

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİM DALI

DENEYSEL METANOL ZEHİRLENMESİ MODELİNDE
ELAMİPRETİD VE METİLPREDNİZOLON TEDAVİLERİNİN
OPTİK SİNİR, RETİNA VE BEYİN HASARI ÜZERİNE
OLUMLU ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem BÜLBÜL

TRABZON-2024

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİM DALI

DENEYSEL METANOL ZEHİRLENMESİ MODELİNDE
ELAMİPRETİD VE METİLPREDNİZOLON TEDAVİLERİNİN
OPTİK SİNİR, RETİNA VE BEYİN HASARI ÜZERİNE
OLUMLU ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem BÜLBÜL

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Vildan ÖZER

TRABZON-2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez yolculuğum boyunca her zaman yanımda olan, bilimsel rehberliğinin yanı sıra insani değerlerle dolu tutumuyla hayata bakış açımı şekillendiren, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, gösterdiği sabır ve anlayışla her zaman ilham kaynağım olan, ablam gibi sevdiğim ve saygı duyduğum Dr. Öğr. Üyesi Vildan ÖZER'e,

Yine uzmanlık eğitimim boyunca hep yanımda olan, öğrettikleriyle yoluma ışık tutan hocalarım Doç. Dr. Yunus KARACA, Doç. Dr. Özgür TATLI, Doç. Dr. Aynur ŞAHİN, Dr. Öğr. Üyesi Sinan PASLI ve Dr. Öğr. Üyesi Melih İMAMOĞLU'na,

Lise yıllarımdan beri tanıdığım, üniversite yıllarımdan uzmanlık eğitimimize kadar olan bu uzun yolculuktaki her anımda, hep yanımda olan ve bana güç veren kıymetli dostum, kardeşim Dr. Esra ÜÇÜNCÜ'ye, uzmanlık eğitimim boyunca her zorluğun üstesinden beraber geldiğimiz kardeşlerim Dr. Hülya KARAKUŞ, Dr. Mutlu YILMAZ ve kıymetli asistan arkadaşlarıma, birlikte görev yaptığımız tüm hemşire, paramedik, teknisyen ve sağlık personeli arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan, beni sabır ve özveriyle yetiştiren, her türlü fedakarlığı gösteren, desteklerini hep arkamda hissettiğim canım annem ve babama; zor zamanlarımda bana destek olan, motivasyonumu yüksek tutmama yardımcı olan, her zaman doğru yolu gösteren, hem akıl danıştığım hem de tüm dertlerimi paylaştığım biricik abim ve değerli eşi Ezgi'ye teşekkür ederim...

Dr. Özlem BÜLBÜL

ÖZET

Deneyisel Metanol Zehirlenmesi Modelinde Elamipretid ve Metilprednizolon Tedavilerinin Optik Sinir, Retina ve Beyin Hasarı Üzerine Olumlu Etkilerinin Histopatolojik ve Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışma ile Elamipretid ve Metilprednizolonun, metanol zehirlenmesinin neden olduğu beyin, optik sinir ve retina toksisitesi üzerine koruyucu ve terapötik etkinliklerinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada 36 adet Wistar Albino cinsi erkek rat, her bir grupta 6'şar rat olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Gruplar; Kontrol, Metotreksat (MTX), MTX + Metanol, MTX + Metanol + Metilprednizolon (MPZ), MTX + Metanol + Elamipretid (SS₃₁), MTX + Metanol + Metilprednizolon + Elamipretid (MPZ+SS₃₁) şeklinde idi. Deneyisel metanol zehirlenmesi modeli oluşturmak amacıyla Kontrol grubu dışındaki tüm ratlara 7 gün boyunca 0.3 mg/kg/gün dozunda MTX uygulandı. Deneyin 8. gününde Kontrol ve MTX grupları dışındaki gruplara 3 g/kg dozunda metanol uygulandıktan sonra ilk dozu metanol uygulandıktan 4 saat sonra olmak üzere; MPZ grubuna 1 mg/kg/gün MPZ, SS₃₁ grubuna 5 mg/kg/gün Elamipretid, MPZ+SS₃₁ grubuna 1 mg/kg/gün MPZ ve 5 mg/kg/gün Elamipretid 3 gün boyunca uygulandı. Son doz ilaçlar uygulandıktan 8 saat sonra ratlar sakrifiye edildi. Ratların serum, caudatoputamen ve göz dokularında histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular: Caudatoputamen dokusundaki hücrelerde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0.001). Grade 1,2,3 hücre oranı Metanol grubunda en yüksek saptandı. Aynı dokuda kombine tedavi alan grubun apoptotik indeksi ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Retinal dejenerasyon skoru kombine tedavi alan grupta metanol grubuna göre daha yüksek saptandı (P=0.001).

Sonuç: Elamipretid ve Metilprednizolon tedavilerinin kombine olarak uygulanmasının caudatoputamen dokusundaki nöronal dejenerasyonu, optik sinir ve

retinal dejenerasyonda iyileşme sağladığı, bu dokularda oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu azalttığı, özellikle beyin dokusunda apoptozu azalttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Elamipretid, Metilprednizolon, Metanolün İndüklediği TON



SUMMARY

Histopathological and biochemical evaluation of the effects of Elamipretide and Methylprednisolone treatments on optic nerve, retina and brain damage in an Experimental Methanol Poisoning Model

Objective: This study aims to biochemically and histopathologically evaluate the protective and therapeutic effects of Elamipretide and Methylprednisolone on brain, optic nerve, and retinal toxicity caused by methanol poisoning.

Method: In this study, 36 male Wistar Albino rats were divided into 6 groups, each consisting of 6 rats. The groups were as follows: Control, Methotrexate (MTX), MTX + Methanol, MTX + Methanol + Methylprednisolone (MPZ), MTX + Methanol + Elamipretide (SS₃₁), and MTX + Methanol + Methylprednisolone + Elamipretide (MPZ+SS₃₁). To establish an experimental model of methanol poisoning, all rats except the Control group were administered MTX at a dose of 0.3 mg/kg/day for 7 days. On the 8th day of the experiment, after administering methanol at a dose of 3 g/kg to all groups except the Control and MTX groups, the MPZ group received 1 mg/kg/day MPZ, the SS₃₁ group received 5 mg/kg/day Elamipretide, and the MPZ+SS₃₁ group received 1 mg/kg/day MPZ and 5 mg/kg/day Elamipretide for 3 days, with the first dose given 4 hours after methanol administration. The rats were sacrificed 8 hours after the last dose of the drugs. Histopathological and biochemical evaluations were conducted on the serum, caudatoputamen, and eye tissues of the rats.

