Tablo 3.1**'deki kriterin toplanması ile elde edildi. Kesitlerdeki Kupffer hücre sayısı her kesitten 200X büyütmede çekilen 5 farklı sahanın fotoğraflarının Qupath (versiyon, v0.4.3) dijital patoloji resim analiz yazılımıyla otomatik olarak sayılmasıyla belirlendi.



Şekil 3.2. Hepatik lobülün zonal bölgelerinin şematik görüntüsü
(Mohty vd. 2015)

Tablo 3.1. Histopatolojik bulguların değerlendirme kriterleri

Parametre	Skor	Kriter
Dejenerasyon	0	yok
	1	Sadece 3. bölgede
	2	2. ve 3. bölgelerde
	3	1., 2. ve 3. bölgelerde
Nekroz	0	yok
	1	Sadece 3. bölgede
	2	2. ve 3. bölgelerde
	3	1., 2. ve 3. bölgelerde
Kupffer Hücresi	0	≤ 30
	1	31-40
	2	41-50
	3	≥ 51

3.3.2. İmmunohistokimyasal Analiz

Bu çalışmada fare karaciğer dokularında NGF, oksidatif hasar belirteci olarak iNOS ve nitrotirozin, apoptoz tespiti için kaspaz 8 ve kaspaz 3 ile yangısal sitokinleri belirlemek amacıyla IL-1, IL-6 ve TNF- α 'nın ekspresyonları immunohistokimyasal olarak araştırıldı.

İmmunohistokimyasal analiz için her parafin bloktan 4.5 μ m kalınlığında kesitler adezivli (poly-L-Lysin) lamlara alındı. Tüm kesitler etüvde 37°C'de 1 saat bekletildikten sonra ksilen (3x10 dakika) ve alkol serilerinden (%100, %96, %80 ve %70) geçirilerek (5'er dakika) deparafinize edildi. Parafinden arındırılan kesitler Fosfat Solüsyonu (PBS, pH 7.2) ile 5 dakika yıkandı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %0.3'lük H₂O₂'de 15 dakika tutulduktan sonra tekrar PBS'de 5 dakika yıkandı. Yıkamanın ardından kesitler dokulardaki antiijenleri açığa çıkarmak için sitrat buffer (pH 6.0) solüsyonu içerisinde, 800 W gücünde mikrodalga fırında 15 dakika ısıya tabi tutuldu. Mikrodalga fırından çıkartılan kesitler sitrat buffer içinde 30 dakika oda ısısında soğutulduktan sonra PBS'de 5 dakika yıkandı.

Dokulardaki spesifik olmayan boyanmayı önlemek için kesitlerin üzerine blok solüsyonu (Large Volume Ultra V Blok, Katalog No: TA-125-UB, Thermo) damlatılıp 30 dakika beklendi. Bu sürenin sonunda doku kesitleri üzerindeki fazla blok solüsyonu döküldü, kalan fazla solüsyon kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. Çalışmada araştırılan antikolar **Tablo 3.2**'de belirtilen oranlarda PBS ile sulandırılarak kesitlere damlatıldı ve 1 saat boyunca nemli ortamda oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Kesitler inkübasyonun ardından 3'er kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Kurutma kağıdı ile fazla PBS uzaklaştırıldıktan sonra kesitlere biyotinlenmiş keçi serumu (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Katalog No: TP-125-BN, Thermo) damlatıldı ve 30 dakika bekletildikten sonra PBS ile 3'er kez 5 dakika yıkandı. Tekrar fazla PBS kurutma kağıdıyla uzaklaştırıldıktan sonra streptavidin-peroksidaz (Streptavidin Peroxidase, Katalog No: TS-125-HR, Thermo) damlatılıp 30 dakika bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Katalog No: 8090S, Cell Signaling) kromojen damlatılarak 2 dakika boyunca reaksiyon beklendi. Sürenin sonunda kesitler distile suya daldırılarak reaksiyon sonlandırıldı. Zemin boyaması Mayer'in hematoksilen boyasında 40 saniye tutulup, çeşme suyunda yıkanarak yapıldı. Son olarak sıralı alkollerden (%70, %80, %96, %100 ve %100) geçirilen kesitler çift ksilen istasyonundan sonra entellan kullanılarak lamelle kapatıldı.

Tablo 3.2. İmmunohistokimyasal analizde kullanılan antikolar ve sulandırma oranları

Antikor	Dilisyonu	Katalog No
NGF	1/100	AP1528SP Chemicon International
iNOS	1/500	PA5-16855 İnvitrogen
Nitrotirozin	1/500	Ab5411 Millipore
IL-1	1/300	Bs-6319R Bioss
IL-6	1/300	Bs-4539R Bioss
TNF- α	1/400	ab112030 Abcam
Kaspaz 3	1/200	ab13847 Abcam
Kaspaz 8	1/200	ab4052 Abcam

İmmunohistokimyasal değerlendirme ışık mikroskobu ve bu mikroskoba entegre dijital kamera (DS-Ri2, Nikon) ile elde edilen fotoğraflar üzerinden yapıldı.

Bu işlem için Fiji (versiyon, 2.12.0) dijital patoloji resim analiz programı kullanıldı. Bu program ile fotoğraflardaki immun pozitif alanların diğer alanlara oranı yüzdesel olarak hesaplandı. Her vaka ve her antikor için 200X büyütmede çekilen 5 farklı resim kullanıldı ve elde edilen yüzdeliklerin ortalaması o deneğe ve antikora ait skor olarak kabul edildi.

3.3.3. Biyokimyasal Analiz

3.3.3.1. Kan Serumlarının Analizi

Serum örneklerinden karaciğer hasar belirteçleri olan AST, ALT ve GGT enzim seviyeleri otoanalizatörde (Randox imola, Antrim) ölçüldü. Veriler U/L olarak sunuldu.

3.3.3.2. Glutatyon (GSH) Analizi

GSH, Ellman'ın yöntemine göre belirlendi (Ellman, 1958). Fare karaciğer dokusu, buz üzerinde homojenize edildi. Homojenat 3000 rpm'de, +4°C'de, 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edilip santrifüj edildi ve bu numuneden GSH analizi yapıldı. Analizin yapılışı **Tablo 3.3**'de açıklandı.

Tablo 3.3. GSH analizinin yapılışı

	Numune	Kör
% 10'luk homojenat	500 µl	---
Na ₂ HPO ₄ (0,3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-----	500 µl

Hazırlanan çözeltilerden 5 dakika sonra oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve sonuçlar glutatyon standart grafiğinden değerlendirilerek hesaplandı ve veriler nmol/gram yaş doku (gyd) olarak sunuldu.

3.3.3.3. Malondialdehit (MDA) Analizi

Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, Uchiyama ve Mihara'nın yöntemine göre ölçüldü (Uchiyama ve Mihara, 1978). Fare karaciğer numunesi, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Bu homojenat doğrudan MDA analizinde kullanıldı. Analizin yapılışı **Tablo 3.4**'te gösterildi.

Tablo 3.4. MDA analizinin yapılışı.

	Numune
Homojenat	250 µl
% 1'lik fosforik asit	1500 µl
% 0,6'lık TBA	1500 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi ve tüpler kaynar suda (en az 95°C'de) 1 saat bekletildi. Tüplere 2 ml n-butanol eklendi ve 5 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra numuneler 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Numuneler spektrofotometrede 535 nm ve 520 nm'de okundu, MDA konsantrasyonları 1,1',3,3' tetrametoksipropan ile hazırlanan standarta göre değerlendirildi ve sonuçlar nmol/gram yağ doku (gyd) olarak verildi.

3.3.3.4. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi

TAS analizi Rel Assay Diagnostic firmasına ait hazır kit (Katalog No: MS22128A) kullanılarak yapıldı. Fare karaciğerleri buz üzerinde homojenize edildikten sonra üzerlerine 1 ml serum fizyolojik eklenip 1 dakika vortekslendi. Daha sonra karışım 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant analizde kullanıldı.

İlk olarak kuyucuklara 18 µl numuneler konulup üzerlerine 300 µl 1. reaktif solüsyonu ilave edildikten sonra 30 saniye beklenip 660 nm dalga boyunda ilk ölçüm

(A1) yapıldı. Daha sonra bu karışıma 45 µl 2. reaktif solüsyonu ilave edildi ve 10 dakika bekleme süresi dolunca 660 nm dalga boyunda ikinci ölçüm (A2) yapıldı. Yukarıdaki işlemlerin aynısı kit içinden çıkan standart ve su için de uygulandı. Hesaplamalarda aşağıdaki formüller kullanılarak dokudaki TAS miktarı hesaplandı. Veriler µmol/L olarak sunuldu.

$$A2 - A1 = \Delta Abs \text{ Numune, Su ya da Standart}$$

$$Sonuç = \frac{[\Delta Abs \text{ Su}] - [\Delta Abs \text{ Numune}]}{[\Delta Abs \text{ Su}] - [\Delta Abs \text{ Standart}]}$$

3.3.3.5. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

TOS analizi Rel Assay Diagnostic firmasına (Katalog No: MK221460) ait hazır kit kullanılarak yapıldı. Fare karaciğerleri buz üzerinde homojenize edildikten sonra üzerlerine 1 ml serum fizyolojik eklenip 1 dakika vortekslendi. Daha sonra karışım 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant analizde kullanıldı.

İlk olarak numuneler kuyucuklara 45 µl konulduktan sonra üzerine 300 µl 1. reaktif solüsyonu ilave edildi ve 30 saniye beklenip 530 nm dalga boyunda ilk ölçüm (A1) yapıldı. Daha sonra bu karışıma 15 µl 2. reaktif solüsyonu ilave edildi ve 10 dakika bekleme süresi dolunca 530 nm dalga boyunda ikinci ölçüm (A2) yapıldı. Yukarıdaki işlemlerin aynısı kit içinden çıkan standart için de uygulandı. Hesaplamalarda aşağıdaki formüller kullanılarak dokudaki TOS miktarı hesaplandı. Veriler µmol/L olarak sunuldu.

$$A2 - A1 = \Delta Abs \text{ Numune ya da Standart}$$

$$Sonuç = \frac{[\Delta Abs \text{ Numune}]}{[\Delta Abs \text{ Standart}]}$$

3.3.4. p38 MAPK mRNA Ekspresyon Analizi

Bu çalışmada fare karaciğer dokusunda *p38 MAPK* ve *β-Aktin* mRNA ekspresyon seviyelerinin tespiti için RNA saflaştırması ticari kit (SanPrep Column MicroRNA Mini-Prep Kit, Katalog No: SK8811, BIO BASIC) kullanılarak aşağıdaki protokol takip edilerek yapıldı.

Yaklaşık 35-40 mg fare karaciğer örnekleri üzerine 1 ml mRNA ekstraksiyon solüsyonu eklendi, 30 saniye boyunca homojenizatör yardımıyla karaciğer dokuları homojenize edildi ve homojenatlar 10 dakika boyunca oda ısısında bekletildi. Süre sonunda homojenatın üzerine 0.2 ml kloroform eklendi ve 30 saniye boyunca vortekslenip 12000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. 540 µl süpernatant RNaz içermeyen temiz bir tüpe alındı ve üzerine 810 µl %100 etil alkol eklendi. Bu solüsyonun tamamı Spin Column TR içerisine aktarılıp 12000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi ve altta biriken akış atıldı. Daha sonra Spin Column TR üzerine 0.5 ml RPE solüsyonu eklenip 12000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi ve altta biriken akış atıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra Spin Column TR yeni bir tüpe yerleştirildi, üzerine 30 µl RNaz içermeyen su eklenip 2 dakika bekletildi. Süre sonunda tüp 12000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonunda izole edilen RNA'lar komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezi yapılana kadar -80°C'de saklandı.

İzole edilen RNA örneklerinin saflık tayini 260 ve 280 nm UV spektrumunda spektrofotometre cihazında (NANODROP 1000, Thermo) ölçüldü. Örneklerdeki RNA miktarı spektrofotometre cihazının kendi yazılım programı kullanılarak ng/µL cinsinden hesaplandı. Elde edilen saf RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanıldı.

3.3.4.1. cDNA Sentezi

Yukarıda ifade edilen işlemlerden sonra elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi Rotor-Gene Q 5PLEX_{HRM} gerçek zamanlı termal döngü cihazı ile cDNA sentez kiti (OneScript Plus cDNA Synthesis Kit, Katalog No: G236, abm) kullanılarak

gerçekleştirildi. Her bir numune için reaksiyon karışımı **Tablo 3.5**'de verilen miktarlarda hazırlandı.

Tablo 3.5. cDNA sentez reaksiyon karışımı

Bileşik	Miktar
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Random Primer	1 µl
Oligo (dT)	1 µl
OneScript Plus RTase	1 µl
Nükleaz içermeyen su	8 µl

Elde edilen total RNA ile reaksiyon karışımı birleştirildikten sonra tüpler termal döngü cihazına yüklendi ve 15 dakika 54°C'de inkübe edildi. Daha sonra enzim aktivitesini durdurmak için ısı 85°C'ye yükseltildi ve bu ısıda 5 dakika bekledikten sonra cDNA sentez aşaması tamamlanmış oldu. Elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PZT yapıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.3.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

Bu analiz gerçek zamanlı termal döngü cihazında SYBR Green bazlı olarak yapıldı. Analizde kullanılan master karışım (**Tablo 3.6**) bir önceki aşamada elde edilen cDNA ve satın alınan SYBR Green Master kitinin (BlaTag 2X qPCR MasterMix, Katalog No: G891, abm) bileşiminden oluşturuldu. Master karışım **Tablo 3.7**'deki koşullarda termal döngü cihazında koşulduktan sonra *p38 MAPK*'ın gen ifadesindeki değişimler *β-Aktin* genine oranla belirlendi. *p38 MAPK* ve *β-Aktin* primer dizilimleri **Tablo 3.8**'de belirtilmiştir. Gerçek zamanlı PZR ile elde edilen gen ürünlerinin Ct değerleri "Komperatif $\Delta\Delta CT$ " yönteminde kullanıldı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 3.6. Gerçek zamanlı PZR master reaksiyon karışımı

Bileşik	Hacim
BlasTag 2X qPCR MasterMiks	10 µl
İleri Primer	0,5 µl
Geri Primer	0,5 µl
cDNA	1 µl
Nükleaz içermeyen su	8 µl

Tablo 3.7. Termal döngü ve koşulları

	Sıcaklık	Süre	Tekrar sayısı
Enzim Aktivasyonu	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Uzama	60°C	1 dakika	

Tablo 3.8. Primer dizilimleri

Genler	Primer Diziler
* <i>β-Aktin-F</i>	5'-CTGGCTCCTAGCACCATGA-3'
* <i>β-Aktin-R</i>	5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3'
** <i>p38 MAPK-F</i>	5'-CCGGATCCTGGAAGATGTCGCAGGAGAG-3'
** <i>p38 MAPK-R</i>	5'-CCGGATCCCCAGGTGCTCAGGACACCAT-3'

*(Özyazgan, 2021) **(Tortarolo vd. 2003)

3.3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada araştırılan histopatolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerden elde edilen veriler Statistic for the Social Sciences (SPSS for Mac, versiyon 26.0) yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Çalışmada elde edilen parametrelere ait tüm verilerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Bu nedenle

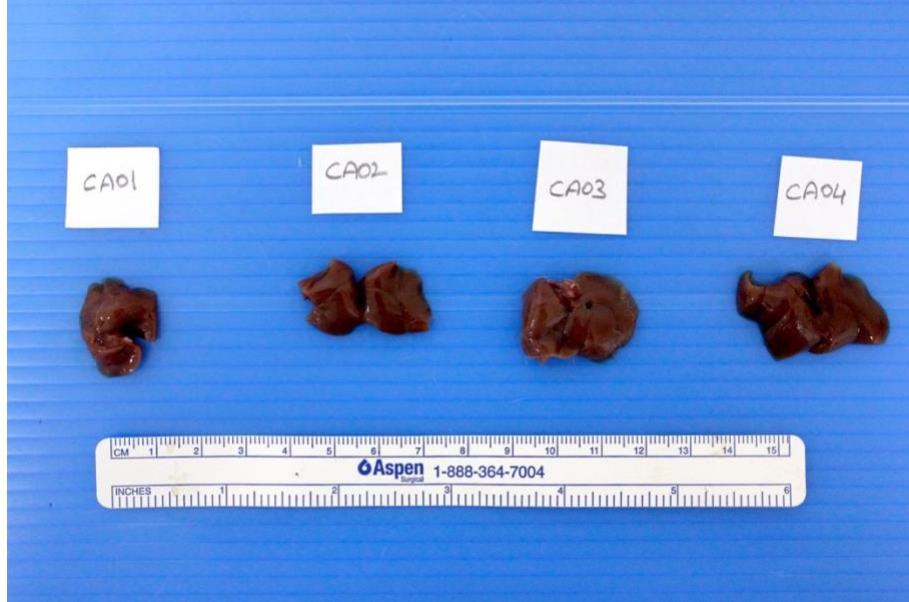
veriler one – way ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arası farkların belirlenmesi için post-hoc Tukey HSD analizi yapıldı. Sonuçlar, ortalama ve standart hata ($\bar{X} \pm SE$) olarak verildi. Anlamlılık derecesi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Patolojik Bulgular

4.1.1. Makroskopik Bulgular

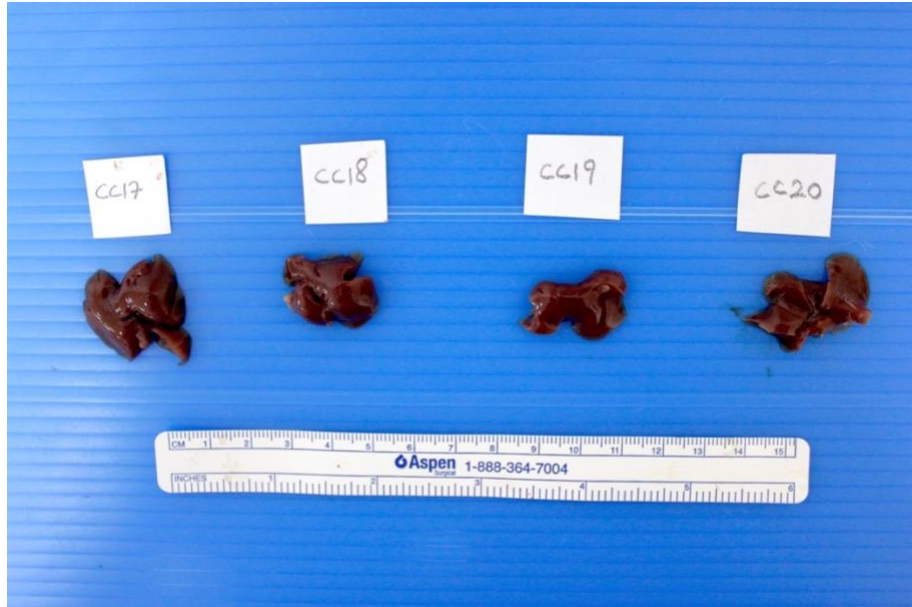
Bu çalışmada kullanılan 64 tane farenin karaciğeri makroskopik olarak incelendi. Yapılan incelemede Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarındaki farelere ait karaciğerlerde herhangi bir lezyona rastlanmadı (**Şekil 4.1-4.4**). Bakır grubunda 4, Bakır+NGF grubunda 2, Bakır+p38MAPKi grubunda 3 ve Bakır+NGF+p38MAPKi grubunda 3 farede karaciğer dokularının göreceli olarak aynı gruptaki diğer deneklerin karaciğerlerinden daha soluk renkte oldukları gözlemlendi. Ayrıca rengi daha soluk olan karaciğerlerin diğer karaciğerlere göre daha kolay parçalandığı tespit edildi (**Şekil 4.5-4.8**).



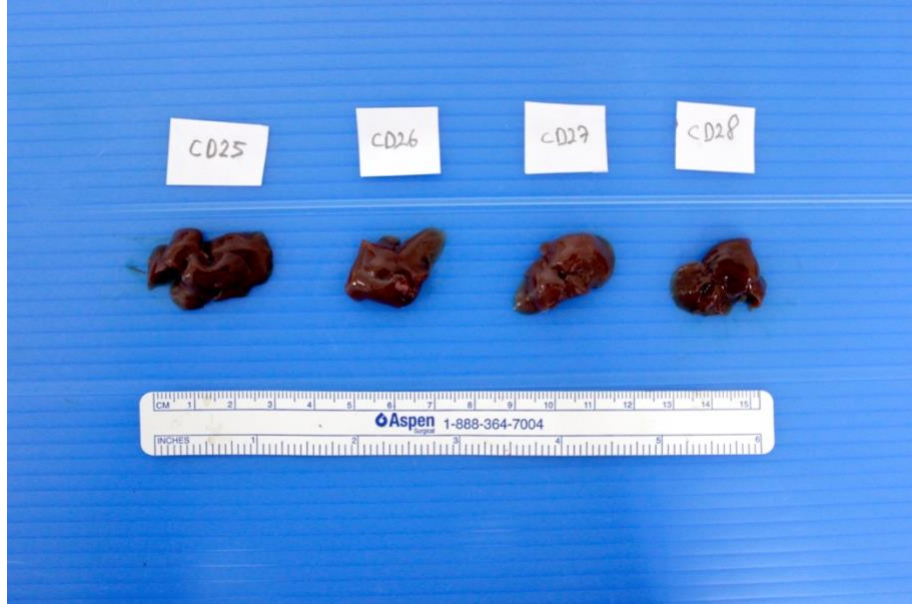
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait karaciğerlerin normal makroskopik görüntüsü.



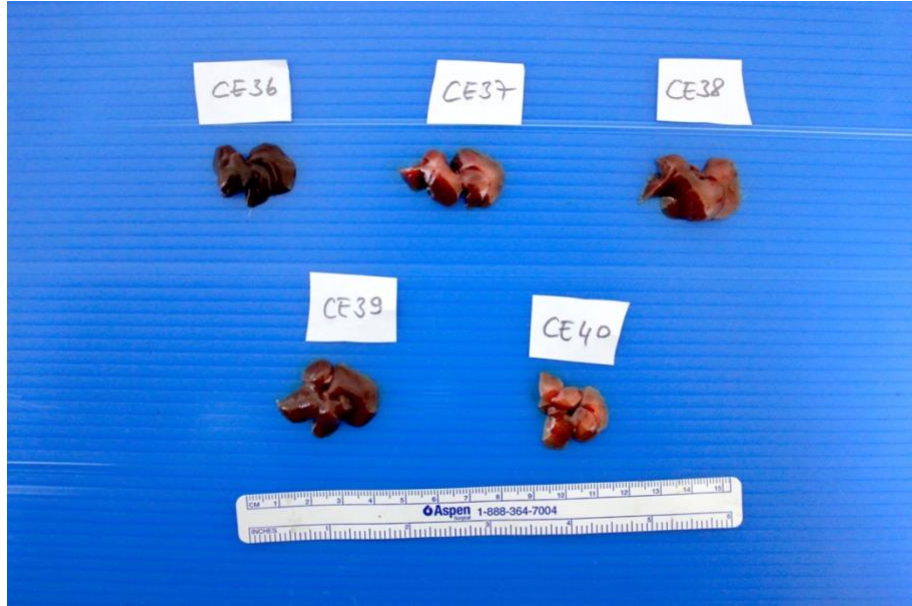
Şekil 4.2. NGF grubuna ait karaciğerlerin makroskobik görüntüsü. Bu gruptaki hayvanların karaciğerleri herhangi bir patolojik bulgu göstermemesi bakımından Kontrol grubundaki deneklerin karaciğerleri ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.3. p38MAPKi grubuna ait karaciğerlerin makroskobik görüntüsü. Bu gruptaki deneklerde herhangi bir patolojik lezyon gözlenmemektedir.



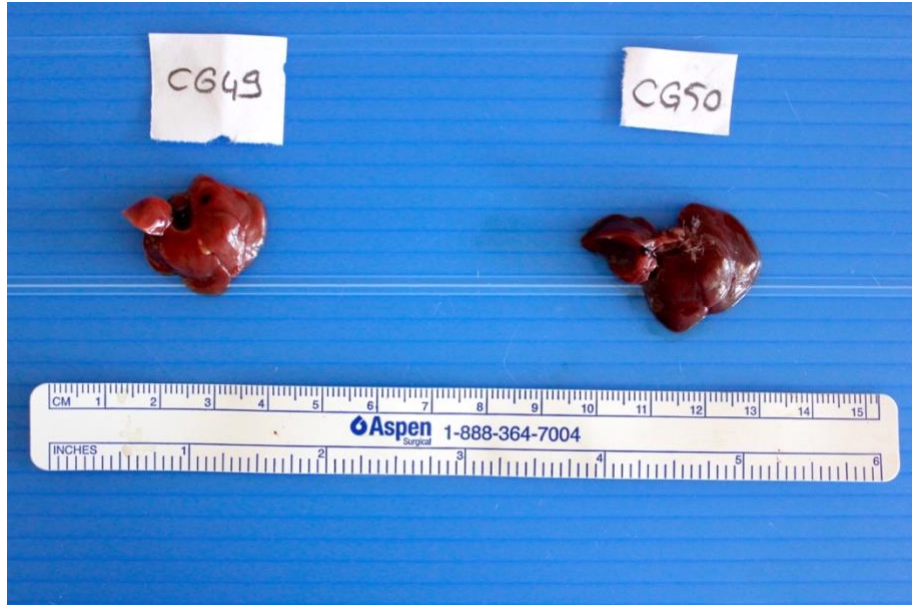
Şekil 4.4. NGF+p38MAPK grubuna ait karaciğerlerin makroskobik görüntüsü. Bu gruptaki deneklerin karaciğerleri Kontrol, NGF ve p38MAPK gruplarındaki deneklerin karaciğerleri ile benzer olarak herhangi bir patolojik değişiklik içermemektedir.



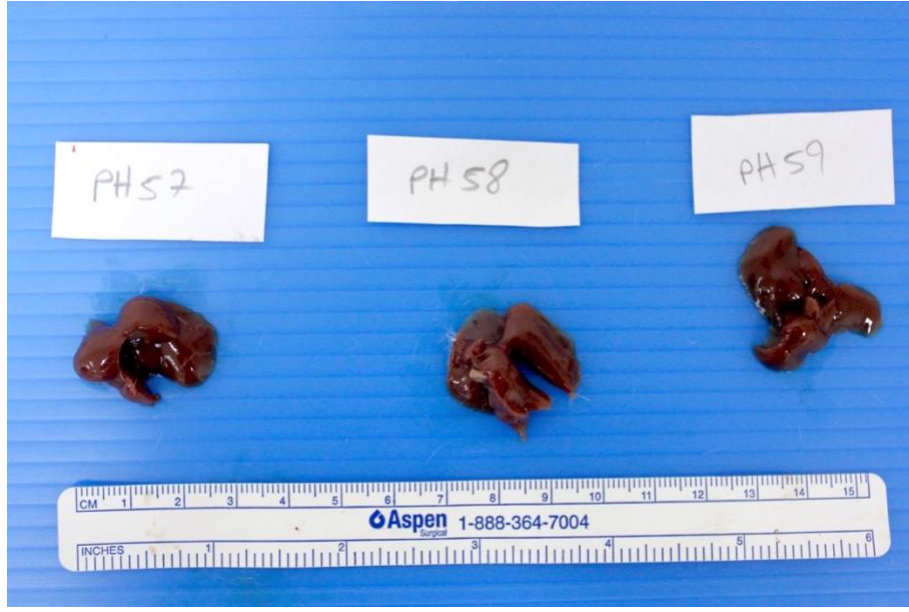
Şekil 4.5. Bakır grubuna ait karaciğerlerin makroskobik görüntüsü. CE37, CE38 ve CE40 denek numaralı farelere ait karaciğerlerin diğer karaciğerlere göre daha soluk renkte olduğu dikkati çekmekte.



