



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



METANOLÜN GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aylin YILMAZ

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yalçın DUYDU

ANKARA

2024

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METANOLÜN GENOTOKSİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Aylin YILMAZ

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Yalçın DUYDU**

**ANKARA
2024**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Metanolün genotoksik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususun doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Aylin YILMAZ

Tarih: 27.06.2024

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında

Aylin YILMAZ tarafından hazırlanan

“Metanolün genotoksik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması” adlı tez çalışması

Aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Jüri üyesi (Danışman)

Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Jüri üyesi

Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Jüri üyesi

Prof. Dr. Onur ERDEM

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Metanolün Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

İnsanların günlük yaşantılarında pek çok farklı yol ile metanole maruz kalmaları mümkündür. Bunlardan en önemlileri her gün aldığımız gıdalardır. Taze meyve ve sebzeler, meyve suları, fermente içecekler ve aspartam içeren alkolsüz diyet içecekler insanlar için önemli birer metanole maruz kalma kaynaklarıdır. Metanol insanlarda orta ile yüksek düzeyde toksik etki gösterebilme potansiyeline sahiptir ve toksik etkilerini iki ana sebep altında toplamak mümkündür. Birincisi, methanol santral sinir sistemi (SSS) üzerindeki depresan etkisi nedeniyle ölümcül olabilir. İkincisi ise, metanolün alkol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla Formaldehide sonrasında da formaldehid dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla formik asite metabolize olmasından kaynaklanmaktadır. Bu metabolizma esnasında ortaya çıkan her iki metabolit de son derece toksiktir.

Ancak bu çalışmada metabolitlerinin değil doğrudan doğruya metanolün kendisinin DNA hasarı oluşturma potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Çünkü metanolün kendisinin genotoksik olup olmadığına dair çalışmalar oldukça kısıtlı ve tartışmalıdır. Yapmayı hedeflemiş olduğumuz çalışma tartışmalı olan bu konuda yeni verilerin elde edilmesini sağlayacak ve bu yolla uluslararası literatüre katkı sağlayacaktır. Bu amaçla V79 hücre hattında metanolün sitotoksik ve genotoksik etkileri (Comet testi) incelenecektir.

Anahtar Sözcükler: Comet testi, DNA hasarı, Metanol genotoksisitesi, Sitotoksisite, V79 hücreleri

SUMMARY

Investigation of Genotoxic and Cytotoxic Effects of Methanol

Humans can be exposed to methanol in many different ways daily. The most important sources of methanol exposure for humans in daily life are foods. Fresh fruits and vegetables, fruit juices, fermented beverages, and non-alcoholic diet drinks containing aspartame are important sources of methanol exposure for humans. Methanol has the potential to have moderate to high toxic effects in humans, and its toxic effects can be classified under two main headings. The first one is, methanol can be fatal due to its depressant effect on the central nervous system (CNS). The second pathway of methanol toxicity is through their metabolites. Methanol is metabolized to formaldehyde by the alcohol dehydrogenase enzyme and then to formic acid by the formaldehyde dehydrogenase. Both metabolites formed in this metabolic pathway are extremely toxic.

However, this study aimed to determine the genotoxic effects of methanol. The genotoxic effects of the metabolites of methanol are not within the scope of this study. Studies on methanol genotoxicity are quite limited and controversial. The study we aim to conduct will enable new data to be obtained on this controversial subject and thus contribute to the international literature. For this purpose, the cytotoxic and genotoxic effects of methanol (Comet test) have been examined in the V79 cell line.

Keywords: Comet assay, Cytotoxicity, DNA damage, Methanol genotoxicity, V79 cells

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Metanol	2
1.1.1. Metanolün Tarihçesi	2
1.1.2. Metanolün Bulunduğu Yerler	2
1.1.3. Pektin	3
1.1.4. Metanole Maruziyet Yolları	4
1.1.4.1. Metanol Metabolizması	4
1.1.4.2. Gıda Katkı Maddesi Olarak Aspartamdan Kaynaklanan Metanol Maruziyet	6
1.1.4.3. Gıda Alımından Kaynaklanan Metanol Maruziyet	6
1.1.4.4. Endojen Yollardan Kaynaklanan Metanol Maruziyeti	8
1.1.4.5. Endojen ve Ekzojen Kombinasyonu Şeklinde Alımdan Kaynaklanan Metanol Maruziyet	10
1.2. Sitotoksosite	11
1.2.1. Sitotoksosite Testleri	12
1.2.1.1. MTT Testi	12
1.3. Genotoksosite	13
1.3.1. Genotoksosite Testleri	14
1.3.1.1. Comet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	14
1.4. Hücre Kültürü	16
1.5. V79 Çin Hamster Akciğer Fibroblast Hücre Özellikleri	17
2. GEREÇ ve YÖNTEM	19
2.1. Gereç	19
2.1.1. Kullanılan Gereçler	19
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	20
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	20
2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması	22
2.4. Test Materyallerinin Hazırlanması ve Hücrelere Maruziyeti	23
2.5. Sitotoksosite-MTT Testinin Yapılışı	24
2.5.1. İstatistiksel Değerlendirme	25
2.6. Genotoksik Etkilerin Belirlenmesi: Comet Testinin Yapılışı	25
2.6.1. İstatistiksel Değerlendirme	27
3. BULGULAR	28
3.1. Metanol Maruziyeti ile Sitotoksosite, MTT Testi Sonuçları	28
3.2. Metanol Maruziyeti İle Elde Edilen Comet Testi Sonuçları	30
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	46

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, metanolün farklı dozlarında, V79 Çin hamster fibroblast akciğer hücre hattı üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin (comet testi) araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmamda metanolün metabolitlerinin değil doğrudan doğruya metanolün kendisinin DNA hasarı oluşturma potansiyelinin belirlenmesi ve bu konuda yeni veriler elde edilerek uluslararası literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Deneyimlerini ve bilgisini her daim benimle paylaşan, bu tezimin her aşamasında her daim yanımda olan, çalışması ve disipliniyle örnek bir bilim insanı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yalçın DUYDU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın araştırılması ve yürütülmesinde, deneysel ve yazım aşamalarında yardımlarını esirgemeyen ve bilgi birikiminden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ'a ve laboratuvar sürecinde yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Seda İPEK TEKNECİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Manevi olarak her daim yanımda olan, bu süreçte asla desteğini esirgemeyen canım eşim Gökhan YILMAZ'a, annem Ağca GÜL'e, kardeşlerim Tuğba APAYDIN ve Duygu GÜL'e, canım arkadaşım Buket OKUR ve son olarak biricik kızım Eylül Ada'ya sonsuz minnetlerimi sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH	Alkol Dehidrogenaz Enzimi
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondiyoksit
Comet	Tek Hücre Jel Elektrophorezi
DECOS	The Dutch Expert Committee on Occupational Safety (Hollanda İş Güvenliği Uzman Komitesi)
DINFO	Doğal gıda oluşumu yolu ile günlük alım analizi (Daily intake via food natural occurrence)
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
EPA	Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Ajansı)
ERF	European Ramazzini Foundation (Avrupa Ramazzini Vakfı)
EU	Avrupa Birliği
FDH	Formaldehit Dehidrogenaz enzimi
g	Gram
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure And Applied Chemistry)
kg	kilogram
kw	Kilo Watt
M	Molar
m ²	Metrekare
mg	Miligram
ml	Mililitre
Mm	Milimolar
MTT	Tetrazolyum tuz redüksiyon
ppb	Milyarda bir
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SCE	Kardeş kromotid değişimi (Sister chromatid exchanges)
sn	Saniye
Tail %	Intensity Ortalama kuyruk yoğunluğu (%)
V	Volt
V79	Çin Hamstır Akciğer Hücreleri (Chinese hamster lung cells)

VCF	Volatile compounds in food (Gıdalardaki uçucu bileşikler)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Pektinin yapısı	4
Şekil 1.2. Metanolün metabolizması	5
Şekil 2.1. MTT testinde kullanılan cihazlar; inverted mikroskop ve TC-20 sayım cihazı (sol üst), laminar akış kabini (sağ üst)	25
Şekil 2.2. Comet testinde kullanılan cihazlar; elektroforez cihazı (sol), fluoresan mikroskop (sağ)	27
Şekil 3.1. % Metanol konsantrasyon değerlerine karşılık gelen % canlılık değerleri. Kontrol grubu: DMEM besiyeri ortamında bulunan ve hiçbir kimyasala maruz kalmamış V79 hücre hattı	29
Şekil 3.2. % Metanol konsantrasyon değerlerine karşılık gelen % canlılık değerleri. IC ₅₀ değeri metanolün %2,5 ila %5 konsantrasyon değerine karşılık gelmektedir	29
Şekil 3.3. 96 kuyuculuk plakada 24 saatlik % metanol maruziyetinin V79 hücre hattındaki hücre canlılık görüntüsü (MTT)	30
Şekil 3.4. V79 hücre hattında %metanol maruziyetinin neden olduğu DNA hasarının ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM grafiği. *p<0,05; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One-Way ANOVA). Pozitif kontrol: 50 µM H ₂ O ₂ , 30 dakika	31
Şekil 3.5. %0,5 metanolün V79 hücre hattında oluşturduğu DNA hasarı (Comet Assay IV Programı)	32

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Metanolün özellikleri	1
Çizelge 1.2. Aspartam kullanımına bağlı tahmini metanol maruziyetleri	6
Çizelge 1.3. Doğal gıda kaynaklı tahmini metanol maruziyet seviyeleri	7
Çizelge 1.4. Gıdalarda bulunan metanol düzeyleri	8
Çizelge 1.5. Tüm kaynaklardan elde edilen toplam methanol maruziyeti	10
Çizelge 1.6. Aspartame kaynakli metanolün tüm kaynaklardan maruz kalmaya toplam katkisi	11
Çizelge 3.1. % Metanol konsantrasyon değerlerine karşılık gelen ortalama hücre canlılık verileri	28
Çizelge 3.2. % Metanol maruziyetinin V79 hücre hattında ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. *p<0,05; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One-Way ANOVA)	31

1. GİRİŞ

1.1. Metanol

Metanol, alifatik alkol grubunda bulunan, karbon atomuna bağlı hidroksi grubu içeren bir bileşiktir. Alifatik alkoller, düz zincirli veya dallanmış olabilirler. IUPAC isimlendirilmesine göre hidroksi grubuna bağlı olan ana karbon zincirinin sonuna -ol eki getirilerek okunur. Metanol, gibi alkoller kısa zincirli alifatik alkoller olarak adlandırılırlar (Ott vd., 2000).

Kısa zincirli alifatik alkoller, düşük kaynama noktasına sahip suda iyi çözünen sıvı bileşiklerdir.

Bu grubun en basit alifatik alkolü metanoldür ve reaktivitesi hidroksil grubuna bağlı olarak gerçekleşir (Valentine, 1990).

Oda sıcaklığı ve basıncında renksiz organik bir sıvı olan metanol uçucu özelliktedir (Barceloux vd., 2002). Molekül formülü CH_3OH ve molekül ağırlığı 32,04 g/mol'dür.

Çizelge 1.1. Metanolün özellikleri

Metanolün Özellikleri	
Molekül formülü	CH_3OH
Molekül kütlesi	32,04 g/mol
Görünüm	Renksiz sıvı(şeffaf)
Koku	Kokusuz
Yoğunluk	0,792 g/cm ³
Erime noktası	-97,6 °C (-143,7 °F; 175,6 K)
Kaynama noktası	64,7 °C (148,5 °F; 337,8 K)
Çözünürlük (su içinde)	Karışabilir
LD ₅₀	5628 mg/kg (sıçan, oral)
Buhar basıncı	13,02 kPa (20 °C'de)
Asitlik(pK _a)	15,5

Metanol, organik çözücü olarak sıkça kullanılmasıyla beraber su, alkol ve birçok organik çözücüyle de karışabilir niteliktedir.

1.1.1. Metanol Tarihçesi

Eski Mısırlılar tarafından mumyalama işlemleri yapılırken odun pirolizinden elde ettikleri metanolün kullanıldığı süregelen söylemler arasındadır. Metanol ilk olarak saf biçimde 1661 yılında Robert Boyle tarafından izole edilmiştir. 1834 yılında metanolün ilk kompozisyonları oluşturulmuş ve 1840 yılına gelindiğinde metil kelimesi oluşturulmuş ve metil alkol tanımı ortaya çıkmıştır.

1892 yılında ise metil alkol, METHANOL olarak kısaltılarak adlandırılmıştır.

Alman kimyager Matthias Pier, 1923 yılında kömürden kullanımına bağlı ortaya çıkan karbonmonoksit ve hidrojenin birlikte kullanılmasıyla sentetik amonyak üretmeyi planlarken, metil alkol elde ettiği bir proses geliştirmiştir (Ott vd., 2000).

Metil alkol ya da odun ispiertosu olarak bilinmekte olan metanol, oda sıcaklığında renksiz organik bir sıvıdır. Metil alkol, 1930'lu yıllar dahil olmak üzere o döneme kadar odunun dilatasyonu sayesinde elde edildiği için, insanlar tarafından odun alkolü olarak isimlendirilmektedir. (Taymaz ve Benli, 2009).

Daha sonralarda geliştirilen tekniklerle modern metanol üretimi daha verimli hale getirildi (Keklikoğlu vd., 2007).

1.1.2. Metanolün Bulunduğu Yerler

Günümüzde metanolün, kimya, ilaç, endüstri kolları dahil olmak üzere pek çok kullanım alanı mevcuttur. Boya çıkarıcı madde, endüstriyel çözücü, flim ve boya üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çamur veya lağım suyunda, biyolojik atıklarda ayrıştırılma yolu ile de elde edilir.

Metanol, birçok kimyasal madde yapımında da kullanılmaktadır; otomobil camı için geliştirilen temizleme solüsyonları, gaz hattı soğutucularında, maket uçak yakıtlarında, karbüratör temizlemek için kullanılan kimyasallarda, fotokopiler için kullanılan sıvılarda ve pek çok çözücülerde bulunabilir (Barceloux vd., 2002).

Şarap ve bazı içeceklerin içinde de belirli oranda bulunmaktadır (Caldwell, 1986).

Daha ucuz ve kolay bulunmasından dolayı bazı içkilere de katılımı sağlanarak tüketimi yapılmaktadır (Gossal, 2018).

Ayrıca aminopirin gibi metil grubu bulunduran ilaçları içeren ksenobiyotiklerin, demetilasyonu sonucu oluşan formaldehidin redüksiyonu sonucu metil alkol oluşumu gözlenmektedir (Dorokhov vd., 2015).

Diğer taraftan yapay tatlandırıcı olarak kullanılan aspartamın vücuttaki metabolizması sırasında metanol açığa çıkmaktadır.