Results: A statistically significant difference was found between the groups in the cells of the caudate-putamen tissue ($p=0.001$). The highest ratio of Grade 1, 2, and 3 cells was observed in the Methanol group. There was no significant difference in the apoptotic index between the combined treatment group and the control group in the same tissue. The retinal degeneration score was found to be higher in the combined treatment group compared to the Methanol group ($p=0.001$)

Conclusion: Elamipretide and methylprednisolone treatments, when applied in combination, have been observed to improve neuronal degeneration in the

caudate-putamen tissue, optic nerve, and retinal degeneration, reduce oxidative stress and lipid peroxidation in these tissues, and particularly decrease apoptosis in brain tissue.

Keywords: Elamipretide, Methylprednisolone, Methanol-induced TON



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Metanol Zehirlenmesi.....	3
2.1.1 Metanol Zehirlenmesinin Tarihçesi	3
2.1.2. Metanolün biyokimyasal yapısı.....	4
2.1.3. Metanol Zehirlenmesinin Epidemiyolojisi	4
2.1.4. Metanolün Toksikokinetik ve Toksikodinamiği	5
2.1.5. Metanol Zehirlenmesinin Patofizyolojisi	9
2.1.6. Metanol Zehirlenmesinde Görülen Klinik Bulgular.....	10
2.1.7. Metanol Zehirlenmesinin Tanısı.....	16
2.1.8. Metanol Zehirlenmesinin Tedavisi	22
2.2. Elamipretid	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
3.1. Araştırmanın Tipi, Yeri, Zamanı ve Araştırma İzni	32
3.2. Araştırmanın Evreni	32
3.3. Örneklem Büyüklüğü ve Yöntemi	32
3.4. Deney Protokolü.....	33
3.5. Dokuların Histopatolojik Analizi	36
3.6. Serum ve Dokuların Biyokimyasal Analizi.....	41
3.7. Araştırmada Kullanılan İstatistiksel Yöntem	52

4. BULGULAR.....	53
5. TARTIŞMA	80
5.1. Çalışmanın Kısıtlılıkları	88
6. SONUÇ	89
7. KAYNAKLAR	90



KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADH	: Alkol Dehidrogenaz
AI	: Apoptotik İndeks
ATP	: Adenozin Trifosfat
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BUN	: Kan Üre Azotu
CO₂	: Karbon Dioksit
CRRT	: Sürekli Renal Replasman Terapisi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dL	: Desilitre
EKG	: Elektrokardiyografi
ETZ	: Elektron Transport Zinciri
EXTRIP	: Zehirlenmelerde Ekstrakorporeal Tedavi Grubu
FDH	: Formaldehit Dehidrogenaz
g	: Gram
GKS	: Glaskow Koma Skalası
GSH	: Glutatyon
h	: Saat
H&E	: Hematoksilen-eozin
H₂O	: Su
ip	: İntraperitoneal
K	: Potasyum
kg	: Kilogram
Komplex IV	: Sitokrom C Oksidaz Kompleksi
L	: Litre
MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
MDA	: Malondialdehit
mEq	: Miliekivalan
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mmol	: Milimol

mOsm	: Miliosmol
MPZ	: Metilprednizolon
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTX	: Metotreksat
n	: Sayı
Na	: Sodyum
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NF-$\kappa\beta$	: Nüklear Faktör Kappa Beta
OCT	: Optik Koherens Tomografi
OR	: Olasılık Oranı
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PCO₂	: Parsiyel Arteriyel Karbondioksit Basıncı
pH	: Power of Hydrogen
ppm	: Parts Per Million
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünü
SF	: Serum Fizyolojik
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SS₃₁	: Elamipretid
TAS	: Total Antioksidan Durum
TDT	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
TOS	: Total Oksidan Durum
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı Nick-end Etiketleme
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
%	: Yüzde
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
°C	: Santigrat Derece

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Alkollerin (100 mg/dL) Osmolal katkısı	20
Tablo 2.	Antidotall Tedavi Kriterleri	24
Tablo 3.	Etanolün Oral ve İntravenöz Tedavi Dozları.....	25
Tablo 4.	Metanol ECTR endikasyonları	27
Tablo 5.	Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü	37
Tablo 6.	TUNEL Boyama Protokolü.....	40
Tablo 7.	TOS Deney Prosedürü.....	49
Tablo 8.	TAS Deney Prosedürü.....	50
Tablo 9.	Grupların Dağılımı ve Özellikleri	53
Tablo 10.	Grupların Caudatoputamen Dokularının Histolojik Gradelerinin Kıyaslanması	57
Tablo 11.	Grupların Optik Sinir ve Retina Dejenerasyon Skorlarının Kıyaslanması	66
Tablo 12.	Grupların Retina ve Caudatoputamen Dokularının Apoptoz İndekslerinin Karşılaştırılması.....	73
Tablo 13.	Grupların Caudatoputamen Doku Proteinlerinin Biyokimyasal Olarak Karşılaştırılması.....	75
Tablo 14.	Grupların Göz Doku Proteinlerinin Biyokimyasal Olarak Karşılaştırılması.....	77
Tablo 15.	Grupların Kan Serum Örneklerinin Biyokimyasal Olarak Karşılaştırılması.....	79

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1:	Formatın yarı niceliksel tespiti için üç seviyeli ölçeğe sahip format testi	18
Resim 2:	Beyin.....	35
Resim 3:	Beyin.....	35
Resim 4:	Putamen	35
Resim 5:	Putamen	35
Resim 6:	Göz küresi ve Optik sinir.....	36
Resim 7:	Göz küresi ve Optik sinir.....	36
Resim 8:	Grup 1 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (H/E)	54
Resim 9:	Grup 2 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (H/E)	54
Resim 10:	Grup 3 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (H/E)	55
Resim 11:	Grup 4 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (H/E)	55
Resim 12:	Grup 5 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (H/E)	56
Resim 13:	Grup 6 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (H/E)	56
Resim 14:	Grup 1 retinaya ait fotomikrograf. (H/E)	59
Resim 15:	Grup 2 retinaya ait fotomikrograf. (H/E)	59
Resim 16:	Grup 3 retinaya ait fotomikrograf. (H/E)	60
Resim 17:	Grup 4 retinaya ait fotomikrograf. (H/E)	60
Resim 18:	Grup 5 retinaya ait fotomikrograf. (H/E)	61
Resim 19:	Grup 6 retinaya ait fotomikrograf. (H/E)	61
Resim 20:	Grup 1 optik sinire ait fotomikrograf. (H/E)	62
Resim 21:	Grup 2 optik sinire ait fotomikrograf. (H/E)	62
Resim 22:	Grup 3 optik sinire ait fotomikrograf. (H/E)	63
Resim 23:	Grup 4 optik sinire ait fotomikrograf. (H/E)	63
Resim 24:	Grup 5 optik sinire ait fotomikrograf. (H/E)	64