Şekil 4.6. Bakır+NGF grubuna ait karaciğerlerin makroskobik görüntüsü. CF45 ve CF48 denek numaralı farelerin karaciğerlerinin aynı gruptaki diğer farelere göre daha soluk renkte olduğu dikkati çekmekte.



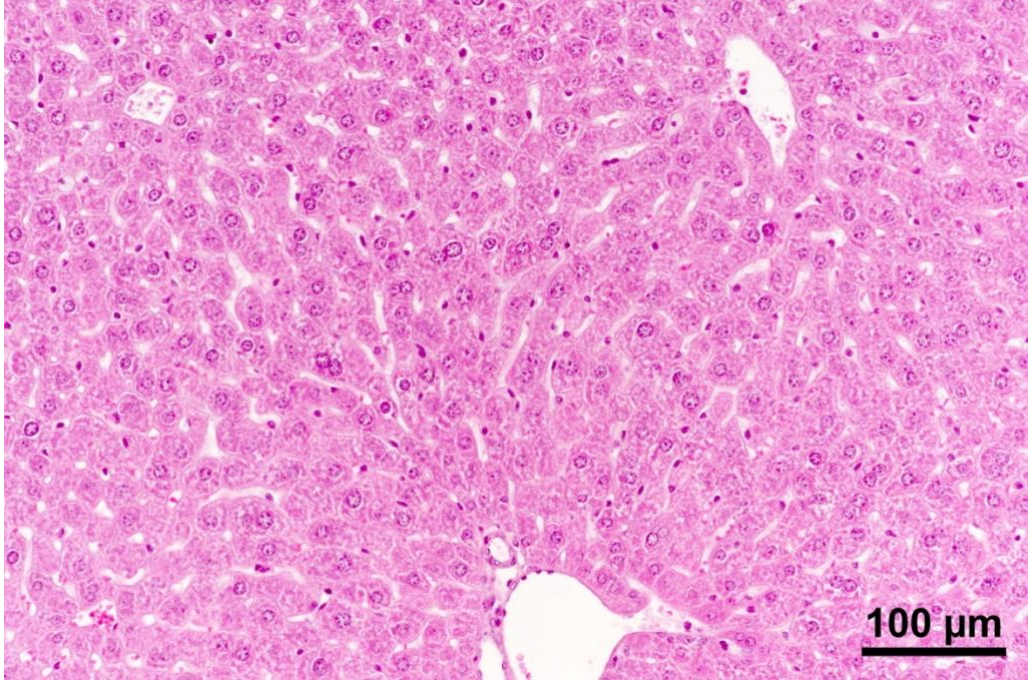
Şekil 4.7. Bakır+p38MAPKi grubuna ait karaciğerlerin makroskobik görüntüsü. CG49 denek numaralı farenin karaciğerinin daha soluk renkte olduğu dikkati çekmekte.



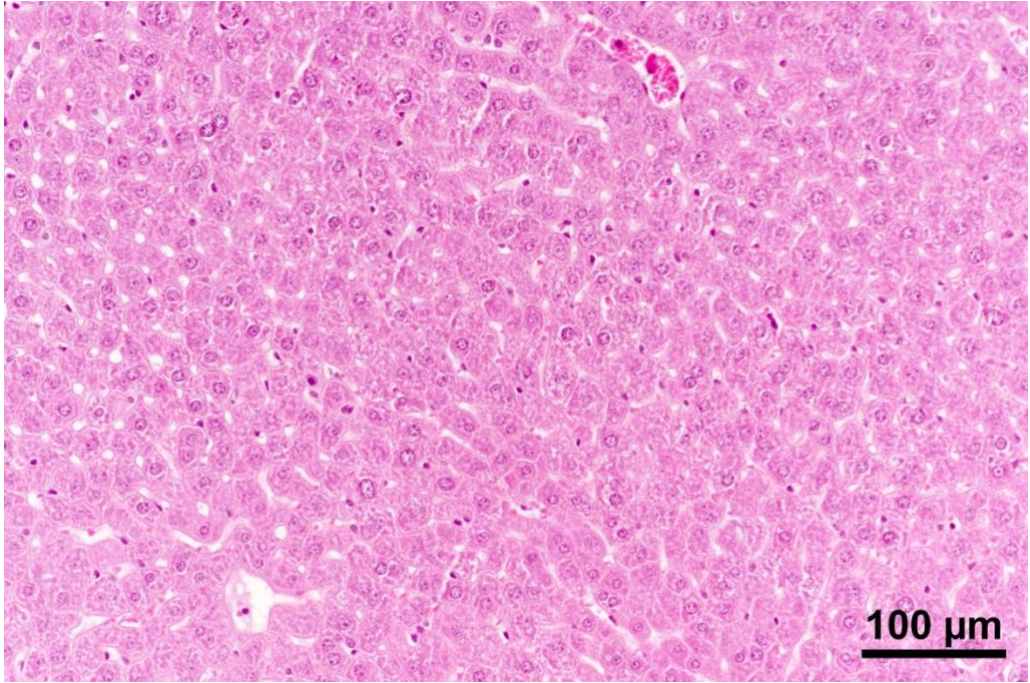
Şekil 4.8. Bakır+NGF+p38MAPKi grubuna ait karaciğerlerin makroskobik görüntüsü.

4.1.2. Histopatolojik Bulgular

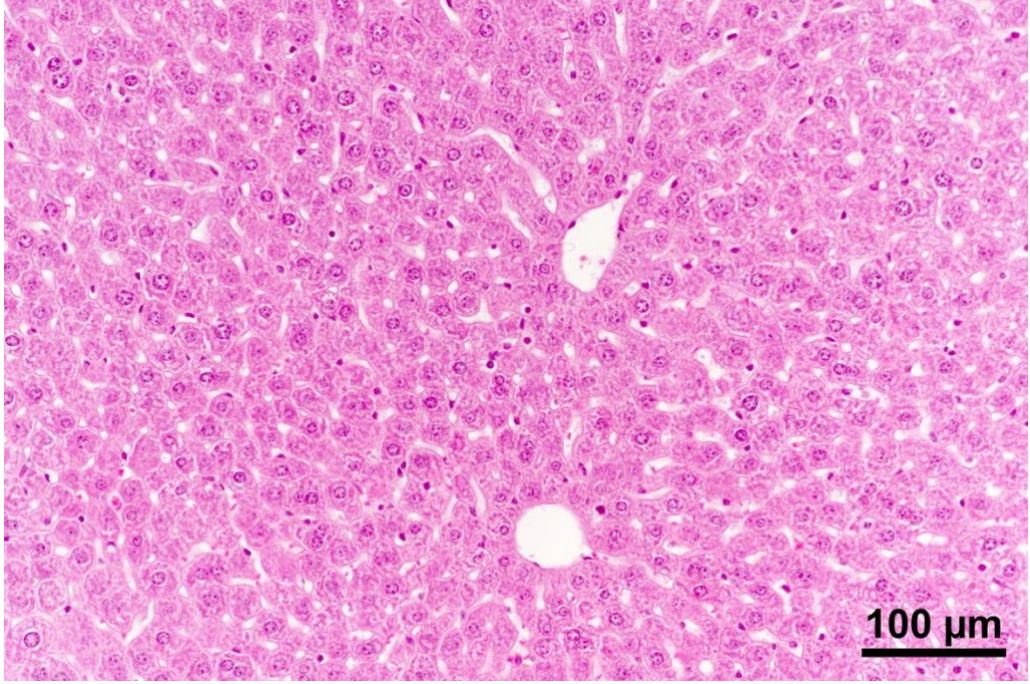
Sunulan bu çalışmada Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarına ait karaciğer dokularının histopatolojik analizlerinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Şekil 4.9-4.12).



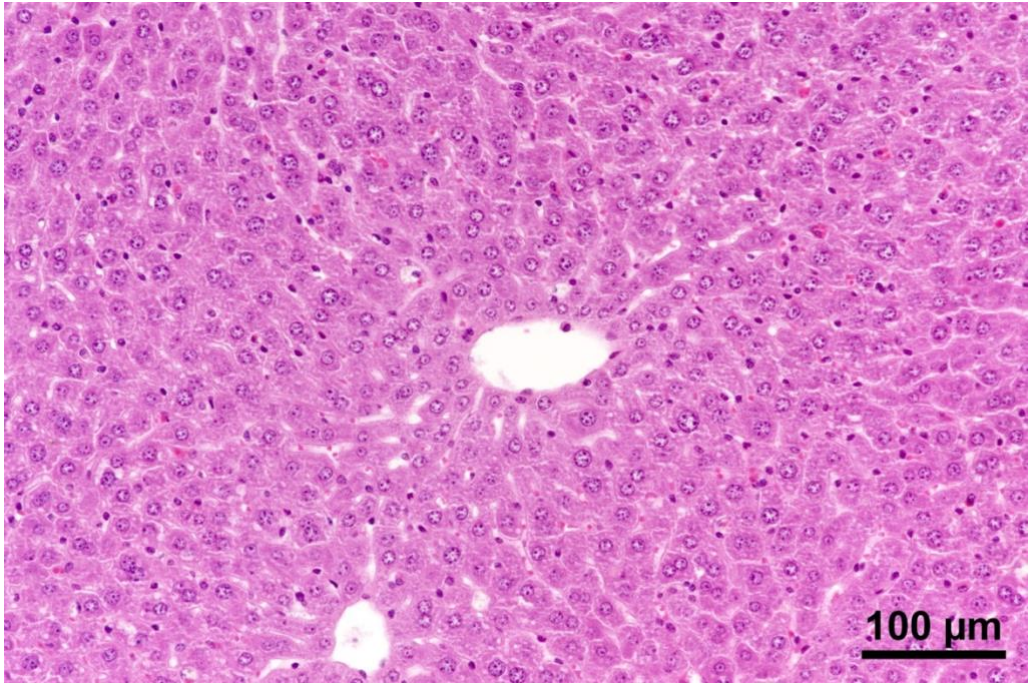
Şekil 4.9. Kontrol grubu; karaciğerde normal histolojik görüntü. HE



Şekil 4.10. NGF grubu; karaciğerde normal histolojik görüntü, herhangi bir histopatolojik lezyon gözlenmemektedir. HE

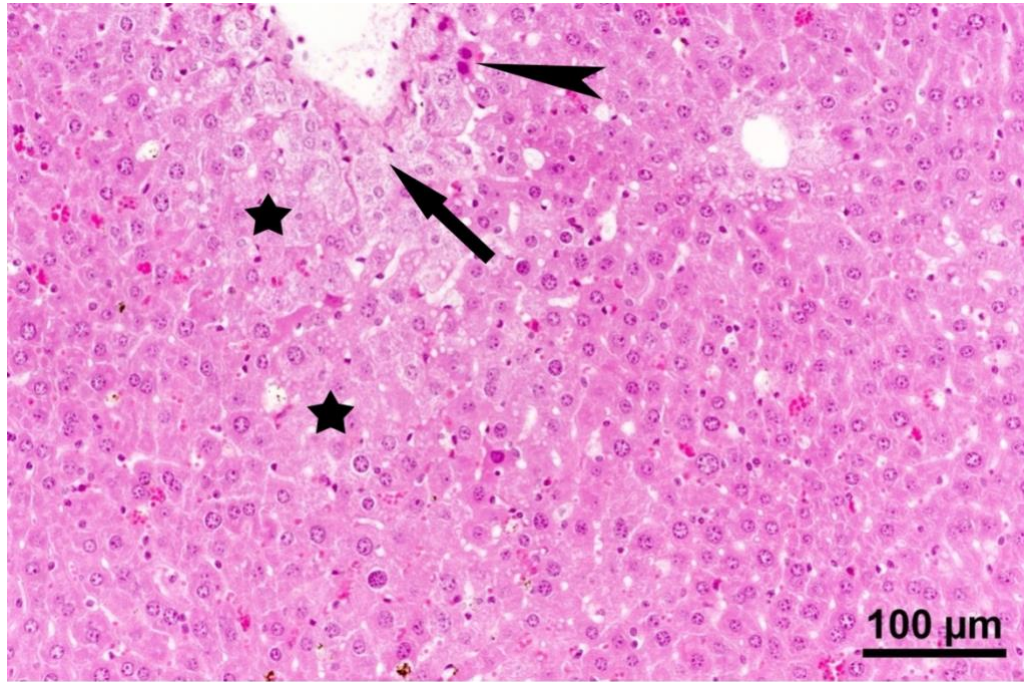


Şekil 4.11. p38MAPKi grubu; karaciğerde normal histolojik görüntü, herhangi bir histopatolojik lezyon gözlenmemektedir. HE

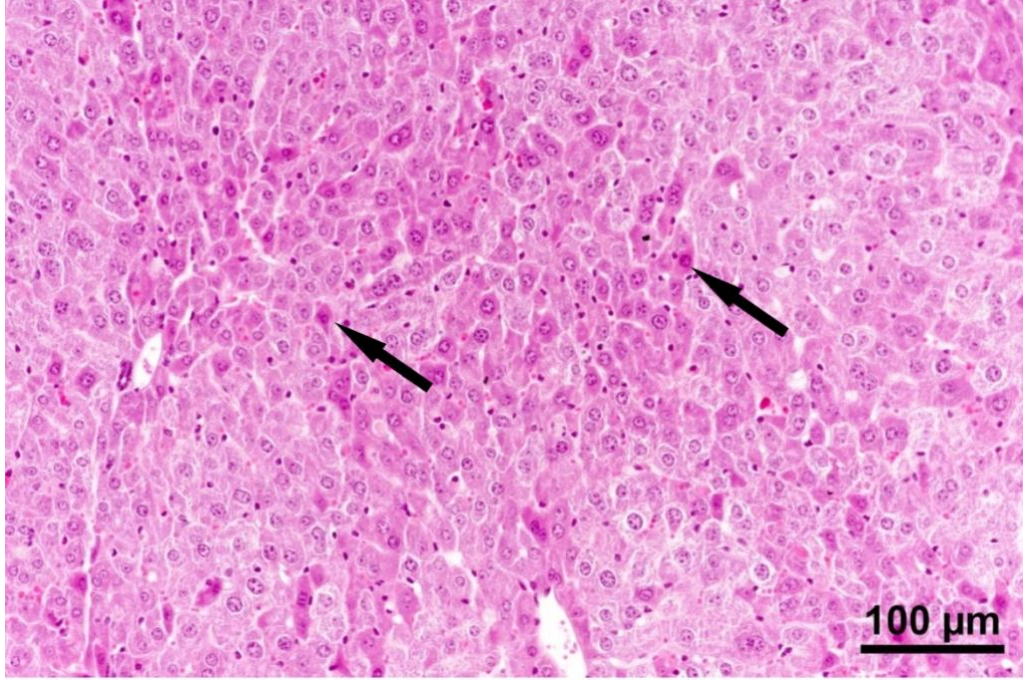


Şekil 4.12. NGF+p38MAPKi grubu; karaciğerde normal histolojik görüntü, herhangi bir histopatolojik lezyon gözlenmemektedir. HE

Bakır grubundaki farelerin karaciğerlerinde hepatositlerde hidropik dejenerasyondan vakuoler dejenerasyon kadar değişen seviyede dejeneratif değişiklikler ile fokal nekrotik alanlar tespit edildi. Dejenere hücrelerin sağlıklı hepatosilere göre daha büyük, sitoplazmalarının daha açık renkli boyandığı ve bazı hücrelerde değişen boyutlarda olmak üzere vakuollerin bulunduğu gözlemlendi. Bu gruptaki deneklerde dejenerasyonun yanı sıra bazı hepatositlerin nekroze olduğu dikkati çekti. Nekroze hücrelerin eozinofilik sitoplazmalı ve piknotik çekirdekli bazılarının çekirdeklerinin tamamen gözden silindiği tespit edildi. Dejenerasyon ve nekrozların özellikle sentrilobüler bölgedeki hepatositlerde daha belirgin olduğu, bu lezyonların hasarın şiddetli olduğu olgularda ise portal alandaki hepatositlere kadar uzandığı görüldü (Şekil 4.13 ve 4.14).

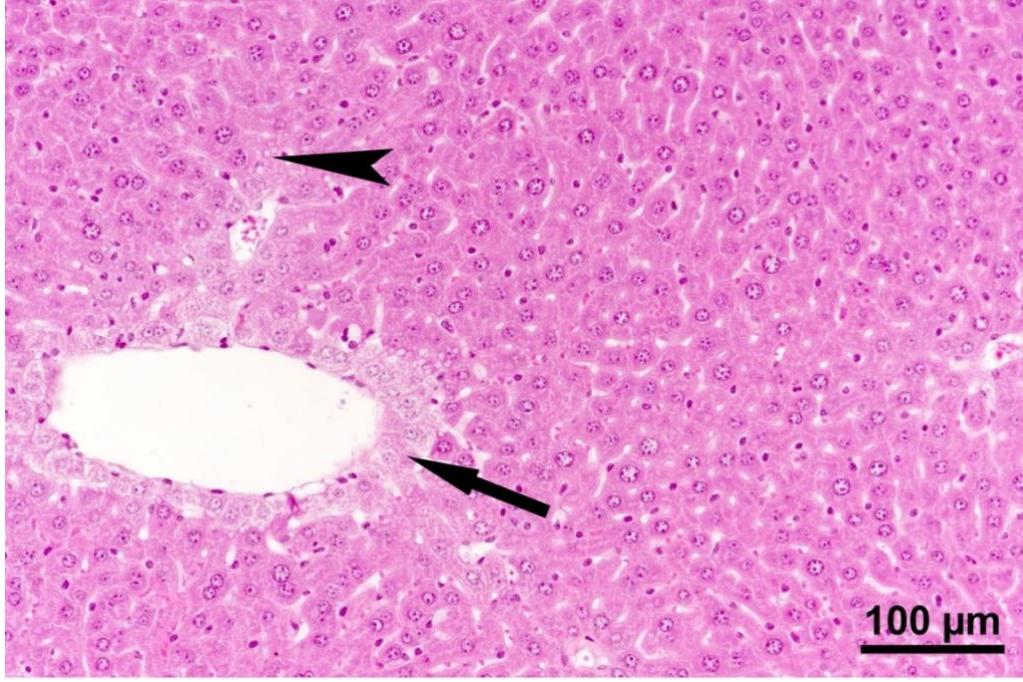


Şekil 4.13. Bakır grubu; sentral ven çevresi ve midzonal bölgede hidropik dejenerasyon (ok), piknotik çekirdekli (ok başı) ve çekirdeklerini yitirmiş nekrotik hepatositler (yıldızlar). HE



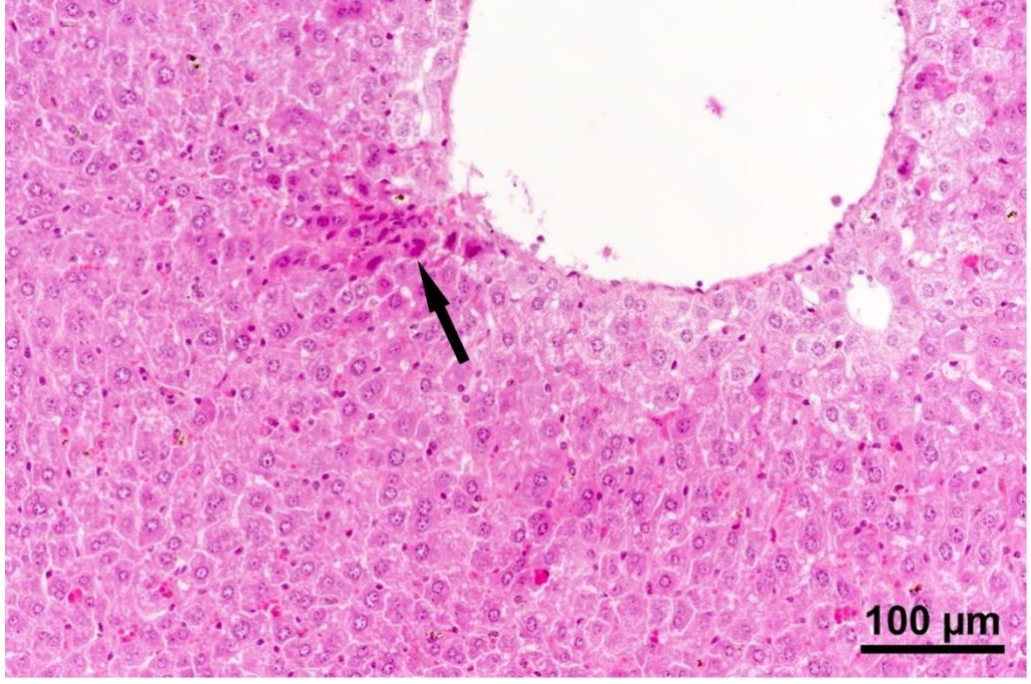
Şekil 4.14. Bakır grubu; şiddetli hidropik dejenerasyon. Çok sayıda eozinofilik sitoplazmalı piknotik çekirdekli hepatositler (oklar). HE

Bakır+NGF grubundaki farelerin karaciğerlerindeki dejenerasyonların Bakır grubundaki farelere göre daha az şiddetli olduğu görüldü. Bu gruptaki farelerin karaciğerlerinde sentral ven çevresinde hidropik ve vakuoler dejenerasyonlar tüm olgularda şekillenirken (Şekil 4.15) fokal nekrozun ise sadece üç olguda ve sentral ven çevresinde olduğu dikkati çekti.

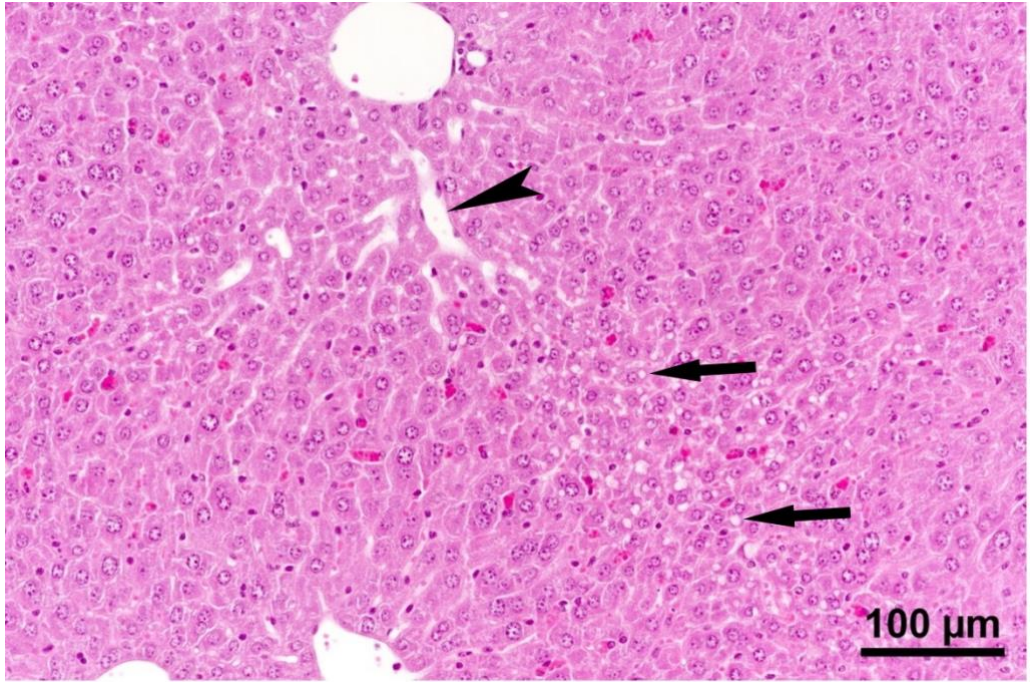


Şekil 4.15. Bakır+NGF grubu; sentral ven çevresindeki hepatositlerde hidropik (ok) ve vakuoler dejenerasyon (ok başı). HE

Bakır+p38MAPKi grubundaki farelerin histopatolojik muayenesinde hidropik dejenerasyonun sentral ven çevresinde olduğu, vakuoler dejenerasyonların ise portal alana kadar uzandığı tespit edildi. Olguların beşinde fokal nekroz görüldü (Şekil 4.16). Ayrıca olgulardan üçünde sinüzoidal boşluğun genişlediği dikkati çekti (Şekil 4.17).

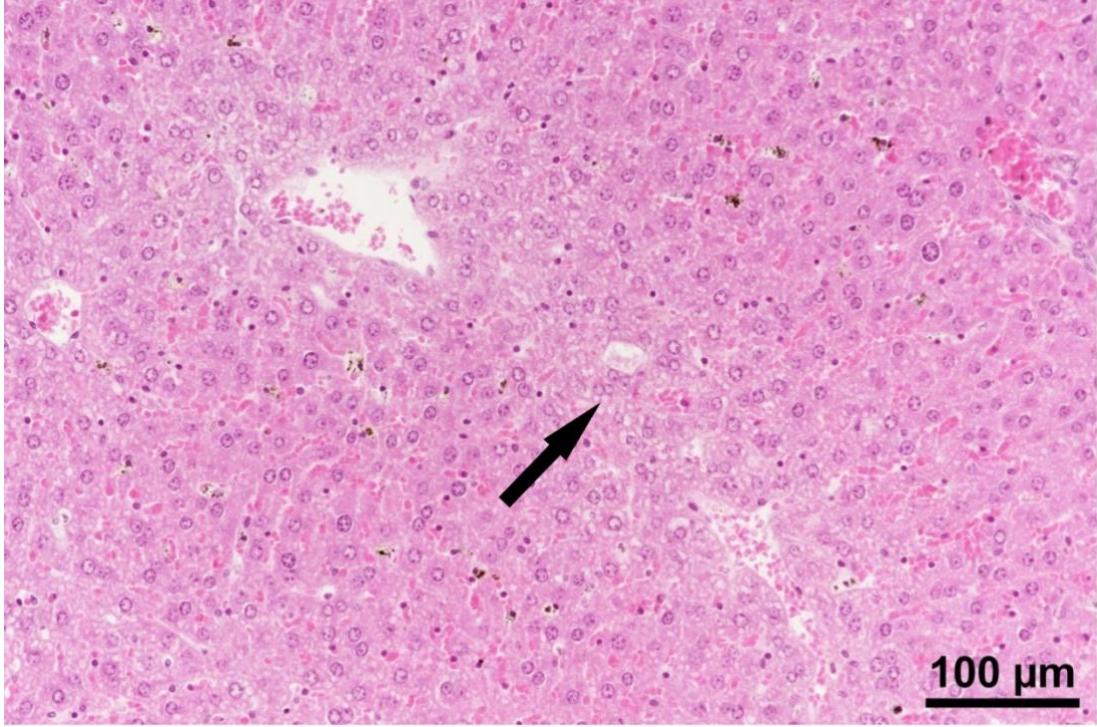


Şekil 4.16. Bakır+p38MAPK grubu; sentral ven çevresi hidropik dejenerasyon ve fokal nekroz (ok). HE



Şekil 4.17. Bakır+p38MAPK grubu; sentral ven ve portal alan arasında vakuoler dejenerasyon (oklar) ile sinuzoidal boşluğun genişlemesi (ok başı). HE

Bakır+NGF+p38MAPKi grubundaki farelerin karaciğerlerinde vena sentralis çevresinde hidropik dejenerasyon ile şiddetli vakuoler dejenerasyon dikkati çekti. Bu gruptaki deneklerden sadece birinde nekroz tespit edildi (Şekil 4.18).