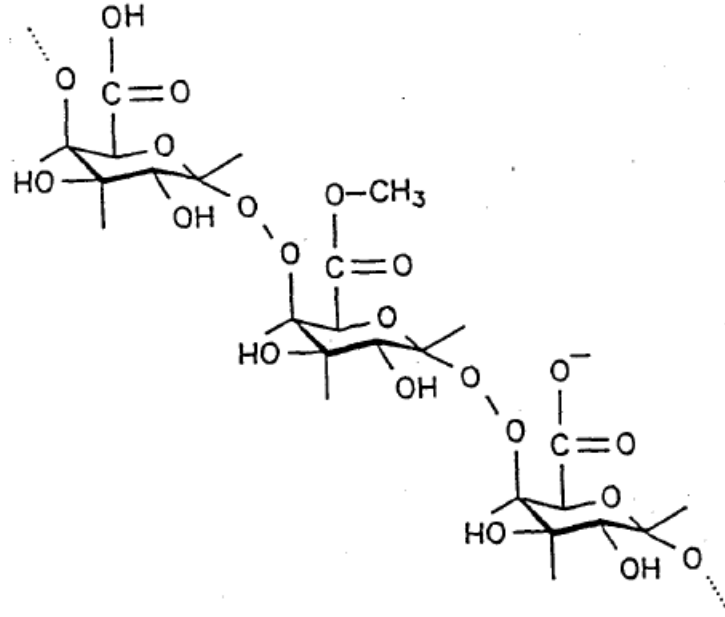
Ayrıca endojen olarak metanol üretimi, diyet ürünlerinin vücudumuzu girdikten sonra ince bağırsak bakterileri ya da hipofiz enzimleri ile de metabolik olarak gerçekleşmektedir (Dorokhov vd., 2015).

Meyve ve sebzelerde bulunan pektinin etkisiyle gastrointestinal yolla üretilen metanolün dışında, direk olarak günlük tükettiğimiz gıdalardan da vücudumuza metanol alımı mevcuttur.

1.1.3. Pektin

Pektin, yapısındaki karboksil gruplarının bir kısmı metil alkol ile esterleşmiş ve birbirine glikozidik bağ ile bağlanmış olan galakturonik asit zinciridir (Ekşi, 1988).

Pektinin günümüzde, α -1,4 bağlı galakturonik asit unitelerinden oluşan “düz bölge” adı verilen bir kısmı ve dallanmış bölge adı verilen, farklı yapıda yan zincirler içeren diğer bir bölgesi bulunmaktadır (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001).



Şekil 1.1. Pektinin yapısı (Okenfull, 1991)

Pektin miktarı meyvelerde bulunma miktarlarına göre farklılık göstermektedir ve meyvede, poligalakturonik asit (PGA) miktarı %0,52-1,21 arasında değişmektedir. Meyvelerdeki pektin miktarlarının değişiklik göstermesinin sebebi, meyvenin çeşidine ve olgunlaşma seviyesidir. Genel anlamda meyvedeki total pektin miktarı, olgunluk seviyesi ilerledikçe azalmaktadır (Ekşi, 1988).

1.1.4. Metanole Maruziyet Yolları

EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)) paneli metanole maruz kalmanın sadece bir gıda katkı maddesi olarak aspartamdan değil, normal bir bileşen olarak diyet yoluyla doğal kaynaklardan, aynı zamanda büyük ölçüde endojen kaynaklardan da (bazal endojen yol, endojen olarak metabolize edilmiş pektin) olabileceğini belirtmiştir (EFSA, 2013).

EFSA'nın yayınladığı veriler doğrultusunda metanolün bulunma miktarları belirtilmiştir.

1.1.4.1. Metanol Metabolizması

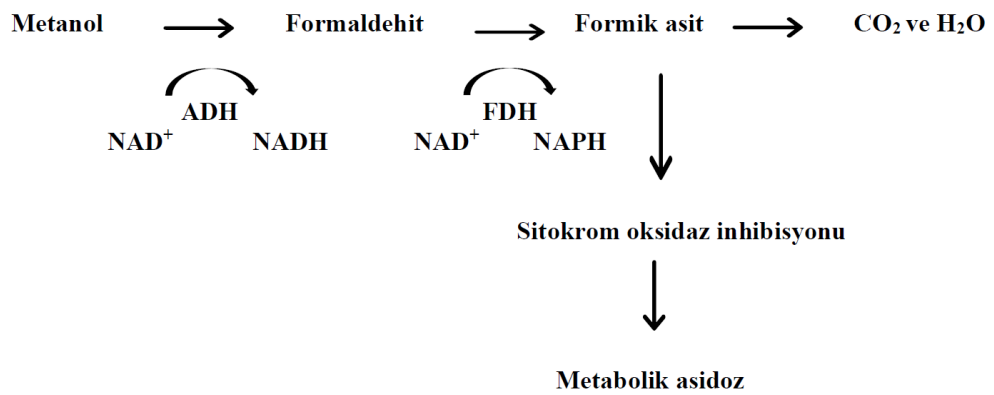
Metanolün vücuda giriş şekli; solunum, oral yol ya da deri yoluyla gerçekleşmektedir (Skrzydłowska, 2003). Metanolün sudaki çözünürlüğünün fazla olması sebebiyle, dokuda

bulunan su miktarıyla, metanolün o dokuda bulunma miktarı doğru orantılıdır (Clary, 2013). Yağlı dokularda ise dağılımı düşüktür. Hacimsel olarak dağılı 0,7 L/kg olarak belirlenmiştir. Oral yolla alımından sonra yaklaşık olarak 10 dakika veya daha kısa bir zaman diliminde mide-bağırdak mukozasında emilir (Ashurst ve Nappe, 2018; Graw vd., 2000).

Metanol, absorpsiyondan sonra karaciğer, gastrointestinal sistem, böbrek, optik sinir ve gözün vitröz sıvısında birikir ve %85-95'i karaciğerden, %10-20'si akciğerlerden, %3'ü ise herhangi bir değişime uğramadan böbrekler tarafından vücuttan uzaklaştırılır (Zakharov, vd., 2015).

Metanolün yıkıma uğraması iki aşama şeklinde gerçekleşmektedir. İlk kısım olan metanolün formaldehite dönüşmesi, %1-2 oranında katalaz enzimi aracılığı ile, %9 oranında CYP450 enzimlerinin karaciğerde yıkıma katkısı ile ve %90 oranında alkolün, sitozolik ADH enzimi aracılığıyla, NAD'ın NADH'a indirgenmesi sonucu formaldehite yükseltgenmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Dorokhov vd., 2015) Yıkımın ikinci kısmında ise formaldehitin formik aside dönüşmesidir (Ashurst ve Nappe, 2018; Clary, 2013) bu aşamada formaldehit, formaldehit dehidrogenaz enzimi aracılığıyla formik asite yükseltgenir (Dorokhov vd., 2015).

Açığa çıkan formik asit idrar yoluyla vücuttan atılabilir veya formik asitten oluşan format, formik asit dehidrogenaz enzimiyle aracılığıyla karbondioksit (CO₂) ve su (H₂O) oluşur ve bu oluşum sonucu açığa çıkan CO₂ ve H₂O solunum yoluyla vücuttan atılır (Ashurst ve Nappe, 2018; Clary, 2013). Metanolün toksik etkisi, doza bağlıdır (Jacobsen vd., 1988). Metanolün metabolizması sonucu açığa çıkan metabolitler, öncelikli olarak Merkezi Sinir Sisteminde, beyin ve retinada toksisiteye yol açmaktadır.



Şekil 1.2. Metanolün metabolizması

1.1.4.2. Gıda Katkı Maddesi Olarak Aspartamdan Kaynaklanan Metanol Maruziyeti

İnsanların metanole maruziyetleri, gastrointestinal sistemdeki aspartamdan salınan metanole bağlı olarak, aspartam içeren ürünler tüketildiği takdirde gerçekleşebilmektedir. Yaklaşık olarak aspartamın %10'u metanol içermektedir.

Hem bildirilen kullanım verileri hemde analitik verilerin kullanılmasıyla aspartamın belirlenen maruziyet seviyelerine dayanarak, beş ayrı popülasyon grubu için yapılan araştırmada, aspartam içeren tüm yiyecek ve içecek uygulamalarından elde edilen tahmini metanol maruziyet seviyeleri, ortalamada 0,05 ile 1,6 mg/kg/gün ve %95 persentil grubunda 0,2 ile 3,7 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir. Metanolün sözü edilen mevcudiyet ve kullanım alanlarındaki durumuna göre, vücudumuza taze sebze ve meyvelerle de girdiği EFSA'nın yayınlarıyla pek çok kısımda desteklenmiştir (EFSA, 2013).

Çizelge 1.2. Aspartam kullanımına bağlı tahmini metanol maruziyetleri (EFSA, 2013).

	Bebek (12-35 ay)	Çocuk (3-9 yaş)	Ergen (10-17 yaş)	Yetişkin (18-64)	İleri yaş (65 yaş ve üstü)
Gıda katkı maddesi olarak aspartam kaynaklı metanol maruziyeti					
Ortama	0,3 - 1,6	0,2 - 1,3	0,1 - ,04	0,1 - 0,9	0,05 - 0,4
Yüksek seviye*	1,2 - 3,7	0,7 - 3,3	0,2 - 1,3	0,3 - 2,7	0,2 - 2,4
Raporlanan kullanım seviyeleri veya analitik verilerin kullanımıyla tahmini maruziyet (beş farklı popülasyon grubu)					
Ortama	0,2 - 1,6	0,2 - 1,3	0,1 - 0,4	0,1 - 0,8	0,04 - 0,4
Yüksek seviye*	0,8 - 3,6	0,6 - 3,2	0,2 - 1,3	0,2 - 2,7	0,1 - 2,4
*%95 persentil					

1.1.4.3. Gıda Alımından Kaynaklanan Metanol Maruziyeti

Metanol kendi başına mevcut olabileceği gibi meyveler, meyve suları, sebzeler, kavrulmuş kahve, bal ve alkollü içecekler gibi gıdalardan da alınabilir. Metanolün, farklı meyve sularındaki konsantrasyonları büyük ölçüde değişiklik göstermektedir (1-640 mg metanol/L) ve genellikle ortalama 140 mg/L'dir (WHO, 1997). Yakın zamanda alınan ölçümler; elma, muz, üzüm ve portakal gibi meyvelerden elde edilen meyve sularının, 8-148 mg/L arasında değişen seviyelerde metanol içerebileceğini doğrulamıştır (Hammerle vd., 2011; Hou vd., 2008; Wu vd., 2007).

Domatesdeki metanol seviyelerine bakıldığında, domates suyunda 240 mg/L'ye kadar çıktığı, doğranmış ve konserve domatesde de 200 mg/kg'a kadar metanol seviyeleri bildirilmiştir (Anthon ve Barrett, 2010; Hou vd., 2008).

Aynı şekilde, sebze sularının (örneğin, yonca filizleri, havuçlar ve ıspanaktan) 53-194 mg/L arasında değişen metanol seviyelerinin olduğu belirtilmiştir (Hou vd., 2008).

Oldukça değişken olan metanol içeriği sadece meyve ve sebzenin türüne, yani işlemiden önce mevcut olan metanole değil, aynı zamanda işleme ve depolama sırasında pektinesterazın etkisiyle pektinden salınan metanole de bağlıdır (Massiot vd., 1997).

EFSA Paneli, gıdalardaki doğal varlığı nedeniyle metanole maruziyeti tahmin etmek için, 1965'ten 2006'ya kadar uzanan makalelerden, gıdalardaki metanol değerleri için, 340 literatür referansından derlenen bir TNO veritabanı olan (2012) VCF'den (Gıdada Uçucu Bileşikler) elde edilen verileri kullanmıştır (EFSA, 2013).

Aynı şekilde EFSA Paneli, ağırlıklı olarak meyve ve meyve bazlı içeceklerde metanol oluşumunun mevcut bilgilerle uyumlu tutarlı olduğunu ve bireysel ürünler için metanol seviyelerinin önemli ölçüde değiştiğini kaydetmiştir.

Ek olarak EFSA, yaptığı incelemelerde, gıdalardaki metanolün nicel ölçümlerinin genel olarak güvenilir olduğunu ve geçmişte kullanılan metodolojik yöntemlerin oluşturduğu verilerin ise makul derecede doğru olarak kabul edilebileceğini düşünmektedir (gıdalarda metanolün belirlenmesi için kullanılan mevcut analitik yöntem GC/MS yöntemidir) (EFSA, 2013).

Çizelge 1.3. Doğal gıda kaynaklı tahmini metanol maruziyet seviyeleri (EFSA, 2013).

	Bebek (12-35 ay)	Çocuk (3-9 yaş)	Ergen (10-17 yaş)	Yetişkin (18-64)	İleri yaş (65 yaş ve üstü)
Doğal gıda kaynaklı metanol maruziyeti					
Ortama	0,2 - 1,4	0,3 - 1,4	0,2 - 0,6	0,3 - 0,6	0,2 - 0,6
Yüksek seviye*	0,9 - 3,8	0,9 - 3,3	0,6 - 1,4	0,7 - 1,6	0,6 - 1,4
*%95 persentil					

Değerler; mg/kg/gün bazındadır.

Yukarıdaki tabloya bakıldığında ortalama grupta metanol maruziyet değerleri 0,2 ile 1,4 mg/kg/gün arasında iken, %95 persentil grubunda ise 0,6-3,8 4 mg/kg/gün'dür. (EFSA, 2013).

Doğal gıda alımıyla metanole maruz kalan ABD'li tüketiciler arasındaki iki grubun, Doğal Gıda Oluşum Yoluyla Günlük Alım Analiz (DINFO) Yöntemi kullanılarak ölçülen metanol değerleri 10,7 ve 33,3 mg metanol/kg/gün olarak rapor edilmiştir (Magnuson vd., 2007). Fakat bu rapordaelde edilen metanol maruziyet seviyelerinin içinde pektinden gelen metanol miktarı hariç tutulduğu için daha düşük veriler elde etmiştir. Bu bilgi ve veriler ışığında EFSA Paneli, elde edilmiş olan bu verileri küresel anlamda elde ettiği tahmini verilerle aynı düzeyde olduğunu belirtmiştir (EFSA, 2013).

Çizelge 1.4. Gıdalarda bulunan metanol düzeyleri (VCF'den temin edilen analitik veriler, 28 Mart 2012, Filer and Stegink, 1989)

Kategori	Minimum-maksimum değerler	Ortalama değer (mg/kg)
İNCİR (Ficus carica L.)	<1—5 ppm	3,00
MUZ (Musa sapientum L.)	15 ppm	15,00
FASÜLYE	1,3 ppm	1,30
SİYAH KUŞ ÜZÜMÜ (Ribesnigrum L.)	4 ppm	4,00
LAHANA(Brassicaoleracea)	0,6ppm	0,60
HAVUÇ (Daucus carota L.)	0,05 ppm	0,03
TURUNÇGİLLER VE MEYVE SULARI	0—213 ppm	106,50
ÜZÜM	0,032—0,04 ppm	<0,04
ÜZÜM SUYU (Filer and Stegink,1989)	12-680 mg/L	346,00
MERCİMEK	4,4 ppm	4,40
SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİ	<0,009 ppm	<0.005
BEZELYE (Pisum sativum L.)	1 ppm	1,00
BÖĞÜRTLEN VE AHUDUDU	7—16 ppm	11,50
SOYA FASÜLYESİ	0,02—6 ppm	3,00
ÇİLEK	0.01—5 ppm	2,50
ÇAY	0,01—1,8 ppm	0,90
DOMATES	2,7—560 ppm	281,40

1.1.4.4. Endojen Yollardan Kaynaklanan Metanol Alımı

Meyve, sebze ve meyve sularından elde edilen metanolün doğrudan katkısına ek olarak, pektinlerden gastrointestinal sistem, karaciğer ve beyin gibi vücudun diğer bölgelerinde endojen olarak da üretilen metanolün varlığı açık olarak bilinmektedir (WHO, 1997).