Resim 25:	Grup 6 optik sinire ait fotomikrograf. (H/E)	64
Resim 26:	Grup 1 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (TUNEL).....	67
Resim 27:	Grup 2 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (TUNEL).....	67
Resim 28:	Grup 3 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (TUNEL).....	68
Resim 29:	Grup 4 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (TUNEL).....	68
Resim 30:	Grup 5 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (TUNEL).....	69
Resim 31:	Grup 6 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. (TUNEL).....	69
Resim 32:	Grup 1 retinaya ait fotomikrograf. (TUNEL).....	70
Resim 33:	Grup 2 retinaya ait fotomikrograf. (TUNEL).....	70
Resim 34:	Grup 3 retinaya ait fotomikrograf. (TUNEL).....	71
Resim 35:	Grup 4 retinaya ait fotomikrograf. (TUNEL).....	71
Resim 36:	Grup 5 retinaya ait fotomikrograf. (TUNEL).....	72
Resim 37:	Grup 6 retinaya ait fotomikrograf. (TUNEL).....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	Metanolün biyokimyasal yapısı.....	4
Şekil 2	Metanolün metabolizması	9
Şekil 3	Metanolün neden olduğu sirküler hipoksi	10
Şekil 4	Metanole bağlı oküler toksisite mekanizmaları.....	14
Şekil 5	Artmış anyon açıklı metabolik asidoz yapan nedenler.....	19
Şekil 6	Anyon gap ve osmolal gap'in zaman içindeki ilişkisi.....	21
Şekil 7	Elamipretid'in biyokimyasal yapısı.....	29
Şekil 8	TNF- α Standart Grafiği	42
Şekil 9	NF- κ B Standart Grafiği	44
Şekil 10	GSH Standart Grafiği	46
Şekil 11	Serum MDA Standart Grafiği	47
Şekil 12	Doku MDA Standart Grafiği.....	48

1. GİRİŞ

Metanol zehirlenmesi, özellikle alkol üretimi ve kullanımının yeterince denetlenmediği ülkelerde, ciddi oküler bulgular ve santral sinir sistemi komplikasyonlarına yol açarak, morbidite ve mortaliteye neden olan halk sağlığı sorunlarından biridir (1). Metanol zehirlenmesindeki toksik etkilerden esas olarak formik asit sorumludur. Formik asit, hücre içi oksijenli solunumdan sorumlu olan elektron transport zincirindeki (ETZ) mitokondriyal sitokrom C oksidaz kompleksini (Kompleks IV) inhibe ederek ATP üretimini bloke eder ve hücrelerde histotoksik hipoksiye neden olur (2-4). Bu durum hem hücre içinde oksijenli solunumun durmasına, hem de hücre içi reaktif oksijen ürünleri ve lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Optik sinir, retina ve bazal gangliyonların enerji gereksiniminin diğer dokulara oranla daha fazla olması nedeniyle, bu dokular metanol zehirlenmesinde en çok etkilenen dokular olmaktadır (3, 5, 6). Bu durum da, bu dokuları metanol zehirlenmesi tedavisindeki hedef dokular haline getirmektedir.

Metanole bağlı oküler toksisitenin tedavisine ilişkin literatürde yapılmış olan birçok klinik çalışma ve hayvan deneyleri mevcuttur. Bildiren vaka serilerinde Metilprednizolon, Eritropoetin gibi ajanlar denenmiş ve bu ajanların metanol zehirlenmesine bağlı gelişen görsel bulgularda iyileşme sağlandığı gösterilmiştir (1, 7). Ayrıca deneysel metanol zehirlenmesi oluşturulan hayvan modellerinde ATP, Kafeik asit, İdebenon, Rutin gibi antioksidan moleküller de tedavide denenmiştir (8-11). Fakat yapılan çalışmalar göstermiştir ki, bu tedaviler göz bulgularında iyileşme sağlasa da tamamen tedavi edici değildir. Güncel tedavilerin yetersiz olması, tedavide kullanılabilecek yeni ajanlara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Elamipretid (MTP 131, SS 31) düşük molekül ağırlıklı bir tetrapeptid olup, mitokondriyal hedefli bir antioksidandır (12). Elamipretid, hücre içine girdikten sonra, membran potansiyelinden bağımsız olarak mitokondri tarafından hızla emilerek; ETZ'nin bulunduğu iç mitokondriyal membranı hedef alır ve sitokrom C

oksidazı iç mitokondriyal membrana sabitleyen kardiyolipine bağlanarak, sitokrom C oksidazın stabilizasyonunu kuvvetlendirir. Bu sayede hem optimal elektron transferini sağlayarak ATP sentez kapasitesini artırır hem de sitokrom C oksidazın hücre sitoplazmasına geçip apoptotik yolağı başlatmasını engelleyerek anti-apoptotik etki gösterir (12-14). Ayrıca Elamipretid'in kan-beyin bariyerini geçebildiği ve nöronlarda oksidatif stresi, lipid peroksidasyonunu, reaktif oksijen ürünü (ROS) oluşumunu azaltarak nöroinflamasyonu da azalttığı gösterilmiştir (15-18).

Bu çalışma antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar ve nöroprotektif özellikleri olan Elamipretid ve Metilprednizolon'un (MPZ), metanolün neden olduğu toksik optik nöropati ve retina hasarını, ayrıca beyinde iskemi, inflamasyon, oksidasyon, apoptoza sekonder meydana gelen etkileri azaltabileceği ya da önleyebileceği hipotezi ile planlanmıştır. Bu çalışmada deneysel olarak metanol zehirlenmesi oluşturulan ratlar üzerinde, bu ajanların histopatolojik ve biyokimyasal olarak koruyucu etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metanol Zehirlenmesi

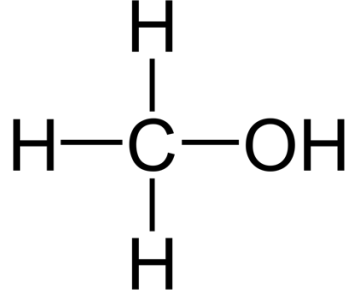
2.1.1 Tarihçe

Metanol, antik Mısır'da mumyalama sıvısının bir bileşeni olarak kullanılmıştır. İlk olarak Robert Boyle tarafından, 1661 yılında “kutu ağacı” olarak da bilinen şimşir ağacının damıtılmasıyla izole edilmiştir (19). Ancak izole edilışinden sonraki yaklaşık iki yüz yıl boyunca endüstriyel olarak pazarlanmamıştır (20). Metanolün moleküler yapısı 1834 yılında Dumas ve Peligot tarafından tanımlanmıştır (19, 20). 1923 yılında ilk sentetik metanolün üretilmesiyle endüstriyel olarak kullanılmaya başlanmıştır (19-21). Üretilen metanolün yaklaşık %85'i kimya endüstrisinde, formaldehit ve asetik asit gibi diğer kimyasalların sentezi için başlangıç maddesi olarak veya solvent üretimi için kullanılmaktadır (19, 21, 22). Geri kalanı ise yakıt katkı maddesi olarak akaryakıt ve enerji sektöründe kullanılmaktadır (21, 22). Uçak yakıtı, cam suyu, fotokopi sıvısı, kolonya, parfüm, gaz hattı antifrizi ve denatüre alkol gibi tüketici ürünlerinin içinde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (19).