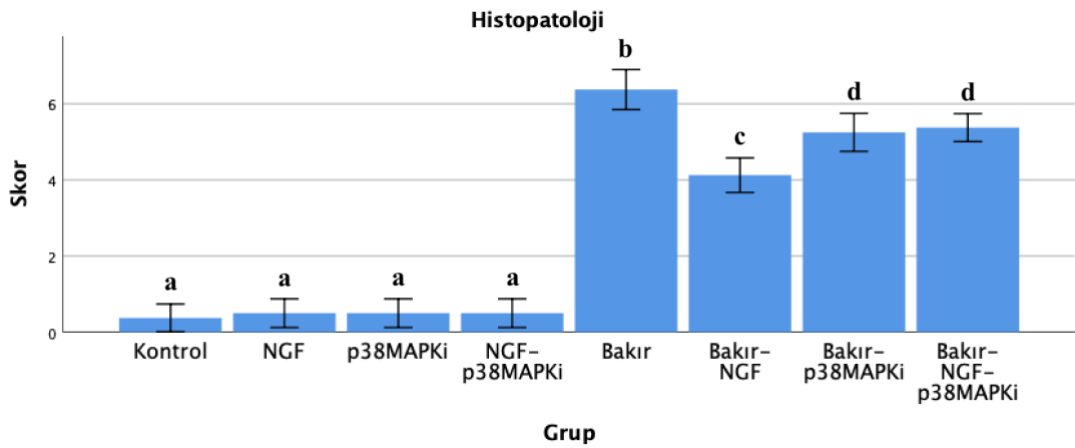
Şekil 4.18. Bakır+NGF+p38MAPKi grubu; vakuoler dejenerasyon (ok). HE

Sunulan bu çalışmaya ait histopatolojik bulguların gruplara göre skorları ve istatistiksel değerlendirilmesi **Tablo 4.1** ve **Şekil 4.19**'de gösterildi.

Tablo 4.1. Gruplara göre karaciğerlerdeki histopatolojik bulguların skorlamasının istatistiksel ortalamaları

Grup	X±SE
Kontrol	0.38±0.183 ^a
NGF	0.63±0.263 ^a
p38MAPKi	0.75±0.250 ^a
NGF+p38MAPKi	0.50±0.189 ^a
Bakır	6.38±0.263 ^b
Bakır+NGF	4.13±0.227 ^c
Bakır+p38MAPKi	5.25±0.250 ^d
Bakır+NGF+p38MAPKi	5.38±0.183 ^d

Veriler Ortalama±Standart hata (X±SE) olarak sunuldu ve One-way ANOVA ve post-hoc Tukey HSD ile karşılaştırıldı. Aynı sütundaki farklı üst simgeler gruplar arasındaki farkın anlamlı (p<0.05) olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.19. Histopatolojik bulguların skorlamasının grafiksel gösterimi.

4.1.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

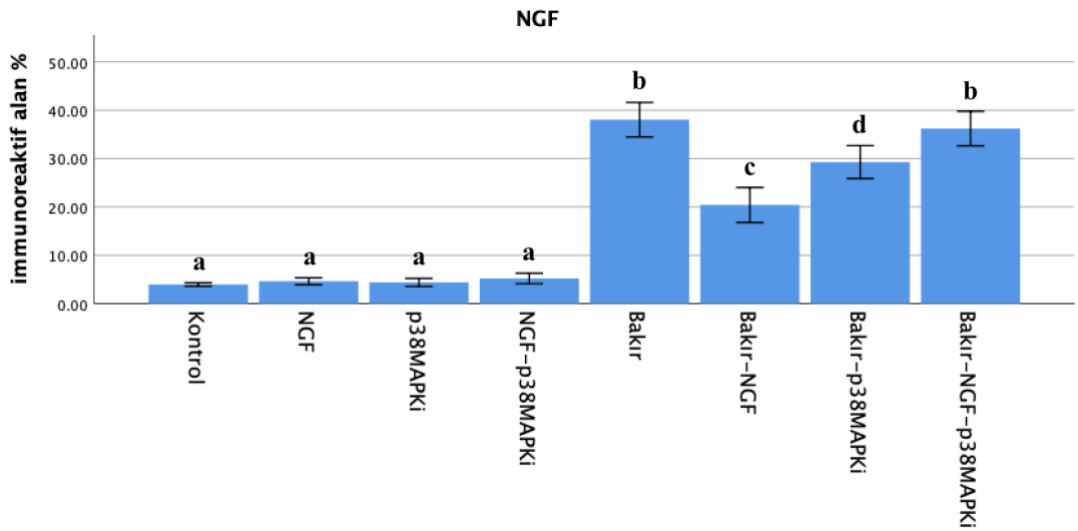
Sunulan bu çalışmada fare karaciğer dokularında NGF, iNOS, nitrotirozin, kaspaz 8, kaspaz 3, IL-1, IL-6 ve TNF- α 'ın ekspresyonları immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Bu antikorlara ait skora immun pozitif alanların yüzdesi olarak Fiji yazılımı ile tespit edildi. Antikorlara ait immunohistokimyasal skorlar ve istatistiksel değerlendirilmesi **Tablo 4.2**'de gösterildi.

Tablo 4.2. Gruplara göre karaciğerlerdeki immunohistokimyasal skorlamanın istatistiksel ortalamaları

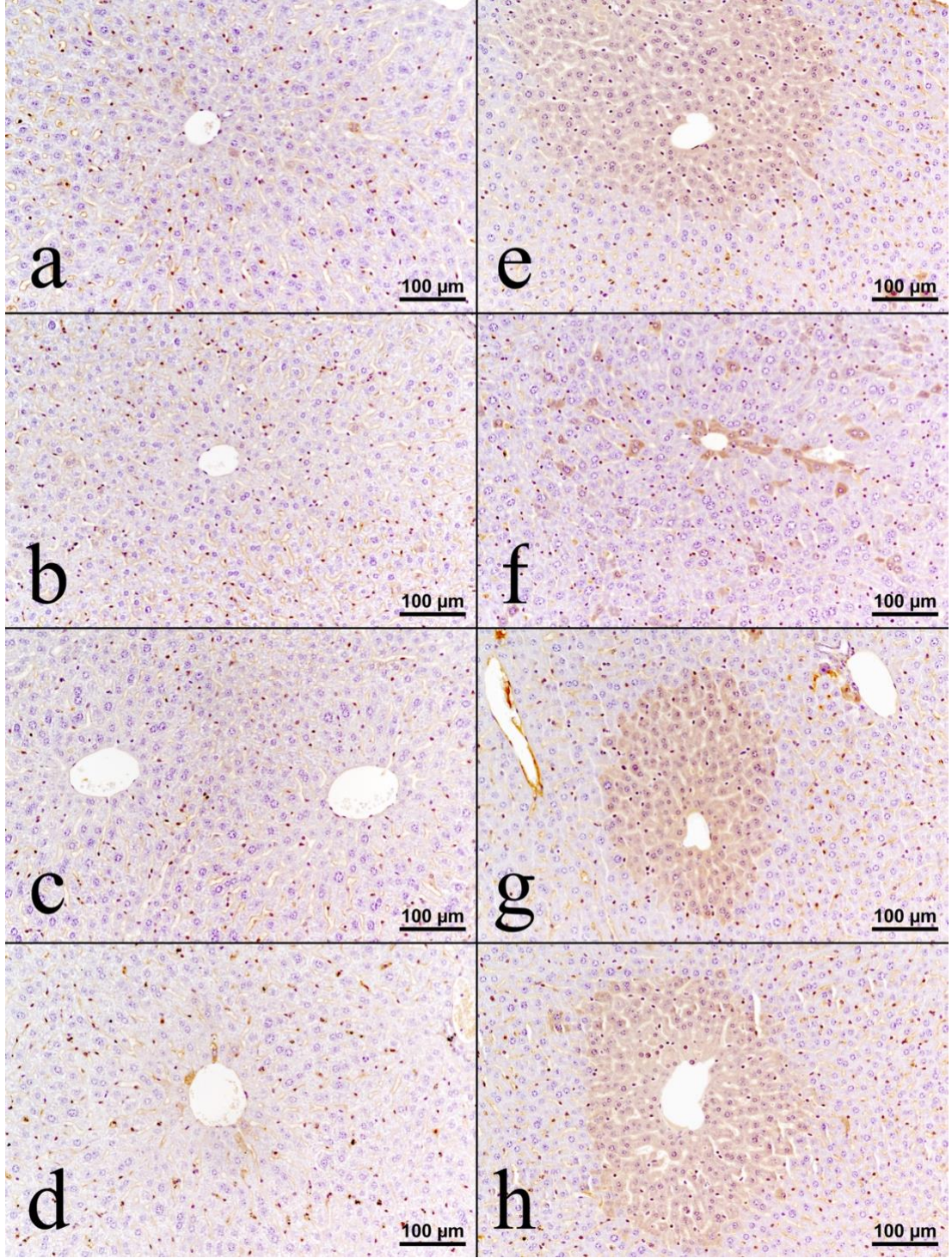
Grup	NGF (X±SE)	iNOS (X±SE)	Nitrotirozin (X±SE)	Kaspaz 8 (X±SE)	Kaspaz 3 (X±SE)	IL-1 (X±SE)	IL-6 (X±SE)	TNF-α (X±SE)
Kontrol	3.97±0.17 ^a	6.02±0.55 ^a	4.06±0.27 ^a	4.88±0.32 ^a	4.18±0.45 ^a	7.07±0.51 ^a	4.03±0.40 ^a	3.63±0.20 ^a
NGF	4.64±0.36 ^a	7.32±0.36 ^a	4.71±0.40 ^a	4.41±0.51 ^a	3.85±0.29 ^a	13.66±1.50 ^a	4.44±0.48 ^a	3.70±0.23 ^a
p38MAPKi	4.39±0.41 ^a	7.36±0.36 ^a	5.81±0.77 ^a	5.50±0.48 ^a	4.61±0.36 ^a	14.24±1.48 ^a	4.55±0.23 ^a	3.64±0.17 ^a
NGF+p38MAPKi	5.21±0.53 ^a	7.60±0.50 ^a	6.09±0.44 ^a	5.26±0.46 ^a	5.83±0.73 ^a	15.00±1.62 ^a	6.38±0.41 ^a	4.01±0.53 ^a
Bakır	38.04±1.78 ^b	42.44±2.01 ^b	34.80±2.07 ^b	23.66±1.62 ^b	20.66±1.13 ^b	53.81±3.75 ^b	45.41±1.57 ^b	66.03±2.08 ^b
Bakır+NGF	20.41±1.81 ^c	18.09±1.98 ^c	15.71±0.77 ^c	13.69±1.13 ^c	12.60±0.75 ^c	31.01±1.91 ^c	16.02±0.95 ^c	56.77±1.75 ^c
Bakır+p38MAPKi	29.28±1.70 ^d	28.80±2.17 ^d	23.89±1.79 ^d	22.03±1.18 ^b	18.17±1.20 ^b	39.16±1.62 ^c	30.92±2.49 ^d	56.69±2.06 ^c
Bakır+NGF+p38MAPKi	36.20±1.79 ^b	35.87±1.50 ^e	44.23±2.33 ^e	26.36±1.55 ^b	22.16±1.67 ^b	49.52±1.78 ^b	38.26±2.87 ^e	67.90±3.58 ^b

Veriler immun reaktif alan %'dir ve Ortalama±Standart hata (X±SE) olarak sunuldu ve One-way ANOVA ve post-hoc Tukey HSD ile karşılaştırıldı. Aynı sütundaki farklı üst simgeler gruplar arasındaki farkın anlamlı (p<0.05) olduğunu göstermektedir.

Dokulardaki NGF ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.20**'de sunuldu. Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarında NGF'nin pozitif immunoreaktivitesi az sayıda hepatositte (her lobülde rastgele dağılımlı 1-4 adet hücrede) intrasitoplazmik olarak görüldü. Bakır, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında NGF immunoreaktivitesi sentral ven çevresinden portal alana kadar değişen yoğunlukta hepatositlerde intrasitoplazmik olarak gözlemlendi. Bakır+NGF grubunda NGF immunoreaktivitesi diğer Cu uygulanan gruplardan daha az olarak sentral ven çevresi ile lobül içerisinde rastgele dağılmış şekilde hepatositlerde intrasitoplazmik olarak tespit edildi (**Şekil 4.21**). Ayrıca NGF pozitif immunoreaktivitesi tüm gruplardaki karaciğerlerde Kupffer hücrelerinin sitoplazmalarında da görüldü.

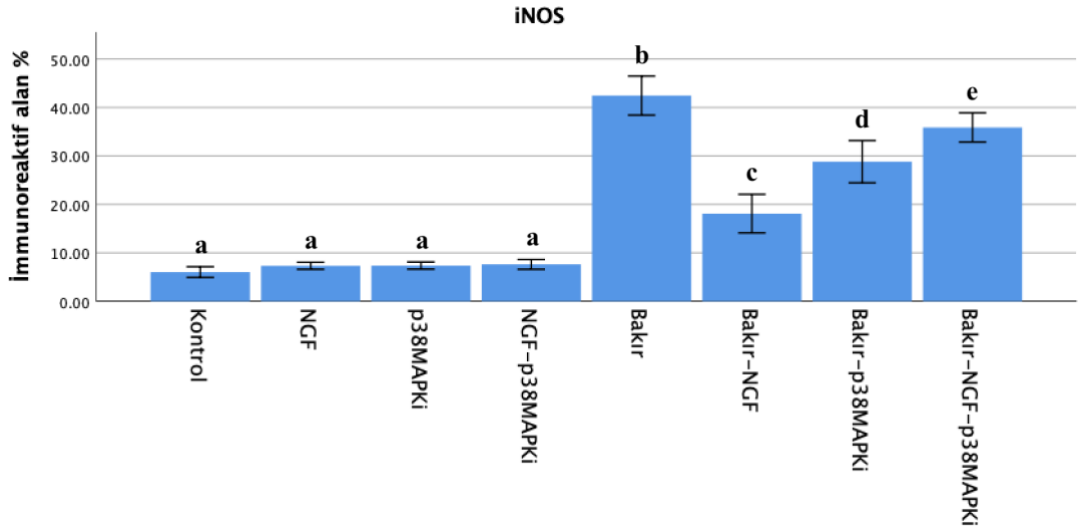


Şekil 4.20. Karaciğer dokularında NGF immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi

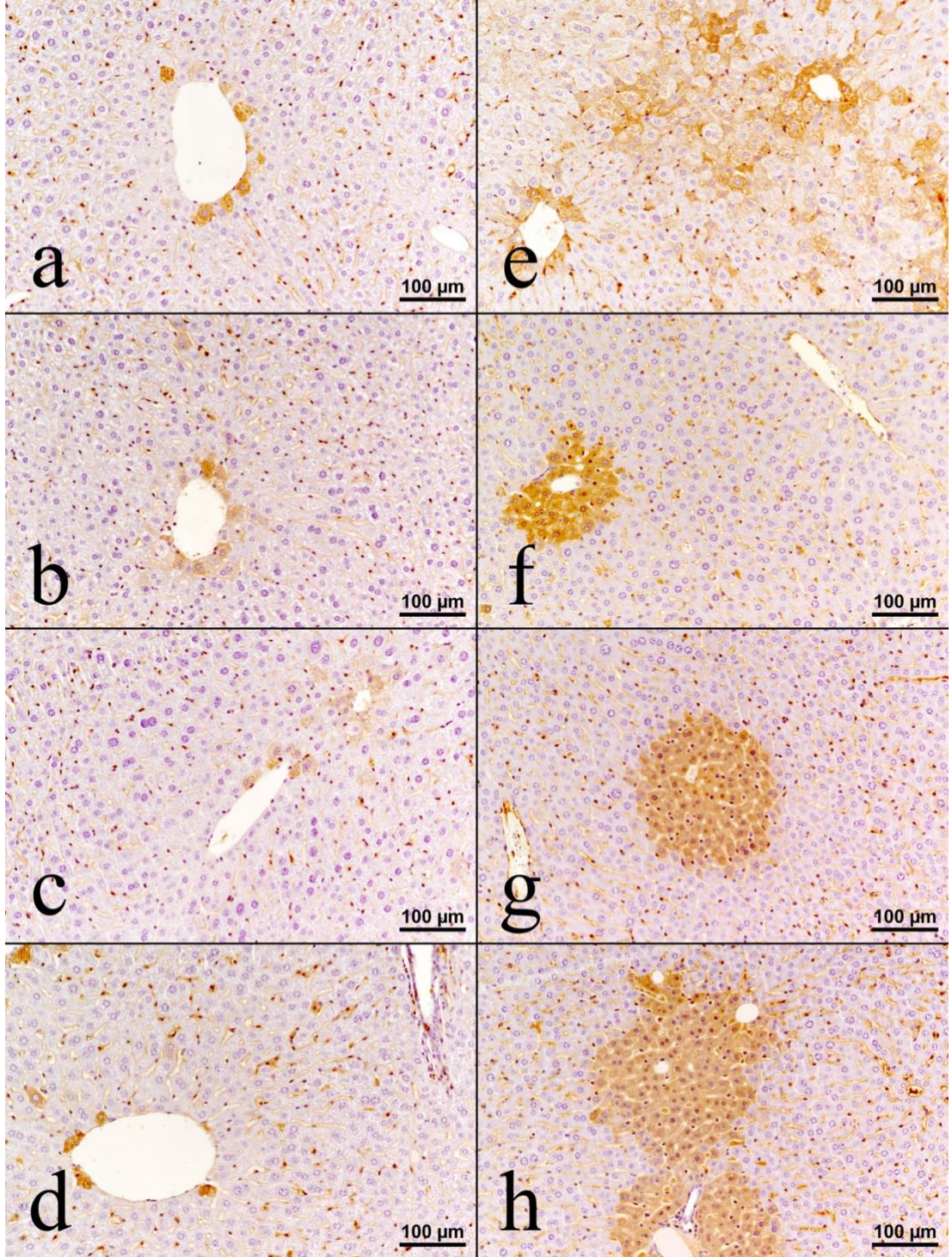


Şekil 4.21. Karaciğer dokusunda NGF immunoreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPK grubu, **d.** NGF+p38MAPK grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPK grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPK grubu. Bakır uygulaması yapılan gruplardaki NGF immunoreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunoreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte. Bakır+NGF grubunda diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az NGF immunoreaktivitesi dikkati çekmekte.

Dokulardaki iNOS ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.22**'de sunuldu. iNOS immunoreaktivitesi Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarında sentral ven çevresindeki az sayıda hepatosit ile lobül içerisinde rastgele dağılmış şekilde hepatositlerin sitoplazmalarında görüldü. Bakır ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında güçlü ve yoğun iNOS immunoreaktivitesi sentral ven ile portal alan arasındaki hepatositlerde intrasitoplazmik olarak tespit edildi. Bakır+NGF ve Bakır+p38MAPKi gruplarında iNOS immunoreaktivitesi sentral ven çevresinden portal alana kadar değişen aralıkta hepatositlerde intrasitoplazmik olarak gözlemlendi (**Şekil 4.23**). Ayrıca tüm gruplardaki karaciğerlerde Kupffer hücreleri ve damar endotelinde güçlü iNOS immunoreaksiyonu tespit edildi.

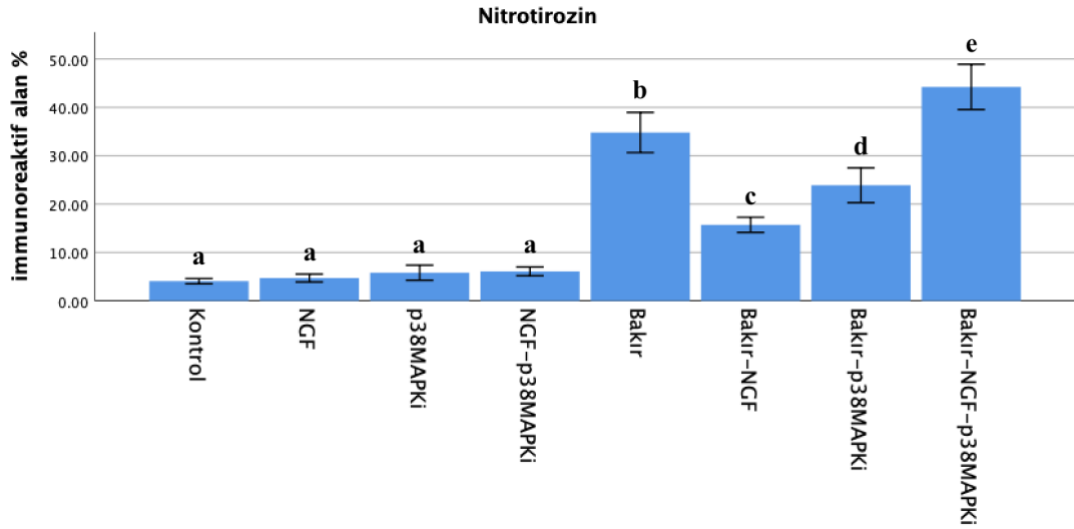


Şekil 4.22. Karaciğer dokularında iNOS immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi

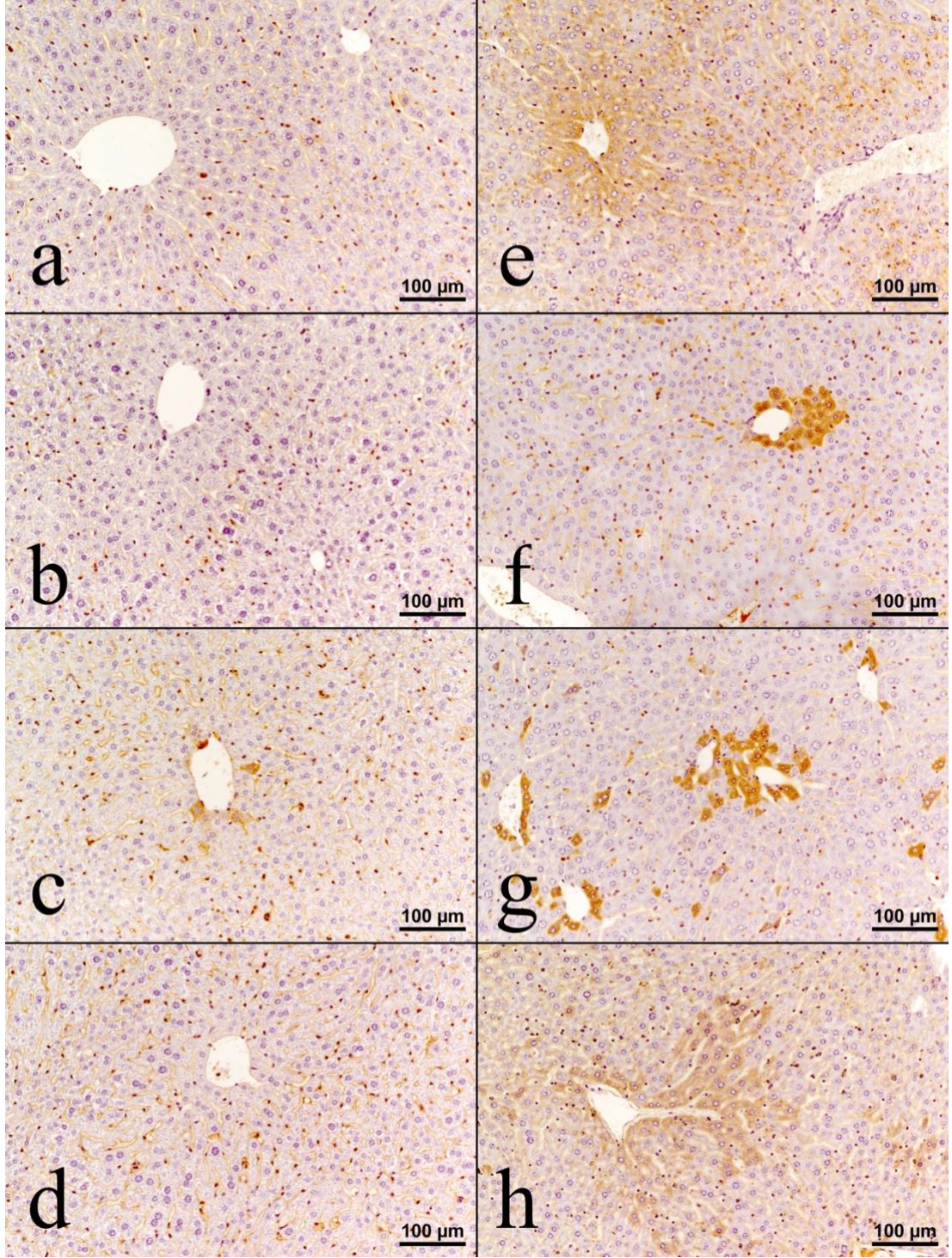


Şekil 4.23. Karaciğer dokusunda iNOS immunoreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPKi grubu, **d.** NGF+p38MAPKi grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPKi grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPKi grubu. Bakır uygulaması yapılan gruplardaki iNOS immunoreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunoreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte. Bakır+NGF grubunda diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az iNOS immunoreaktivitesi dikkati çekmekte.

Dokulardaki nitrotirozin ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.24**'de sunuldu. Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarında nitrotirozin immunoreaktivitesi az sayıda hepatositte sitoplazmik olarak gözlemlendi. Bakır ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında sentral ven ile portal alan arasındaki hepatositlerde intrasitoplazmik olarak nitrotirozin güçlü pozitif immunoreaktivitesi görüldü. Nitrotirozin immunoreaktivitesi Bakır+NGF ve Bakır+p38MAPKi gruplarında diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az şiddetli olarak sentral ven çevresinde görüldü (**Şekil 4.25f** ve **g**). Ayrıca tüm gruplardaki karaciğerlerde Kupffer hücreleri ve damar endotelinde güçlü nitrotirozin immunoreaksiyonu tespit edildi.