Yazarlar insan vücudu tarafından üretilen bazal endojen metanol miktarının, 6-12 saatlik bir süre boyunca 300 ve 600 mg metanol/gün (Lindinger vd., 1997) olduğunu ve yine aynı yazarlar, 10 ila 15 g pektin (1 kg elmaya karşılık gelmektedir) yutulduğunda ise 400-1400 mg kişi/gün ek metanol miktarı belirtmiştir.

Altı sağlıklı erkek birey üzerinde yapılan bir çalışmada, günlük endojen metanol üretimini ölçmek için gaz kromografisi yöntemi kullanılmış (Haffner vd., 1997). 22 kadın ve 13 erkek gönüllüden oluşan farklı bir çalışmada bazal endojen metanol üretimi ölçülmüştür. Placebo kontrol ile karşılaştırıldığında, kan metanol seviyelerinde 3,6 µM/saat miktarında doğrusal bir artış ölçülmüştür (Sarkola ve Eriksson,2001). Bu çalışmalardaki verilere dayanarak EFSA, ilk çalışma için 0,77 l/kg metanolün tüm vücut dağılım (VD) hacmindeki (Graw vd., 2000) kan değerlerini, yaklaşık olarak 1,5-6,5 mg/kg/gün veya 107-453 mg/kişi/gün olarak bildirmiş, ikinci çalışma için ise 2,1 mg/kg/gün veya 149 mg/kişi/gün olarak belirtilmiştir.

Panel, bu sonuçlar doğrultusunda yetişkinlerde bazal endojen metanol üretim miktarının 2 ila 9 mg/kg/gün arasında değiştiği sonucuna varmıştır (EFSA, 2013).

Yaşlılarda, dinlenme metabolizma hızı yaşla birlikte azaldığı için endojen metanol üretiminin %15'e kadar daha az olabilmektedir (Speakman ve Westerterp, 2010). Bebekler ve 18 yaşından küçük çocuklarda, yetişkinlere göre vücut kütle indeksi başına düşen daha yüksek bir metabolizma hızı vardır (Wang, 2012).

Panel tarafından pektinlerden metanole maruz kalma olayı, çiğ gıda tüketimi ile olduğu tahmin edilmektedir.

Panel, pektin oluşumunun ağırlıklı olarak meyve ve sebzelerde olduğunu belirtmiştir. Lindinger vd. (1997) tarafından yapılan çalışmalarda pektinden metanole dönüşüm miktarı, yaklaşık 10 gr pektinden ortalama 900 mg ek metanol olarak kaydedilmiştir.

EFSA, sadece tek yönlü metanol maruziyetinin olamadığı aynı zamanda endojen metanol üretimi ile birlikte ekzojen metanol maruziyetinde aynı anda yaşanabileceğini vurgulamıştır.

1.1.4.5. Endojen ve Ekzojen Kombinasyonu Şeklindeki Alımdan Kaynaklanan Metanol Maruziyeti

Panel, beş popülasyon grubunda yaptığı çalışmada tüm kaynaklardan metanole maruz kalmanın (bazal endojen yol ve endojen olarak metabolize edilmiş pektin, doğal gıdalardan alım ve gıda katkı maddesi olarak aspartam) ortalamada 8,4 ila 18,9 mg/kg/gün arasında olduğu, bu maruz kalma seviyesinin yüksek seviyede maruz kalanlar grubunda (%95 persentil) 15,1 ila 35,1 mg/kg/gün arasında değiştiğini açıklamıştır.

Çizelge 1.5. Tüm kaynaklardan elde edilen toplam metanol maruziyeti (EFSA, 2013).

	Bebek		Çocuk		Ergen		Yetişkin		İleri yaş (65 yaş ve üstü)	
	Ortalama	Yüksek seviye*	Ortalama	Yüksek seviye*	Ortalama	Yüksek seviye*	Ortalama	Yüksek seviye*	Ortalama	Yüksek seviye*
Bazal endojen kaynaklı metanol maruziyeti	5,5	9	5,5	9	5,5	9	5,5	9	5,5	9
Metabolize olan pektin kaynaklı endojen metanol maruziyeti	7,9 - 12,5	15,2 - 24,1	3,9 - 10,5	7,7 - 20,0	2,1 - 5,0	5,3 - 10,5	2,4 - 4,2	5,1 - 7,9	3,0 - 4,5	6,0 - 8,1
Doğal gıda kaynaklı metanol maruziyeti	0,2 - 1,4	0,9 - 3,8	0,3 - 1,4	0,9 - 3,3	0,2 - 0,6	0,6 - 1,4	0,3 - 0,6	0,7 - 1,6	0,2 - 0,6	0,6 - 1,4
Doğal gıda ve endojen kaynaklı metanol maruziyeti (bazal ve pektin kaynaklı)	13,8 - 18,4	25,2 - 34,2	9,8 - 17,4	17,2 - 31,5	8,0 - 10,7	15,0 - 19,9	8,2 - 10,3	14,7 - 18,1	8,9 - 10,6	15,7 - 17,7
Gıda katkı maddesi olarak aspartam kaynaklı metanol maruziyeti	0,3 - 1,6	1,2 - 3,7	0,2 - 1,3	0,7 - 3,3	0,1 - 0,4	0,2 - 1,3	0,1 - 0,9	0,3 - 2,7	0,05 - 0,4	0,2 - 2,4
Tüm etkenlerin birlikte oluşturduğu toplam metanol maruziyeti	14,7 - 18,9	26,3 - 35,1	10,4 - 17,6	18,1 - 31,8	8,4 - 11,0	15,5 - 20,2	8,4 - 10,3	15,1 - 18,2	9,0 - 10,7	15,8 - 17,9
*%95 persentil										

Değerler; mg/kg/gün bazındadır.

Panel, genel popülasyonda ortalama aspartam tüketimi için, aspartamdan metanole genel maruziyetin, tüm maruziyetlere ek katkısını %1 ile %10 arasında değiştiğini belirtmektedir. Ayrıca bu tahminden de yola çıkarak panel, doğal gıda oluşumundan kaynaklanan metanole maruziyetin, endojen yollardan maruz kalma ile karşılaştırıldığında minör katkıda bulunan kaynak olduğunu göstermiş (<%10) ve aspartamdan kaynaklanan metanol maruziyetinin ise gıda yoluyla alınan metanol maruziyetiyle hemen hemen aynı olduğunu açıklamıştır (EFSA, 2013).

Çizelge 1.6. Aspartam kaynaklı metanolün tüm kaynaklardan maruz kalmaya toplam katkısı (EFSA, 2013).

	Bebek (12-35 ay)	Çocuk (3-9 yaş)	Ergen (10-17 yaş)	Yetişkin (18-64)	İleri yaş (65 yaş ve üstü)
	ortalama	ortalama	ortalama	ortalama	ortalama
	%				
Tüm etkenlerden (endojen+doğal gıda+ekzojen) kaynaklanan metanol maruziyetine aspartam kaynaklı metanolün katkısı	1,7 - 9,2	1,6 - 9,7	0,8 - 4,8	0,7 - 9,4	0,5 - 4,7
Tüm etkenlerden kaynaklanan metanol maruziyetine endojen kaynaklardan (bazal + pektin) metanol katkısı	84 - 95	86 - 94	91 - 96	87 - 96	91 - 97
Tüm etkenlerden kaynaklanan metanol maruziyetine doğal gıdalardan kaynaklanan metanol katkısı	1,2 - 7,6	2,1 - 7,8	1,9 - 5,5	2,7 - 6,2	2,4 - 5,3

1.2. Sitotoksisite

Sitotoksisite terimi, hücrelerin yapısal işlevlerinde meydana gelen hasar olarak tanımlanmaktadır (Helgason ve Miller, 2005).

Sitotoksisite, kimyasal bir maddenin dozuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapılan deneyler esnasında, biyolojik, kimyasal veya fiziksel maruziyetler sonrasında hücrelerin canlı olup olmadıkları önemli bir basamak olup, çalışmaların sonunda canlı ve ölü hücre durumunu belirlemek büyük önem taşımaktadır (Nicholson, 2020).

Sitotoksisite testler ile hücrelerdeki yaşamsal faaliyetlerdeki meydana gelen değişikliklerle beraber hücrelerdeki hasar durumu ve derecesi belirlenir (Tuncer ve Demirci, 2011). Ayrıca bu testlerle beraber, bir kimyasalın toksik etkilerinin değerlendirilmesi de yapılmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

Hücreye dayalı sitotoksik testler, hem çalışmalardaki kolaylık hem de in vivo testlerle olan sonuç uyumluluğundan dolayı hayvan deneylerine alternatif olarak geliştirilmiş ve toksikolojik deneylerde sıklıkla kullanılmaktadır.

1.2.1. Sitotoksitite Testleri

Kimyasalların hücrelerde ve dokularda meydana getirdiği etkilerin değerlendirilmesinde sitotoksik testleri kullanılmaktadır.

Hücreler, toksik maddeye maruziyetlerinden sonra apoptoz, otofaji ve nekrotik olaylar sonucu ölebilir ya da sitotoksik etki nedeniyle canlılık özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi vd., 2009).

Sitotoksitenin belirlenmesinde in vitro olarak farklı metodlar ve yöntemler geliştirilmiştir. Bu testler ile hücrelerin yaşamsal faaliyetlerindeki değişimler ve hücre hasar dereceleri belirlenmektedir. Sitotoksitite testleri, hücre bölünmesi, hücre canlılığı, hücre zarı ve organel hasarı, DNA ve protein sentezi gibi olaylar hakkında bilgi edinmemizi sağlar (Tuncer ve Demirci, 2011).

Sitotoksitite belirleme metodları genel olarak; Kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (Crouch vd., 1993; Fan ve Wood, 2007; Longo-Sorbello vd., 2006).

1.2.1.1. MTT Testi

Kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolyum bromür), canlı hücrelerdeki mitokondriyal enzim aktivitesiyle formazan kristallerinin oluşması prensibine dayanır (Meerloo vd., 2011).

MTT testi, hücrelerin metabolik canlılığın belirlenmesinde kullanılan in vitro bir yöntemdir. Mossman ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem, meydana gelen sitotoksiteyi nicel olarak ölçmede başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Mossman ,1983).

MTT ve diğer tetrazolyum tuzları, ektron taşıma sistemleri tarafından suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgenirler. Sarı renkli MTT tuzu, mitokondrinin matriksinde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerine bağlanırlar ve canlı hücrelerde bulunan bu enzimler, mtt tuzunu, mitokondriyal aktiviteleri sayesinde tetrazolyum halkasını açarak suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürürler. Organik çözücülerde kolayca çözünebilen formazan kristalleri,

konsantrasyonlara bağlı olarak farklı dalga boylarında (500-600) absorbands değeri verirler (Holst-Hansen ve Br  nner, 1998).

Organik   z  c   olarak genelde DMSO veya izopropanal tercih edilir. Formazan kristalleri çözündüklerinde aldıkları renk konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Karaaslan vd., 2019).

Canlı hücrelerdeki meydana gelen bu mitokondriyal dönüşüm, toplam canlı hücre sayısı ile paralel olduğundan en çok kullanılan in vitro sitotoksik test olarak mtt testi tercih edilmektedir (Karaaslan vd., 2019; Meerloo vd., 2011). Aynı zamanda güvenilir, hızlı ve tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olması tercih edilme sebepleri arasındadır (Kumar vd., 2018).

1.3. Genotoksisite

Genetik toksisite ya da diğer bir deyişle genotoksisite, hücre DNA'sında, kromozomlarda ve DNA   retiminde meydana gelen hasarları ve değimleri ifade eden genel bir tanıdır (Mouchet vd., 2005).

Genotoksik maddelerin varlığına bağlı olarak, gen aktarımından sorumlu olan DNA pek çok hasara uğrayabilir. DNA da meydana gelen bu hasarlar; tek ve çift zincir baz hasarı, oksidatif DNA baz hasarı, DNA'daki yanlış baz eşleşmeleri ve kromozomal bozukluklar bunlardan bazılarıdır (Fidan, 2008; Umbuzeiro vd., 2017).

DNA hasarı nedeni, replikasyon sırasında yaşanan yanlış baz eşleşmeleri veya hücrelerde metabolik olaylar sırasında açığa çıkan toksik materyaller ile etkileşimi olabileceği gibi radyasyon, ilaç kullanımı ve ağır metal etkisi, diğer nedenler arasındadır (Atmaca ve Aksoy, 2009; Kulaksız ve Sancar, 2007).

DNA hasarı endojen ve ekzojen kaynaklı DNA hasarları olmak üzere iki sınıfta toplanır. Endojen DNA hasarı nedenleri, hücrelerin yapısında bulunan su ve reaktif oksijen türlerinin hidrolitik veya oksidatif reaksiyonlar vermesi iken, ekzojen DNA hasarı nedenleri ise UV, iyonize radyasyon, alkileyici ajanlar, çevresel stres gibi çeşitli dış etkenlerdir (Chatterjee ve Walker, 2017).

DNA da meydana gelen hasarlar, DNA onarım mekanizması tarafından tamir edilebilse de bazen bu tamirlerin yanlış yapılması veya DNA hasarlarının devam etmesi durumunda mutasyonlara ve hücre ölümlerine neden olmaktadır (Bankoglu vd., 2021; Fidan, 2008).

DNA hasarı ile ilgili sorunlar çözülmediği durumda, hücreler planlanmış hücre ölümüne başvururlar. Ancak bazı durumlarda hem DNA tamir mekanizmaları hemde apoptoz yolağı genotoksisiteye karşı etkisiz kalmaktadır. DNA tamirinin yanlış yapılması ya da hasarın devam etmesi durumunda bu süreç mutasyonlara, malignant hücre dönüşümlerine ve hücre ölümüne kadar gidebilmektedir. Bu durumdan ötürü, genotoksik maddelerin potansiyellerinin belirlenmeleri hem mutajenik hem de karsinojenik etkilerinin anlaşılması açısından önemlidir (Bankoglu vd., 2021; ECVAM, 2013).

1.3.1. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite testleri, DNA hasarının varlığında kullanılan testlerdir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). İn vitro olarak yapılan testler, kromozomal ve gen hasarlarını belirlemede kullanılsa da toksikokinetik kısımda yetersiz kalabilmektedir (Umbuzeiro vd., 2017). Bundan dolayı in vitro süreçleri değerlendirmede aşaması in vivo hayvan testleri ile desteklenmeye devam edilir. Bu durumun amacı, in vitro test sonuçlarını hayvan deneyleri ile desteklemektir. Farklı ülkelerde hayvan kullanımının önüne geçmek amacıyla yasaklanan in vivo test kullanımları, in vitro testlerin performansı arttırarak ve test sonuçlarının kesinliğini kanıtlamak için farklı testlerle desteklenerek azaltılmalıdır. Bu şekilde hayvan kullanım sayısı azaltılmaya yönelik olacaktır ve deney hayvan sayısı küçültülerek ve farklı test sonuçlarının çalışmaya dahil edilmesiyle sağlanmış olacaktır (Corvi ve Madia, 2017).