Metanolün endüstriyel üretimindeki değişiklikler ve kullanımının artmasıyla metanol zehirlenmesi, klinik olarak önemli bir sorun haline gelmeye başlamıştır. İnsanlarda ilk metanol zehirlenmesi, 1879 yılında raporlanmıştır (23). 1904 yılında Wood ve Buller metanol zehirlenmesinin nörolojik ve oftalmolojik komplikasyonlarını tanımlamış, hastalarda optik atrofi ile birlikte tam ve kalıcı körlük geliştiğini bildirmişlerdir (24). 1920'lerde metanol zehirlenmesinin metabolik asidoz ile olan ilişkisi tespit edilmiştir (25). 1940'larda etanol alan hastalarda, metanol zehirlenmesinin geciktiği gözlenmesi üzerine, etanol; metanol zehirlenmesinde antidotal tedavi olarak kullanılmaya başlanmıştır (23). 1960 yılında Aurele ve Schreiner, hemodiyaliz metanol düzeylerini hızlı ve etkili bir şekilde düşürebildiğini göstermişlerdir (26). 1969'da Li ve Theorell 4-metilpirazolün (Fomepizol) insan karaciğer preparatlarında Alkol dehidrogenaz (ADH) enzimini

inhibe ettiğini ve fomepizolün metanol zehirlenmesinde antidotal tedavi olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (19).

2.1.2. Metanolün Biyokimyasal Yapısı



Şekil 1: Metanolün biyokimyasal yapısı

Metil alkol olarak da bilinen metanol (H₃COH), alifatik alkol ailesinin en küçük üyesi olup; molekülün sonunda yani terminal karbon ucunda bir adet hidroksil grubu bulunan bir hidrokarbondur (Şekil 1) (3, 19, 27). Günümüzde karbonmonoksit veya karbondioksitin katalitik indirgenmesiyle sentetik olarak üretilmektedir (3). Metanol oda sıcaklığında berrak, renksiz, uçucu, yanıcı bir sıvı olup moleküler ağırlığı 32 g/mol'dür, 65 °C'de kaynar ve yoğunluğu sudan azdır. Metanol; su, etanol ve birçok organik çözücü ile serbestçe karışabilmektedir (3, 27). Temizlik ürünlerinde, fotokopi solüsyonlarında, yapıştırıcılarda, boya, vernik ve incelticilerde, boya sökücülerde solvent olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda cam sularında, gaz hatlarında antifriz olarak; akaryakıtlarda benzin katkı maddesi olarak; kamp ocaklarında yakıt olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır (3).

2.1.3. Metanol Zehirlenmesinin Epidemiyolojisi

Metanol zehirlenmesi, metanol toksisitesinden şüphelenme ve teşhis etmedeki gecikmeler nedeniyle çok sayıda ölüme yol açmaktadır (27). İran, Endonezya gibi bazı ülkelerde alkollü içeceklerin üretimi, dağıtımı ve içilmesinin yasaklanması, alkollü içeceklerin yasadışı yollarla üretimi, dağıtımı ve tüketimine neden olmaktadır (3, 28). Metanol, etanol ile karşılaştırıldığında; etanole göre çok ucuzdur ve yapısal olarak birbirlerine benzemektedir. Bu nedenle metanol, maliyeti azaltmak adına yasadışı ve resmi olmayan üretimlerde, alkollü içeceklerin taşışında

kullanılabilmektedir (27). Metanol zehirlenmeleri sporadik vakalar şeklinde görülebileceği gibi; genellikle bir ülke veya bölgede salgınlar şeklinde görülmekte olup, İran, Çek Cumhuriyeti, Estonya, Norveç, Kenya, Libya, Malezya gibi birçok ülkede metanol salgınları bildirilmiştir (29-34). Bildirilen salgınların büyüklükleri genellikle 10-800 vaka arasında değişmekte olup, bazı salgınlarda %30'un üzerinde mortalite bildirilmektedir ve mortalite ile sonuçlanan vakaların %50'sinin, başvurudan önce veya başvurudan sonraki ilk 30 dakika içinde öldükleri belirtilmiştir (34, 35). Son yıllarda dünyada görülen en büyük metanol salgınlardan biri, 2020 yılında İran'da COVID-19 döneminde meydana gelen metanol zehirlenmesi salgınıdır. COVID-19'un önlenmesi ve tedavisi konusundaki bilinçsizlik, bu metanol zehirlenmesi salgınına yol açmıştır. Bu salgında, 5876 hasta metanol zehirlenmesi nedeniyle hastaneye kaldırılmış ve hastane dışı ölümler de dahil olmak üzere yaklaşık 800 ölüm meydana gelmiştir. Bu süreçte, sosyal medyada alkol bazlı maddelerin kullanımının virüse karşı koruyucu etkileri olduğuna dair sahte ve yanıltıcı mesajların yayılması, insanların virüsü vücuttan dezenfekte etme ve COVID-19'a karşı koruma sağlama umuduyla alkol bazlı maddeleri yutma, içme ve gargara yapmak suretiyle kullanmasına neden olmuştur. Ayrıca, salgın sırasında el dezenfektanlarının üretiminde etanol kullanılması, piyasadaki etanol miktarında azalmaya yol açmıştır. Bu durum da daha önce alkollü içecek üretiminde etanol kullanan kişilerin metanol kullanmaya yönelmesine neden olarak vaka sayısında artışa sebep olmuştur (28, 36).

2.1.4 Metanolün Toksikokinetik ve Toksikodinamiği

a. Absorbsiyon

Metanol zehirlenmesi oral alım, inhalasyon ve transdermal maruziyet olmak üzere üç farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Akut toksisite, çoğunlukla oral alım sonrası gerçekleşmektedir. Fakat nadir olarak transdermal ve inhalasyon yoluyla maruziyet sonrası da metanol zehirlenmesi görülebilmektedir (3).