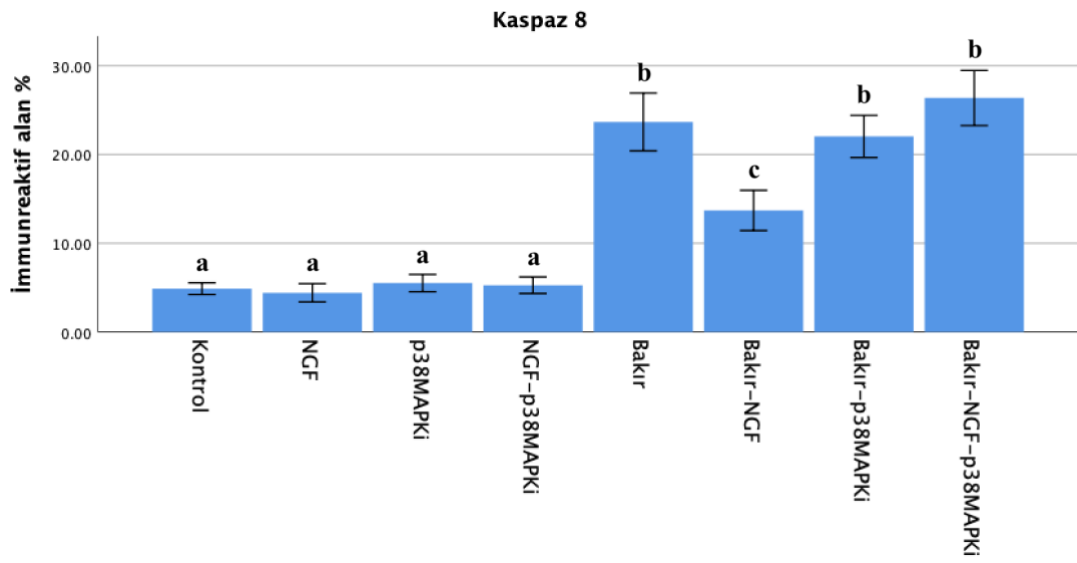
Şekil 4.24. Karaciğer dokularında nitrotirozin immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi



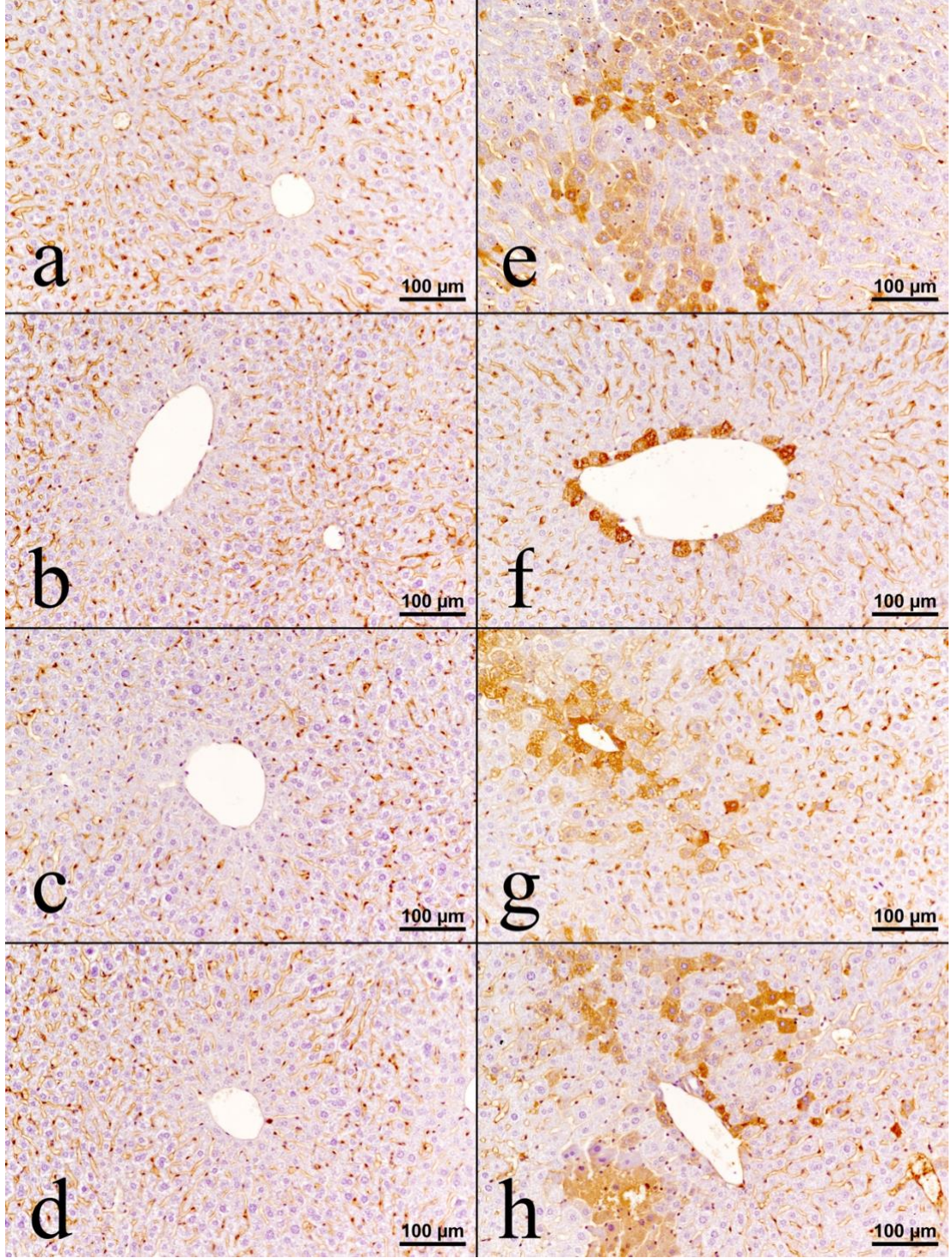
Şekil 4.25. Karaciğer dokusunda Nitrotirozin immunoreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPKi grubu, **d.** NGF+p38MAPKi grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPKi grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPKi grubu.

Bakır uygulaması yapılan gruplardaki nitrotirozin immunoreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunoreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte. Bakır+NGF grubunda diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az nitrotirozin immunoreaktivitesi dikkati çekmekte.

Dokulardaki kaspaz 8 ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.26**'da sunuldu. Kaspaz 8 immunoreaktivitesi Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarında lobül içerisine rastgele dağılmış tek tük hepatositte sitoplazmik olarak görüldü. Bakır, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında kaspaz 8 immunoreaksiyonu sentral venden portal alana doğru zayıflayan derecede hepatositlerde sitoplazmik olarak tespit edildi. Bakır+NGF grubunda sentral ven çevresindeki hepatositler ile sınırlı olan sitoplazmik immunoreaksiyon gözlemlendi (**Şekil 4.27**).



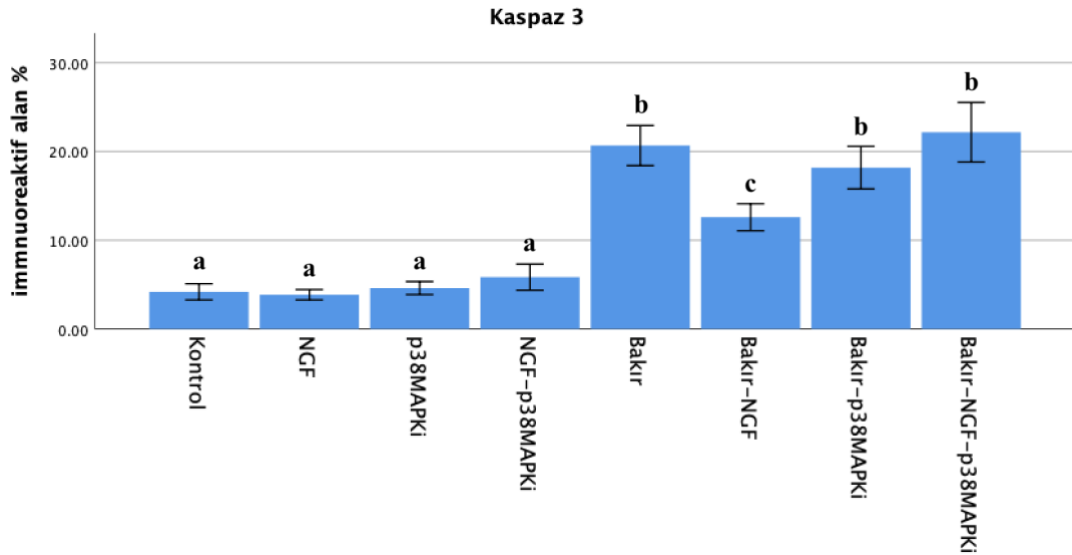
Şekil 4.26. Karaciğer dokularında kaspaz 8 immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi



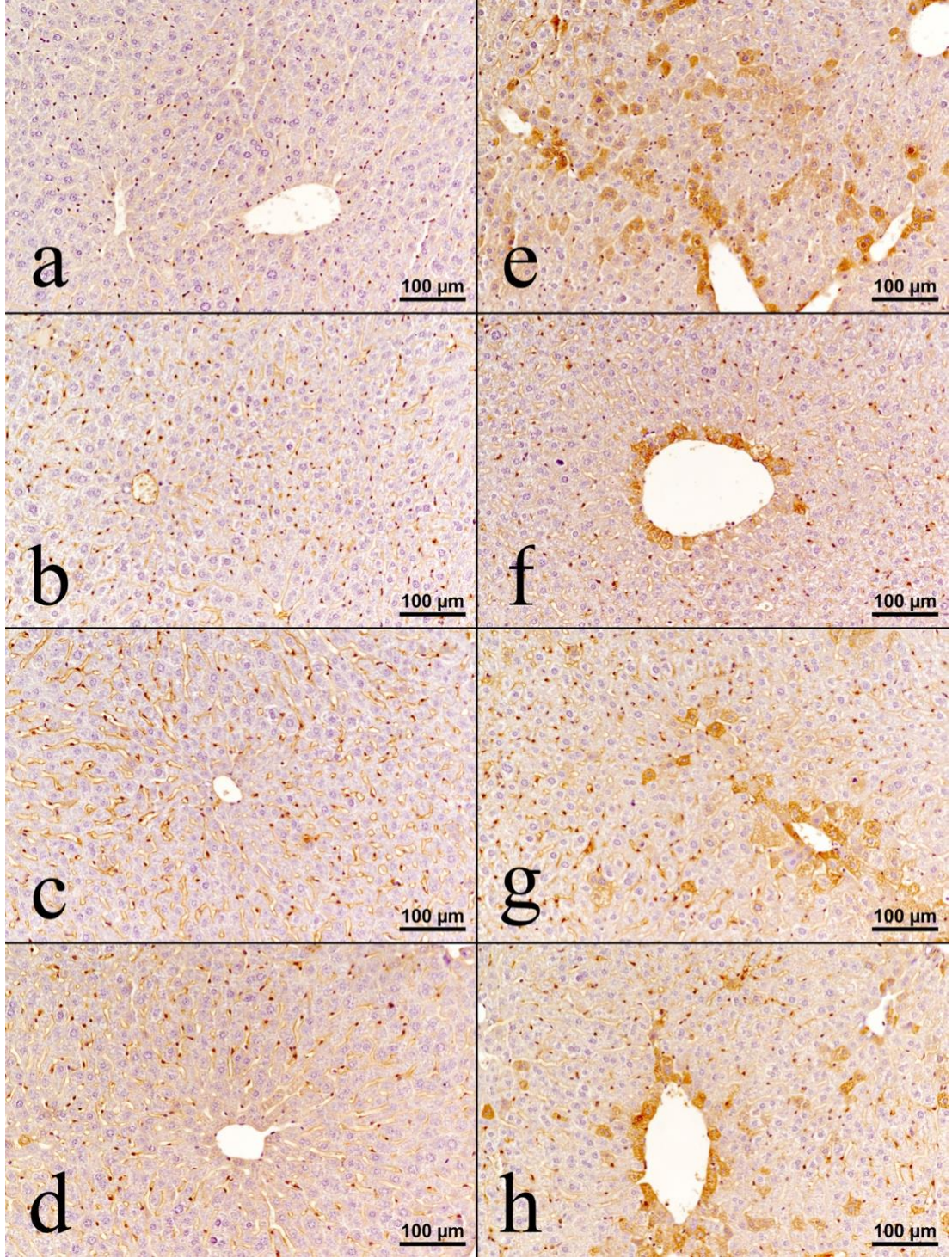
Şekil 4.27. Karaciğer dokusunda kaspaz 8 immunoreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPKi grubu, **d.** NGF+p38MAPKi grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPKi grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPKi grubu. Bakır uygulaması yapılan gruplardaki kaspaz 8 immunoreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunoreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte.

Bakır+NGF grubunda diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az kaspaz 8 immunoreaktivitesi dikkati çekmekte.

Dokulardaki kaspaz 3 ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.28**'de sunuldu. Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarında kaspaz 3 immunoreaktivitesi lobül içerisinde bireysel 1-2 hepatositte sitoplazmik olarak gözlemlendi. Bakır, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında kaspaz 3 immunoreaksiyonu özellikle sentral ven çevresindeki hepatositlerde güçlü, lobülün diğer alanlarındaki hepatositlerde ise rastgele dağılmış zayıf şiddete tespit edildi. Bakır+NGF grubunda kaspaz 3 immunoreaksiyonu sadece sentral ven çevresindeki hepatositlerde sitoplazmik olarak gözlemlendi (**Şekil 4.29**).



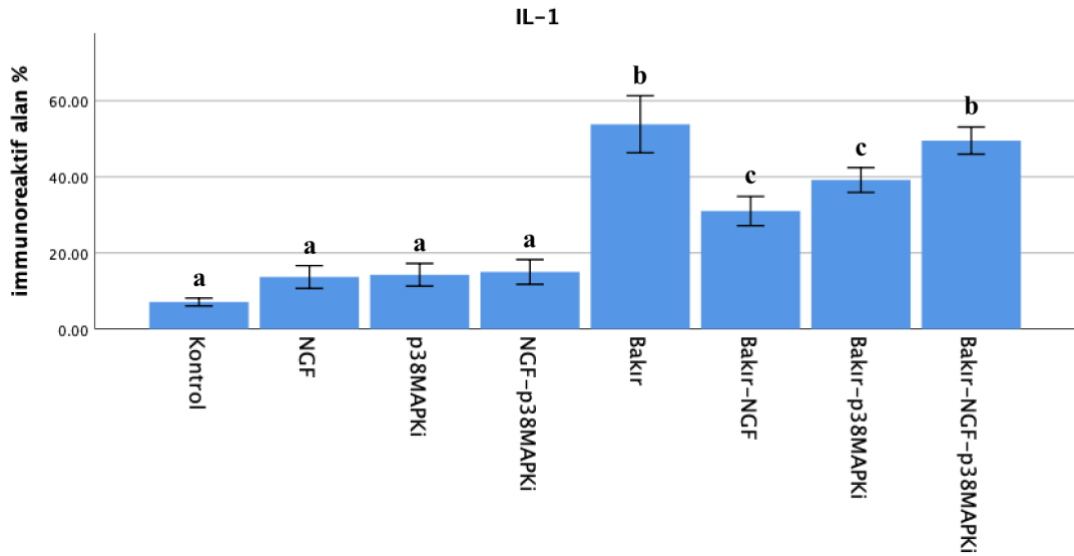
Şekil 4.28. Karaciğer dokularında kaspaz 3 immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi



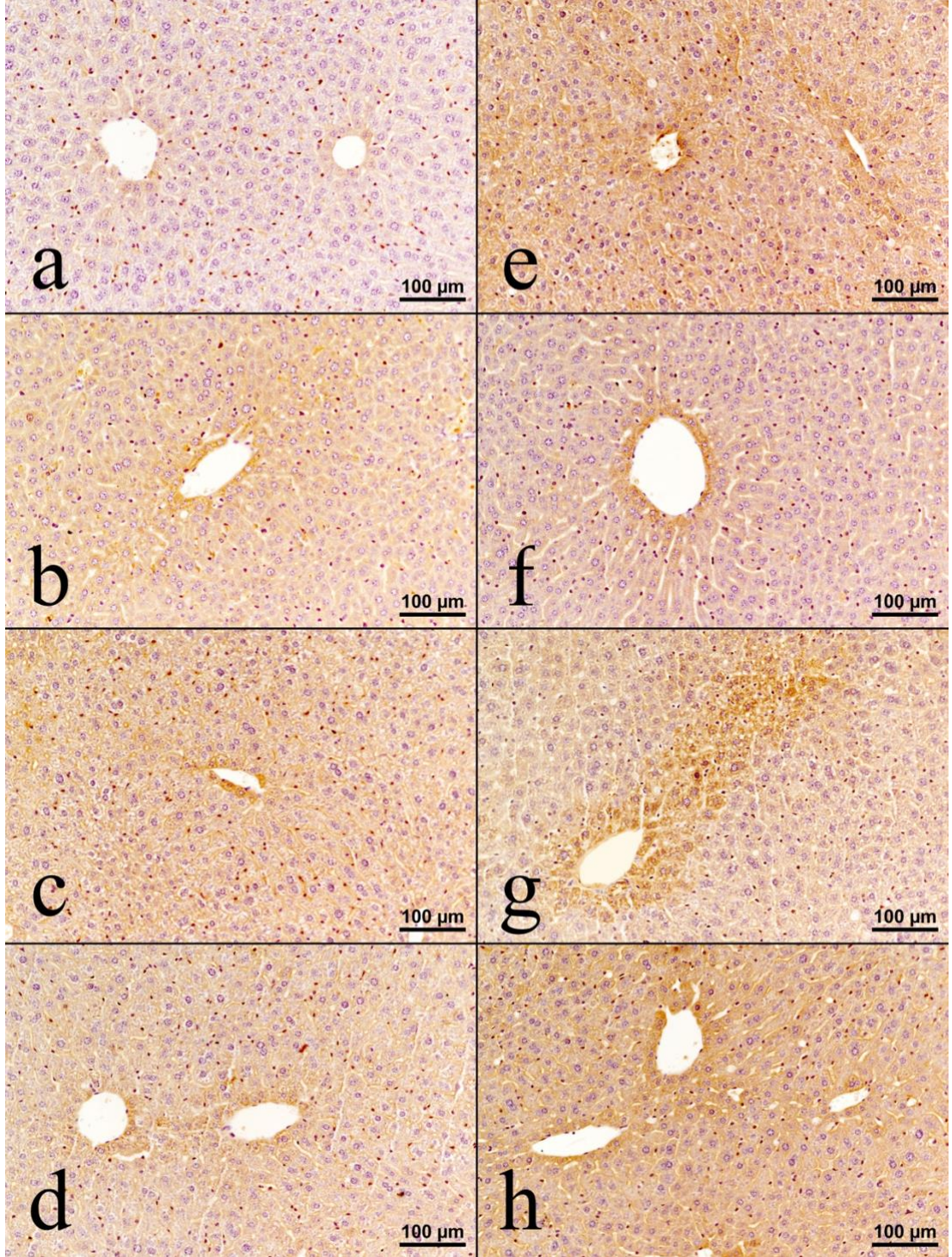
Şekil 4.29. Karaciğer dokusunda kaspaz 3 immunoreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPK grubu, **d.** NGF+p38MAPK grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPK grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPK grubu. Bakır uygulaması yapılan gruplardaki kaspaz 3 immunoreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunoreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte.

Bakır+NGF grubunda diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az kaspaz 3 immunoreaktivitesi dikkati çekmekte.

Dokulardaki IL-1 ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.30**'da sunuldu. Kontrol grubunda IL-1 immunoreaktivitesi sadece sentral vena çevresindeki hepatositlerde sitoplazmik olarak zayıf şiddette görüldü. NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarında IL-1 immunoreaktivitesi sentral vena çevresindeki hepatositlerde orta şiddete iken portal alana doğru giderek azalan şiddette olduğu tespit edildi. Bakır, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında IL-1 immunoreaksiyonu lobülün tamamında yoğun şekilde özellikle sentral ven çevresinden portal alana güçlüden zayıfa azalan şiddette tüm hepatositlerde sitoplazmik olarak gözlemlendi. Bakır+NGF grubunda IL-1 immunoreaksiyonu sadece sentral ven çevresindeki hepatositlerde orta şiddetteyken reaksiyon yoğunluğunun portal alana doğru azaldığı gözlemlendi (**Şekil 4.31**). Ayrıca tüm gruplardaki karaciğerlerde Kupffer hücrelerinde güçlü IL-1 immunoreaksiyonu tespit edildi.



Şekil 4.30. Karaciğer dokularında IL-1 immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi

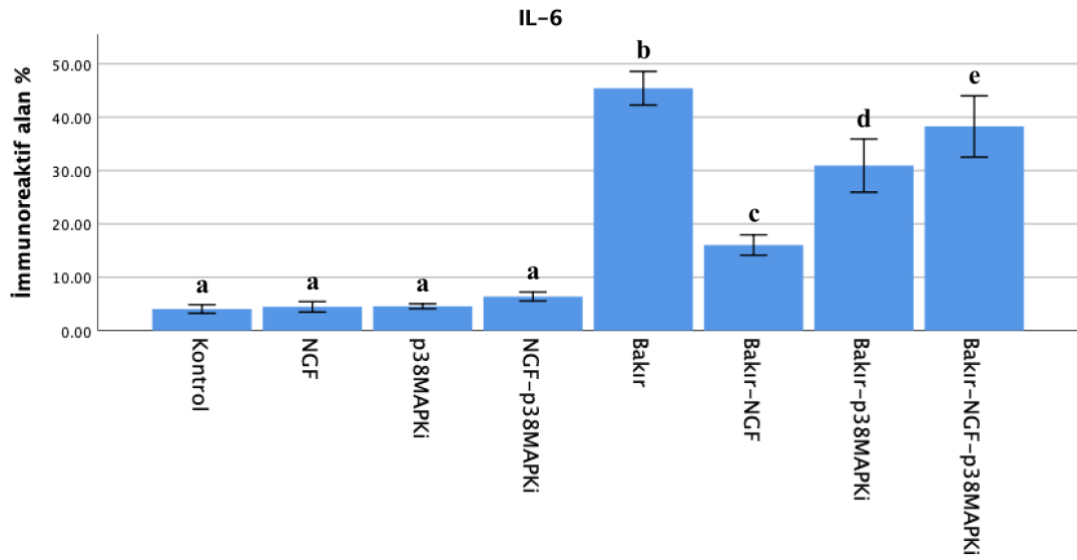


Şekil 4.31. Karaciğer dokusunda IL-1 immunoreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPKi grubu, **d.** NGF+p38MAPKi grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPKi grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPKi grubu.

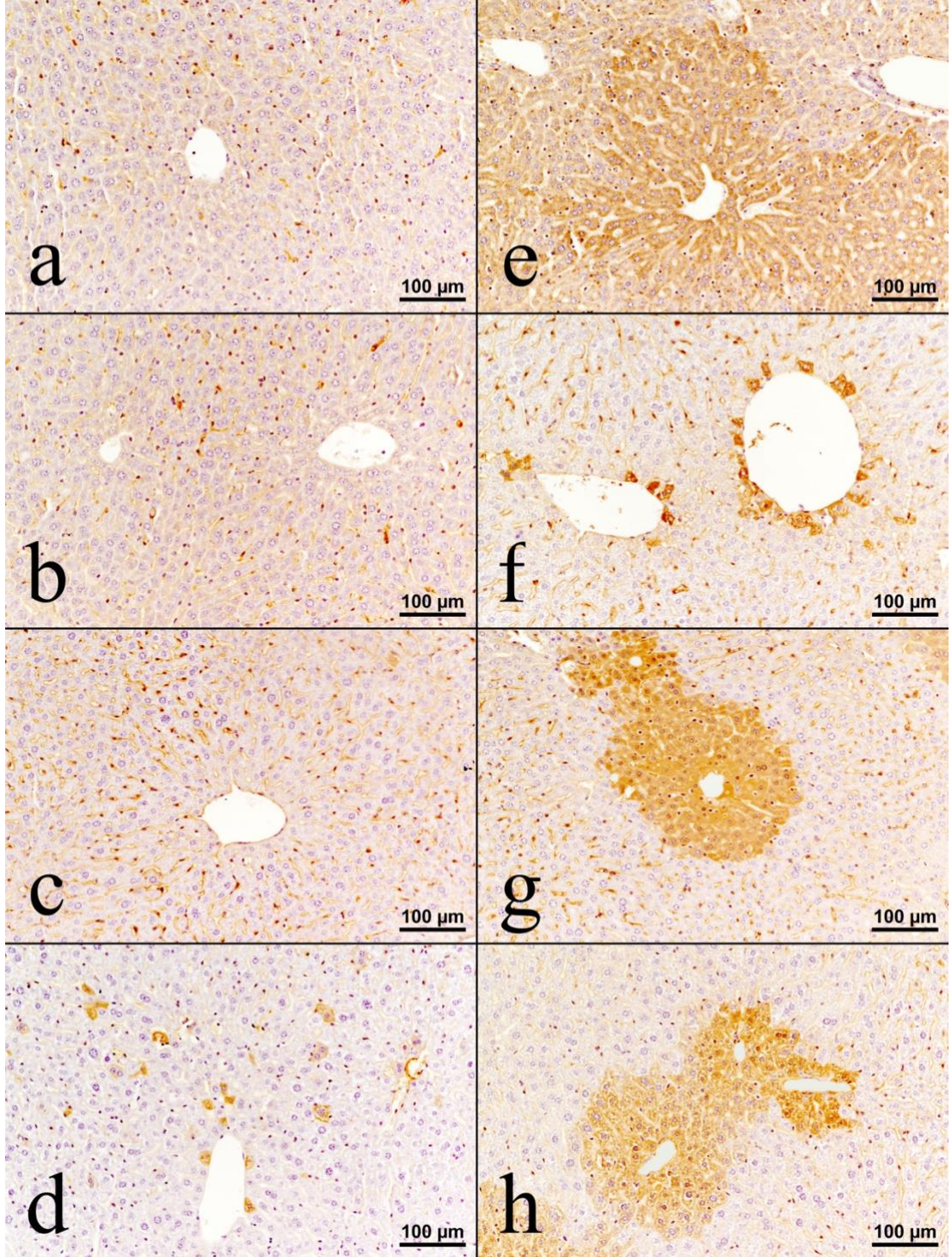
Bakır uygulaması yapılan gruplardaki IL-1 immunoreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunoreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte.

Bakır+NGF grubunda diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az IL-1 immunoreaktivitesi dikkati çekmekte.

Dokulardaki IL-6 ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.32**'de sunuldu. IL-6 immunoreaktivitesi Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarında lobül içerisinde rastgele dağılmış şekilde az sayıda hepatosit sitoplazmalarında pozitif olarak görüldü. Bakır, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında güçlü IL-6 immunoreaktivitesi sentral ven çevresindeki hepatositlerde sitoplazmik olarak yoğun ve şiddetli olarak tespit edildi. Bakır+NGF grubunda IL-6 immunoreaktivitesi sentral ven çevresindeki hepatositlerde intrasitoplazmik olarak gözlemlendi (**Şekil 4.33**). Ayrıca tüm gruplardaki karaciğerlerde Kupffer hücrelerinde güçlü IL-6 immunoreaksiyonu tespit edildi.