Hücrelerde genotoksik etkiyi belirlemek amacıyla kullanılan test yöntemleri; mikroçekirdek analizi, kromozom aberasyonu analizi, kardeş kromatid değişimi analizi, bakteri mutasyon testi ve tek hücre jel elektroforezi (Comet yöntemi)'dir.

1.3.1.1. Comet Testi

Genotoksik test olarak kullanılan “Tek Hücre Jel Elektroforezi/Single Cell Gel Electrophoresis” (SCGE) ya da diğer adıyla Comet Assay, DNA bütünlüğünü tek hücre bazında belirleyen, ucuz, hassas ve hızlı bir test yöntemidir (Fidan, 2008; Gajski vd., 2021).

Comet test yöntemi, ilk kez Rygberg ve Johanson adlı bilim insanlarının 1978’de hafif alkali şartlar altında hücreleri lize ederek DNA zincir kırıklarını belirlemeleriyle ortaya çıkmıştır. Daha sonra, Ostling ve Johanson adlı bilim insanları tarafından 1984 yılında da modifiye edilerek kullanılmıştır (Martin vd., 1993). Ancak comet terimi ilk kez Oliv ve ark tarafından 1990 yılında DNA hasarının agaroz jelde kuyruklu bir yıldız şekline benzetilmesiyle ortaya çıkmıştır (Møller, 2018).

Comet testi, genotoksik bir maddenin etki mekanizması bilinmeden, tek hücreye ya da hücre süspansiyonlarından elde edilen hücrelere uygulanarak DNA hasarlarını belirlemeye olanak tanır (Bolognesi vd., 2019).

Bu tezde kullandığımız comet testi, hücrelerde DNA hasarına neden olan genotoksik madde maruziyetlerinin bir göstergesidir.

Bu testin prensibi, negatif yüke sahip olan hasarlı DNA’nın elektroforatik yükte anoda doğru göç ederek tayin edilmesine dayanır. Hasar almış olan DNA kompakt bütünlüğünü kaybetmiş olmasından dolayı DNA zincirlerinde gevşeme olur, elektroforez çözeltisine akım uygulanmasıyla negatif yüklü olan DNA anoda doğru göç etmeye başlar (Bolognesi vd., 2019). Göç sırasında bütünlüğü bozulmamış DNA kuyuksuz halinde ilerlerken, hasar almış DNA parçalanmış yapıları gereği arkasında bir kuyruk görüntüsü bırakarak ilerler.

Alkali comet testi yöntemimde, hücreler agaroz jelle kaplı olan slaytlara yayılır. Daha sonra bu hücrelere yüksek tuz ve deterjan muamelesi yapılarak lizis aşaması gerçekleştirilmiş olur. Bu aşamada ki amaç DNA’nın etrafındaki proteinlerin yapısını bozarak nükleer matrikste DNA’nın süpersarmal halkalarını içeren nükleotidler oluşturmaktır. Gevşeyen DNA sarmalı DNA kırıkları varlığında, yüksek pH’lı elektroforez aşamasında anoda doğru kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Bunun nedeni hasarsız DNA molekülü kuyruk biçiminde bir iz bırakmadan yavaş hareket ederken, hasar almış olan DNA süpersarmal yapısından ayrılan kırılmış DNA parçacıklarının anoda doğru hızlı göç etmeleridir (Klaude vd., 1996; Singh vd., 1988; Tice vd., 1990) nötralizasyon işlemi yapıldıktan sonra fluroesans boyama yapılarak floresan mikroskobunda değerlendirme kısmı yapılır (Collins, 2004; Gajski vd., 2021; Singh vd.,1988).

DNA kırıklarının sıklığı ne kadar fazla ise o oranda kuyruk yüzdesi alınması en güvenilir parametre olarak kabul edilir (Collins ve Oscoz, 2008).

Nötral alanda yapılan comet testi uygulamaları çift zincir kırıklarını tespit etmeye yararken, alkali comet tekniği hem çift zincir hem de tek zincir kırıklarını tespit etmede, DNA-DNA ya da DNA-protein çapraz eşleşmelerini, tamamlanmamış tamir onarımlarının tespitini de yapmaktadır (Lu vd., 2017). Comet testinin her iki yönteminde de DNA hasarının kantitatif olarak ölçümü yapılmaktadır.

Comet testinin kullanım alanları da oldukça fazladır. Başlıca uygulama alanları; genotoksik maddelerin değerlendirilmesi, çevresel maruziyet değerlendirilmesinde, mesleki maruziyetlerde, ilaç izleme çalışmalarında, DNA tamir kapasitesinin belirlenmesi, ekotoksikoloji alanı gibi alanlardır (Lu vd., 2017; Üzen vd., 2019).

1.4. Hücre Kültürü

İlk olarak hücre kültürü, 1907 yılında Harrison tarafından, hayvan hücrelerinin dışarı ortamında incelenebilmesi için keşfedilmiştir (Koçaklı vd., 2015).

Hücre kültürü, hücrelerin dokulardan, hücre süslerinden ya da hücre hatlarından doğrudan ya da enzimatik yollarla, hücrelerin yapay ortamda kendileri için gerekli olan büyüme faktörleri ve besin maddeleriyle beraber çoğaltılma işlemidir (Anton vd., 2015).

Hücre kültürleri, hücrelerin biyolojik ve fizyolojik faaliyetlerini ve süreçlerini belirlemede önemli bir yeri olduğundan, ilaç geliştirme süreçleri belirlemede, kök hücre ve kanser çalışmalarına önemli katkı sağlamışlardır (Jensen ve Teng, 2020).

Hücre kültürleri, gerekli ortam sıcaklığı ve nemi (37 derece), %5'lik karbondioksit düzeyi, hormonların etkilenmemesi için yeterli besiyeri pH'sı, büyüme faktörleri ve besin maddeleri içeren besiyeri yerinde çoğalırlar. Gerekli koşulların sağlanması durumunda hücreler, büyüme ortamına adherent ya da süspanse halde çoğalırlar (Anton vd., 2015; Haboken vd., 2015).

Sitotoksikite testlerinde farklı hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu hücre kültürleri, primer hücre kültürleri ve devamlı hücre hatlarıdır. Primer hücre kültürleri, sınırsız bir şekilde çoğalma özelliği gösteremeyen ve 50 jenerasyona kadar yaşayabilen hücrelerdir ve dış eti fibroblastları, düz kas hücreleri gibi dokulardan izole edilirler (Masters ve Stacey, 2007).

Primer hücrelerin değişikliğe uğraması sonucu oluşan sınırsız büyüyebilme özelliği gösteren hücre hatları ise sınırsız hücre hatları olarak isimlendirilir.

İn vitro çalışmalarda genellikle tercih edilen devamlı hücre hatları; fare akciğer fibroblast hücreleri (V 79), embriyonik fibroblast hücreler (3T3), fare fibroblast hücreleri (L-929) ve insan serviks epitelyal kanser hücreleri (HeLa) örnek gösterilebilir (Tuncer ve Demirci, 2011).

1.5. V79 Çin Hamster Akciğer Fibroblast Hücre Özellikleri

Çin Hamster Akciğer fibroblast hücresi (V79), akciğerlerden elde edilen ($2n=22$) adherant özellikte fibroblast hücrelerdir. Besiyerinde kolaylıkla çoğalabilen bu hücrelerin G1 faz evresi ya çok kısa sürer ya da gerçekleşmez. Tositite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Chaung vd.,1997; Doehmer, 1993).

Tezimizde elde edeceğimiz in vitro sitotoksik ve in vitro genotoksik bulgulardan sonra, tartışmalı bir konu olan, doğrudan metanol alımının MTT testi ile elde edilen sitotoksik etkilerinden sonra alkali comet test tekniği kullanılarak metanolün DNA hasarı üzerine genotoksik etkileri yorumlanacaktır. Tezimizde elde edilecek veriler, daha önceki metanolün genotoksik olup olmadığı yönündeki tartışmalara bilimsel destek sağlayacak olup, bu konuda yapılacak olan yeni çalışma sonuçları uluslararası literatür için değerli olacaktır.

Belirtmiş olduğumuz hedefler doğrultusunda tez çalışmamız aşağıdaki şekilde planlanmıştır;

- V79 hücre hattında insanların maruz kalabileceği metanol konsantrasyonları test edilerek sitotoksik etkilerin başladığı dozlar tespit edilecektir.
- Sitotoksik olan dozlar tespit edildikten sonra sitotoksik etkilere görülmeyen dozlarda metanolün genotoksik etkisinin (Comet testi) olup olmadığı incelenecektir.
- V79 hücrelerinde MTT testi yöntemi kullanılarak %0,1, %0,25, %0,5, %1, %2,5, %5, %10, %25 metanol konsantrasyonlarında sitotoksik etkisinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmektedir.

- V79 hücrelerinde Comet testi yöntemi kullanılarak %0,1, %0,25, %0,5, %1 metanol konsatrasyonlarının oksidatif DNA hasarına yol açıp açmadığı incelenecektir.

Günlük yaşantımızda pek çok gıda ile düşük oranlarda da olsa metanole maruz kalınmaktadır. Ancak metanolün genotoksik etkileri ile ilgili bilgiler literatürde yok denecek kadar azdır. Bu çalışma ile literatürdeki bu eksikliğin giderilmesi hedeflenmiştir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Gereçler

- DMEM (SARTORIUS-Biological Industries, İsrail)
- Tripsin-EDTA (SARTORIUS-Biological Industries, İsrail)
- L-Glutamin-Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD)
- Fötal Bovin Serum (FBS) (Biological Industries, İsrail)
- Fosfat tamponu çözeltisi (PBS) (Sigma-Aldrich, ABD)
- MTT (Sigma-Aldrich, ABD)
- Tripan mavisi (Sigma-Aldrich, ABD)
- Na₂EDTA (Amresco, ABD)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Hidroklorik asit (Merck, Almanya)
- Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)
- Sodyum klorür (Amresco, ABD)
- Sodyum lauril sarkosinat (Amresco, ABD)
- Tris (Merck, Almanya)
- Triton x-100 (Merck, Almanya)
- Normal erime noktalı agar (NMA) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Düşük erime noktalı agar (LMA) (Sigma-Aldrich, ABD)
- Etidium bromür (Sigma-Aldrich, ABD)
- H₂O₂ (Sigma-Aldrich, ABD)
- Metanol RPE (Carlo Erba Reagents, Fransa)

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

- Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
- Karbondioksit inkübatörü (Heal Force HF240, Çin)
- Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur)
- İnverted Mikroskop (Micros MCX 7600, Avusturya)
- Floresan Mikroskop (Comet testi yazılım programı-Comet Assay IV ile)
- pH metre cihazı (WTW pH 330i, Almanya)
- Su banyosu (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
- Sterilizatör (Sanyo MAC 235EX, Japonya)
- Derin Dondurucu (-80°C) (Scancool, Almanya)
- Hassas terazi (Sartorius CP225D, Türkiye)
- Buz makinası (Hoshizaki, Avrupa)
- Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)
- Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Multiskan Go Mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific, ABD)
- Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd., UK)

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

DMEM besi yeri: Kullandığımız DMEM'in içine, %10 FBS ve %1 oranında Penisilin-streptomisin ilave edilerek +4°C'de saklaacak. Deney zamanı, önceden 37 °C'ye getirildikten sonra kullanıldı.

Tripsin Nötralizasyon Çözeltisi (TNS-Stop Medyum): %60 DMEM ve %40 FBS karıştırıldıktan sonra +4 °C'de saklandı ve Deney zamanı, önceden 37 °C'ye getirildikten sonra kullanıldı.

Nötralizasyon çözeltisi: 1 litre çözelti için 5 gram Tris tartılarak distile suda çözülecek ve pH=7,5'e ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

Lizing stok çözeltisi: 100 mM Na₂EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris tartılarak distile suda çözülecek ve pH=10'a ayarlandı. pH ayarından sonra üzerine %1 sodyum lauril sarkosinat ilave edildi ve 1-2 gün boyunca karışmaya bırakıldı. Stok olarak hazırlanan bu çözeltiye deney günü taze bir şekilde %1 oranında triton ve %10 oranında DMSO ilave edildikten sonra +4 °C'de soğutularak kullanıldı.

Elektroforez çözeltisi: 1 mM miktarında Na₂EDTA ve 300 mM NaOH tartılarak distile suyun içinde çözüldü. Deney günü taze olarak hazırlanması gereken bu çözeltinin pH'sı>13 olacak şekilde ayarlanıp, +4 °C'de soğutulduktan sonra kullanıldı.

Normal erime noktasına sahip agar (NMA): normal erime noktasına sahip agarın %1'lik oranda çözeltisi hazırlandı. Bunun için 1 gram NMA 100 mL PBS ile çözülerek hazırlandı. NMA çözeltisinin sıcaklığı 100 °C'ye getirildi. Lamlar hazırlamış olduğumuz %1'lik NMA çözeltisinin içine koyuldu ve ön yüzlerinin agar ile kaplanması sağlandı ve oda sıcaklığında 1-2 gün boyunca lamlar kurutuldu.

Düşük erime noktasına sahip agar (LMA): %0,75 oranında olacak LMN çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı ve ardından +4 °C'de deneyde kullanılacağı süreye kadar saklandı. Deney günü agarın mikrodalgada çözülmesi sağlandıktan sonra 37 °C'ye getirilerek kullanıldı.

PBS çözeltisi: Hazır PBS tabletler distile suda çözülerek hazırlandı.

Etidium bromür çözeltisi: 200 µg/ml stok çözeltisi distile suda çözülerek hazırlanan stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. Lamların boyanması sırasında 1:10 seyreltilecek ve 20 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra Mikroskop altında hücre sayımı sırasında her bir lam üzerine 60 µl damlatılıp lamların üzerine lamel kapatıldı.

MTT çözeltisi: 100 mg MTT tartıldı. Karanlıkta 20 mL steril PBS'de laminar akış kabini altında çözülerek filtreden geçirildi ve +4 °C 'de saklandı.

2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması

- V79 hücre hattı (Hamster lung fibroblast cells) -80°C'den çıkartıldı.
- -80°C'den çıkartılan hücreler 37 °C'de hızlıca çözündükten sonra laminar akış kabini içerisinde 15 ml'lik steril santrifüj tüpündeki 9 ml (37 °C) DMEM besi yeri içerisine aktarımı yapıldı.
- Daha sonra 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- Üst faz, alttaki hücre pelletine zarar vermeden pastör pipet aracılığıyla steril koşullarda atıldı ve alt fazda kalan hücrelerin üstüne yaklaşık 5-6 ml DMEM medyum ilavesi yapılarak, hücrelerin DMEM içerisinde pipetle çek-bırak işlemi yapılarak homojen bir şekilde dağıtılması sağlanmış oldu. Ardından 25 cm²'lik flasklara ekilerek ve 37°C, %5 CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

- Hücrelerin düzenli bir şekilde çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek için iki günde bir hücreler mikroskop altında kontrol edildi.