Oral alım

Metanolün oral uygulamayı takiben emilimi hızlıdır fakat tokluk durumunda, gecikmiş ve uzamış emilim meydana gelebilmektedir (19). Oral uygulamayı takiben ortalama absorpsiyon yarı ömrü 5 dakikadır (3, 37). Açlık-tokluk durumuna bağlı olarak ise en yüksek emilim 30-60 dakika içinde gerçekleşir (3, 38). Gastrik alkol dehidrogenaz tarafından metabolize edilmesi ve karaciğerde presistemik eliminasyona uğraması nedeniyle %100 biyoyararlanıma sahip değildir (3, 19, 39). Metanol zehirlenmesinin klinik bulguları ve şiddeti, eş zamanlı etanol tüketimi, diyetteki folat içeriği ve metanolü metabolize eden enzimlerin aktivitesinin bireysel farklılık göstermesi gibi nedenlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle metanolün toksik ve öldürücü dozları şimdiye kadar kesin olarak belirlenememiştir (4). Bazı bireylerde 10-15 mL %40'lık metanol tüketimi ölüme neden olurken, bazı bireylerde ise 400-500 mL tüketilmesine rağmen toksisite gelişmediğine dair raporlar bulunmaktadır (4, 39). Metanol ile birlikte aynı anda etanol tüketmeyen insanlarda, metanolün minimum lethal dozu; 1 g/kg olarak tanımlanmıştır (40).

İnhalasyon

Metanolün inhalasyon yoluyla emilim oranı yüksektir (3, 19). Yapılan bir çalışmada 4 saat boyunca 200 ppm metanol solutulan gönüllülerde, metanolün ortalama absorpsiyon yarı ömrünün 0.80 saat olduğu gösterilmiştir (41). Ayrıca metanolün pulmoner emilim fraksiyonunun % 65-75 olduğu tahmin edilmektedir (3, 42). Fakat metanol suda çözünür bir molekül olduğundan ve bir kısmı üst solunum yolu mukozasından emildiği için absorpsiyonu %100 değildir (42). Metanol solunum yoluyla yüksek oranda emilmesine rağmen, inhalasyon yoluyla zehirlenme; sadece birkaç vaka serisi şeklinde bildirilmiş olup, oral alım ile zehirlenme kadar yaygın görülmemektedir (19). Bu vaka serileri genellikle endüstriyel işlemlerden kaynaklanan metanol dumanına akut ya da kronik maruziyet sonrası ortaya çıkmıştır (19). Akıllı telefon üreten işçilere ait iki vaka serisinde, toplam 5 hastada kronik maruziyet sonrası kalıcı görsel ve nörolojik sekellerin geliştiği bildirilmiştir (43, 44). Bildirilen serilerde kronik metanol inhalasyonu sonrası başvuran hastaların genellikle ciddi bir zehirlenme geçirmediği öne sürülürken, bir başka seride ise oral alım

sonrası zehirlenen hastalar kadar geniş bir tedavi gerektirme olasılığı olduğu ve bu vakalarda kalıcı görsel sonuçlar ve ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir (45-47). Başka bir vaka serisinde ise metanol taşıyan bir tankerde, inhalasyon yoluyla metanole akut maruz kalan iki hastada, toksisite gelişmiş ve bu hastaların biri ölmüştür (47).

Transdermal

Alkollerin bir miktar ciltten emilimi mevcuttur, ancak metanol diğer alkollere göre ciltten çok daha etkili bir şekilde emilir (19). Transdermal maruziyet sonrası bildirilen vakalarda yetişkinlerin yanında, yetişkinlere kıyasla daha büyük vücut yüzey alanı-hacim oranına sahip ve cilt geçirgenliklerinde farklılıklara sahip bebekler de bulunmaktadır (48). Transdermal metanol maruziyetinin süresi uzun olduğunda, ciddi toksisite bildirilmiştir (49). Bildirilen vakalarda transdermal maruziyet sonrası hastalarda ciddi görsel ve nörolojik sonuçlar yaşanmıştır (50, 51).

b. Dağılım

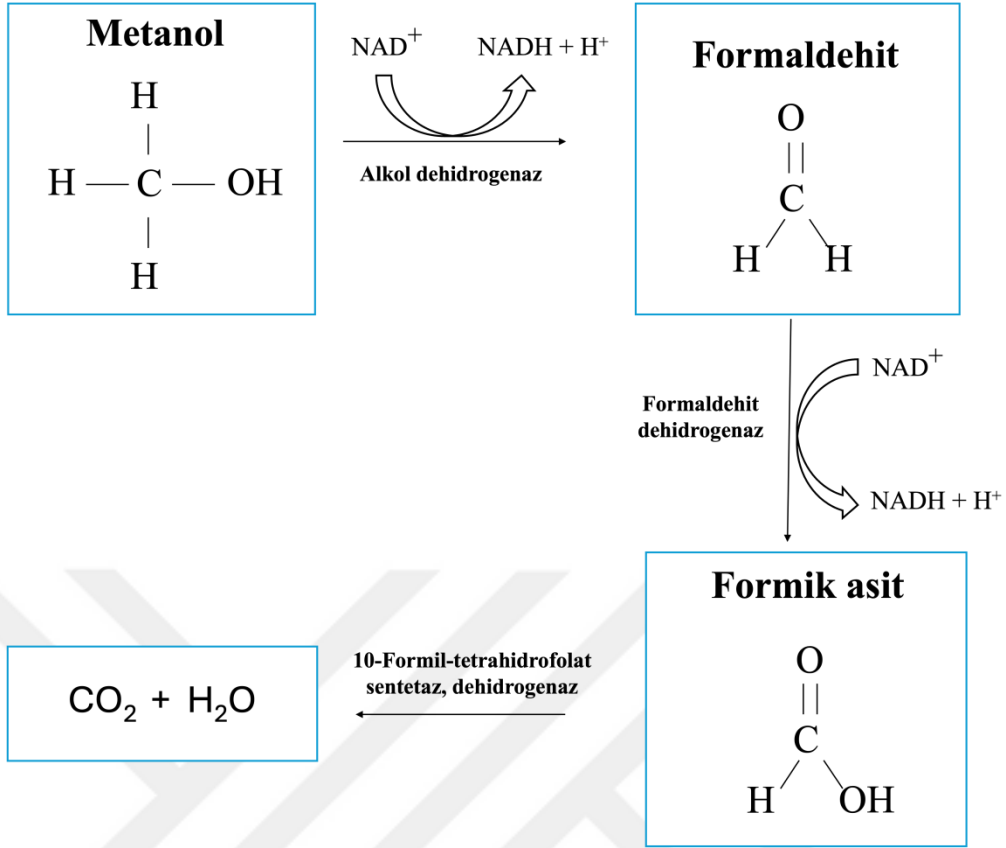
Metanol suda çözünür bir moleküldür ve vücutta suyun dağılımına benzer şekilde dağılım göstermektedir (3, 19). Dağılım hacmi yaklaşık 0.60-0.77 L/kg'dır (5, 37, 52) . Metanol içildikten sonra ortalama dağılım yarı ömrü yaklaşık 8 dakikadır (19, 37) . Metanol vücuda alındıktan sonra hızlı emilim ve dağılım göstermektedir. Bu durum, metanolün 30-90 dakika içinde serumda pik konsantrasyona ulaşmasını sağlar (27). Ancak, fazla miktarda metanol alımı olan hastalarda veya metanol alımından önce tok olan hastalarda pik konsantrasyona ulaşma süresi uzayabilir (3, 19). 8 dakikalık dağılım yarılanma ömrü, emilim yarılanma ömründen uzun olduğundan; alımdan hemen sonra pik serum konsantrasyonlarına ulaşır ve sonrasında düşmeye başlar (39).