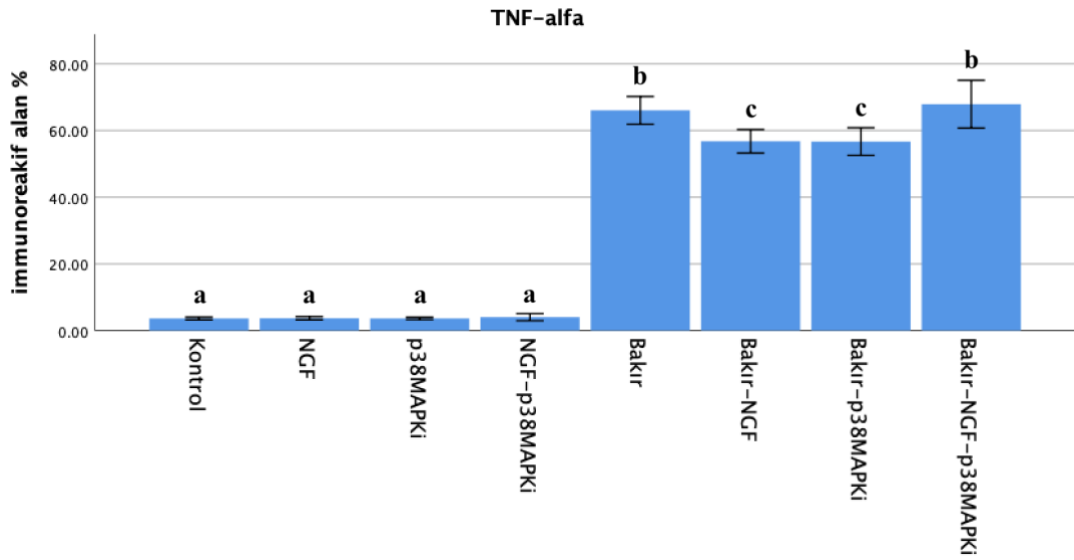


Şekil 4.32. Karaciğer dokularında IL-6 immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi

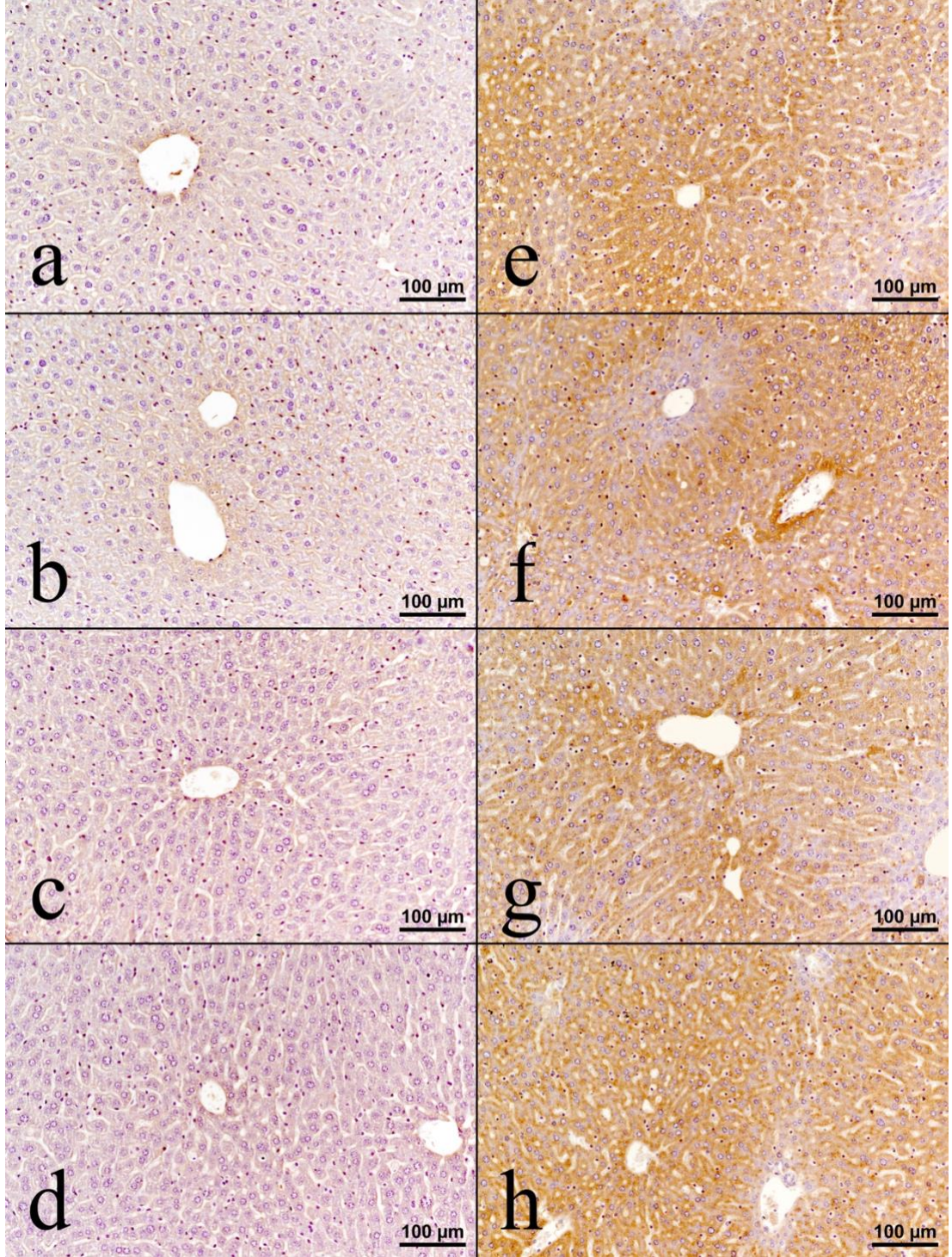


Şekil 4.33. Karaciğer dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPKi grubu, **d.** NGF+p38MAPKi grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPKi grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPKi grubu. Bakır uygulaması yapılan gruplardaki IL-6 immunoreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunoreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte. Bakır+NGF grubunda diğer Cu uygulanan gruplara göre daha az IL-6 immunoreaktivitesi dikkati çekmekte.

Dokulardaki TNF- α ekspresyonu için yapılan immunohistokimyasal analizin sonuçları **Şekil 4.34**'de sunuldu. Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarındaki TNF- α immunoreaktivitesi sentral ven çevresindeki hepatositlerde sitoplazmik olarak hafif şiddette gözlemlendi. Bakır, Bakır+NGF, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarında güçlü TNF- α immunoreaktivitesi sentral ven çevresindeki hepatositlerde sitoplazmik olarak yoğun ve şiddetli olarak tespit edildi. Bu gruplarda portal alana yakın hepatositlerde TNF- α immunoreaksiyonu görülmedi (**Şekil 4.35**). Ayrıca tüm gruplardaki karaciğerlerde Kupffer hücrelerinde güçlü TNF- α immunoreaksiyonu tespit edildi.



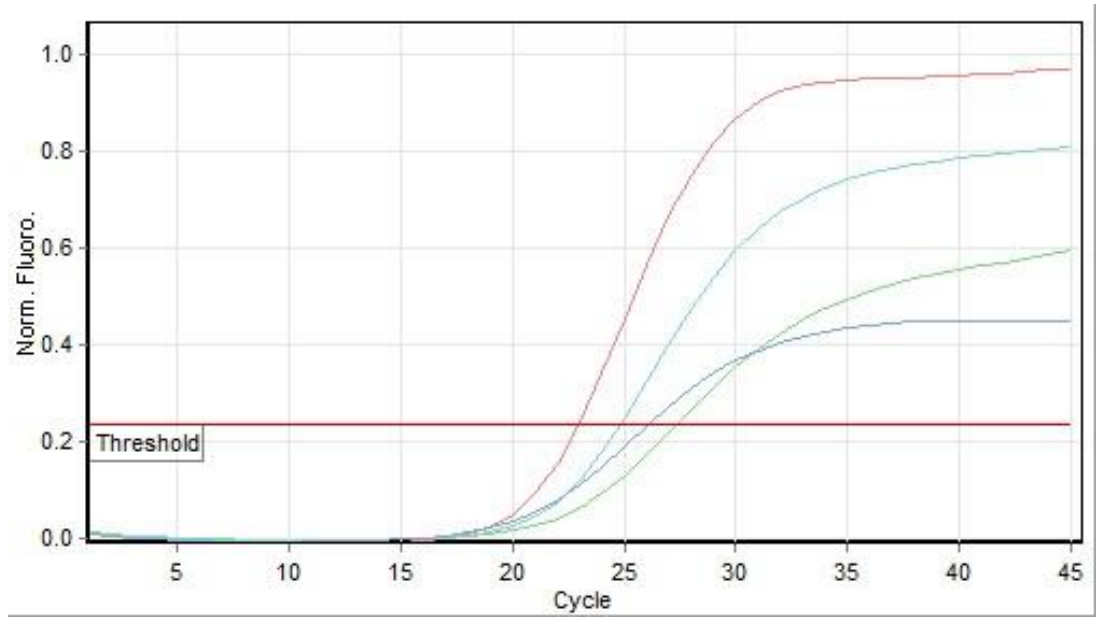
Şekil 4.34. Karaciğer dokularında TNF- α immunoreaktivitesinin gruplara göre grafiksel gösterimi



Şekil 4.35. Karaciğer dokusunda TNF- α immunreaktivitesi; **a.** Kontrol grubu, **b.** NGF grubu, **c.** p38MAPKi grubu, **d.** NGF+p38MAPKi grubu, **e.** Bakır grubu, **f.** Bakır+NGF grubu, **g.** Bakır+p38MAPKi grubu, **h.** Bakır+NGF+p38MAPKi grubu. Bakır uygulaması yapılan gruptaki TNF- α immunreaktivitesinin genel olarak uygulama yapılmayan gruplara oranla daha fazla olduğu ve bu immunreaktivitenin vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğu gözlemlenmekte.

4.1.4. *p38 MAPK* mRNA Ekspresyon Bulguları

Gerçek zamanlı termal döngü cihazında *p38 MAPK* ve β -*Aktin* genleri koşuldu (Şekil 4.36) ve *p38 MAPK*'ın ekspresyonundaki değişimler β -*Aktin* genine oranla "Komperatif $\Delta\Delta CT$ " yöntemi kullanılarak hesaplandı. Gruplara göre karaciğer *p38 MAPK* mRNA seviyelerinin oranları **Tablo 4.3** ve Şekil 4.37'de gösterildi.

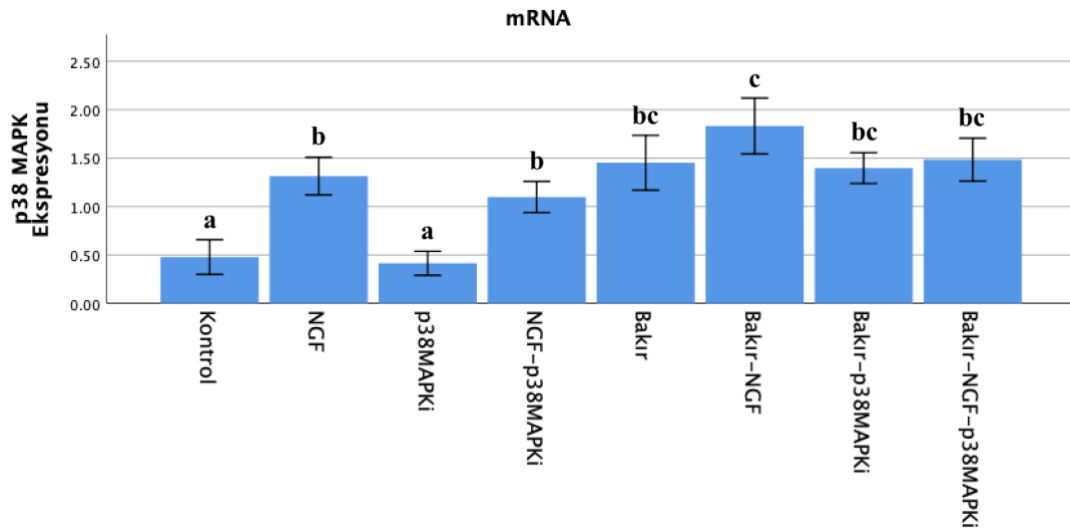


Şekil 4.36. mRNA'lardan elde edilen cDNA'larında *p38 MAPK* ve β -*Aktin* genlerinin çoğalma eğrisi.

Tablo 4.3. Gruplara göre karaciğerlerdeki *p38 MAPK* mRNA seviyelerinin oranı.

Grup	X±SE
Kontrol	0.47±0.08 ^a
NGF	1.31±0.09 ^b
p38MAPKi	0.41±0.06 ^a
NGF+p38MAPKi	1.09±0.08 ^b
Bakır	1.45±0.15 ^{bc}
Bakır+NGF	1.83±0.14 ^c
Bakır+p38MAPKi	1.39±0.07 ^{bc}
Bakır+NGF+p38MAPKi	1.48±0.11 ^{bc}

Veriler Ortalama±Standart hata (X±SE) olarak sunuldu ve One-way ANOVA ve post-hoc Tukey HSD ile karşılaştırıldı. Aynı sütundaki farklı üst simgeler gruplar arasındaki farkın anlamlı (p<0.05) olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.37. Gruplara göre *p38 MAPK* mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.

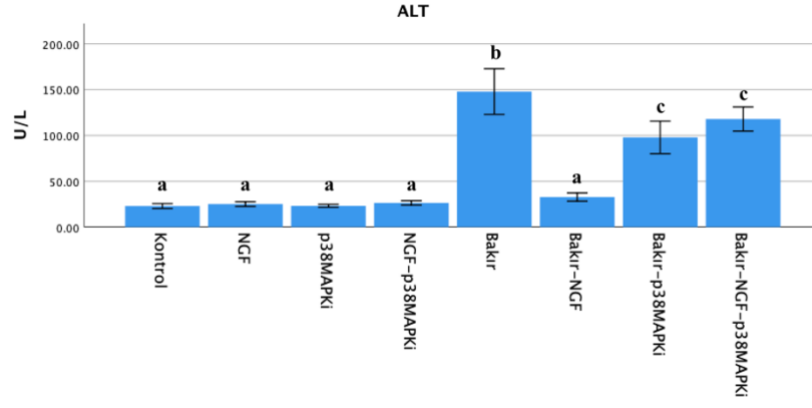
4.1.5. Biyokimyasal Bulgular

Bu çalışmada farelerin kan serumlarında ALT, AST ve GGT, karaciğer dokularında TOS ve TAS ile GSH ve MDA parametreleri biyokimyasal yöntemler kullanılarak araştırıldı. Parametrelere ait elde edilen veriler **Tablo 4.4**'de ve bu verilerin gruplara göre grafiksel gösterimi **Şekil 4.38 – 4.44**'de sunuldu.

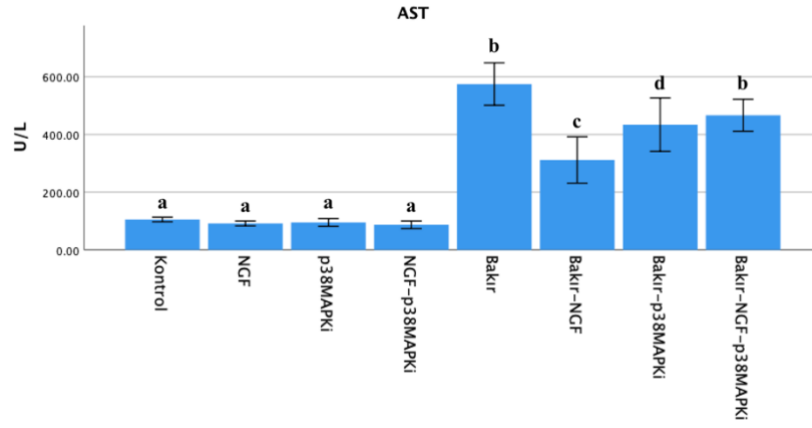
Tablo 4.4. Gruplara göre biyokimyasal analiz sonuçları ve istatistiksel değerleri.

Grup	ALT (U/L) X±SE	AST (U/L) X±SE	GGT (U/L) X±SE	TOS µmol/L X±SE	TAS µmol/L X±SE	GSH nmol/gr X±SE	MDA nmol/gr X±SE
Kontrol	23.00±1.33 ^a	105.13±3.96 ^a	1.57±0.21	37.79±0.81 ^a	10.97±0.24 ^a	2774.04±257.42 ^a	80.09±3.77 ^a
NGF	25.13±1.31 ^a	91.62±4.29 ^a	3.30±0.71	36.90±0.14 ^a	10.20±0.50 ^a	2823.94±267.04 ^a	80.04±5.70 ^a
P38MAPKi	23.13±0.81 ^a	95.00±6.69 ^a	2.93±0.74	37.31±1.76 ^a	11.41±0.37 ^a	3130.71±138.09 ^a	83.81±3.3 ^a
NGF+p38MAPKi	26.38±1.19 ^a	86.88±6.54 ^a	2.70±0.65	36.24±0.78 ^a	9.48±0.52 ^a	2978.40±55.05 ^a	85.33±3.44 ^a
Bakır	147.87±12.44 ^b	574.63±37.67 ^b	4.15±0.95	51.10±0.64 ^b	6.30±0.30 ^b	1324.17±87.24 ^b	158.87±11.94 ^b
Bakır+NGF	32.75±2.25 ^a	311.50±40.19 ^c	3.18±0.80	36.55±0.92 ^a	10.72±0.45 ^a	2197.32±218.84 ^a	106.06±3.46 ^{ac}
Bakır+p38MAPKi	97.88±8.87 ^c	434.00±46.34 ^d	4.47±0.92	39.84±0.55 ^a	4.40±0.62 ^b	1147.54±46.85 ^b	103.92±7.62 ^{ac}
Bakır+NGF+p38MAPKi	117.87±6.58 ^c	466.13±27.75 ^b	4.75±1.10	43.43±0.62 ^a	8.01±0.37 ^b	1646.63±120.22 ^b	126.26±10.62 ^c

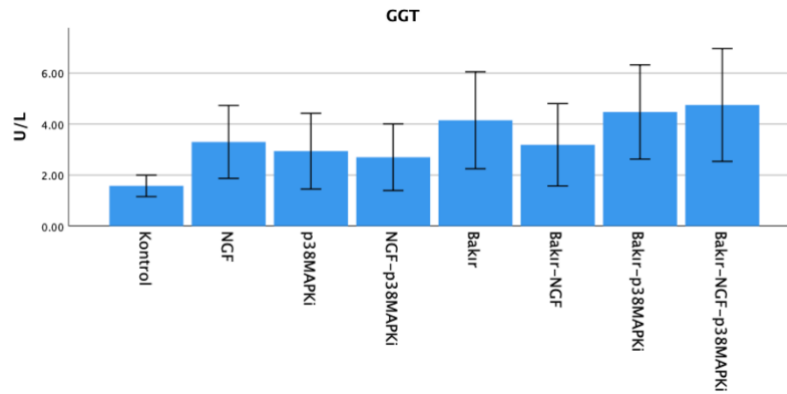
Veriler Ortalama±Standart hata (X±SE) olarak sunuldu ve One-way ANOVA ve post-hoc Tukey HSD ile karşılaştırıldı. Aynı sütundaki farklı üst simgeler gruplar arasındaki farkın ilgili parametre (ALT, AST, TOS, TAS, GSH ve MDA) için anlamlı (p<0.05) olduğunu göstermektedir.



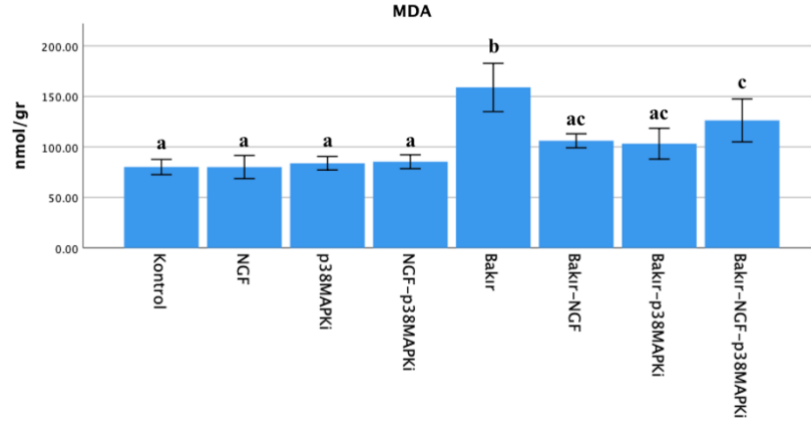
Şekil 4.38. Kan serum ALT seviyelerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



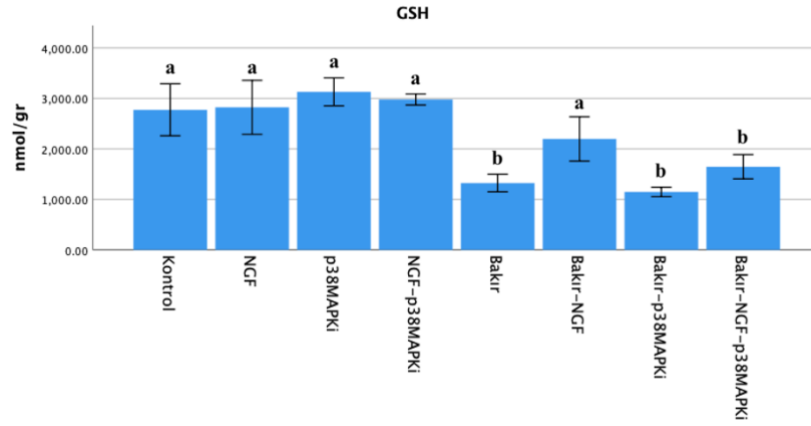
Şekil 4.39. Kan serum AST seviyelerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



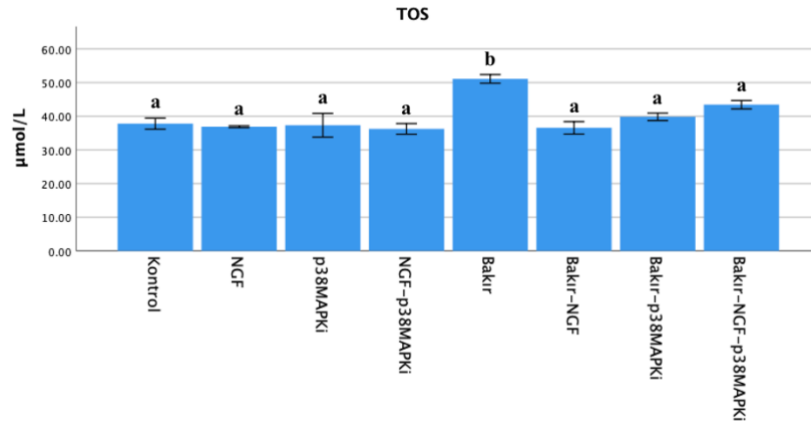
Şekil 4.40. Kan serum GGT seviyelerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



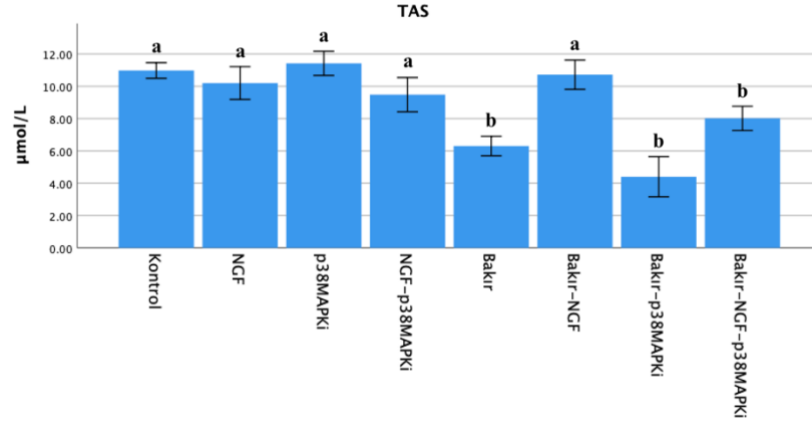
Şekil 4.41. Karaciğer dokularında MDA seviyelerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



Şekil 4.42. Karaciğer dokularında GSH seviyelerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



Şekil 4.43. Karaciğer dokularında TOS seviyelerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.



Şekil 4.44. Karaciğer dokularında TAS seviyelerinin gruplara göre grafiksel gösterimi.

5. TARTIŞMA

Temel bir mikro besin olan Cu, mitokondriyal solunum, antioksidan savunma ve protein sentezi gibi birçok biyolojik süreçte önemli katalitik kofaktör olarak işlev gören hayati bir elementtir (Chen vd. 2022; Gaetke vd. 2014). Ayrıca Cu, organizmanın canlılığını sürdürebilmesi için anjiyogenez, hipoksiye yanıt ve nöromodülasyon gibi hayati fonksiyonların düzenlenmesinde rol alır (Scheiber vd. 2013). Bakır, canlı organizmalar tarafından metabolik süreçlerle oluşturulmadığı için besinler aracılığıyla alınması gereken bir iz elementtir (Shanbhag vd. 2021).

Memelilerde Cu diyetle alınır ve bağırsak epitel hücrelerinden CTR1 tarafından hücre içine alındıktan sonra portal dolaşım yoluyla karaciğere gelir. Karaciğer vücuttaki ana Cu deposudur ve Cu'nun kan dolaşımı yoluyla periferik organlara dağıtılmasını veya safra yoluyla vücuttan atılmasını kontrol eder (Gaetke vd. 2014; Li, 2020). Portal yoldan albümin ve transkupreine bağlı olarak karaciğere gelen Cu, hepatosit hücre duvarında bulunan CTR1 tarafından hücre içine alınır. Hücre içine giren Cu, CCS tarafından SOD1 sentez yolağına, COX17 tarafından enerji üretimi için mitokondriyal membrana ve Atox1 tarafından Cu ile ilişkili enzimlerin sentezi için endoplazmik retikuluma taşınır (Shanbhag vd. 2021). Hepatosit sitoplazmasında Cu veziküllerin içerisinde depolanır ve organizmada diğer dokuların ihtiyacı olduğunda ATP7A tarafından dolaşıma verilerek ilgili dokunun Cu ihtiyacı karşılanır. Hücre içindeki Cu depolanamayacak kadar çok olduğunda ATP7B tarafından safra yoluyla organizmadan uzaklaştırılır (Li, 2020). Bakır bu yollar sayesinde hücre içerisinde belirli bir seviyede tutulur. Hücre içerisindeki serbest Cu miktarının artması oksidatif strese bağlı sitotoksisteye neden olur (Chen vd. 2022). Sitoplazmada serbest halde bulunan Cu redoks döngüsü sırasında açığa çıkan süperoksit ya da sitoplazmada bulunan GSH gibi indirgeyici moleküllerin varlığında Haber–Weiss reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksitten hidroksil radikallerinin oluşumunu katalizler (Gaetke ve Chow, 2003; Kadiiska ve Mason, 2002). Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde ortaya çıkması muhtemel en güçlü oksitleyici radikaldır. Bu radikal hücre

membranlarında lipit peroksidasyonuna, DNA'nın yapısında bulunan bazlara bağlanarak DNA zincirinin kırılmasına ve proteinlerdeki karbona bağlanarak proteinlerin modifikasyonuna neden olur (Nieves-Cordones vd. 2019).

Oksidatif strese uğrayan hücrelerde hücre içi sinyal yollarından MAPK'ler aktif hale gelir. MAPK ailesinin üyelerinden p38 MAPK ve JNK oksidatif stresle aktive olurlar. p38 MAPK aktivasyonu hasarlı protein, membran ve DNA'nın onarımını sağlayarak hücrelerin hayatta kalmasına yardımcı olur (Boilan vd. 2013; He vd. 2020). Ancak, p38 MAPK'nin aktive olması her zaman hücrenin kaderi için olumlu sonuçlanmayabilir, bazı durumlarda proapoptotik moleküllerin ekspresyonunu arttırarak hücrenin programlı bir şekilde ölmesine neden olabilir (Yue ve López, 2020). p38 MAPK oksidatif stresin dışında büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından da aktive edilir (Son vd. 2013; Zarubin ve Han, 2005). Büyüme faktörlerinden NGF, MAP3K seviyesinde TAK1 ve ASK1, MAP2K seviyesinde MKK3 ve MKK6 yoluyla üzerinden p38 MAPK'yi aktive eder (Dai vd. 2020; Takeda ve Ichijo, 2002). Karaciğer doku hasarında hepatositlerde NGF ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Tsai vd. 2014; Tsai vd. 2018). Hepatositlerde NGF ekspresyonunun p38 MAPK üzerinden hasarı arttırıcı mı yoksa azaltıcı mı etkisinin olduğu bilinmemektedir.

Bu çalışmada farelerde deneysel olarak oluşturulan Cu toksikasyonunda p38 MAPK inhibitörü (SB203580) kullanılarak NGF'nin p38 MAPK yoluyla üzerinden hasarı arttırıcı mı yoksa azaltıcı mı etkisinin olduğu histopatolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırıldı.

Bakır uygulamasına bağlı olarak hepatositlerde meydana gelen sitotoksitenin tespiti için kan serumlarında ALT, AST ve GGT biyokimyasal belirteçleri araştırıldı. Bakır grubuna ait ALT ve AST seviyelerinin Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarına göre istatistiksel olarak ($p < 0.05$) yüksek olduğu tespit edildi. Karaciğer enzimlerinden ALT ve AST, akut hepatosellüler hasarın şiddetinin, prognozunun ve tedaviye cevabın değerlendirilmesinde kullanılan en önemli belirteçlerdendir. Hepatositlerde membran geçirgenliği arttığında ya da nekroz şekillendiğinde sitoplazmada bulunan bu enzimler hücre dışına geçiş yaparlar ve kandaki miktarları artar (Kantar, 2017).