Hücrelerin Pasajlanması;

- Flask içerisindeki DMEM besi yeri aspire edildi.
- Önceden ısıtılan (37°C) 2 ml tripsin/EDTA T25 flask içerisine aktarıldı ve 37°C'de 2-3 dakikalık sürede hücrelerin flask yüzeyinden kalkması için beklenildi.
- Mikroskop altında hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra tripsinin çalışmasını durdurulmak amacıyla 2 ml stop medyum çözeltisi ilave edildi.
- ilave edilen stop mediumundan sonra 4 ml'lik hücre süspansiyonunun, 15ml'lik tüpe aktarımı yapıldı.
- 1000 rpm oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha sonra üst faz, tüpün dibindeki hücre pelletine dokunmadan pastör pipet ile atıldı.
- Üst faz atıldıktan sonra pelletin üzerine yaklaşık 5 ml DMEM (37°C) ilavesi yapıldı.

- Pastör pipet aracılığı ile çek-bırakışlemleri yapılarak karıştırılan hücrelerin sayımı TC-20 cihazında yapıldı. Bunun için 20 µL Tripan mavisi içerisine 20 µL hücre süspansiyonu ilave edildi ve hücre sayım lamına 10 µL hücre süspansiyonu + tripan mavisi karışımı yayıldı.

- Bir sonraki pasaj için 15 ml DMEM medyum içerisinde 1.500.000-2.000.000 hücre olacak şekilde T75 flask içerisine hücreler ekildi.

2.4. Test Edilecek Metaryalin Hazırlanması ve Hücrelere Maruziyeti

Test edilecek Metanol yüzdesinin ayarlanması

Sitotoksikite (MTT) testi için:

Tez çalışmamızda hücrelere maruz bırakılacak %metanol değerleri aşağıda belirtildiği şekilde olmuştur;

- %0,1 Metanol: 9,990 ml besiyeri (DMEM) içerisine 10 µL metanol ilave edildi.
- %0,25 Metanol: 9,975 ml besiyeri (DMEM) içerisine 25 µL metanol ilave edildi.
- %0,5 Metanol: 9,950 ml besiyeri (DMEM) içerisine 50 µL metanol ilave edildi.
- %1 Metanol: 9,90 ml besiyeri (DMEM) içerisine 100 µL metanol ilave edildi.
- %2,5 Metanol: 9,75 ml besiyeri (DMEM) içerisine 250 µL metanol ilave edildi.
- %5 Metanol: 9,5 ml besiyeri içerisine 500 µL metanol ilave edildi.
- %10 Metanol: 9 ml besiyeri içerisine 1 ml Metanol ilave edildi.
- %25 Metanol: 7,5 ml besiyeri içerisine 2,5 ml metanol ilave edildi.

MTT testinden elde edilen sonuçlara göre comet testi için hücrelerin maruz kalacağı %metanol değerleri %0,1, %0,25, %0,5 ve %1 olarak belirlenmiştir.

Comet testinde pozitif kontrol olarak 50 µM H₂O₂ çözeltisi seçilmiştir.

H₂O₂ çözeltisi: 1 Molar H₂O₂ stok çözeltisi distile su içerisinde deney günü taze olarak hazırlanacak. Hazırlanan bu stok çözeltiden 10 µL alınıp üzerine 190 µL distile su ilave edilecek. Böylece 0,05 Molar stok H₂O₂ çözeltisi hazırlanmış olacaktır. Hücreler 0,05 Molar H₂O₂ çözeltisine %0,1 oranında maruz bırakılmış olacaktır.

2.5. Sitotoksite-MTT Testinin Yapılışı

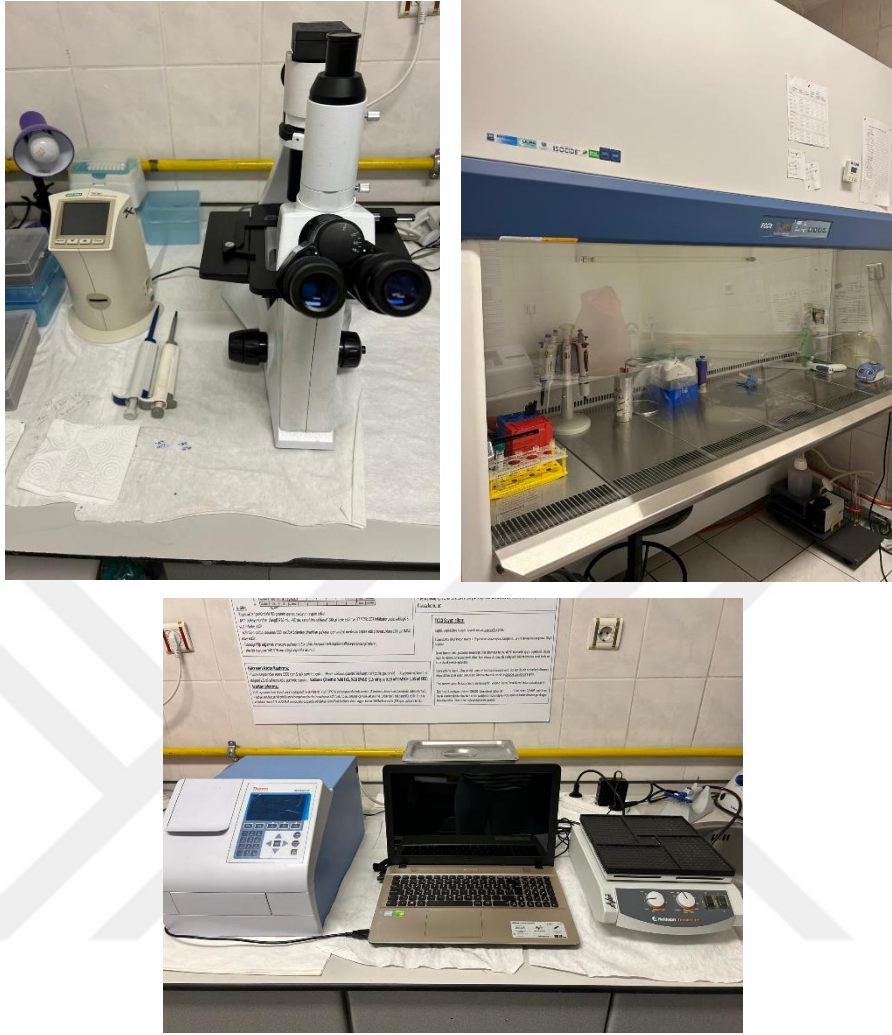
V79 Çin Hamster Akciğer fibroblast hücrelerine, sekiz farklı %'lik konsantrasyonlarda metanol uygulaması yapıldı. V79 hücreleri üzerinde çalışmış olduğumuz konsantrasyon değerleri, kan metanol seviyeleri göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

MTT testi için kullanacağımız hücrelerin ml deki sayısı belirlendi.

İlk gün hücreler (V79) 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 4000 hücre/200 µL DMEM olacak şekilde ekildi. Ekim yapılmış olan plakalar 24 saatlik zaman diliminde 37°C'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

24 saat sonra hücreler, tez çalışmamız için belirlenen % metanol değerlerine (%0,1, %0,25, %0,5, %1, %2,5, %5, %10, %25) maruz bırakıldı. 96 kuyucuklu plakanın 1. ve 2. sütunlarına sadece besiyeri ilave edilirken, 3. ve 12. sütunlarda sadece hücre+DMEM konuldu. 4.-11. sütun arasına azalan konsantrasyondan artan konsantrasyona doğru hücreler metanole maruz bırakıldı.

24 saatlik maruziyet süresinin ardından tüm kuyucuklar aspire edildi. Bütün kuyucuklara daha önceden filtreden geçirilerek hazırlanan 0,5 mg/mL MTT ilave edilerek 2 saat boyunca 37°C %5 CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı (2 saat beklenmesinin nedeni, formazan kristallerinin oluşum süresidir). İnkübasyon süresinin sonuna gelindiğinde tüm kuyucuklardaki MTT aspire edilecek ve oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözüldü. Oluşan rengin şiddeti mikropilaka okuyucuda 540 nm'de ölçümü yapıldı.



Şekil 2.1. MTT testinde kullanılan cihazlar; inverted mikroskop ve TC-20 sayım cihazı (sol üst), laminar akış kabini (sağ üst), mikrolaka okuyucu ve çalkalayıcı (alt resim).

2.5.1. İstatistiksel Değerlendirme

Absorbans değerlerinin belirlenmesi ile hücre canlılığı belirlendi ve Excel’de % metanol konsantrasyona (x eksen) karşılık gelen absorbans değerlerine (y-eksen) ait sigmoidal grafik elde edilerek IC₅₀ (inhibitör konsantrasyon 50) değeri belirlendi.

2.6. Genotoksik Etkilerin Belirlenmesi: Comet Testinin Yapılışı

Hücreleri agara alma: T75 flaskta çoğalan hücreler TC-20 sayım cihazında sayıldı Uygun konsantrasyonda (200.000/2 ml DMEM) 6’lı kuyucuklu plakalara ekildi. İnkübatörde 1 gün boyunca çoğalmaları için bekletildi ve testin 3. gününde hücreler, sitotoksosite testinde belirlenen metanol değerlerine 2 saat; pozitif kontrol olarak seçilen H₂O₂’e ise 30 dakika

olmak üzere maruz bırakıldı. Hücreler plakalardan tripsinlenerek tüplere aktarıldı. Her bir örneğe ait lamda yaklaşık 20000 hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak bir eppendorfta 100 µl hücre süspansiyonu ile 200 µl LMA (37°C’de) karıştırıldıktan sonra önceden NMA ile bir yüzleri kaplanmış ve kurutulmuş lamlara yayıldı. Daha sonra agarlar donmadan üzerine lamel kapatıldı. Daha sonra altında buz kalıpları bulunan metal bir satıh üzerinde bekletilerek agarın tamamen donması sağlandı.

Lizing işlemi: Agarın içerisine hücrelerin gömülerek hazırlanan lamlar, deney günü taze hazırlanıp buzdolabında bekletilen bir şale içerisindeki soğuk lizing çözeltisine daldırılarak karanlıkta 1 saat boyunca +4°C’de bekletildi. Bekleme süresinin sonunda lamlar lizing çözeltisinden çıkarılarak agarla kaplanan yüzeyleri üste gelecek şekilde elektroforez tankının içerisine dizildi.

Alkali pH’da elektroforez aşaması: Comet testine uygun özel koyu renkli malzemedan yapılan elektroforez tankı pH>13 olarak ayarlanan soğuk elektroforez tampon çözeltisi ile tank için hesaplanan miktarda dolduruldu. Lamlar dizilecek ve ardından önce akım uygulamaksızın 20 dakika bu tampon çözeltisi içerisinde bekletildi ve daha sonrada, 20 dakika boyunca 25 V altında ve 300 mA akım uygulamasıyla elektroforez aşaması gerçekleştirilmiş oldu.

Nötralizasyon aşaması: Toplam 40 dakikalık alkali uygulaması ve elektroforez aşamasından sonra lamlar elektroforez tankından çıkarılıp şalelere dizildi. Şale içerisindeki lamlar önce distile su ile 5 dakika, nötralizasyon çözeltisi ile 15 dakika ve ardından tekrardan distile su ile 5 dakika şeklinde yıkandı.

Fiksasyon: Hücreleri lamlara fikse etmek amacıyla sırasıyla %50, %70 ve %99 alkol ile 5’er dakika sürelerle bekletilen lamlar okuma yapılıncaya kadar oda sıcaklığında lam kutusu içerisinde saklandı.

Boyama ve mikroskopta değerlendirme: Lamların üzerine 60 µl etidium bromür çözeltisi ilavesi yapıldı ve üzeri lamel kapatıldı. En az 10 dakika bekleme süresinden sonra mikroskop altında okuma işlemi gerçekleştirildi. Her lam için toplam 100’er hücre sayılacak ve fluoresan mikroskopunda değerlendirildi. “Comet assay IV” programı kullanılarak hücreler işaretlendi ve hücre sayımı yapıldı.



Şekil 2.2. Comet testinde kullanılan cihazlar; elektroforez cihazı (sol), fluoresan mikroskop (sağ)

2.6.1. İstatistiksel Değerlendirme

İstatiksel değerlendirmeler, SPSS programı (SPSS Windows Release 23,0) kullanılarak yapıldı. MTT test sonuçlarından elde edilen veriler, IC50 degerleri student *t*-test kullanılarak değerlendirilmiştir.

Yapılan Comet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde, her bir numune için belirlenen tüm 100 sayıma ait DNA kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) değerleri kontrol ve test kimyasalları grupları olarak kullanıldı. Tüm testlerden elde edilecek olan sonuçlarda istatistiksel anlamlılık One-Way ANOVA testi ile test edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Metanol Maruziyeti ile Sitotoksisite, MTT Testi Sonuçları

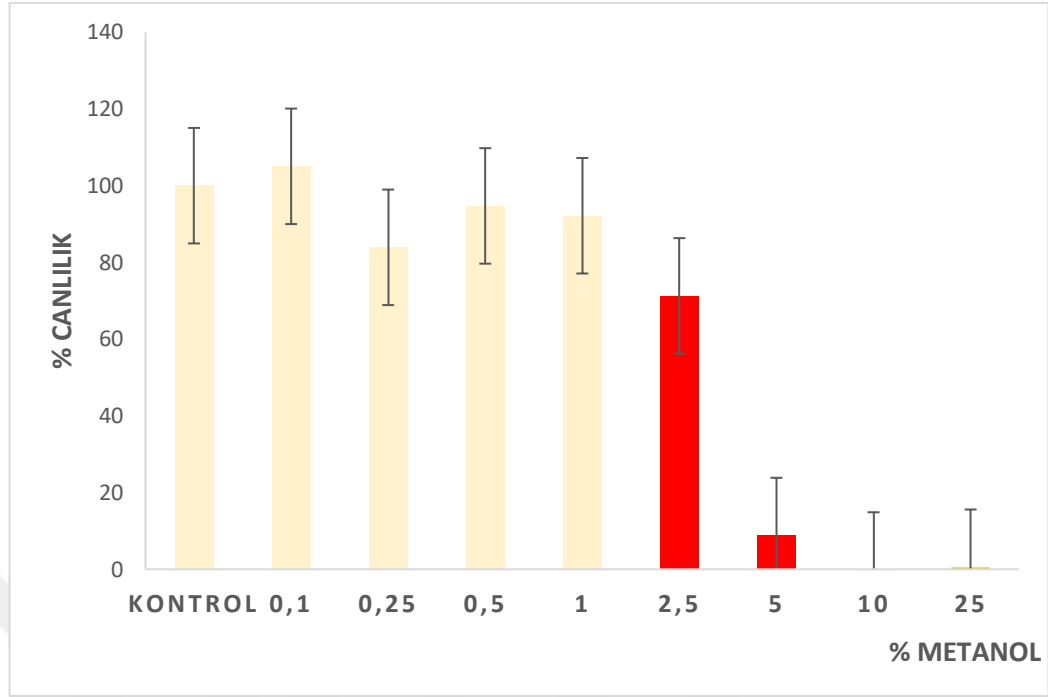
Çin Hamster Akciğer fibroblast hücre (V79) hattına, farklı metanol konsantrasyonları uygulanmıştır. Tez çalışmamız için belirlenen % metanol değerlerine (%0,1, %0,25, %0,5, %1, %2,5, %5, %10, %25) maruz bırakılan V79 hücre hattı 24 saatlik maruziyet süresinin ardından 0,5 mg/mL MTT ilave edilerek 2 saat boyunca 37°C %5 CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda tüm kuyucuklardaki MTT aspire edilerek oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözüldü. Oluşan rengin şiddeti mikropłaka okuyucuda 540 nm’de ölçüldü.