c. Metabolizma ve Eliminasyon

Metanol esas olarak karaciğerde metabolize olur ve bir dizi enzimatik reaksiyon sonrası önce ara metabolitleri olan formaldehit ve formata, sonrasında ise oksidasyona uğrayarak karbondioksit ve suya dönüşür (4). Vücutta alınan metanolün %96.9'u karaciğerde okside edilirken, %0.6'sı idrarla ve %2.5'i ekshalasyon ile metabolize olmadan vücuttan elimine edilmektedir (3, 4, 19). Eliminasyon yarılanma

ömrü yaklaşık olarak 52 saattir, çok yüksek konsantrasyonlarda yarılanma ömrü uzamaktadır (3, 19).

Metanolün kendisi toksik değildir. Metanolün toksisitesine asıl neden olan molekül, metanolün metaboliti olan formik asittir (3, 53). Metanolün metabolizasyonu sırasındaki ilk enzimatik reaksiyon; metanolün NAD^+ bağımlı bir enzim olan Alkol dehidrogenaz (ADH) tarafından formaldehite metabolizasyonudur. Bu reaksiyon ile metanol, formaldehite okside olurken; NAD^+ ise $\text{NADH} + \text{H}^+$ 'a indirgenir (3, 4, 19, 53). Formaldehit de NAD^+ bağımlı başka bir enzim olan Formaldehit dehidrogenaz (FDH) ile formik asite metabolize olur (4, 19, 39, 53). Formaldehitin formik asite metabolizasyonu 1-2 dakikalık yarılanma ömrü ile çok kısa sürede gerçekleşir. Bu nedenle kanda formaldehit birikimi görülmemektedir (3). Formaldehitin formik asite metabolizasyonu sırasında, fizyolojik pH'da formik asit; format ve hidrojen iyonuna ayrışır (3). Format da folat bağımlı bir mekanizma ile karbondioksit ve suya metabolize edilir. Format, 10-formil tetrahidrofolat sentetaz enzimi aracılığıyla tetrahidrofolat ile reaksiyona girerek 10-formil tetrahidrofolat oluşturur. Bu enzimin etkinliği, ortamdaki B_{12} vitamini ve S-adenozilmetiyonin'in miktarlarına bağlıdır (54). Metanolün metabolizasyonundaki son reaksiyonda ise 10-formil tetrahidrofolat, 10-formil tetrahidrofolat dehidrogenaz enzimi ile karbondioksit ve suya metabolize olur (3, 4, 19, 55).



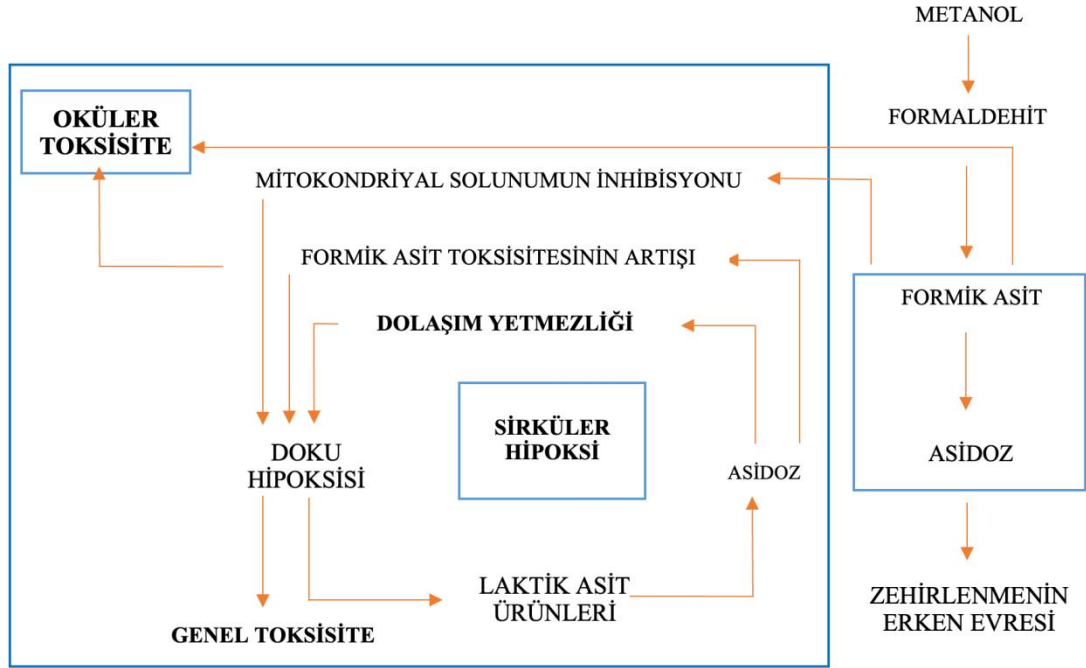
Şekil 2: Metanolün Metabolizması (Kaynak 3 ve 39'dan uyarlanmıştır)

2.1.5. Metanol Zehirlenmesinin Patofizyolojisi

Metanol toksisitesinden esas sorumlu olan metabolit, formik asittir. Formaldehit de toksiktir fakat formaldehit kısa süre içinde formik asite metabolize olduğundan kanda birikmez. Formik asit, formaldehite göre daha yavaş metabolize olur ve formik asitin metabolizasyonundan sorumlu olan enzimlerin kapasiteleri aşıldığında vücutta birikir (3).

Formik asit fizyolojik pH'ta format ve bir hidrojen iyonuna ayrışır. Formatı metabolize eden enzimatik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için tetrahidrofolata ihtiyaç vardır. Dolayısıyla bu reaksiyonun hızı, hepatik tetrahidrofolat konsantrasyonlarına bağlıdır. Tetrahidrofolat, folik asitten üretildiğinden diyetteki folik asit varlığı da reaksiyonun hızını etkileyecektir (3, 4). Yapılan çalışmalarda formik asit birikimi ile metanol toksisitesi arasında doğrudan bir ilişki bulunmuştur ve yüksek serum formik asit düzeylerinin mortalite ve morbiditeyi artırdığı tespit edilmiştir (56, 57).