Çalışmamızda serum ALT ve AST oranları sadece bakır verilen deneklerde Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Bu bulgu farelerde (Liu vd. 2020a; Tian vd. 2015) ve sıçanlarda (Kumar vd. 2016) yapılan Cu karaciğer hasar modellerindeki değişimler ile uyumluydu. Mevcut çalışmanın ALT ve AST bulgularının benzer karaciğer hasar modeli kullanılan çalışmalarla uyumlu olması sunulan bu çalışmada karaciğer hasarının CuSO₄ kullanılarak başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, Bakır+NGF grubuna ait ALT ve AST oranları Bakır grubuna göre önemli oranda ($p<0.05$) düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum Cu'nun hepatositler üzerine olan olumsuz etkilerinin NGF tarafından başarılı bir şekilde azaltıldığını göstermektedir. Mevcut çalışmada Bakır+p38MAPKi grubuna ait ALT ve AST seviyelerinin Bakır grubuna göre önemli oranda ($p<0.05$) düşük olduğu tespit edildi. Deneysel olarak SB203580 ile p38 MAPK'nin inhibe edildiği karaciğer hasarı ve kanama modellerinde kan serum ALT ve AST seviyelerinin düştüğü bildirilmiştir (Chen vd. 2005; Zhao vd. 2011; Yu vd. 2013). Bu inhibitörün kullanımı mevcut çalışmada da ALT ve AST biyobelirteç seviyelerinde anlamlı düşüşe neden olmuştur. Bu durum p38 MAPK inhibisyonunun Cu'nun neden olduğu hepatotoksositeye karşı koruyucu olduğunu düşündürmektedir. Mevcut çalışmada ALT seviyesi incelendiğinde bakır ile birlikte NGF verildiğinde bu enzimin düzeyinin Kontrol grubu ile aynı seviyeye düştüğü dikkati çekti. ALT enziminin kaynağının temel olarak karaciğer olduğu dikkate alındığında eksojen olarak NGF uygulamasının Cu'nun hepatositler üzerine olan olumsuz etkilerine karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edildi. Ancak AST seviyesinin Bakır+NGF grubunda her ne kadar Bakır grubuna oranla seviyesi düşmüş olsada Kontrol grubu seviyesine indirmediği belirlendi. Bu durumun AST enziminin karaciğer haricinde böbrek, kalp ve beyin gibi dokulardan da kaynaklanabilmesine bağlanabilir. Bakır+NGF+p38MAPKi grubuna ait ALT ve AST seviyelerinin ise Bakır+NGF grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek olduğu görüldü. Sonuç olarak, NGF'nin farelerde Cu'nun karaciğer serum biyokimyasal belirteçleri üzerine olan olumsuz etkilerini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden başarılı bir şekilde azalttığı bu çalışma ile ortaya konuldu.

Sunulan bu çalışmada, GGT seviyesinin gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermediği ($p>0,05$) tespit edildi. Karaciğer dokusunda portal alana yakın hepatositlerin ve safra kanallarının etkilendiği durumlarda kan serum GGT seviyesinin arttığı bildirilmektedir (Desmen, 1995; Haijer vd. 2023). Mevcut çalışmada hasar

oluşturmak için kullanılan Cu'nun, özellikle vena sentralis ve çevresindeki hepatositlerde dejenerasyon ve nekrozlara neden olduğu tespit edildi. Bu nedenle gruplar arasındaki GGT seviyeleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması bu enzimin karaciğerdeki lokalizasyonu ile ilişkili olduğu şeklinde yorumlandı.

Bakır toksikasyonunun temel mekanizması hücre içerisindeki biyomoleküllerin yapısını veya işlevini değiştiren oksidatif stres hasarı ile ilişkilendirilmektedir (Gaetke vd. 2014). Oksidatif stres hücre ve organel membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olmaktadır. Bu durum lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır (Gaschler ve Stockwell, 2017). Lipit peroksidasyonunun son ürünü MDA'dır. Bu özelliğinden dolayı dokulardaki oksidatif stres kaynaklı doku hasarının belirlenmesi için araştırmalarda MDA seviyesi sıklıkla kullanılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Ozcelik vd. 2003). Sıçan ve farelerde yapılan birçok araştırmada Cu uygulanan gruplardaki MDA seviyesinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Kumar vd. 2016; Ohhira vd. 1995; Ozcelik vd. 2003; Tatum vd. 2000). Mevcut çalışmada Bakır grubundaki MDA oranının Kontrol, NGF, p38MAPK ve NGF+p38MAPK gruplarına göre anlamlı ($p < 0.05$) oranda yüksek olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada Cu uygulanan gruplarda MDA seviyesinin Cu uygulaması yapılmayan gruplara oranla yüksek olması hücre içindeki aşırı Cu'nun indüklediği reaktif türlerin lipit peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Bakır+NGF, Bakır+p38MAPK ve Bakır+NGF+p38MAPK gruplarındaki MDA oranı Bakır grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) oranda düşüktü. Bakır+NGF ve Bakır+p38MAPK gruplarındaki MDA oranlarının ise Kontrol grubu ile benzer seviyede olduğu görüldü. NGF ve SB203580'nin ayrı ayrı uygulandıklarında Cu ile oluşturulan hasarın seviyesini azaltarak Kontrol grubu ile benzer seviyeye çektiği ancak birlikte uygulandıklarında bu etkinin gerçekleşmediği bununla birlikte sadece Cu uygulanan gruptan anlamlı oranda daha az olduğu belirlendi. NGF ve inhibitörün ayrı ayrı verildiklerinde sadece Bakır verilen gruba göre MDA seviyesindeki düşme NGF'nin lipit peroksidasyonunu azaltıcı etkisini hem p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden hem de farklı bir sinyal yolağı üzerinden yaptığı şeklinde yorumlanabilir.

Canlı organizmalar antioksidan adı verilen enzim ve maddeler sayesinde oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türlerinin olası hasarına karşı kendilerini korurlar (Karabulut ve Gülay, 2016; Young ve Woodside, 2001). Bu antioksidanlardan biri de GSH'dır. Tüm memelilerde hücre içi bir antioksidan olan GSH, hücreyi endojen ve eksojen kaynaklı serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif strese karşı korumada görev yapar (Pei vd. 2013). Bu antioksidan Cu homeostazisi için oldukça önemlidir. Hücreler Cu'nun bir kısmını GSH ve MT'ye bağlayarak depolar. Bu yüzden hücrenin sahip olduğu GSH miktarı ne kadar fazla olursa Cu'nun neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı hücre o kadar dirençli olur (Chen vd. 2022; Li, 2020). Bakır ile oluşturulan çeşitli toksikasyon çalışmalarında GSH değerlerinin hasar gruplarında kontrol gruplarına oranla düşük olduğu bildirilmiştir (Kumar vd. 2016; Liu vd. 2020b; Ozcelik vd. 2003). Bu çalışmada, GSH miktarının Bakır grubunda Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) oranda düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca Bakır+NGF grubundaki GSH konstantrasyonunun Bakır, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek olduğu gözlemlendi. Bakır+NGF grubundaki GSH konstantrasyonunun Kontrol grubu ile aynı seviyede olduğu belirlendi. Cu'nun neden olduğu hücresel hasarın oksidatif stresten kaynaklandığı bildirilmiştir (Boilan vd. 2013; Liu vd. 2012; Ozcelik vd. 2003). Sunulan bu çalışmada da Cu'nun neden olduğu oksidatif strese karşı koyma çabası olarak GSH'nin seviyesinin düştüğü gözlemlendi. GSH miktarının Bakır+NGF grubunda Bakır+NGF+p38MAPKi grubundan anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek olması NGF'nin GSH üzerine olumlu etkilerini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden yaptığının göstergesi olarak yorumlandı.

Mevcut çalışmada karaciğer dokusundaki toplam oksidan ve antioksidan miktarlarını değerlendirmek için TOS ve TAS değerleri incelendi. Bakır grubunun TOS oranı Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) olarak yüksek, TAS oranı ise anlamlı ($p<0.05$) olarak düşük tespit edildi. Bu bulgu, Cu'nun hepatositler üzerine olan sitotoksik etkisinin oksidatif stresten kaynaklandığının net bir göstergesidir. Bakır+NGF grubuna ait TOS oranının Bakır grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak düşük, TAS oranının ise anlamlı ($p<0.05$) olarak yüksek olduğu görüldü. Ayrıca Bakır+NGF grubuna ait TAS oranı Bakır+NGF+p38MAPKi grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak yüksek iken bu gruplar arasındaki TOS oranı farkının anlamlı olmadığı ($p>0.05$) gözlemlendi. Bu durum

hepatositlerde Cu'nun neden olduğu oksidatif strese karşı NGF'nin koruyucu etkisini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden muhtemelen antioksidan sentezini arttırmak suretiyle yapabildiğı şeklinde yorumlandı.

Bakırın metabolizması gereğı toksikasyonunda en fazla etkilenen organ karaciğerdir. Farelere bakır sülfat 33 mg/kg dozda 7 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandığında hasar grubunda şiddetli hidropik dejenerasyon, nekroz ve Kupffer hücrelerinde proliferasyon şekillendiğı bildirilmektedir (Özen, 2007). Fareler üzerinde yürütölen bir çalışmada intramuskuler bakır asetat uygulamasının hasar gruplarında hidropik ve vakuoler dejenerasyonlar ile nekroza neden olduğı ortaya konulmuştur (Bulut, 2006). Farelerde yürütölen diğör çalışmalarda oral olarak bakır sülfatın dozu ve uygulama süresi arttıkça hepatositlerde dejenerasyon ve nekrozun şiddetinin arttığı bildirilmektedir (Liu vd. 2020a; Liu vd. 2020b). Sıçanlarda yürütölen çalışmalarda da hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve özellikle sentriloböler bölgede fokal nekroz bildirilmiştir (Kumar vd. 2016; Sakhaee vd. 2012). Yapılan bu çalışmada da Bakır grubundaki deneklerin karaciğerlerinde literatür bilgisi ile uyumlu olarak hepatositlerde şiddetli hidropik dejenerasyon ve nekroz tespit edildi. Meydana gelen patolojik değışikliklerin Cu uygulanan tüm gruplarda belirgin olarak sentriloböler bölgede (hepatik asinusun 3. bölgesi) daha şiddetli olduğı, portal alana doğru bu değışikliklerin göreceli olarak azaldığı dikkati çekti. Bakır grubundaki hasarın şiddetinin Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarına oranla anlamlı ($p<0.05$) seviyede yüksek olduğı belirlendi. Bakır+NGF grubunda dejenerasyon ve nekrozların Bakır grubuna göre daha az olduğı tespit edildi. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ayrıca Bakır+NGF+p38MAPKi grubundaki hasarın Bakır+NGF grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda daha şiddetli olduğı göröldü. Sunulan bu çalışma Cu'nun hepatositlerde neden olduğı hidropik dejenerasyon ve nekrozlara karşı NGF'nin koruyucu etkisini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden yaptığı tespit edildi.

Hepatositlerde oksidatif strese bağılı olarak insan (Tsai vd. 2018), sıçan (Tsai vd. 2014) ve farelerde (Ceccanti vd. 2016) NGF ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. NGF nöronların büyümesi, hayatta kalması ve korunmasında rol oynayan önemli bir büyüme faktörüdür. NGF'nin ayrıca karaciğerde çeşitli hasarlara bağılı olarak ekspresyonunda artış olduğı bildirilmiştir (Oakley vd. 2003; Valdovinos-Flores ve

Gonsebatt, 2013). Ancak NGF'nin hepatositler üzerindeki spesifik rolleri tam olarak bilinmemekte ve deneysel modele ve koşullara bağlı olarak ekspresyonunda değişmeler olduğu ifade edilmektedir. Örneğin farelerde yürütölen bir araştırmada butiyonin sülfoksimin, arsenik ve asetaminofenin neden olduğu oksidatif strese ve ksenobiyotik hasarına karşı NGF'nin karaciğerin korunmasında kritik bir rol oynadığı bildirilmektedir (Valdovinos-Flores ve Gonsebatt, 2013). Başka bir çalışmada insanlarda safra kesesi taşlarının neden olduğu oksidatif strese karşı hepatositlerden NGF eksprese edildiği ve bu molekülün hepatositleri sirtun 1 molekül yolağı üzerinden koruduğu bildirilmektedir (Tsai vd. 2018). Hepatositlerde CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında hepatositlerden NGF eksprese edildiği ve eksprese edilen NGF'nin karaciğer uydu hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonu sonucunda apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (Oakley vd. 2003). Mevcut çalışmada farelerde Cu ile oluşturulan karaciğer hasarında NGF ekspresyonu immunohistokimyasal olarak incelendi. Bakır grubundaki NGF immunoreaktif alanların yüzdesi Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarına göre anlamlı (p<0.05) oranda yüksek tespit edildi. Bakır grubunda NGF ekspresyonundaki artışın, oluşan oksidatif hasarı önlemeye yönelik bir hücre reaksiyonu olduğu düşünöldü. Bakır+NGF grubuna ait immunoreaktif alanların yüzdesi Bakır grubuna göre anlamlı (p<0.05) oranda düşöktü. Bu durum eksojen olarak uygulanan NGF'nin oksidatif stresi azaltmasına ve buna bağlı olarak hepatositlerden daha az miktarda NGF eksprese edilmesine neden olduğu şeklinde yorumlandı. Bakır+NGF+p38MAPKi grubuna ait immunoreaktif alanların yüzdesinin Bakır+NGF grubuna göre anlamlı (p<0.05) oranda yüksek olduğu tespit edildi. Bu durum NGF'nin hepatositleri oksidatif stresten p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden koruduğu şeklinde yorumlandı.

Mitojenle aktive olan kinaz ailesinin bir üyesi olan p38 MAPK oksidatif stres, büyüme faktörleri, sitokinler ve daha birçok uyarana yanıt olarak aktif hale gelir. Hücrede aktif p38 MAPK'ın bağlanabileceği yüzlerce substrat vardır (Cuadrado ve Nebreda, 2010). Bu substratlar hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalması, apoptoz, yangı, doku homeostazı gibi temel hücresel süreçlerde görev alan molekülüdür (Cuadrado ve Nebreda, 2010; Han vd. 2020). p38 MAPK substratları hakkındaki bilgilerin çoğu, SB203580 gibi kimyasal inhibitörlerin kullanıldığı araştırmalardan elde edilmektedir (Gao vd. 2016; Hsu vd. 2017; Zhang vd. 2002). Bir imidazol grubu türevi olan SB203580 ilk başlarda sitokin üretimini baskılayan bir

molekül olarak bilinirken daha sonra p38 MAPK'ı inhibe ettiği tespit edilmiştir (Canovas ve Nebreda, 2021; Lee vd. 1994).

Sunulan bu çalışmada p38 MAPK'ın mRNA ekspresyonu araştırıldı. Liu vd. tarafından farelerde Cu ile oluşturulan karaciğer hasarında p38 MAPK ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Liu vd. 2020a). Mevcut çalışmada da bu literatürle uyumlu olarak Bakır grubunda p38 MAPK ekspresyonunun Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) oranda yüksek olduğu tespit edildi. İki farklı *in vitro* çalışmada Cu'nun p38 MAPK'ı oksidatif stres üzerinden indüklediği bildirilmektedir (Boilan vd. 2013; He vd. 2020).

Bu çalışmada p38 MAPK ekspresyonu bakımından Kontrol ve p38MAPKi grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0,05$). Bu gruplara göre NGF ve NGF+p38MAPKi gruplarındaki p38 MAPK ekspresyonu anlamlı ($p < 0.05$) oranda yüksekti. Farklı hücrelerin NGF ile uyarımı sonucunda p38 MAPK ekspresyonlarını arttırdığı bir çok çalışmada bildirilmiştir (Cui vd. 2011; Ji vd. 2002; Mufti vd. 2014; Xing vd. 1998; Yung vd. 2008). Mevcut çalışmada Cu uygulanan gruplar arasında p38 MAPK ekspresyonu bakımından anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi. p38 MAPK inhibitörü olarak SB203580 uygulamasının p38 MAPK ekspresyonu üzerine tespit edilebilir seviyede bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Bu bulgular ışığında hem NGF hem de Cu'nun ayrı ayrı veya birlikte uygulamalarının p38 MAPK'ın ekspresyonunu Kontrol grubuna göre arttırdığı gözlemlendi. Bakır ile birlikte SB203580'nin uygulandığı deneklerde p38 MAPK ekspresyonunun Kontrol grubuna göre arttığı ancak sadece Cu uygulanan deneklerden anlamlı derece farklı olmadığı ($p > 0,05$) gözlemlendi. Benzer olarak Bakır+NGF+p38MAPKi ile Bakır+NGF grupları arasında p38 MAPK ekspresyonları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) görüldü. SB203580'in p38 MAPK'ı inhibisyonu, bu molekülün ekspresyonu üzerine etki etmesinden dolayı değil daha ziyadesiyle p38 MAPK'a bağlanarak substratlarının fonksiyonlarını bloke ederek gerçekleştirdiği ifade edilmektedir (Lee vd. 2000; Yong vd. 2009). Bu durum SB203580'nin p38 MAPK mRNA ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığı şeklinde yorumlandı.

Bakır toksikasyonunun neden olduğu oksidatif stresin hücrede p38 MAPK ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Mattie vd. 2008). Oksidatif stres aracılığı ile

aktif hale gelen p38 MAPK, aşağı akışında Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B) üzerinden sitokinlerin ekspresyonlarını düzenlemektedir (Benedetti vd. 2014; Didonato vd. 2012; Qiao ve May, 2009). Farelerde Cu ile oluşturulan karaciğer hasarında NF- κ B'nin IL-1, IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarını indüklediği bildirilmiştir (Patwa ve Flora, 2020). Sunulan bu çalışmada da literatür bilgisi ile uyumlu olarak Bakır grubuna ait IL-1, IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarının Kontrol, NGF, p38MAPKi ve NGF+p38MAPKi gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek olduğu görüldü. Bakır+NGF grubuna ait IL-1, IL-6 ve TNF- α ekspresyonları ise Bakır grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda düşük tespit edildi. NGF'nin antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Minnone vd. 2017). Sunulan bu çalışmada Cu ile birlikte NGF uygulanan deneklerde IL-1, IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarının sadece Cu uygulananlara göre düşük seviyede olması NGF'nin antiinflamatuvar etkisini gösterdiği şeklinde yorumlandı. Bir p38 MAPK inhibitörü olan SB203580'nin aynı zamanda proinflamatuvar sitokinler için de inhibitör etkisi vardır. p38 MAPK'ın inhibe edilmesinin çeşitli toksikasyon modellerinde IL-1, IL-6 ve TNF- α 'nın ekspresyonlarının azalmasına neden olduğu bildirilmektedir (Hsu vd. 2017; Sreekanth vd. 2016). Mevcut çalışmada da literatür bilgisi ile uyumlu olarak Bakır+p38MAPKi grubundaki IL-1, IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarının Bakır grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda düşük olduğu gözlemlendi. Bakır+NGF grubundaki IL-1, IL-6 ve TNF- α ekspresyonlarının Bakır+NGF+p38MAPKi grubuna göre anlamlı oranda düşük olduğu görüldü. Bu veri NGF'nin antiinflamatuvar etkisini p38 MAPK yolağı üzerinden yaptığı şeklinde yorumlandı.

Endojen ve eksojen uyaranlara karşı aktif hale gelen p38 MAPK, NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri üzerinden NO sentezini indükleyerek yangı ve bağışıklık yanıtlarının oluşturulmasında rol oynar (Schieven 2005; Wagner ve Nebreda, 2009). Enfeksiyonlarda yangı hücreleri başta olmak üzere pek çok hücre iNOS sentezler. Bu enzime bağlı olarak sentezlenen NO damarlarda permeabilite artışına ve yangı hücrelerinin proliferasyonuna neden olmaktadır (Delker vd. 2010; Luo vd. 2017; Nader vd. 2014). Bu özelliklerinden dolayı dokularda iNOS'un miktarının artışı esas olarak yangısal bir cevap olarak kabul edilir (Tian vd. 2016). iNOS'a bağlı olarak aşırı miktarda NO sentezi nitrozatif strese neden olmaktadır (Aladağ vd. 2000). Nitrozatif stres, NO ile süperoksitin birleşmesi ile oluşan peroksinitrit oluşumu ile gerçekleşir.

Peroksinitrit ROT gibi hücre için hayati görev ve fonksiyonları olan biyolojik yapılara bağlanarak hücrenin ölmesine neden olabilir (Ridnour vd. 2004). NO'in neden olduğu nitrozatif stres belirteci olarak iNOS ekspresyonu kullanılmaktadır (Bandoowala ve Sengupta, 2020; Özen vd. 2014; Thomson, 2015). Bakır toksikasyonunda fare karaciğerinde iNOS ekspresyonunun arttırdığı bildirilmektedir (Liu vd. 2020a). Sunulan bu çalışmada da Cu'ın neden olduğu nitrozatif stres iNOS üzerinden immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Bakır uygulanan gruplardaki iNOS ekspresyonu Cu uygulaması yapılmayan gruplara göre anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek tespit edildi. Bakır+NGF grubundaki iNOS ekspresyonu Bakır grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda düşüktü. Bu durum Cu'ın hepatositler üzerindeki zararlı etkisini ROT ile birlikte RNT tarafından da yaptığını göstermektedir. Bakır+p38MAPKi grubundaki iNOS ekspresyonunun Bakır grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda düşük olduğu görüldü. Farklı karaciğer hasar modeli kullanılan araştırmalarda da mevcut çalışma ile uyumlu olarak p38 MAPK inhibitörü olan SB203580 uygulanmasının iNOS ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Hsu vd. 2017; Wu ve Cederbaum, 2003). Sunulan çalışmada Bakır+NGF+p38MAPKi grubundaki iNOS immunoreaktivitesinin Bakır+NGF grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek olduğu görüldü. Bu veri NGF'nin RNT tarafından oluşturulan zararlı etkilere karşı hepatositleri p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden koruduğunu göstermektedir.

Dokularda sentezlenen NO'in bir kısmı hücre sitoplazmasında bulunan tirozin amino asidi ile birleşerek nitrotirozin adı verilen bileşiği oluşturur. Bu molekül toksikasyon çalışmalarında sıklıkla ROT ve RNT'nin dokular üzerindeki etkisini araştırmak için kullanılır (Bandoowala ve Sengupta, 2020; Özen vd. 2014; Thomson 2015). Bu çalışmada Bakır uygulanan gruplardaki nitrotirozin seviyesi Cu uygulaması yapılmayan gruplara göre anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek tespit edildi. Bu bulgu Cu tarafından oluşturulan hepatosit hasarında iNOS tarafından indüklenen NO'in aşırı miktarda nitrotirozin oluşturduğunun göstergesidir. Bakır+NGF ve Bakır+p38MAPKi gruplarındaki nitrotirozin seviyesinin Bakır grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda düşük olduğu görüldü. Bu durum hem NGF hem de SB203580'nin iNOS'u inhibe ederek NO sentezini azaltmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlandı. Bakır+NGF+p38MAPKi grubundaki nitrotirozin seviyesinin Bakır+NGF grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) oranda yüksek olduğu görüldü. Nitrotirozin ve iNOS bulguları birlikte değerlendirildiğinde iNOS aracılığı ile sentezlenen NO'in nitrozatif hasara

neden olduğu ve Cu'ın neden olduğu bu hasarın NGF ile başarılı bir şekilde p38MAPK yoluyla üzerinden önlendiğini gösterdi.

Bakırın neden olduğu oksidatif stresin hücrelerde apoptoza neden olabildiği bildirilmiştir (Jian vd. 2020). Apoptoz kaspaz adı verilen proteaz ailesinin üyesi enzimler tarafından yönetilir. Kaspazlar “başlatıcı” ve “effektör” olarak sınıflandırılırlar (Boatright ve Salvesen, 2003). Başlatıcı kaspazlar apoptozun başlatılmasında birinci aşamada yer alırlar. Dış etkenlere yanıt olarak aktive olurlar ve ardından effektör kaspazları aktive eder (Mandal vd. 2020; Tummers ve Green, 2017). Effektör kaspazlar ise hücrenin apoptotik sürecinin ilerlemesinde ve hücrenin ölümünün gerçekleşmesinde önemli bir rol oynarlar. Effektör kaspazlar hücre zarının parçalanması ve hücre içeriklerinin boşaltılması gibi apoptozun karakteristik özelliklerini gerçekleştirirler (Choudhary vd. 2015; Eskandari ve Eaves, 2022). Bakır ile oluşturulan karaciğer hasarında kaspaz 8 ve kaspaz 3 ekspresyonlarının kontrol gruplarına göre arttığı bildirilmiştir (Liu vd. 2020b). Cu'ın karaciğerden farklı hücre ve dokularda da kaspaz 8 ve kaspaz 3 ekspresyonlarını arttırdığı bildirilmektedir (Al-Musawi vd. 2022; Santos vd. 2016; Zhong vd. 2014). Bu çalışmada kaspaz 8 ve kaspaz 3 immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Bakır uygulanan gruplardaki kaspaz 8 ve kaspaz 3 ekspresyonu Cu uygulaması yapılmayan gruplara göre literatür bilgisi ile uyumlu olarak anlamlı ($p < 0.05$) oranda yüksek tespit edildi. Bakır+NGF grubundaki kaspaz 8 ve kaspaz 3 ekspresyonunun Bakır grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) oranda düşük olduğu görüldü. Bu durumun NGF'nin oksidatif stresi azaltmasına bağlı olarak şekillendiği düşünüldü. Ayrıca karaciğerden farklı doku ve hücrelerde etkisinin araştırıldığı çalışmalarda NGF'nin mezenkimal kök hücrelerinde (Bai vd. 2020), serebral nöronlarda (Liu vd. 2020c), nöroblastomlarda (Su vd. 2019) ve kemik iliği kök hücrelerinde (Wang vd. 2019) antiapoptotik moleküllerin ekspresyonlarını arttırarak apoptoza karşı daha dirençli olmalarını sağladığı bildirilmektedir. Bu literatür bilgileri ışığında mevcut çalışmada da NGF'nin hepatositlerde antiapoptotik moleküllerin ekspresyonlarını arttırarak bu hücreleri apoptoza karşı korumuş olabileceği düşünüldü.

Sunulan bu çalışmada, Bakır, Bakır+p38MAPKi ve Bakır+NGF+p38MAPKi grupları arasındaki kaspaz 8 ve kaspaz 3 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). p38 MAPK inhibitörü olarak kullanılan SB203580'nin *Dengue*

virüsü enfeksiyonunda ve taurourodekseoksikolik asit sitotoksitesinde hepatositlerde kaspaz 8 ve kaspaz 3'ün ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Schoemaker vd. 2004; Sreekanth vd. 2016). Ayrıca farelerde oluşturulan kronik Cu toksikasyonunda SB203580 uygulamasının karaciğer dokusunda kaspaz 3'ün ekspresyonunu azalttığı bildirilmektedir (Patwa ve Flora, 2020). Mevcut çalışmada, Bakır+p38MAPKi grubundaki kaspaz 8 ($22,03 \pm 1,18$) ve kaspaz 3 ($18,17 \pm 1,20$) ekspresyonları oranı Bakır grubunun kaspaz 8 ($23,66 \pm 1,62$) ve kaspaz 3 ($20,66 \pm 1,13$) ekspresyonları oranına göre düşük olmasına rağmen bu iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Bu çalışmada sadece Cu uygulanan deneklerde kaspaz 8 ve kaspaz 3 ekspresyonu artarken Cu ile birlikte NGF uygulandığında ise bu moleküllerin ekspresyonlarında anlamlı ($p < 0.05$) oranda bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir. Bakır+NGF grubundaki kaspaz 8 ve kaspaz 3 ekspresyonlarının Bakır+NGF+p38MAPKi grubuna göre anlamlı ($p < 0.05$) oranda düşük olduğu görüldü. Bu bulgular Cu toksikasyonunda NGF'nin hepatositler üzerindeki antiapoptik etkisini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden yaptığının göstergesidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, farelerde CuSO₄ ile oluşturulan deneysel karaciğer hasarında NGF'nin doku hasarı üzerine etkileri p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden histopatolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırıldı.