Sonuçların değerlendirilmesinde çift plaka çalışıldı. Absorbans değerlerinin ölçülmesinden sonra Excel’de % metanol konsantrasyona (x eksenı) karşılık gelen absorbans değerlerine (y-eksenı) ait sigmoidal grafik elde edilerek IC₅₀ (inhibitör konsantrasyon₅₀) değeri belirlendi. Her bir plakaya ait ortalama ölçüm değeri Çizelge 3.1’de buna ait grafik ise Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Excel’de % metanol konsantrasyona (x eksenı) karşılık gelen absorbans değerlerine (y-eksenı) ait sigmoidal grafik elde edilerek belirlenen IC₅₀ değeri Şekil 3.2’de gösterilmiştir ve buna göre IC₅₀ değeri %2,5 ila %5 arasında bir değeri olarak belirlenmiştir. Bu değeri ise metanolün %5 konsantrasyon değerine daha yakındır.

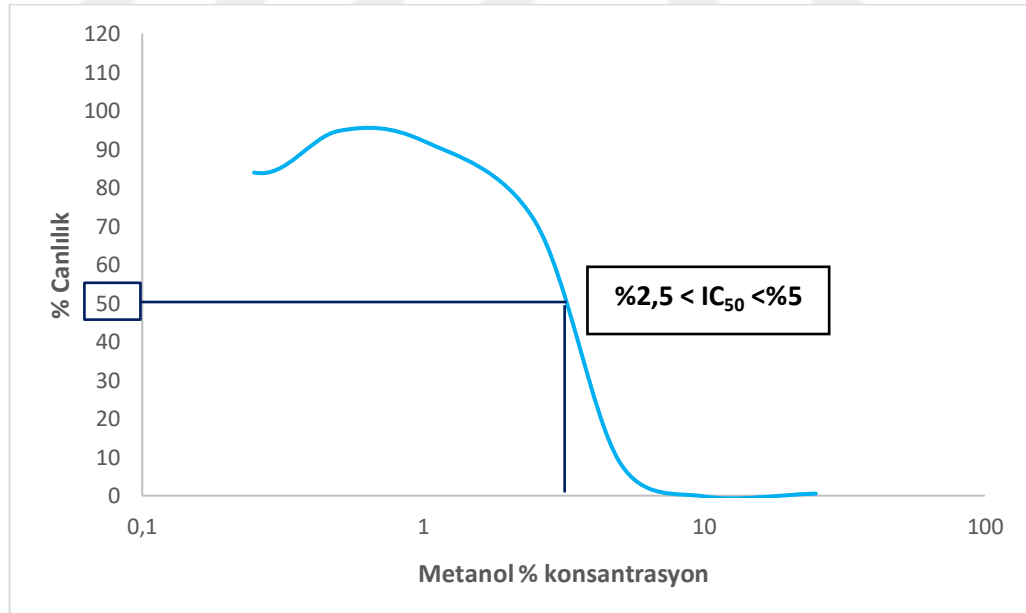
Çizelge 3.1. % Metanol konsantrasyon değerlerine karşılık gelen ortalama hücre canlılık verileri

Absorbans Değerleri	Kontrol	%0,1	%0,25	%0,5	%1	%2,5	%5	%10	%25
1.ÖLÇÜM	100	119,5283	87,87263	94,96546	103,2121	69,84356	9,207496	0,309696	0,0357
2.ÖLÇÜM	100	90,55104	79,98633	94,48404	81,11556	72,70331	8,366689	-0,69316	1,03485
ORTALAMA	100	105,0397	83,92948	94,72475	92,16383	71,27344	8,787093	-0,19173	0,53529

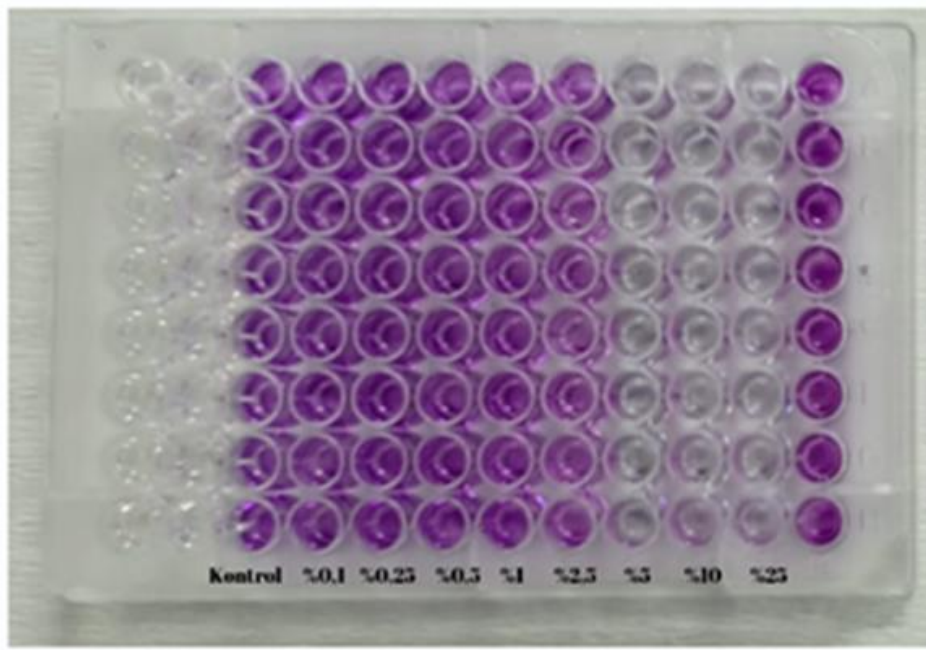
Çizelge 3.1’e göre %2,5 metanol konsantrasyonunda hücre canlılığı IC₃₀ değerine ulaşırken, %5 ve sonrasındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığında önemli bir düşüş yaşanmıştır. IC₅₀ değeri ise Excel Ofis Programı’nda elde edilen grafiğe göre metanolün %2,5 ila %5 konsantrasyon değerlerine karşılık gelmektedir. Buna göre tezimizde bir sonraki aşamada DNA hasarının belirlenmesinde %2,5 metanol konsantrasyonunun altındaki değerlerin kullanılması planlanmıştır.



Şekil 3.1. % Metanol konsantrasyon değerlerine karşılık gelen % canlılık değerleri. Kontrol grubu: DMEM besiyeri ortamında bulunan ve hiçbir kimyasala maruz kalmamış V79 hücre hattı



Şekil 3.2. % Metanol konsantrasyon değerlerine karşılık gelen % canlılık değerleri. IC_{50} değeri metanolün %2,5 ila %5 konsantrasyon değerine karşılık gelmektedir.



%Metanol, 24 saat (V79)

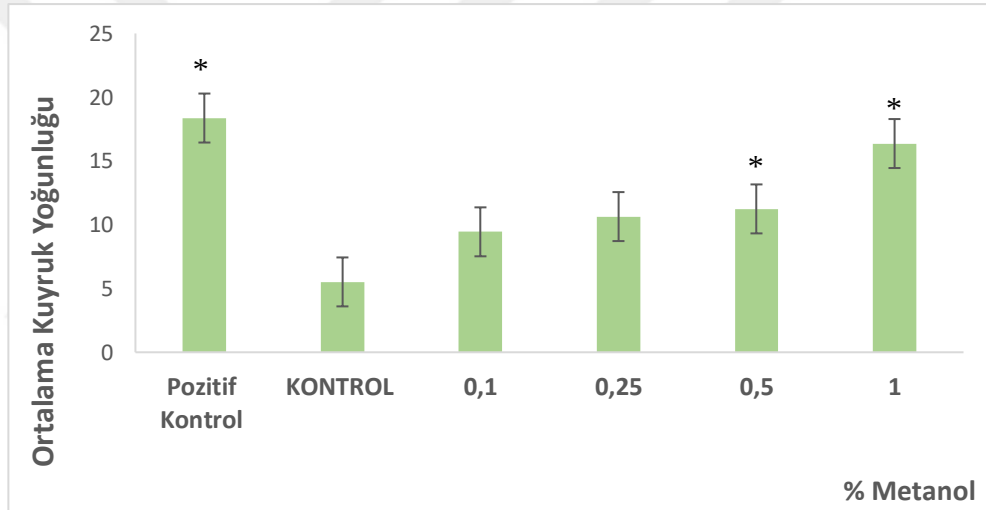
Şekil 3.3. 96 kuyuculuk plakada 24 saatlik % metanol maruziyetinin V79 hücre hattındaki hücre canlılık görüntüsü (MTT)

3.2. Metanol Maruziyeti ile Elde Edilen Comet Testi Sonuçları

Fluoresan mikroskop altında rastgale 100'er hücre tek bir araştırmacı tarafından okunmuştur. Comet Assay IV programı ile elde edilen sonuçlar ortalama kuyruk yoğunluğu (Mean Tail Intensity) değerleri $\pm$ standart hata (SEM: Standart Sapma/ $\sqrt{n}$; $n=100$) şeklinde verilmiştir. Metanole ait tüm konsantrasyon değerleri için çift lam çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak 50 μM H_2O_2 seçilmiştir. DNA hasarının belirlenmesi için metanol konsantrasyonları sitotoksisite verilerinden yola çıkarak %0,1, %0,25, %0,5 ve %1 olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyon değerlerine ait ortalama kuyruk yoğunluğu $\pm$ SEM verileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

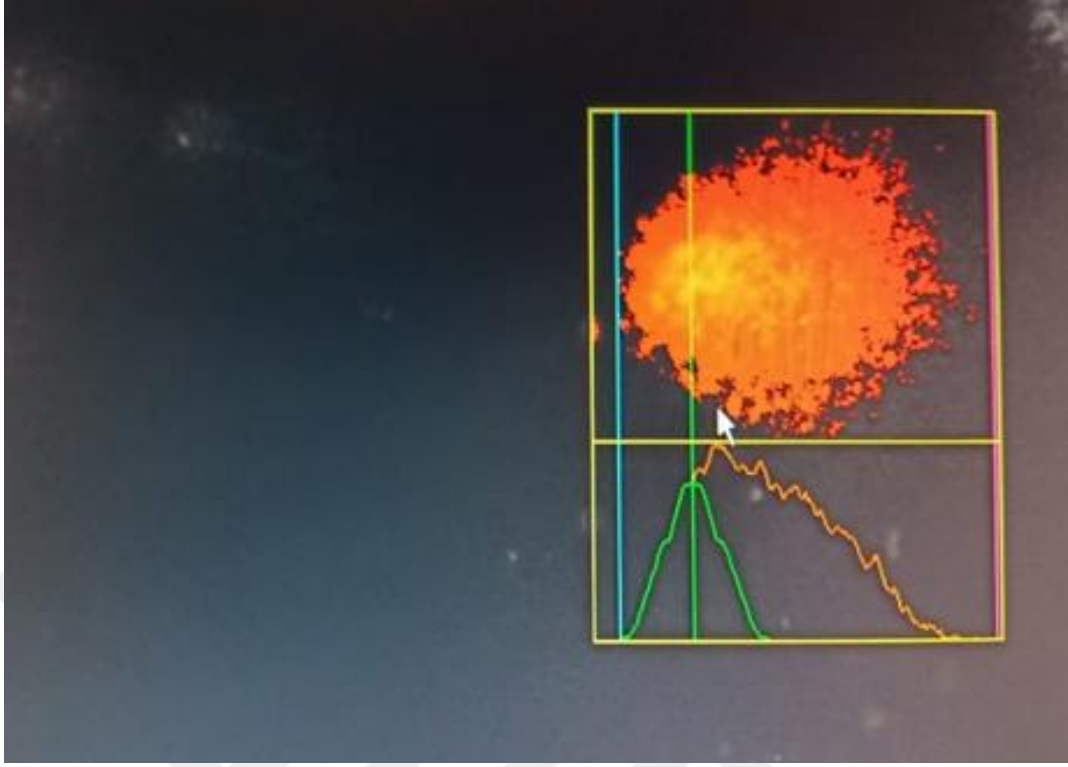
Çizelge 3.2. %Metanol maruziyetinin V79 hücre hattında ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM. *p<0,05; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Repeated measures One-Way ANOVA)

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu ± SEM	
Kontrol	5,516 ± 0,78
Pozitif Kontrol	18,36 ± 1,91*
% 0,1	9,44 ± 1,10
% 0,25	10,63 ± 1,05
% 0,5	11,24 ± 1,09 *
% 1	16,36 ± 1,56 *



Şekil 3.4. V79 hücre hattında %metanol maruziyetinin neden olduğu DNA hasarının ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM grafiği. *p<0,05; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (One-Way ANOVA). Pozitif kontrol: 50 µM H₂O₂, 30 dakika

% Metanol maruziyetinin V79 hücre hattında neden olduğu DNA hasarı ortalama kuyruk yoğunluğu (n=100) ± SEM Çizelge 3.2 ve Şekil 3.4’de verilmiştir. Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz bu verilere göre %0,5 ve %1 metanolün neden olduğu DNA hasarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (p<0,05).



Şekil 3.5. %0,5 metanolün V79 hücre hattında oluşturduğu DNA hasarı (Comet Assay IV Programı)

4. TARTIŞMA

Günlük hayatta; taze meyve ve sebzeler, aspartam içeren endüstriyel gıdalar, meyve suları, fermente içecekler ve tütün dumanı, insanlar için önemli birer metanole maruz kalma kaynaklarıdır. Metanole işyerlerinde mesleki olarak da maruz kalmak mümkündür (vernük üretimi,boya üretimi, antifriz üretimi, yapıştırıcı üretimi vb.). Metanolün sahte alkollü içki üretiminde de yasa dışı olarak kullanılabilmesi de insanlar için en önemli maruz kalma kaynaklarından biridir. Bu örneklere dayanarak insanların metanole yaygın olarak maruz kalabildikleri görülmektedir

Metanol insanlarda orta ila yüksek düzeyde toksik etki gösterebilme potansiyeline sahiptir ve toksik etkilerini iki ana başlık altında toplamak mümkündür. Birincisi, metanol, santral sinir sistemi (SSS) üzerindeki depresan etkisi nedeniyle ölümcül olabilir. İkincisi ise, metanolün alkol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla formaldehide sonrasında da formaldehid dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla formik asite metabolize olmasından kaynaklanmaktadır. Bu metabolizma esnasında ortaya çıkan her iki metabolit de son derece toksiktir.

Ancak tez çalışmamızda metanolün metabolitlerinin toksik (ya da genotoksik) etkilerinin incelenmesi hedeflenmemiştir. Metanolün kendisinden kaynaklanan genotoksik ve sitotoksik etkilere ait verilerin dünya literatüründe yetersiz olması nedeniyle sadece metanolün genotoksik etki potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Literatürdeki çalışmaların önemli bir bölümü metanolün genotoksik, mutajenik ve kanserojenik olmadığı yönündedir. Ancak genotoksik olup olmadığı ile ilgili çalışmalar oldukça çelişkili ve bu nedenle de tartışmalıdır.