Sitokrom oksidaz, mitokondri iç membranında yerleşim gösteren, elektron transport sisteminin bir üyesi olan, integral bir protein kompleksidir. Bu protein kompleksi, hücre içi oksijenli solunum ile ATP sentezinde önemli rol oynamaktadır (5). Metanol zehirlenmesindeki toksik metabolit olan formik asit, hücre içi ortama geçip, sitokrom oksidaz kompleksine bağlanarak hücre içi oksijenli solunumu inhibe ederek toksik etkisini göstermektedir (3-5). Bu durum “histotoksik hipoksi” olarak adlandırılmaktadır (3, 58). Hücre içi oksijenli solunumun inhibisyonu sonrası hücre içi solunum anaerobik metabolizmaya kayar. Hem anaerobik solunum sonrası oluşan laktik asit, hem de formik asitin kendisi, pH’ın düşmesine, asidozun daha da derinleşmesine, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve doku hipoksisinin artmasına neden olur (4, 5). Asidozun derinleşmesiyle formik asitin hücre içine difüzyonu kolaylaşır, fizyolojik pH’ta format ve hidrojen iyonuna ayrılan formik asit, formata dönüşmez. Ortamda biriken formik asit daha güçlü şekilde sitokrom oksidaz kompleksini inhibe ederek hücre hasara neden olur (5).



Şekil 3: Metanolün neden olduğu sirküler hipoksi (Kaynak 39’dan uyarlanmıştır)

a. Oküler Toksisite

Optik sinir lifleri ve miyelin kılıflarının yüksek metabolik ihtiyacı, bu dokuları histotoksik hipoksiye karşı daha hassas hale getirmektedir (3, 5). Hem

formik asitin doğrudan kendisi hem de neden olduğu asidoz oküler toksisiteden sorumludur. Formik asit, sitokrom oksidaza bağlanarak hücre içi oksijenli solunumu durdurur ve histotoksik hipoksiye neden olur. Böylece retina ve optik sinir dokularında ATP tükenmeye başlar. ATP tükendikçe, hücre membranında bulunan Na/K ATPaz pompasının aktivitesi azalır. Bu durum aksiyon potansiyelinin iletiminin durmasına neden olur (3, 27, 59).

Aksoplazmik akışın durması aksonal şişme ve optik disk ödemeine neden olur. Ayrıca asidoz nedeniyle formik asidin hücre içine difüzyonu kolaylaşır ve formik asitin formata ayrışması azalır. Ayrışmamış formik asit, özellikle optik disk ve optik sinirin retrolaminar bölümünü hedef alarak optik disk ödemi, myelin kılıfların parçalanması ve optik sinir lezyonlarına neden olur. Miyelin kılıf, hasar gördükçe şişmeye başlar ve sinir liflerinde kompresyon tipi bir yaralanma meydana gelir. Bu yaralanma, aksonal liflerin fonksiyonlarını yerine getirmek için gerekli olan temel proteinlerin, hücre gövdesinden aksonal liflere olan akışını önler. Temel maddelerdeki yetersizlik nedeniyle aksonal lifler formik asitin neden olduğu hasara daha da duyarlı hale gelirler. Tüm bu mekanizmalar optik disk, optik sinirin retrolaminar bölümü ve retinanın hasarına neden olur (3-5, 27, 59-61).

b. Nörotoksosite

Metanol zehirlenmesi durumunda subkortikal beyaz cevherde ve bazal gangliyonlarda; özellikle putamende ödem, hemoraji ve nekrotik hasar görülmektedir. Nükleus lentiformise arteriyel akışın az olması ve bölgenin venöz drenajının zayıf olması; metanol zehirlenmesi nedeniyle görülen lokal hücresel ödeme, putameni hassas hale getirmektedir. Ayrıca putamen, komşu beyaz cevher ve diğer bazal gangliyonlara göre daha fazla oksijen ve glikoz tüketmektedir, bu durum da putamenleri histotoksik hipoksiye karşı daha duyarlı hale getirmektedir (3, 6, 62, 63).

Subkortikal beyaz cevher dokusu, optik sinirin hasar mekanizmasına benzer şekilde hasarlandığından miyelin kılıfların parçalanmasıyla beyaz cevherde; dolaşım stazına bağlı infarktüsle benzer morfolojik değişiklikler görüldüğü gözlemlenmiştir (62, 64).

2.1.6. Metanol Zehirlenmesinde Görülen Klinik bulgular

Metanol zehirlenmesinin klinik belirti ve bulguları genellikle merkezi sinir sistemi, optik sinir ve gastrointestinal sistem ile sınırlıdır (3, 65). Metanolün serum seviyeleri, alımdan 30-90 dakika sonra zirveye ulaşır ancak bu süre, genellikle semptomların ortaya çıkışına kadar geçen süre ile ilişkili değildir (3, 27, 53). Klinik bulguların ortaya çıkış süresi, alınan metanolün hacmine ve birlikte etanol kullanımına göre değişmekle birlikte; yaklaşık 12-24 saatlik latent bir periyod sonrası ortaya çıkmaktadır. Fakat bildirilen vaka serilerinde bu süre 1 saat ile 72 saat arasında değişmektedir (53, 66, 67). Etanolün birlikte alınması semptomların başlangıcını 24 saatten fazla uzatmaktadır (3). Latent periyodun uzunluğu metanol toksisitesinin ciddiyeti açısından prognostik bir faktör değildir (3). Bu nedenle hastaların henüz klinik bulgularının olmaması, önemsiz bir zehirlenmenin göstergesi olarak yorumlanmamalıdır (53). Metanol zehirlenmesinde görülen erken bulgular genellikle spesifik değildir. Bu hastalar genellikle halsizlik, bulantı, kusma, karın ağrısı gibi non-spesifik semptomlar ile başvururlar (68).

a. Akut Merkezi Sinir Sistemi Bulguları

Tüm alkoller, doza bağımlı olarak merkezi sinir sistemi depresyonuna neden olmaktadır. Molekül ağırlığı daha fazla olan alkollerin sarhoş edici etkisi daha fazla olup, metanolün diğer alkollere göre moleküler ağırlığının düşük olması nedeniyle merkezi sinir sistemi depresyonu etkisi daha azdır (19). Zehirlenmenin ilk döneminde görülen santral sinir sistemi depresyonu, genellikle eş zamanlı etanol alımından kaynaklanmaktadır. Daha sonra toksik metabolitlerin birikmesi nedeniyle santral sinir sistemi depresyonu şiddetlenir (67).