Bakır grubundaki farelere 3 gün boyunca 20 mg/kg CuSO₄'ın intraperitoneal olarak uygulanmasının doku hasarının biyobelirteçleri olan ALT, AST, MDA, TOS, iNOS ve nitrotirozin seviyelerinde artışa, GSH ve TAS seviyelerinde ise azalmaya neden olması mevcut çalışmada karaciğerde doku hasarına neden olduğunun göstergesidir. Bakır ile eş zamanlı olarak 10 µg/kg NGF'nin intraperitoneal olarak uygulanmasının bu belirteçlerde hücre homeostazisine yönelik anlamlı değişikliklere neden olduğu tespit edildi. Bu deneklerde eksojen NGF uygulanmasının hepatositlerde proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6 ve TNF-α) ekspresyonlarını sadece Cu uygulanan deneklere göre anlamlı derecede azalttığı da gözlemlendi. Çalışmada p38 MAPK inhibitörü olan SB203580'nin 20 mg/kg dozda Cu ve NGF ile birlikte uygulandığında ise NGF'nin göstermiş olduğu iyileştirici etkiyi azalttığı belirlendi.

Bakırın karaciğerde hidropik dejenerasyon, fokal nekroz ve apoptoza neden olduğu gözlemlendi. Bakır ile eş zamanlı olarak eksojen NGF uygulanan deneklerde oluşan bu histopatolojik değişikliklerin şiddet ve seviyelerinin anlamlı derecelerde azaldığı tespit edildi. Bakır ile NGF'nin birlikte uygulandığı deneklerde Bakır ve NGF ile birlikte SB203580 verilen gruba göre apoptozda (kaspaz 8 ve kaspaz 3) belirgin bir azalışın olduğu tespit edildi. Bu bulgular Cu'nin neden olduğu hasarda NGF'nin hepatositleri apoptozdan koruyucu etkisini p38 MAPK sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini gösterdi.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde Cu ile oluşturulan karaciğer doku hasarında p38 MAPK sinyal yolağının rol oynadığı, NGF uygulamasının bu yolak üzerinden etki göstererek toksisite etkisini azalttığı tespit edildi. Hüresel hasar ve onarım mekanizmalarında NGF'nin yolaklarına dair bazı kavramlar her ne kadar

biliniyor olsa da bu mekanizmaların hücre içi hangi sinyal yollarını etkilediği henüz net olarak bilinmemektedir. Bu nedenle bu sinyal yollarına dair daha kapsamlı ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Aarão, T. L. S., Jorge R. S., Aline S. C. F., Luiz F. M. F., & Juarez A. S. Q. (2018). Nerve Growth Factor and Pathogenesis of Leprosy: Review and Update. *Frontiers in Immunology* 9(MAY). doi: 10.3389/FIMMU.2018.00939.
- Aggett, P. J. (1999). An overview of the metabolism of copper. *European Journal of Medical Research* 4(6), 214–16.
- Al-Musawi, M., Al-Shmgani, H., & Al-Bairuty, G. A. (2022). Histopathological and biochemical comparative study of copper oxide nanoparticles and copper sulphate toxicity in male albino mice reproductive system. *International Journal of Biomaterials*, 2022. doi: 10.1155/2022/4877637.
- Aladağ, M. A., Türköz, Y., & Özerol, İ. H. (2000). Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri.
- Alastra, G., Aloe, L., Baldassarro, V. A., Calzà, L., Cescatti, M., Duskey, J. T., ... & Tosi, G. (2021). Nerve growth factor biodelivery: a limiting step in moving toward extensive clinical application?. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 1–17. doi: 10.3389/fnins.2021.695592.
- Alman, B., Antezena D., Chiger A., Hall S., Lynch M., & Diskin K. (2022). Toxicological profile for copper. *Public Health* (April), 314.
- Aloe, L., Rocco, M. L., Bianchi, P., & Manni, L. (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1-15. doi: 10.1186/1479-5876-10-239.
- Ambrosino, C., Mace, G., Galban, S., Fritsch, C., Vintersten, K., Black, E., ... & Nebreda, A. R. (2003). Negative feedback regulation of MKK6 mRNA stability by p38 α mitogen-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 370-381. doi: 10.1128/mcb.23.1.370-381.2003.
- Arriazu, E., Vicente, C., Pippa, R., Peris, I., Martínez-Balsalobre, E., García-Ramírez, P., ... & Otero, M. D. (2020). A new regulatory mechanism of protein phosphatase 2A activity via SET in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, 10(1), 3. doi: 10.1038/s41408-019-0270-0.
- Arthur, J., Simon C., & Ley S. C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2013 13:9 13(9), 679–92. doi: 10.1038/nri3495.
- Aslan, R., Kutlu, R., Civi, S., & Tasyurek, E. (2014). The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clinical Biochemistry*, 47(6), 393-397. doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.10.002.
- Bai, Q., Zou, M., Zhang, J., Tian, Y., Wu, F., Gao, B., & Piao, F. (2020). NGF mediates protection of mesenchymal stem cells-conditioned medium against 2, 5-hexanedione-induced apoptosis of VSC4. 1 cells via Akt/Bad pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 469, 53-64. doi: 10.1007/S11010-020-03727-5/FIGURES/5.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Hadjiloi, T., Martinelli, M., & Palumaa, P. (2008). Mitochondrial copper (I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 6803-6808. doi: 10.1073/PNAS.0800019105/SUPPL_FILE/0800019105SI.PDF.
- Bandookwala, M., & Sengupta, P. (2020). 3-Nitrotyrosine: A versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience*, 130(10), 1047-1062. doi: 10.1080/00207454.2020.1713776.
- Barber, R. G., Grenier Z. A., & Burkhead J. L. (2021). “Copper toxicity is not just oxidative damage: Zinc systems and insight from wilson disease”. *Biomedicines* 9(3). doi: 10.3390/biomedicines9030316.
- Barceloux, D. G. (1999). “Copper”. *Journal of toxicology. Clinical Toxicology* 37(2):217–30. doi: 10.1081/CLT-100102421.

- Beardmore, V. A., Hinton, H. J., Eftychi, C., Apostolaki, M., Armaka, M., Darragh, J., ... & Arthur, J. S. C. (2005). Generation and characterization of p38 β (MAPK11) gene-targeted mice. *Molecular and Cellular Biology*, 25(23), 10454-10464. doi: 10.1128/MCB.25.23.10454-10464.2005.
- Benedetti, F., Davinelli, S., Krishnan, S., Gallo, R. C., Scapagnini, G., Zella, D., & Curreli, S. (2014). Sulfur compounds block MCP-1 production by Mycoplasma fermentans-infected macrophages through NF- κ B inhibition. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1-11. doi: 10.1186/1479-5876-12-145/FIGURES/6.
- Boal, A. K., & Rosenzweig, A. C. (2009). Structural biology of copper trafficking. *Chemical Reviews*, 109(10), 4760-4779. doi: 10.1021/CR900104Z/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2009-00104Z_0001.GIF.
- Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 15(6), 725–31. doi: 10.1016/j.ceb.2003.10.009.
- Boilan, E., Winant, V., Dumortier, E., Piret, J. P., Bonfitto, F., Osiewicz, H. D., ... & Toussaint, O. (2013). Role of p38MAPK and oxidative stress in copper-induced senescence. *Age*, 35, 2255-2271. doi: 10.1007/s11357-013-9521-3.
- Borobia, M., Villanueva-Saz, S., Ruiz de Arcaute, M., Fernández, A., Verde, M. T., González, J. M., ... & Ortín, A. (2022). Copper poisoning, a deadly hazard for sheep. *Animals*, 12(18), doi: 10.3390/ani12182388.
- Bouhaddou, M., Memon, D., Meyer, B., White, K. M., Rezelj, V. V., Marrero, M. C., ... & Krogan, N. J. (2020). The global phosphorylation landscape of SARS-CoV-2 infection. *Cell*, 182(3), 685-712. doi: 10.1016/J.CELL.2020.06.034.
- Boyd, S. D., Ullrich, M. S., Skopp, A., & Winkler, D. D. (2020). Copper sources for Sod1 activation. *Antioxidants*, 9(6), 500. doi: 10.3390/ANTIOX9060500.
- Bulut, M. (2006). Erişkin Fare Karaciğeri Üzerine Bakır Asetatın Histopatolojik Etkisinin Araştırılması. [Yayımlanmamış Yüksek Linsan Tezi]. Kafkas Üniversitesi.
- Cakir, M., Erduran, E., Turkmen, E. S., Aliyazicioglu, Y., Reis, G. P., Cobanoglu, U., & Demir, S. (2015). Hepcidin levels in children with chronic liver disease. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 21(5), 300. doi: 10.4103/1319-3767.166205.
- Canovas, B., & Nebreda, A. R. (2021). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(5), 346-366. doi: 10.1038/s41580-020-00322-w.
- CCOHS. (2022). *CCOHS: RTECS® (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)*.
- Ceccanti, M., Coccorello, R., Carito, V., Ciafrè, S., Ferraguti, G., Giacobozzo, G., ... & Fiore, M. (2016). Paternal alcohol exposure in mice alters brain NGF and BDNF and increases ethanol-elicited preference in male offspring. *Addiction Biology*, 21(4), 776-787. doi: 10.1111/ADB.12255.
- Chen, L., Min, J., & Wang, F. (2022). Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 378. doi: 10.1038/s41392-022-01229-y.
- Chen, X. L., Xia, Z. F., Wei, D., Ben, D. F., Wang, Y. J., Wang, C. R., & Deng, N. Q. (2005). The modulating role of p38 mitogen-activated protein kinase in the expression of tumor necrosis factor- α in hepatic cells and its role in hepatic injury in severely burned rats. *Zhonghua Shao Shang za zhi= Zhonghua Shaoshang Zazhi= Chinese Journal of Burns*, 21(6), 418-421. doi: 10.1007/S11706-021-0540-1.
- Cheng, Y., Sun, F., Wang, L., Gao, M., Xie, Y., Sun, Y., ... & Cao, Z. (2020). Virus-induced p38 MAPK activation facilitates viral infection. *Theranostics*, 10(26), 12223. doi: 10.7150/thno.50992.
- Cherla, R., Zhang Y., Ledbetter L., & Zhang G. (2018). Coxiella burnetii inhibits neutrophil apoptosis by exploiting survival pathways and antiapoptotic protein Mcl-1. *Infection and Immunity* 86(4). doi: 10.1128/IAI.00504-17/SUPPL_FILE/ZII999092336S1.PDF.

- Choudhary, G. S., Al-Harbi, S., & Almasan, A. (2015). Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols*, 1-9. doi: 10.1007/978-1-4939-1661-0_1.
- Cigremis, Y., Turel, H., Adiguzel, K., Akgoz, M., Kart, A., Karaman, M., & 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, 31-38. doi: 10.1007/S11010-008-9961-8/FIGURES/5.
- Clarkson, A. H., Paine, S., Martín-Tereso, J., & Kendall, N. R. (2020). Copper physiology in ruminants: trafficking of systemic copper, adaptations to variation in nutritional supply and thiomolybdate challenge. *Nutrition Research Reviews*, 33(1), 43-49. doi: 10.1017/S0954422419000180.
- Crichton, R. R., & Pierre, J. L. (2001). Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals*, 14, 99-112.
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3), 403-417. doi: 10.1042/BJ20100323.
- Cui, H., Shao, C., Liu, Q., Yu, W., Fang, J., Yu, W., ... & Ding, K. (2011). Heparanase enhances nerve-growth-factor-induced PC12 cell neuritogenesis via the p38 MAPK pathway. *Biochemical Journal*, 440(2), 273-282. doi: 10.1042/BJ20110167.
- Dai, W. L., Yan, B., Bao, Y. N., Fan, J. F., & Liu, J. H. (2020). Suppression of peripheral NGF attenuates neuropathic pain induced by chronic constriction injury through the TAK1-MAPK/NF- κ B signaling pathways. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1-13. doi: 10.1186/S12964-020-00556-3/FIGURES/7.
- Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G., & Klausner, R. D. (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(9), 3869-3873. doi: 10.1073/pnas.89.9.3869.
- Davies, C., & Tournier, C. (2012). Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 85-89. doi: 10.1042/BST20110641.
- De Nicola, G. F., Bassi, R., Nichols, C., Fernandez-Caggiano, M., Golfroush, P. A., Thapa, D., ... & Marber, M. S. (2018). The TAB1-p38 α complex aggravates myocardial injury and can be targeted by small molecules. *JCI Insight*, 3(16). doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.121144.
- de Romaña, D. L., Olivares, M., Uauy, R., & Araya, M. (2011). Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(1), 3-13. doi: 10.1016/j.jtemb.2010.11.004.
- Dechant, G., & Neumann, H. (2003). Neurotrophins. *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*, 303-334. doi: 10.5578/kvj.7239.
- del Barco Barrantes, I., Coya, J. M., Maina, F., Arthur, J. S. C., & Nebreda, A. R. (2011). Genetic analysis of specific and redundant roles for p38 α and p38 β MAPKs during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12764-12769.
- Delker, S. L., Xue, F., Li, H., Jamal, J., Silverman, R. B., & Poulos, T. L. (2010). Role of zinc in isoform-selective inhibitor binding to neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, 49(51), 10803-10810. doi: 10.1021/BI1013479/SUPPL_FILE/BI1013479_SI_001.PDF.
- Deng, H., Zhu, S., Yang, H., Cui, H., Guo, H., Deng, J., ... & Zhu, Y. (2023). The dysregulation of inflammatory pathways triggered by copper exposure. *Biological Trace Element Research*, 201(2), 539-548. doi: 10.1007/s12011-022-03171-0.
- Desmet, V. J. (1995). Histopathology of cholestasis. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 79, 233-240.
- Dhanasekaran, D. N., & E. P. Reddy. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008 27:48 27(48) 6245-51. doi: 10.1038/onc.2008.301.

- Dickinson, R. J., & Keyse, S. M. (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of Cell Science*, 119(22), 4607-4615.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. (2012). NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*, 246(1), 379-400. doi: 10.1111/J.1600-065X.2012.01099.X.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. doi: 10.1152/PHYSREV.00018.2001.
- Duarte, T. L., & Lunec, J. (2005). When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, 39(7), 671-686.
- Duncan, A. 1997. Copper. *In Practice* 19(9), 503–503. doi: 10.1136/INPRACT.19.9.503.
- Ellman, G. L. (1958). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74(2): 443–50. doi: 10.1016/0003-9861(58)90014-6.
- Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37(2), 112-119. doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2003.10.014.
- Eroksuz, Y., Incili, C. A., Karabulut, B., Yilmaz, I., Yerlikaya, Z., & Eroksuz, H. (2021). Pathological Changes due to Copper Toxication in Two Sheep. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 35(3), 187-89.
- Escós, A., Risco, A., Alsina-Beauchamp, D., & Cuenda, A. (2016). p38 γ and p38 δ mitogen activated protein kinases (MAPKs), new stars in the MAPK galaxy. *Frontiers in Cell and Developmental biology*, 4, 31. doi: 10.3389/FCELL.2016.00031/BIBTEX.
- Eskandari, E., & Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*, 221(6), e202201159. doi: 10.1083/JCB.202201159.
- Floriańczyk, B. (2003, January). Copper in the organism--transport and storage in the cells. In *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina* (Vol. 58, No. 1, pp. 85-88).
- Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., & Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, 78(6), 1039-1049. doi: 10.1016/0092-8674(94)90278-X.
- Fujisawa, T., Takeda, K., & Ichijo, H. (2007). ASK family proteins in stress response and disease. *Molecular Biotechnology*, 37, 13-18. doi: 10.1007/S12033-007-0053-X/FIGURES/3.
- Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S., & Chow, C. K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology*, 88, 1929-1938. doi: 10.1007/s00204-014-1355-y.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163. doi: 10.1016/S0300-483X(03)00159-8.
- Gao, B., Sun, W., Meng, X., Xue, D., & Zhang, W. (2016). Screening of differentially expressed protein kinases in bone marrow endothelial cells and the protective effects of the p38a inhibitor SB203580 on bone marrow in liver fibrosis. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4629-4637. doi: 10.3892/mmr.2016.5837.
- Gao, Y., Yang, W., Che, D., Adams, S., & Yang, L. (2020). Advances in the mechanism of high copper diets in restraining pigs growth. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(2), 667-678. doi: 10.1111/jpn.13213.
- Garajová, I., Giovannetti, E., Biasco, G., & Peters, G. J. (2015). c-Met as a target for personalized therapy. *Translational Oncogenomics*, 7(Suppl 1), 13. doi: 10.4137/tog.s30534.
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419-425. doi: 10.1016/J.BBRC.2016.10.086.
- Ge, B., Gram, H., Padova, F. D., Huang, B. New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y. & Han, J. (2002). "MAPKK-independent activation of p38 α mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38 α ". *Science* 295(5558):1291–94.

- Georgatsou, E., Mavrogiannis, L. A., Fragiadakis, G. S., & Alexandraki, D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13786-13792. doi: 10.1074/jbc.272.21.13786.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106-1114. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00394-4.
- Gomes, E., & Rockwell, P. (2008). p38 MAPK as a negative regulator of VEGF/VEGFR2 signaling pathway in serum deprived human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters*, 431(2), 95-100. doi: 10.1016/J.NEULET.2007.11.068.
- Gooneratne, S. R., W. T. Buckley, & D. A. Christensen. "Review of copper deficiency and metabolism in ruminants." *Canadian Journal of Animal Science* 69.4 (1989): 819-845. doi: 10.4141/cjas89-096.
- Gräb, J., & Rybniker, J. (2019). The expanding role of p38 mitogen-activated protein kinase in programmed host cell death. *Microbiology Insights*, 12, 1178636119864594. doi: 10.1177/1178636119864594.
- Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology*, 173(18), 5918-5920. doi: 10.1128/jb.173.18.5918-5920.1991.
- Greenberg, M. E., Xu, B., Lu, B., & Hempstead, B. L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *Journal of Neuroscience*, 29(41), 12764-12767. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3566-09.2009.
- Greenblatt, M. B., Shim, J. H., Zou, W., Sitara, D., Schweitzer, M., Hu, D., ... & Glimcher, L. H. (2010). The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2457-2473. doi: 10.1172/JCI42285.
- Grubman, A., & White, A. R. (2014). Copper as a key regulator of cell signalling pathways. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 16, e11. doi: 10.1017/erm.2014.11.
- Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997-2007. doi: 10.3892/ETM.2020.8454.
- Hajimohammadi, S., Gharibi, S., Pourbarkhordar, V., Mousavi, S. R., & Salmani Izadi, H. (2022). Acute poisoning of copper sulfate: a case report and review literature. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*, 34(1), 1-5. doi: 10.1186/S43162-022-00168-Y.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., & Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265(5173), 808-811. doi: 10.1126/SCIENCE.7914033.
- Han, J., Wu, J., & Silke, J. (2020). An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling. *F1000 Research*, 9. doi: 10.12688/F1000RESEARCH.22092.1.
- Han, S. K., Park, S. W., Cho, Y. M., Wang, I. J., Bae, B. K., Yeom, S. R., & Park, S. C. (2021). Use of succimer as an alternative antidote in copper sulfate poisoning: A case report. *Journal of the Korean Society of Clinical Toxicology*, 19(1), 59-63. doi: 10.22537/JKSCT.2021.19.1.59.
- Haijer, F. W., Van Vliet, C. B., Brusse-Keizer, M. G., Van der Palen, J. A., Kerbert-Dreteler, M. J., & Kolkman, J. J. (2023). Gamma-Glutamyl Transferase: A Friend against Cholestatic Itch? A Retrospective Observational Data Analysis in Patients with Extrahepatic Cholestasis. *International Journal of Hepatology*, 2023.
- Harris, E. D. (1990). Transport of Copper. In *Trace Elements in Clinical Medicine: Proceedings of the Second Meeting of the International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH) August 28-September 1, 1989, Tokyo* (pp. 421-424). Springer Japan.
- Hart, E. B., Steenbock, H., Waddell, J., & Elvehjem, C. A. (1928). Iron in nutrition VII. Copper as a

supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *Nutrition Reviews*, 45(8), 181-183. doi: 10.1111/J.1753-4887.1987.TB06082.X.

Hayakawa, M., Hayakawa, H., Petrova, T., Ritprajak, P., Sutavani, R. V., Jiménez-Andrade, G. Y., ... & Park, J. M. (2017). Loss of functionally redundant p38 isoforms in T cells enhances regulatory T cell induction. *Journal of Biological Chemistry*, 292(5), 1762-1772. doi: 10.1074/jbc.M116.764548.

Haywood, S., Simpson, D. M., Ross, G., & Beynon, R. J. (2005). The greater susceptibility of North Ronaldsay sheep compared with Cambridge sheep to copper-induced oxidative stress, mitochondrial damage and hepatic stellate cell activation. *Journal of Comparative Pathology*, 133(2-3), 114-127. doi: 10.1016/J.JCPA.2005.02.001.

He, H., Zou, Z., Wang, B., Xu, G., Chen, C., Qin, X., ... & Zhang, J. (2020). Copper oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and cell death via copper ion-mediated P38 MAPK activation in vascular endothelial cells. *International Journal of Nanomedicine*, 3291-3302. doi: 10.2147/IJN.S241157.

Helman, R. G., Adams, L. G., Pierce, K. R., Bridges, C. H., & Bailey, E. M. (1985). The role of lysosomes in the pathogenesis of copper-induced hepatotoxicity: morphological studies. *Journal of Comparative Pathology*, 95(1), 25-35. doi: 10.1016/0021-9975(85)90074-X.

Hill, G. M., & Shannon, M. C. (2019). Copper and zinc nutritional issues for agricultural animal production. *Biological Trace Element Research*, 188, 148-159. doi: 10.1007/S12011-018-1578-5.

Hollenbach, E., Neumann, M., Vieth, M., Roessner, A., Malfertheiner, P., & Naumann, M. (2004). Inhibition of p38 MAP kinase-and RICK/NF- κ B-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *The FASEB Journal*, 18(13), 1550-1552. doi: 10.1096/FJ.04-1642FJE.

Hölscher, C., Gräß, J., Hölscher, A., Müller, A. L., Schäfer, S. C., & Rybniker, J. (2020). Chemical p38 MAP kinase inhibition constrains tissue inflammation and improves antibiotic activity in Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Scientific Reports*, 10(1), 13629. doi: 10.1038/s41598-020-70184-x.

Hsu, J. T., Le, P. H., Lin, C. J., Chen, T. H., Kuo, C. J., Chiang, K. C., & Yeh, T. S. (2017). Mechanism of salutary effects of melatonin-mediated liver protection after trauma-hemorrhage: p38 MAPK-dependent iNOS/HIF-1 α pathway. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(5), G427-G433. doi: 10.1152/ajpgi.00440.2016.

Huang, Y. K., Chang, K. C., Li, C. Y., Lieu, A. S., & Lin, C. L. (2023). AKR1B1 Represses Glioma Cell Proliferation through p38 MAPK-Mediated Bcl-2/BAX/Caspase-3 Apoptotic Signaling Pathways. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(4), 3391-3405. doi: 10.3390/CIMB45040222.

Huster, D. (2010). Wilson disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 24(5), 531-539. doi: 10.1016/J.BPG.2010.07.014.

Ibáñez, C. F., & Simi, A. (2012). p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends in Neurosciences*, 35(7), 431-440. doi: 10.1016/J.TINS.2012.03.007.

Ji, R. R., Samad, T. A., Jin, S. X., Schmoll, R., & Woolf, C. J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36(1), 57-68. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00908-X.

Jian, Z., Guo, H., Liu, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., ... & Zhao, L. (2020). Oxidative stress, apoptosis and inflammatory responses involved in copper-induced pulmonary toxicity in mice. *Aging (Albany NY)*, 12(17), 16867. doi: 10.18632/AGING.103585.

Johnson, G. V., & Bailey, C. D. (2003). The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 183(2), 263-268. doi: 10.1016/S0014-4886(03)00268-1.

Kabel, A. M. (2014). Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*, 2(3), 35-38. doi: 10.12691/jnh-2-3-2.

Kadiiska, M. B., & Mason, R. P. (2002). In vivo copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 58(6), 1227-1239. doi: 10.1016/S1386-1425(01)00713-2.

- Kaim, W., & Rall, J. (1996). Copper—a “modern” bioelement. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 35(1), 43-60. doi: 10.1002/anie.199600431.
- Kantar, F. U. (2017). Karaciğer Fonksiyon Testi Yüksekliğine Yaklaşım. *Klinik Tıp Bilimleri* 5(2), 30–38.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76. doi: 10.24880/maeuafd.260790.
- Karakaya, D., Barış, S., & Tür, A. (2010). Nitrik oksit. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 17(3). doi: 10.5835/JECM.V17I3.382.
- Karaman, M., Özen, H., Tuzcu, M., Çiğremiş, Y. I. L. M. A. Z., Önder, F., & Özcan, K. (2010). Pathological, biochemical and haematological investigations on the protective effect of α -lipoic acid in experimental aflatoxin toxicosis in chicks. *British Poultry Science*, 51(1), 132-141. doi: 10.1080/00071660903401839.
- Kadammatil, A. V., Sajankila, S. P., Prabhu, S., Rao, B. N., & Rao, B. S. S. (2018). Systemic toxicity and teratogenicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(4), 2394-2404.
- Karin, M., & Gallagher, E. (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*, 57(4-5), 283-295. doi: 10.1080/15216540500097111.
- Kazak, F., & Yarım, G. F. (2014). Nörotrofinler. *Kocatepe Veterinary Journal*, 7(1), 47-57. doi: 10.5578/KVJ.7239.
- Kelner, G. S., Lee, M., Clark, M. E., Maciejewski, D., McGrath, D., Rabizadeh, S., ... & Maki, R. A. (2000). The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 580-584. doi: 10.1074/jbc.275.1.580.
- Keshet, Y., & Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *MAP Kinase Signaling Protocols: Second Edition*, 3-38. doi: 10.1007/978-1-60761-795-2_1/COVER.
- Koganti, P., Levy-Cohen, G., & Blank, M. (2018). Smurfs in protein homeostasis, signaling, and cancer. *Frontiers in Oncology*, 8, 295. doi: 10.3389/FONC.2018.00295.
- Koul, H. K., Pal, M., & Koul, S. (2013). Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes & Cancer*, 4(9-10), 342-359. doi: 10.1177/1947601913507951.
- Kumar, V., Kalita, J., Bora, H. K., & Misra, U. K. (2016). Temporal kinetics of organ damage in copper toxicity: A histopathological correlation in rat model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 372-380. doi: 10.1016/J.YRTPH.2016.09.025.
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews*, 81(2), 807-869.
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiological Reviews*, 92(2), 689-737.
- La Fontaine, S., Ackland, M. L., & Mercer, J. F. (2010). Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B: emerging roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(2), 206-209.
- Lala, V., Zubair, M., & Minter, D. A. (2022). Liver function tests. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Lanna, A., Henson, S. M., Escors, D., & Akbar, A. N. (2014). The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nature Immunology*, 15(10), 965-972. doi: 10.1038/ni.2981.
- Lee, J. C., Kumar, S., Griswold, D. E., Underwood, D. C., Votta, B. J., & Adams, J. L. (2000). Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 185-201. doi: 10.1016/S0162-3109(00)00206-X.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., ... & Young, P. R.