Yapılan çalışmaların incelenmesi neticesinde, metanol, yapılan in vivo ve in vitro testlerde mutajenik bir bileşik olarak sınıflandırılmamaktadır. Elde edilen veriler, genetik materyale zarar vermediğini gösterdiği yönündedir.

Metanol, Salmonella typhimurium suşları TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538'de ve Escherichia coli suşu WP2uvrA'da bir dizi Ames testinde mutajenite açısından negatif sonuçlar vermiştir (NEDO, 1987; Simmon vd., 1977).

In vivo testlerde, 1,050 veya 5,200 mg/m³ metanol miktarına inhalasyon yoluyla maruz bırakılan farelerde, kırmızı kan hücrelerindeki mikronükleus sıklığında veya kardeş

kromozom değişimlerinde (SCE'ler), kromozomal anormalliklerde veya akciğerdeki mikron kleuslarda herhangi bir artış görülmemiştir (Campbell vd., 1991).

Ekzojen kaynaklardan oluşan DNA katım ürünlerini (addact)  l mek için tasarlanan bir çalışmada metanol, 5 gün boyunca 500 veya 2,000 mg/kg/gün dozlarında sıçanlara oral olarak uygulanmıştır. Uygulanan dozun artmasıyla birlikte tüm dokularda artan sayıda DNA katım ürünleri gözlenmiştir (Lu vd., 2012).

Yakın zamanda EFSA'nın yapmış olduğu değerlendirmelerde, bu ve benzeri çalışmalardan hiçbir sonuç çıkarılamayacağı, yöntemlerin sağlam olmadığı, DNA eklentilerinin, organ ve dokuların metanole maruz kalınmasının biyolojik belirteçleri olduğunu ancak mutajenik etkinin doğrudan göstergeleri olmadığını belirtmiştir. Bu açıdan, bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamıştır (EFSA, 2013).

 n vitro test sistemleri ile yayınlanan genotoksisite testlerinde metanol ile çoğunlukla negatif sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda görülen pozitif sonuçlar genotoksisitenin kanıtı olarak yorumlanmamış ve tartışmalara neden olmuştur (EFSA, 2013).

Escherichia coli WP67 ve CM871'in bulunduğu ve metabolik aktivasyonu olmayan bakteriyel test sistemlerinde metanol ile zayıf pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bulguların safsızlıklardan kaynaklandığı düşünüldüğünden, yazarlar metanol  belirsiz veya şüpheli bir mutajen olarak sınıflandırmışlardır (De Flora vd., 1984).

E. coli SA500'de ileri mutasyona yönelik bir testte, %23' n üzerindeki metanol konsantrasyonları sitotoksik bulunmuş ve hücrelerin hayatta kalma oranının %40'ın altına düştüğü belirtilmiştir (Hayes vd., 1990).

In vitro çalışmalarda, Aspergillus nidulans mantarında, metabolik aktivasyonun olmadığı bir testte, sitotoksik aralıktaki metanol konsantrasyonlarının an ploidiyi tetiklediği gösterilmiştir (Crebelli vd., 1989). %50 büyüme inhibisyonuna neden olan ve test edilen en yüksek metanol konsantrasyonunda, ek bir metabolik sistem olmadan Çin hamsteri akciğer hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (SCE) testinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Buna karşılık standart konsantrasyonda (2,5 mg/ml) S9 karışımı olan ve olmayan fare lenfoma hücreleriyle yapılan bir testte negatif sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, daha yüksek bir S9 karışımı konsantrasyonu (7,5 mg/ml) kullanıldığında mutantlarda doza bağlı bir artış elde edilmiştir (NEDO, 1987).

2010 yılında ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), Soffritti ve arkadaşları (Soffritti vd., 2010) tarafından yürütülen sıçanlar üzerindeki aspartam kaynaklı metanol maruziyetinin kronik toksisitesi ve kanserojenik etkilerinin araştırıldığı çalışmada verilerin tekrar araştırılmasını istemiştir. EFSA, araştırmayı yürüten European Ramazzini Foundation (ERF)'ın sonuçlarının tutarsız olduğunu belirtmiş ve Soffritti ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmanın geçerliliğini desteklememiştir (EFSA, 2013). Hayvan çalışmalarından metanolün kanserojen olduğunu öne süren hiçbir kanıt bulunmamakla birlikte, metanolün kemirgenler ve insanlar arasındaki metabolizmasındaki büyük farklılıklar nedeniyle uygun bir hayvan modelinin bulunmadığı kabul edilmektedir. Saf metanolün insanlarda öldürücü dozu 343 mg/kg iken; oral yol ile maruziyette körlüğe neden olan dozu ise 114 mg/kg'dır. Sıçanlarda ise akut oral metanol maruziyetinin LD₅₀ değeri ise 1187-2769 mg/kg'dır. Metanole akut olarak maruz kalmış bir bireyde, 500 mg/L kan metanol seviyesi zehirlenmiş kişilerde hemodiyalize başlama kriteridir. Belirtilen kan metanol seviyesine yetişkin bir birey 0,4 ml/kg metanole oral yol ile maruz kaldığında erişebilmektedir (Kavet ve Nauss, 1990) 0,4 ml/kg metanol ise yaklaşık olarak 316,4 mg/kg'a karşılık gelmektedir ($d_{\text{metanol}}=0,791 \text{ g/ml}$). Bu değer LD₅₀ değeri 1187-2769 mg/kg olan sıçan grubuna uygulandığında beklenildiği üzere insanlarda görülen etkiyi göstermeyecektir. Bu durum türler arası farklılığı ortaya koymakla birlikte hayvan deneylerinde yapılan çalışmaların insanlara ekstrapolasyonunda bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır.

EFSA bu bağlamda, Hollanda İş Güvenliği Uzman Komitesi 'nin (DECOS), metanolün kanserojenik potansiyeli açısından sınıflandıramayacağı sonucuna vardığını yayınlamıştır. Aynı zamanda EFSA, güvenilir in vivo ve in vitro verilerin metanolün genotoksik olduğunu göstermediği sonucuna varmıştır. Bu açıdan bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamıştır (EFSA, 2013).

Yukarıda da görüldüğü gibi literatürde yer alan sonuçlar metanolün genotoksik olup olmadığı konusunda kesin bir yargıya varmakta zorlanmaktadır. Bu açıdan konu ile ilgili yeni veriler bu konunun aydınlatılmasında fayda sağlayacaktır.

Sitotoksite terimi, hücrelerin yapısal işlevlerinde meydana gelen hasar olarak tanımlanmaktadır (Helgason ve Miller, 2005).

Sitotoksite, kimyasal bir maddenin dozuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapılan deneyler esnasında, biyolojik, kimyasal veya fiziksel

maruziyetler sonrasında hücrelerin canlı olup olmadıkları önemli bir basamak olup, çalışmaların sonunda canlı ve ölü hücre durumunu belirlemek büyük önem taşımaktadır (Nicholson, 2020). Bir kimyasal maddenin, sitotoksik olup olmadığını anlamak amacıyla sitotoksosite çalışmaları yapılmaktadır.

Sitotoksosite testleri ile hücrelerdeki yaşamsal faaliyetlerdeki meydana gelen değişikliklerle beraber hücrelerdeki hasar durumu ve derecesi belirlenir (Tuncer ve Demirci, 2011). Ayrıca bu testlerle beraber, bir kimyasalın toksik etkilerinin değerlendirilmesi de yapılmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

Hücre temelli sitotoksosite testleri, hem çalışmalarda kolaylık hem de in vivo testlerle olan sonuç uyumluluğundan dolayı hayvan deneylerine alternatif olarak geliştirilmiş ve toksikolojik deneylerde sıklıkla kullanılmaktadır.

Kimyasalların hücrelerdeki ve dokulardaki toksik etki mekanizmaları, sitotoksosite değerlendirmesinde önemlidir (Putnam vd., 2002). Sitotoksosite test analizlerinde yaygın olarak kullanılan MTT analiz yöntemi, hücre ölümünü tetikleyen, mitokondriyal membranlarında meydana gelen hasar nedeniyle test edilen hücrelerin sitotoksik potansiyelini değerlendirmek ve canlılığını ölçmek amacıyla kullanılan testlerden biridir (Assuncao Guimaraes vd., 2004). Tez çalışmamız için belirlenen % metanol değerlerine (%0,1, %0,25, %0,5, %1, %2,5, %5, %10, %25) maruz bırakılan V79 hücre hattı üzerinde elde ettiğimiz verilerde, %2,5 metanol konsantrasyonunda hücre canlılığı IC₃₀ değerine ulaşırken, %5 ve sonrasındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığında önemli bir düşüş yaşanmıştır. Bu bağlamda %2,5, %5, %10 ve %25 lik metanol konsantrasyon değerlerinde gerçekleştirilen MTT testinde elde ettiğimiz bu verilere göre, V79 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki gözlemlenmiştir.

Buna göre tezimizde bir sonraki aşamada DNA hasarının belirlenmesinde %2,5 metanol konsantrasyonunun altındaki değerlerin kullanılması planlanmıştır.

Tüm canlı organizmalarda varolan, genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA, kolay zarar görebilen bir molekül olmasından kaynaklı yapısında sürekli olarak hasar oluşmaktadır. DNA da meydana gelen hasar, onarım sistemleri tarafından onarılmaktadır. Organizmaların DNA hasarı, DNA tamir mekanizmalarının işleyişi, hücre döngüsünün durdurulması ve programlanmış hücre ölümü olan apoptozis sürecinin yaşanması

şeklinde sıralanmaktadır Ancak, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda ise kanser başta olmak üzere çeşitli hastalık durumları ortaya çıkmaktadır (Ames ve Shigenaga, 1992; Baynton ve Fuchs, 2000; Chatterjee ve Walker, 2017).

DNA'nın yapı ve bütünlüğünü etkileyen değişiklikler pek çok faktörden kaynaklanmaktadır. Bu faktörler DNA'da, tek ve/veya çift zincir kırıkları ve DNA-protein çapraz bağ oluşması gibi hasar durumlarını meydana getirmektedir (Martin, 2008). Genotoksik test yöntemlerinden Comet testi, DNA hasarını ve onarımını belirlemek amacıyla pek çok hücre tipinde hem in-vivo hem de in-vitro olarak uygulanabilen, hızlı, hassas, tayini kolay olan ve diğer yöntemlere kıyasla daha ucuzdur bir yöntemdir (Collins, 2004). Kantitatif olarak DNA hasarının tespit edildiği comet testi pH farklılıklarına göre alkali ya da nötral ortamlarda yapılabilmektedir. Nötral pH ortamında yapılan comet testi, çift zincir kırıklarını belirlemede avantaj sağlarken,alkali pH'da yapılan comet testi ise hem çift zincir kırıklarının hem de tek zincir kırıklarını, oksidatif baz hasarını, oynak alkali bölgeleri, DNA-DNA çapraz bağ oluşumunu, DNA-protein ya da DNA-kimyasal çapraz bağlanmalarını belirlemede kullanılır (Üstündağ vd., 2014). Tez çalışmamızda DNA hasarının belirlenmesi için metanol konsantrasyonları, sitotoksisite verilerinden yola çıkarak %0,1, %0,25, %0,5 ve %1 olarak belirlendi. Genotoksisite için belirlenen bu konsantrasyonlar V79 hücre hattı üzerine uygulandı ve comet testi yöntemi ile hasar tespiti yapıldı. Bu bağlanmda %0,5 ve %1 lik metanol konsantrasyon değerlerinde gerçekleştirilen comet testinde elde ettiğimiz bu verilere göre, oksidatif DNA hasarı gözlemlenmiştir.

Metanolün akut maruziyetinin değerlendirildiği çalışmalar yaygın iken, kronik olarak metanol maruziyetinin neden olduğu sonuçları aydınlatan çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bir çalışmada 57 yaşındaki bir kadın hastanenin acil servisine ilerleyici dispne, yüksek anyon açıklığı ile karakterize bir metabolik asidoz tablosu ve metabolik ensefalopati bulguları ile başvurmuştur. Hastaya uygulanan acil hemodiyaliz sonrası bireyde her iki gözünde de görme kaybı ortaya çıkmıştır. İlk olarak hastanın bulguları ve laboratuvar sonuçları klinisyenleri akut metanol zehirlenmesinden şüphelendirmiştir. Ancak hastanın kaşıntı şikayeti nedeniyle internet üzerinden satın aldığı ve 1 yılı aşan bir süredir kullandığı renksiz sıvı içerisinde yapılan kimyasal analizler sonucunda %95, oranında metanol tespit edilmiştir. Bu çalışma sadece akut metanol maruziyetinin değil, kronik metanol maruziyetinin de değerlendirilmesi gerektiğinin önemini vurgulamaktadır (Mojica vd., 2020). Metanolün inhalasyon, dermal gibi oral yol dışındaki maruziyet yolları da özellikle görme kaybının hasara uğraması açısından önem taşımaktadır. Retrospektif bir çalışmada iş yeri

kaynaklı kronik metanol maruziyetinin sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre inhalasyon yolu ile kronik metanol maruziyetinin optik sinirlerde önemli hasara neden olabileceği vurgulanmıştır (Ma vd., 2019) 2002 yılında kronik metanol maruziyeti ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, laboratuvar ortamında metanol buharına uzun süre maruz kalan bir araştırmacıda kronik metanol maruziyetinin neden olduğu gecikmiş nörotoksik etkinin gözlemlendiği belirtilmiştir (Finkelstein ve Vardi, 2002). Kronik metanol maruziyetinin Alzheimer hastalığı ile ilişkisinin aydınlatıldığı bir çalışmada, 6 haftalık süre boyunca farelere kontrol grubu (su) ve %2 ve %3,8 metanol çözeltileri verilmiştir. Araştırmanın sonunda immünohistokimyasal analizler farelerin beyinde Alzheimer gelişiminden sorumlu olan tau proteinlerinin fosforilasyonunda ve beyin hipokampus bölgesindeki nöronlarda apoptik belirteçlerde artış gözlenmiştir. Araştırma in vitro bulgularla desteklenmiş ve özellikle metanolün metaboliti olan formaldehitin tau proteinlerindeki artışı indüklediği belirtilmiştir (Yang vd., 2014). Bizim de tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler in vitro bulgulara dayanmakta olup, metanolün hem akut hem de kronik toksisitesinin değerlendirildiği çalışmalar için bir referans olma özelliği taşımaktadır. Metanolün toksisitesi değerlendirilirken sadece akut nedenler göz önünde bulundurulmamalıdır. Metanole mesleki anlamda maruz kalan işçiler, laboratuvar çalışanları, belirli gıdalarla düşük miktarlarda metanole maruz kalan ve bu gıdaları uzun süre tüketen insanlarda oluşabilecek etkileri gözlemlemek açısından tezimizde de hedeflediğimiz gibi metanolün toksisitesinin değerlendirildiği daha fazla ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda hedeflediğimiz şekilde, V79 hücre hattı üzerinde, metanolün farklı konsantrasyon değerlerinde, hem sitotoksik hem de genotoksik etkileri (Comet testi) MTT ve comet testleri kullanılarak araştırılmıştır.

Bu tez çalışmamızda yapılan MTT ve Comet test sonuçları aşağıda verilmiştir.

1. Çin Hamster Akciğer fibroblast hücre (V79) hattına, farklı metanol konsantrasyonları uygulanmıştır. Tez çalışmamız için belirlenen % metanol değerlerine (%0,1, %0,25, %0,5, %1, %2,5, %5, %10, %25) maruz bırakılan V79 hücre hattında, %2,5 metanol konsantrasyonunda hücre canlılığı IC_{30} değerine ulaşırken, %2,5-5 konsantrasyonlarında maruziyette IC_{50} değerine ulaşılmıştır. %5 ve sonrasındaki konsantrasyonlarda hücrelerin öldüğü bulunmuştur.
2. Genotoksik etkinin belirlenmesinde kullandığımız Comet testinde pozitif kontrol olarak 50 μM H_2O_2 seçilmiştir ve DNA hasarının belirlenmesi için metanol konsantrasyonları sitotoksisite verilerinden yola çıkarak, %0,1, %0,25, %0,5 ve %1 olarak belirlenmiştir. Uyguladığımız 4 farklı konsantrasyon değerlerinde, çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre, 30 dakikalık %0,5 ve %1 metanol konsantrasyonunun neden olduğu DNA hasarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu bulunmuştur.

Tezimizden elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, direkt metanol maruziyetinin %2,5 ile %25 aralığında sitotoksik etkilerinin olduğu, %0,5 ve %1 konsantrasyon değerlerinde ise genotoksik etkilerinin olduğu söylenebilir. Bu doğrultuda tezimiz tartışmalı olan metanolün genotoksik etkisi konusunda uluslararası literature katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- American Academy of Clinical Toxicology Ad Hoc Committee on the Treatment Guidelines for Methanol Poisoning, Barceloux, D.G., Randall Bond, G., Krenzelok, E.P., Cooper, H. & Allister Vale, J. (2002). American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *Journal of toxicology: Clinical toxicology*, 40(4), 415-446.
- Ames, B.N., and Shigenaga, M.K. (1992). DNA damage by endogenous oxidants and mitogenesis as causes of aging and cancer. *Molecular biology of free radical scavenging systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-22.
- Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2010). Changes in pectin methylesterification and accumulation of methanol during production of diced tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 97(3), 367-372.
- Anton, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3): 5517–5527.
- Ashurst, J. V., & Nappe, T. M. (2018). Methanol toxicity.
- Assuncao Guimaraes, C. and Linden, R. (2004). Programmed cell deaths: apoptosis and alternative deathstyles. *European journal of biochemistry*, 271(9), 1638-1650.
- Bankoglu, E.E., Schuele, C. & Stopper, H. (2021). Cell survival after DNA damage in the comet assay. *Archives of Toxicology*, 95(12), 3803-3813.
- Baynton, K., and Fuchs, R.P. (2000). Lesions in DNA: hurdles for polymerases. *Trends in biochemical sciences*, 25(2), 74-79.
- Bolognesi, C., Cirillo, S. & Chipman, J.K. (2019). Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in *Mytilus* sp. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842: 50–59.
- Caldwell, K. (1986). Methanol levels in methylated spirit drinking alcoholics. *The New Zealand Medical Journal*, 99(811), 764-765.
- Campbell, J.A., Howard, D.R., Backer, L.C. & Allen, J.W. (1991). Evidence that methanol inhalation does not induce chromosome damage in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(3), 257-264.
- Chatterjee, N., and Walker, G.C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235-263.
- Chaung, W., Mi, L.J. & Boorstein, R.J. (1997). The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 25(5), 992-994.
- Clary, J.J. (2013). *The Toxicology of Methanol*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Press,
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 6(3): 249-61.
- Collins, A.R., and Oscoz, A.A. (2008). Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3): 143-51.
- Corvi, R., and Madia, F. (2017). In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food and Chemical Toxicology*, 106: 600–608.

- Crebelli, R., Conti, G., Conti, L. & Carere, A. (1989). A comparative study on ethanol and acetaldehyde as inducers of chromosome malsegregation in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 215(2), 187-195.
- Crouch, S.P.M., Kozlowski, R., Slater, K.J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 160(1), 81-88.
- De Flora, S., Zanicchi, P., Camoirano, A., Bennicelli, C. & Badolati, G.S. (1984). Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 133(3), 161-198.
- Doehmer, J. (1993). V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology*, 82(1-3), 105-118.
- Dorokhov, Y. L., Shindyapina, A. V., Sheshukova, E. V., & Komarova, T. V. (2015). Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews*, 95(2), 603-644.
- Dorokhov, Y.L., Shindyapina, A.V., Sheshukova, E.V., & Komarova, T.V. (2015). Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews*, 95(2), 603-644.
- Ecvam, 2013. Eurl Ecvam Strategy to Avoid and Reduce Animal use in Genotoxicity Testing, 2013, *JRC Scientific and Policy Report*
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2013). Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. *Efsa Journal*, 11(12), 3496.
- Ekşi, A. (1988). Meyve suyu durultma tekniği. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 9, 127.
- Fidan, A.F. (2008). DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8,1: 41-52.
- Filer Jr, L.J. and Stegink, L.D. (1989). Aspartame metabolism in normal adults, phenylketonuric heterozygotes, and diabetic subjects. *Diabetes care*, 12(1), 67-74.
- Finkelstein, Y., and Vardi, J. (2002). Progressive parkinsonism in a young experimental physicist following long-term exposure to methanol. *Neurotoxicology*, 23(4-5), 521-525.
- Gajski, G., Ravlić, S., Godschalk, R., Collins, A., Dusinska, M., & Brunborg, G. (2021). Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 788: 108398
- Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Laurenzi, V.De., Maria, R.De., Deshmukh, M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M-L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, B.A., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J-CW., Martin, S.J., Medema, J.P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U.M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D.W., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H-U., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Vousden, K.H., Youle, R.J., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16(8), 1093-1107.
- Graw, M., Haffner, H.T., Althaus, L., Besserer, K. & Voges, S. (2000). Invasion and distribution of methanol. *Archives of toxicology*, 74, 313-321.

- Haboken, John Wiley ve Sons (2005). R. Ian Freshney *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 15th Edition: p.1-216
- Haffner, H. T., Graw, M., Besserer, K., & Stränger, J. (1997). Curvilinear increase in methanol concentration after inhibition of oxidation by ethanol: significance for the investigation of endogenous methanol concentration and formation. *International journal of legal medicine*, 111, 27-31.
- Hämmerle, M., Hilgert, K., Horn, M.A. & Moos, R. (2011). Analysis of volatile alcohols in apple juices by an electrochemical biosensor measuring in the headspace above the liquid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 158(1), 313-318.
- Hansen, C.H., and Brunner, N. (1998). MTT-cell proliferation assay. *Cell biology*.
- Hayes, S., Hayes, C., Duncan, D., Bennett, V. & Blushke, J. (1990). Stimulation of mutations suppressing the loss of replication control by small alcohols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(2), 151-163.
- Helgason, C.D., and Miller, C.L. (2005). *Basic cell culture protocols*. Totowa, NJ.: Humana Press
- Hou, C.Y., Lin, Y.S., Wang, Y.T., Jiang, C.M. & Wu, M.C. (2008). Effect of storage conditions on methanol content of fruit and vegetable juices. *Journal of food composition and analysis*, 21(5), 410-415.
- Jacobsen, D., Sebastian, C.S., Blomstrand, R. & McMartin, K.E. (1988). 4-Methylpyrazole: a controlled study of safety in healthy human subjects after single, ascending doses. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 12(4), 516-522.
- Jensen, C., and Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7: 1–15.
- Karaaslan, C., Duydu, Y., Üstündağ, A., Yalcin, C.O., Kaskatepe, B., & Goker, H. (2019). Synthesis & Anticancer Evaluation of New Substituted 2-(3,4- Dimethoxyphenyl) benzazoles. *Med Chem*. 15: 287-297
- Kavet, R., and Nauss, K.M. (1990). The toxicity of inhaled methanol vapors. *Critical reviews in toxicology*, 21(1), 21-50.
- Keklikoğlu, H.D. and Çoruh, Y. (2007). Metanol Zehirlenmesi ve Putaminal Hemoraji: Olgu Sunumu. *Journal of Neurological Sciences*, 24(4).
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J. & Ahnström, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA Repair*, 363(2), 89-96.
- Koçaklı, Z.G., Akıllıoğlu, K., & Doğan, A. (2015). Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü. *Archives Medical Review Journal*; 24(3): 390-401.
- Kulaksız Erkmen, G.Ü.L.N.İ.H.A.L. & Sancar, A. (2007). Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, 32(3), 104-111.
- Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P.D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols*, 2018(6), pdb-prot095505.
- Lindinger, W., Taucher, J., Jordan, A., Hansel, A. & Vogel, W. (1997). Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(5), 939-943.
- Liu, J.J., Daya, M.R., Carrasquillo, O., & Kales, S.N. (1998). Prognostic factors in patients with methanol poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 36(3), 175-181.

- Lu, K., Gul, H., Upton, P.B., Moeller, B.C. & Swenberg, J.A. (2012). Formation of hydroxymethyl DNA adducts in rats orally exposed to stable isotope labeled methanol. *Toxicological sciences*, 126(1), 28-38.
- Lu, Y., Liu, Y., & Yang, C. (2017). Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 128: 2–7
- Ma, Z., Jiang, H. & Wang, J. (2019). Clinical analysis of severe visual loss caused by inhalational methanol poisoning in a chronic process with acute onset: a retrospective clinical analysis. *BMC ophthalmology*, 19, 1-7.
- Magnuson, B.A., Burdock, G., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P. S., Waddell, W.J., Walker, R., Williams, G.M. (2007). Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Critical reviews in toxicology*, 37(8), 629-727.
- Martin, L.J. (2008). DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(5), 377-387.
- Martin, M., V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., & Collins, A. (1993). The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay). A European Review, *Mutation Research*, 288: 47-63.
- Massiot, P., Perron, V., Baron, A. & Drilleau, J.F. (1997). Release of methanol and depolymerization of highly Methyl Esterified Apple Pectin with an endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* and pectin methylesterases from *A. niger* or from Orange. *LWT-Food Science and Technology*, 30(7), 697-702.
- Masters, J.R., and Stacey, G.N. (2007). Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocols*, 2(9): 2276–2284.
- Mojica, C.V., Pasol, E.A., Dizon, M.L., Kiat Jr, W.A., Lim, T.R.U., Dominguez, J.C., Valencia, V.V., Tuaño, B.J.P. (2020). Chronic methanol toxicity through topical and inhalational routes presenting as vision loss and restricted diffusion of the optic nerves on MRI: a case report and literature review. *Eneurologicalsci*, 20, 100258.
- Møller, P. (2018). The comet assay: Ready for 30 more years. *Mutagenesis*, 33(1): 1–7.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- New Energy Development Organization, NEDO. (1987). Toxicological Research of Methanol as a Fuel for Power Station: Summary Report on Tests with Monkeys, Rats, and Mice.
- Nicholls, P. (1976). The effect of formate on cytochrome aa3 and on electron transport in the intact respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 430(1), 13-29.
- Nicholson, J.W. (2020). *The chemistry of medical and dental materials* (Vol. 7). Royal Society of Chemistry.
- Oakenfull, D.G. (1991). The chemistry and technology of pectin. *The chemistry and technology of pectin*, 87-108.
- Ott, J., Gronemann, V., Pontzen, F., Fiedler, E., Grossmann, G., Kersebohm, D.B., Weiss, G., Witte, C. (2000). Methanol. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*.
- Putnam, K.P., Bombick, D.W. & Doolittle, D.J. (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in vitro*, 16(5), 599-607.

- Sarkola, T., & Eriksson, C. P. (2001). Effect of 4-methylpyrazole on endogenous plasma ethanol and methanol levels in humans. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(4), 513-516.
- Simmon, V.F., Kauhanen, K. & Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water In: Scott D, Bridges DA, Sobels FH, editors. Progress in genetic toxicology.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. & Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Skrzydłowska, E. (2003). Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. *Toxicology mechanisms and methods*, 13(4), 277-293.
- Speakman, J.R. and Westerterp, K.R. (2010). Associations between energy demands, physical activity, and body composition in adult humans between 18 and 96 y of age. *The American journal of clinical nutrition*, 92(4), 826-834.
- Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik Toksisite Testleri. *Tübbav Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Soffritti, M., Belpoggi, F., Manservigi, M., Tibaldi, E., Lauriola, M., Falcioni, L., & Bua, L. (2010). Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. *American Journal of Industrial Medicine*, 53(12), 1197-1206.
- Taymaz, I. ve Benli M., (2009), Metanol'ün tasitlarda enerji kaynağı olarak farklı kullanım yöntemlerinin incelenmesi, *Mühendis ve Makine*, 50.cilt, 596. sayı, 21. sayfa.
- Tice, R.R., Andrews, P.W. & Singh, N.P. (1990). The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In *DNA damage and repair in human tissues* (pp. 291-301). Boston, MA: Springer US.
- Tokur, O., ve Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Tuncer, S., ve Demirci, M. (2011). Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri. *Atatürk Üni. Diş. Hek. Fak. Derg.*; 21: 141-149.
- Tuncer, S., ve Demirci, M. (2011). Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirme. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011(2), 141-149.
- Üstündağ, A., Behm, C., Föllmann, W., Duydu, Y. & Degen, G.H. (2014). Protective effect of boric acid on lead-and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. *Archives of Toxicology*, 88, 1281-1289.
- Üzen, R., Tomatir, A., Cücer, N. & Altuntaş, H. (2019). Comet assay and applications. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 5.5: 9-16.
- Valentine, W.M. (1990). Short-chain alcohols. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 20(2), 515-523.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J. & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 237-245.
- Wang, Z. (2012). High ratio of resting energy expenditure to body mass in childhood and adolescence: a mechanistic model. *American Journal of Human Biology*, 24(4), 460-467.
- WHO (World Health Organization), 1997. Methanol. Environmental Health Criteria 196. Availableonline: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc196.htm>.

- Wu, M.C., Jiang, C.M., Ho, Y.Y., Shen, S.C. & Chang, H.M. (2007). Convenient quantification of methanol in juices by methanol oxidase in combination with basic fuchsin. *Food Chemistry*, 100(1), 412-418.
- Yang, M., Lu, J., Miao, J., Rizak, J., Yang, J., Zhai, R., Zhou, J., Qu, J., Wang, J., Yang, S., Ma, Y., Hu, X., He, R. (2014). Alzheimer's disease and methanol toxicity (part 1): chronic methanol feeding led to memory impairments and tau hyperphosphorylation in mice. *Journal of Alzheimer's disease*, 41(4), 1117-1129.
- Zakharov, S., Pelclova, D., Diblik, P., Urban, P., Kuthan, P., Nurieva, O., Kotikova, K., Navratil, T., Komarc, M., Belacek, J., Seidl, Z., Vaneckova, M., Hubacek, J.A., Bezdicek, O., Klempir, J., Yurchenko, M., Ruzicka, E., Miovsky, M., Janikova, B., Hovda, K.E. (2015). Long-term visual damage after acute methanol poisonings: Longitudinal cross-sectional study in 50 patients. *Clinical toxicology*, 53(9), 884-892.