- (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372(6508), 739-746. doi: 10.1038/372739a0.
- Lee, W. B., Kang, J. S., Choi, W. Y., Zhang, Q., Kim, C. H., Choi, U. Y., ... & Kim, Y. J. (2016). Mincle-mediated translational regulation is required for strong nitric oxide production and inflammation resolution. *Nature Communications*, 7(1), 11322. doi: 10.1038/ncomms11322.
- Levi-Montalcini, R., & Hamburger V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* 116(2), 321–61. doi: 10.1002/JEZ.1401160206.
- Li, Y. (2020). Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment. *IUBMB life*, 72(9), 1900-1908. doi: 10.1002/iub.2341.
- Liao, J. H., Chen, J. S., Chai, M. Q., Zhao, S., & Song, J. G. (2001). The involvement of p38 MAPK in transforming growth factor β 1-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Cell Research*, 11(2), 89-94. doi: 10.1038/sj.cr.7290072.
- Lin, J., Lee, D., Choi, Y., & Lee, S. Y. (2015). The scaffold protein RACK1 mediates the RANKL-dependent activation of p38 MAPK in osteoclast precursors. *Science Signaling*, 8(379), ra54-ra54. doi: 10.1126/SCISIGNAL.2005867/SUPPL_FILE/8_RA54_SM.PDF.
- Linder, M. C. (2013). *Biochemistry of copper* (Vol. 10). Springer Science & Business Media.
- Liu, D., Wang, H., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020c). Protective effects of chlorogenic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury rats by regulating oxidative stress-related Nrf2 pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 51-60. doi: 10.2147/DDDT.S228751.
- Liu, F. C., Yu, H. P., Hwang, T. L., & Tsai, Y. F. (2012). Protective effect of tropisetron on rodent hepatic injury after trauma-hemorrhagic shock through P38 MAPK-dependent hemeoxygenase-1 expression. *PLoS One*, 7(12), e53203.
- Liu, H., Guo, H., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., ... & Zhao, L. (2020a). Copper induces hepatic inflammatory responses by activation of MAPKs and NF- κ B signalling pathways in the mouse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110806. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110806.
- Liu, H., Guo, H., Jian, Z., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., ... & Zhao, L. (2020b). Copper induces oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. doi: 10.1155/2020/1359164.
- Liu, J., & Lin, A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell research*, 15(1), 36-42. doi: 10.1038/sj.cr.7290262.
- Liu, N., Lo, L. S. L., Askary, S. H., Jones, L., Kidane, T. Z., Nguyen, T. T. M., ... & Linder, M. C. (2007). Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 597-608. doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2006.11.005.
- Liu, Z., Wu, H., & Huang, S. (2021). Role of NGF and its receptors in wound healing. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(6), 1-9. doi: 10.3892/etm.2021.10031.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/METH.2001.1262.
- López-Alonso, M., Carbajales, P., Miranda, M., & Pereira, V. (2017). Subcellular distribution of hepatic copper in beef cattle receiving high copper supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 42, 111-116. doi: 10.1016/J.JTEMB.2017.05.001.
- Lucas, L. C., & Lemons, J. E. (1992). Biodegradation of restorative metallic systems. *Advances in Dental Research*, 6(1), 32-37. doi: 10.1177/08959374920060011301.
- Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Kuang, P., Liu, H., Lu, Y., ... & Zhao, L. (2017). Sodium fluoride induces renal inflammatory responses by activating NF- κ B signaling pathway and reducing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Oncotarget*, 8(46), 80192. doi: 10.18632/ONCOTARGET.19006.
- Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y., & Dmitriev, O. Y. (2007). Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiological reviews*, 87(3), 1011-1046. doi:

10.1152/PHYSREV.00004.2006.

Mahatesh, S. P., Gangawane, A. K. & Patil, C. S. (2012). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines in human health: future prospects. *World Research Journal of Medicinal & Aromatic Plants* 1(1), 06–10.

Mandal, R., Barrón, J. C., Kostova, I., Becker, S., & Strebhardt, K. (2020). Caspase-8: The double-edged sword. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1873(2), 188357. doi: 10.1016/J.BBCAN.2020.188357.

Mason, J. E., Starke, R. D., & Van Kirk, J. E. (2010). Gamma-Glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk BioMarker. *Preventive Cardiology*, 13(1), 36-41. doi: 10.1111/J.1751-7141.2009.00054.X.

Matesanz, N., Bernardo, E., Acín-Pérez, R., Manieri, E., Pérez-Sieira, S., Hernández-Cosido, L., ... & Sabio, G. (2017). MKK6 controls T3-mediated browning of white adipose tissue. *Nature Communications*, 8(1), 856.

Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2008). Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(11), 1325-1336. doi: 10.1016/J.BBAGEN.2007.12.011.

Mattie, M. D., McElwee, M. K., & Freedman, J. H. (2008). Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Journal of Molecular Biology*, 383(5), 1008-1018. doi: 10.1016/J.JMB.2008.08.080.

Mebratu, Y., & Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?. *Cell Cycle*, 8(8), 1168-1175. doi: 10.4161/CC.8.8.8147.

Minervino, A. H. H., López-Alonso, M., Barrêto Júnior, R. A., Rodrigues, F. A. M. L., Araújo, C. A. S. C., Sousa, R. S., ... & Ortolani, E. L. (2018). Dietary zinc supplementation to prevent chronic copper poisoning in sheep. *Animals*, 8(12), 227. doi: 10.3390/ANI8120227.

Minnone, G., De Benedetti, F., & Bracci-Laudiero, L. (2017). NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1028. doi: 10.3390/ijms18051028.

Mohty, M., Malard, F., Abecassis, M., Aerts, E., Alaskar, A. S., Aljurf, M., ... & Carreras, E. (2015). Sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease: current situation and perspectives—a position statement from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplantation*, 50(6), 781-789.

Mufti, R. E., Sarker, K., Jin, Y., Fu, S., Rosales, J. L., & Lee, K. Y. (2014). Thrombin enhances NGF-mediated neurite extension via increased and sustained activation of p44/42 MAPK and p38 MAPK. *PLoS One*, 9(7), e103530. doi: 10.1371/journal.pone.0103530.

Nader, M., Vicente, G., da Rosa, J. S., Lima, T. C., Barbosa, A. M., Santos, A. D. C., ... & Fröde, T. S. (2014). *Jungia sellowii* suppresses the carrageenan-induced inflammatory response in the mouse model of pleurisy. *Inflammopharmacology*, 22, 351-365. doi: 10.1007/S10787-014-0210-3/FIGURES/7.

National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water. (2000). *Health Effects of Excess Copper*.

Nebreda, A. R., & Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(6), 257-260. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01595-4.

Nieves-Cordones, M., López-Delacalle, M., Ródenas, R., Martínez, V., Rubio, F., & Rivero, R. M. (2019). Critical responses to nutrient deprivation: A comprehensive review on the role of ROS and RNS. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 74-85. doi: 10.1016/J.ENVEXPBOT.2018.10.039.

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006. doi: 10.1039/C4RA13315C.

Oakley, F., Trim, N., Constandinou, C. M., Ye, W., Gray, A. M., Frantz, G., ... & Iredale, J. P. (2003). Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic

stellate cell apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 1849-1858. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63544-4.

Ohhira, M., Ono, M., Ohhira, M., Sekiya, C., Namiki, M., Fujimoto, Y., ... & Mori, M. (1995). Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats. *Journal of Gastroenterology*, 30, 619-623. doi: 10.1007/BF02367788/METRICS.

Olson, S. Y., & Garbán, H. J. (2008). Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide*, 19(2), 170-176. doi: 10.1016/J.NIOX.2008.04.005.

Oruc, H. H., Cengiz, M., & Beskaya, A. (2009). Chronic copper toxicosis in sheep following the use of copper sulfate as a fungicide on fruit trees. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(4), 540-543.

Ozcelik, D., Ozaras, R., Gurel, Z., Uzun, H., & Aydin, S. (2003). Copper-mediated oxidative stress in rat liver. *Biological Trace Element Research*, 96, 209-215. doi: 10.1385/BTER:96:1-3:209.

Özen, H., Kamber, U., Karaman, M., Gül, S., Atakişi, E., Özcan, K., & Atakişi, O. (2014). Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66(8), 367-375. doi: 10.1016/J.ETP.2014.05.003.

Özen, S. N. (2007). Farelerde Akut Bakır Toksikasyonunun Biyokimyasal ve Histopatolojik Yönden Araştırılması. [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi] Kafkas Üniversitesi.

Özen, B. (2021). Doksorubisin Kardiyotoksitesinde P38 Map Kinaz İnhibitörünün Moleküler Genetik Ve Biyokimyasal Parametrelere Etkisi [Yayımlanmış Doktora Tezi] İnönü Üniversitesi.

Palipoch, S., & Koomhin P. (2015). Oxidative Stress-Associated Pathology: A Review. *Sains Malaysiana* 44(10), 1441–51.

Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2011). P-type ATPases. *Annual review of biophysics*, 40, 243-266. doi: 10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.093008.131331.

Patwa, J., & Flora, S. J. S. (2020). MiADMSA abrogates chronic copper-induced hepatic and immunological changes in Sprague Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111692. doi: 10.1016/J.FCT.2020.111692.

Pei, S., Minhajuddin, M., Callahan, K. P., Balys, M., Ashton, J. M., Neering, S. J., ... & Jordan, C. T. (2013). Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33542-33558. doi: 10.1074/jbc.M113.511170.

Perestrelo, A. P., Miranda, G., Gonçalves, M. I., Belino, C., & Ballesteros, R. (2021). Chronic Copper Sulfate Poisoning. *European Journal of Case Reports in Internal Medicine*, 8(2). doi: 10.12890/2021_002309.

Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619-1633. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2010.12.012.

Pohl, H. R., Roney N, & Abadin H. G. (2015). Metal ions affecting the neurological system. *Metal Ions in Toxicology: Effects, Interactions, Interdependencies* 247–62. doi: 10.1039/978184973211600247.

Pöyhönen, S., Er, S., Domanskyi, A., & Airavaara, M. (2019). Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: expression and properties in neurodegeneration and injury. *Frontiers in Physiology*, 10, 486. doi: 10.3389/FPHYS.2019.00486.

Prohaska, J. R. (2008). Role of copper transporters in copper homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), 826S-829S. doi: 10.1093/AJCN/88.3.826S.

Puig, S., & Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 171-180. doi: 10.1016/S1367-5931(02)00298-3.

Qiao, H., & May, J. M. (2009). Macrophage differentiation increases expression of the ascorbate transporter (SVCT2). *Free Radical Biology and Medicine*, 46(8), 1221-1232. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.02.004.

- Ravingerová, T., Barančík, M., & Strnisková, M. (2003). Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 247, 127-138. doi: 10.1023/A:1024119224033/METRICS.
- Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N., ... & Wink, D. A. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting Perspective on Stressful Biological situations. doi: 10.1515/BC.2004.001/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- Roberts, R. E. (2012). The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway: a potential therapeutic target in hypertension. *Journal of Experimental Pharmacology*, 77-83. doi: 10.2147/JEP.S28907.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., ... & Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 78(6), 1027-1037. doi: 10.1016/0092-8674(94)90277-1.
- Roux, P. P., & Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology*, 67(3), 203-233. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00016-3.
- Royer, A., & Sharman, T. (2020). Copper toxicity.
- Sabio, G., & Davis, R. J. (2014, June). TNF and MAP kinase signalling pathways. In *Seminars in immunology* (Vol. 26, No. 3, pp. 237-245). Academic Press. doi: 10.1016/J.SMIM.2014.02.009.
- Sakauchi, C., Wakatsuki, H., Ichijo, H., & Hattori, K. (2017). Pleiotropic properties of ASK1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(1), 3030-3038. doi: 10.1016/J.BBAGEN.2016.09.028.
- Sakhaee, E., Emadi, L., Abshenas, J., Kheirandish, R., Azari, O., & Amiri, E. (2012). Evaluation of epididymal sperm quality following experimentally induced copper poisoning in male rats. *Andrologia*, 44, 110-116. doi: 10.1111/J.1439-0272.2010.01147.X.
- Salvador, J. M., Mittelstadt, P. R., Guszczynski, T., Copeland, T. D., Yamaguchi, H., Appella, E., ... & Ashwell, J. D. (2005). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nature Immunology*, 6(4), 390-395. doi: 10.1038/ni1177.
- Santos, S., Silva, A. M., Matos, M., Monteiro, S. M., & Álvaro, A. R. (2016). Copper induced apoptosis in Caco-2 and Hep-G2 cells: Expression of caspases 3, 8 and 9, AIF and p53. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 185, 138-146. doi: 10.1016/J.CBPC.2016.03.010.
- Sargison, N. (2009). *Sheep flock health: a planned approach*. John Wiley & Sons.
- Sase, K., Tsukahara, C., Fujita, N., Arizono, I., Otsubo, M., & Kitaoka, Y. (2023). Inhibition of p38 ameliorates axonal loss with modulation of autophagy in TNF-induced optic nerve damage. *International Ophthalmology*, 1-8. doi: 10.1007/S10792-023-02706-1/FIGURES/6.
- Scheiber, I., Dringen, R., & Mercer, J. F. (2013). Copper: effects of deficiency and overload. *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, 359-387. doi: 10.1007/978-94-007-7500-8.
- Schieven, G. L. (2005). The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(10), 921-928. doi: 10.2174/1568026054985902.
- Schoemaker, M. H., Conde de la Rosa, L., Buist-Homan, M., Vrenken, T. E., Havinga, R., Poelstra, K., ... & Moshage, H. (2004). Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology*, 39(6), 1563-1573. doi: 10.1002/hep.20246.
- Sedel, F., Béchade, C., & Triller, A. (1999). Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 11(11), 3904-3912. doi: 10.1046/J.1460-9568.1999.00814.X.
- Shanbhag, V. C., Gudekar, N., Jasmer, K., Papageorgiou, C., Singh, K., & Petris, M. J. (2021). Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1868(2), 118893. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2020.118893.

- Sherman, K. E. (1991). Alanine aminotransferase in clinical practice: a review. *Archives of Internal Medicine*, 151(2), 260-265. doi: 10.1001/ARCHINTE.1991.00400020036008.
- Shiraishi, N., Taguchi, T., & Kinebuchi, H. (1991). Copper-induced toxicity in macular mutant mouse: An animal model for Menkes' kinky-hair disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110(1), 89-96. doi: 10.1016/0041-008X(91)90292-M.
- Sofroniew, M. V., C. L. Howe, & Mobley W. C. (2003). Nerve Growth Factor Signaling, Neuroprotection, and Neural Repair. 24:1217–81. doi: 10.1146/ANNUREV.NEURO.24.1.1217.
- Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G., & Pae, H. O. (2011). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?. *Journal of Signal Transduction*, 2011 doi: 10.1155/2011/792639.
- Son, Y., Kim, S., Chung, H. T., & Pae, H. O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods in Enzymology*, 528, 27-48.
- Sreekanth, G. P., Chuncharunee, A., Sirimontaporn, A., Panaampon, J., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P. T., & 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), e0149486. doi: 10.1371/journal.pone.0149486.
- Sternlieb, I. (1980). Copper and the liver. *Gastroenterology* 78(6),1615–28. doi: 10.1016/s0016-5085(19)30524-4.
- Stone, W. L., Leavitt, L., & Varacallo, M. (2017). Physiology, growth factor.
- Su, Rui, Wei Su, ve Qian Jiao. 2019. “NGF protects neuroblastoma cells against β -amyloid-induced apoptosis via the Nrf2/HO-1 pathway”. *FEBS open bio* 9(12):2063–71. doi: 10.1002/2211-5463.12742.
- Suttle, N. F. (2012). Control of hepatic copper retention in Texel ram lambs by dietary supplementation with copper antagonists followed by a copper depletion regimen. *Animal Feed Science and Technology*, 173(3-4), 194-200. doi: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2012.01.013.
- Szegezdi, E., Reed Herbert, K., Kavanagh, E. T., Samali, A., & Gorman, A. M. (2008). Nerve growth factor blocks thapsigargin-induced apoptosis at the level of the mitochondrion viaregulation of Bim. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6a), 2482-2496. doi: 10.1111/J.1582-4934.2008.00268.X.
- Takeda, K., & Ichijo, H. (2002). Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes to Cells*, 7(11), 1099-1111. doi: 10.1046/J.1365-2443.2002.00591.X.
- Takizawa, H., Fritsch, K., Kovtonyuk, L. V., Saito, Y., Yakkala, C., Jacobs, K., ... & Manz, M. G. (2017). Pathogen-induced TLR4-TRIF innate immune signaling in hematopoietic stem cells promotes proliferation but reduces competitive fitness. *Cell Stem Cell*, 21(2), 225-240. doi: 10.1016/J.STEM.2017.06.013.
- Tan, Y. I., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., & Comb, M. J. (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO journal*, 15(17), 4629-4642. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00840.x.
- Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D. A., Saurin, A. T., Jiang, J., Heads, R. J., ... & Marber, M. S. (2003). Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circulation research*, 93(3), 254-261. doi: 10.1161/01.RES.0000083490.43943.85.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A., & Grisham, M. B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(3), R431-R444. doi: 10.1152/AJPREGU.00361.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH60030420820007.JPEG.
- Tatum, L., Shankar, P., Boylan, L. M., & Spallholz, J. E. (2000). Effect of dietary copper on selenium toxicity in Fischer 344 rats. *Biological Trace Element Research*, 77, 241-249. doi:

10.1385/BTER:77:3:241/METRICS.

Theivanthiran, B., Kathania, M., Zeng, M., Anguiano, E., Basrur, V., Vandergriff, T., ... & Venuprasad, K. (2015). The E3 ubiquitin ligase Itch inhibits p38 α signaling and skin inflammation through the ubiquitylation of Tab1. *Science Signaling*, 8(365), ra22-ra22. doi: 10.1126/SCISIGNAL.2005903/SUPPL_FILE/8_RA22_TABLE_S2.ZIP.

Thiele, D. J. (2003). Integrating trace element metabolism from the cell to the whole organism. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1579S-1580S. doi: 10.1093/JN/133.5.1579S.

Thomson, L. (2015). 3-nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis. *Disease Markers*, 2015. doi: 10.1155/2015/708282.

Tian, F., Xiao, Y., Li, X., Zhai, Q., Wang, G., Zhang, Q., ... & Chen, W. (2015). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against copper toxicity in mice. *PloS One*, 10(11), e0143318. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0143318.

Tian, Y., Huo, M., Li, G., Li, Y., & Wang, J. (2016). Regulation of LPS-induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines via alteration of NF- κ B activity in mouse peritoneal macrophages exposed to fluoride. *Chemosphere*, 161, 89-95. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.06.035.

Tomida, T., Takekawa, M., & Saito, H. (2015). Oscillation of p38 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nature Communications*, 6(1), 8350. doi: 10.1038/ncomms9350.

Torchia, G., Dutta, D., Mittelstadt, P. R., Guha, J., Gaida, M. M., Fish, K., ... & Ashwell, J. D. (2018). Intensity and duration of TCR signaling is limited by p38 phosphorylation of ZAP-70T293 and destabilization of the signalosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(9), 2174-2179. doi: 10.1073/PNAS.1713301115/SUPPL_FILE/PNAS.201713301SI.PDF.

Tortarolo, M., Veglianesi, P., Calvaresi, N., Botturi, A., Rossi, C., Giorgini, A., ... & Bendotti, C. (2003). Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(2), 180-192.

Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155. doi: 10.1016/S0753-3322(03)00043-X.

Trabjerg, E., Kartberg, F., Christensen, S., & Rand, K. D. (2017). Conformational characterization of nerve growth factor- β reveals that its regulatory pro-part domain stabilizes three loop regions in its mature part. *Journal of Biological Chemistry*, 292(40), 16665-16676. doi: 10.1074/JBC.M117.803320.

Tsai, M. S., Lee, P. H., Sun, C. K., Chiu, T. C., Lin, Y. C., Chang, I. W., ... & Kao, Y. H. (2018). Nerve growth factor upregulates sirtuin 1 expression in cholestasis: a potential therapeutic target. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(1), e426-e426 doi: 10.1038/emm.2017.235.

Tsai, M. S., Lin, Y. C., Sun, C. K., Huang, S. C., Lee, P. H., & 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. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0112113.

Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*, 524, 13-30. doi: 10.1016/J.AB.2016.10.021.

Tummers, B., & Green, D. R. (2017). Caspase-8: regulating life and death. *Immunological Reviews*, 277(1), 76-89. doi: 10.1111/IMR.12541.

Türköz, Y., & Özerol, E. (1997). Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 4(4).

Turnlund, J. R., Scott, K. C., Peiffer, G. L., Jang, A. M., Keyes, W. R., Keen, C. L., & Sakanashi, T. M. (1997). Copper status of young men consuming a low-copper diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(1), 72-78. doi: 10.1093/AJCN/65.1.72.

Tuzcu, M., Özdemir, Ö., Çelik, Z., Ulusoy, Y., Salik, R., Kılınç, B., ... & Tarakci, A. (2022). Koyunlarda premiks kaynaklı bakır zehirlenmesinin klinik, patolojik ve toksikolojik incelenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 33(2), 70-78. doi: 10.35864/evmd.1187281.

- Uauy, R., Olivares, M., & Gonzalez, M. (1998). Essentiality of copper in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), S952-S959. doi: 10.1093/ajcn/67.5.952S.
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271-278. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
- Uriu-Adams, J. Y., & Keen, C. L. (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5), 268-298. doi: 10.1016/j.mam.2005.07.015.
- Van der Berg, R., Levels, F. H. R., & Van der Schee, W. (1983). Breed differences in sheep with respect to the accumulation of copper in the liver. *Veterinary Quarterly*, 5(1), 26-31.
- Valdovinos-Flores, C., & 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. doi: 10.3109/10715762.2013.783210/SUPPL_FILE/IFRA_A_783210_SM0001.PDF.
- Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208. doi: 10.2174/0929867053764635.
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537-549. doi: 10.1038/nrc2694.
- Wang, Q., Chen, R., Zhang, C., Piao, F., & Shi, X. (2019). NGF protects bone marrow mesenchymal stem cells against 2, 5-hexanedione-induced apoptosis in vitro via Akt/Bad signal pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 457, 133-143. doi: 10.1007/S11010-019-03518-7.
- Warr, N., Carre, G. A., Siggers, P., Faleato, J. V., Brixey, R., Pope, M., ... & Greenfield, A. (2012). Gadd45 γ and Map3k4 interactions regulate mouse testis determination via p38 MAPK-mediated control of Sry expression. *Developmental Cell*, 23(5), 1020-1031. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2012.09.016.
- Weiss, K. C., & Linder, M. C. (1985). Copper transport in rats involving a new plasma protein. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1985.249.1.E77> 12(1).
- Wiener, G., Suttle, N. F., Field, A. C., Herbert, J. G., & Woolliams, J. A. (1978). Breed differences in copper metabolism in sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 91(2), 433-441. doi: 10.1017/S0021859600046530.
- Winge, D. R., & Mehra, R. K. (1990). Host defenses against copper toxicity. *International Review of Experimental Pathology* 31(C):47-83. doi: 10.1016/B978-0-12-364931-7.50007-0.
- Wise, B. L., Seidel, M. F., & Lane, N. E. (2021). The evolution of nerve growth factor inhibition in clinical medicine. *Nature Reviews Rheumatology*, 17(1), 34-46. doi: 10.1038/s41584-020-00528-4.
- Woolliams, J. A., Suttle, N. F., Wiener, G., Field, A. C., & Woolliams, C. (1983). The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *The Journal of Agricultural Science*, 100(2), 441-449. doi: 10.1017/S0021859600033608.
- Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2003). Role of p38 MAPK in CYP2E1-dependent arachidonic acid toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1115-1124. doi: 10.1074/jbc.M207856200.
- Xing, J., Kornhauser, J. M., Xia, Z., Thiele, E. A., & Greenberg, M. E. (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 1946-1955. doi: 10.1128/mcb.18.4.1946.
- Yanai, I., Benjamin, H., Shmoish, M., Chalifa-Caspi, V., Shklar, M., Ophir, R., ... & Shmueli, O. (2005). Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics*, 21(5), 650-659. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTI042.
- Yang, R. Z., Park, S., Reagan, W. J., Goldstein, R., Zhong, S., Lawton, M., ... & Gong, D. W. (2009). Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*, 49(2), 598-607. doi: 10.1002/HEP.22657.
- Yong, H. Y., Koh, M. S., & Moon, A. (2009). The p38 MAPK inhibitors for the treatment of

- inflammatory diseases and cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(12), 1893-1905. doi: 10.1517/13543780903321490.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186. doi: 10.1136/JCP.54.3.176.
- Yu, H. P., Liu, F. C., Tsai, Y. F., & Hwang, T. L. (2013). Osthole attenuates hepatic injury in a rodent model of trauma-hemorrhage. *PLoS One*, 8(6), e65916. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0065916.
- Yue, J., & López, J. M. (2020). Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2346.
- Yung, L. Y., Tso, P. H., Wu, E. H., Jowie, C. H., Ip, N. Y., & Wong, Y. H. (2008). Nerve growth factor-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase in PC12 cells is partially mediated via Gi/o proteins. *Cellular Signalling*, 20(8), 1538-1544. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.04.007.
- Zarubin, T., & Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 15(1), 11-18. doi: 10.1038/sj.cr.7290257.
- Zhang, H., Ozaki, I., Mizuta, T., Matsuhashi, S., Yoshimura, T., Hisatomi, A., ... & Yamamoto, K. (2002). β 1-integrin protects hepatoma cells from chemotherapy induced apoptosis via a mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 95(4), 896-906. doi: 10.1002/cncr.10751.
- Zhao, G., Chen, Z. C., Shen, X., Chen, Y. L., & Lv, Y. (2011). Protective effect of remifentanyl preconditioning against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: role of p38 mitogen-activated protein kinases. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 31(12), 2016-2020.
- Zhao, F., Guo, L., Wang, X., & Zhang, Y. (2021). Correlation of oxidative stress-related biomarkers with postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Osteoporosis*, 16, 1-10. doi: 10.1007/S11657-020-00854-W/FIGURES/6.
- Zhong, W., Zhu, H., Sheng, F., Tian, Y., Zhou, J., Chen, Y., ... & Lin, J. (2014). Activation of the MAPK11/12/13/14 (p38 MAPK) pathway regulates the transcription of autophagy genes in response to oxidative stress induced by a novel copper complex in HeLa cells. *Autophagy*, 10(7), 1285-1300. doi: 10.4161/auto.28789.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mustafa USTA
Eğitim	
Lise	Gördes Lisesi
Lisans	Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2008-2013)
Yüksek Lisans	Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2017-2019)
Doktora	Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Patoloji Anabilim Dalı (2019-2023)

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Belgesi



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

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Bakar Sülfat ile Oluşturulan Deneysel Karaciğer Hasarında Sinir Büyüme Faktörünün p38 MAPK Sinyal Yolu Üzerindeki Rolü</i>	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Hasan ÖZEN BAÜN Veteriner Fakültesi Patoloji AD.	
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Araş. Gör. Mustafa USTA BAÜN Veteriner Fakültesi	
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doktora	
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01/04/2022 – 01/04/2024	
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	FARE – 64 ADET	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı		Tarihi
	HADYEK BAŞVURU FORMU		17/02/2022
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2022/1-9		Tarih :24/02/2022
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	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 kurul görüşmesine katılmaz.



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...



Balıkesir Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlık Binası
Çağış Yerleşkesi/BALIKESİR



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