Hafif-orta şiddette metanol zehirlenmesi olan hastalarda baş ağrısı, baş dönmesi, konfüzyon, letarji görülürken şiddetli metanol zehirlenmesinde ise nöbetten komaya değişik spektrumda semptomlar görülebilmektedir. Nöbet ve komanın nedeni genellikle beyin ödemidir. Şiddetli metanol zehirlenmesinden kurtulan hastalarda birkaç gün ile birkaç hafta sonra metanolün globus pallidus üzerine toksik etkileri nedeniyle; görme bulgularına ek olarak rijidite, tremor, bradikinezi, maske

yüz, letarji, demans ile seyreden parkinson benzeri sendrom görülebilmektedir (3, 19, 69).

Metanol zehirlenmesinde, putamenlerde bilateral kanama ile birlikte veya kanamasız nekrozu; daha az yaygın olarak nucleus caudatus lezyonları gibi bilateral bazal gangliyon lezyonları görülebilir. Metanol zehirlenmesine bağlı olarak klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte, putamende kanama ve insular subkortekste beyaz cevher nekrozunun varlığı kötü klinik sonlanımla ilişkilendirilmiştir (39). Nucleus lentiformis üzerindeki toksik etki, hastanın santral sinir sistemi depresyonu nedeniyle gizlendiğinden, akut aşamada tespit edilebilir klinik ve bulgulara neden olmayabilir (69).

b. Oküler Bulgular

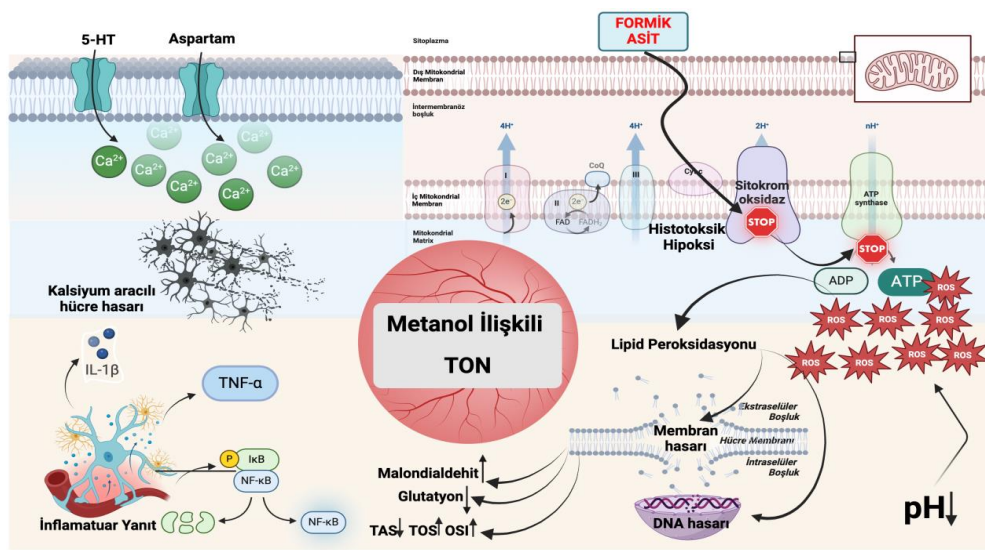
Optik sinir başının, lamina kribrosanın hemen önündeki kısmı olan prelaminar bölgesi yüksek sitokrom oksidaz aktivitesine sahip olduğundan, metanol zehirlenmesi bu bölgeyi metanolün etkilerine hassas hale getirmektedir. Yapılan çalışmalarda metanol zehirlenmesinde; optik disk ödemi, optik sinir başında prelaminar aksonal vakuolizasyon, retrolaminar bölgede oligodentrosit ödemi ve optik sinirde progresif demiyelinizasyon geliştiği gösterilmiştir. Metanol zehirlenmesinin ana hedefi optik sinir gibi görülse de yapılan çalışmalar, retinal toksisite de geliştiğini göstermektedir. Akut metanol zehirlenmesinde sıklıkla peripapiller retina ödemi de görülmektedir (3, 19, 39, 70).

Metanol zehirlenmesiyle başvuran hastaların görme kaybı oldukça değişkendir. Görme kaybı çoğunlukla asimetrik olarak ilerler ve bulanık veya puslu görme, renk görme kusurları, 'kar alanı görüşü' ve görme keskinliğinde azalma gibi kısmi görme kusurlarına neden olabilir. Bu hastalarda fotofobi de görülebilirken, şiddetli metanol zehirlenmesinde tam körlük gelişebilir. (3, 19, 27, 71). Görme kaybı metanol alımından sonraki birkaç saatten 72 saate kadar olan süreç içerisinde görülmeye başlayabilir (39). Bu hastalarda henüz görme bozukluğu olmasa bile bazı oftalmolojik patolojiler gelişmiş olabilir. Metanol zehirlenmesinin erken döneminde hastalarda optik disk hiperemisi ve pupil refleksinin azalması görülebilir. Pupil refleksindeki bozulmanın derecesi; metanol zehirlenmesinin şiddetiyle

ilişkilendirilmiştir. Zehirlenmeye bağlı optik disk ödemi gelişmeye başlar, ilerleyen dönemlerde retinal ödeme bağlı fizyolojik çukurlaşma kaybı görülebilir. Santral skotomların gelişmesiyle görme alanı konsantrik olarak daralmaya başlar. Optik disk hiperemisi 3 gün içerisinde azalmaya başlarken, retina ödemi birkaç hafta devam edebilmektedir. Optik sinirin aksonal dejenerasyonunun metanole maruz kaldıktan sonra en az 2 yıl daha devam ettiği gösterilmiştir (19). Yapılan çalışmalarda hastaların bir kısmının görme kusurları düzelirken, %25-33'ünde kalıcı görme kusurları gelişmiştir (3, 27, 39, 61).

Fizik muayenede görme alanı muayenesinde santral skotom, görme keskinliğinde azalma, renkli görme kaybı, optik diskte hiperemi veya solgunluk, peripapiller ödem, pupil refleksinde bozulma, ilerleyen dönemde optik atrofi görülebilir (3, 19, 27, 39). Elektoretinografide b dalgasında azalma görülebilmektedir. Bu durum bipolar hücrelerin fonksiyonlarının bozulduğunu göstermektedir (19, 39).

Optik koherens tomografi (OCT), saydam dokuları görüntülemek için yansıyan ışık dalgalarını kullanan prensip olarak ultrasona benzeyen bir görüntüleme yöntemidir. Metanol zehirlenmesinde papiller sinir lifi ödemi ve intraretinal sıvı birikimini OCT ile değerlendirmek mümkündür. Hastalar mutlaka retinal ödem çözüldükten, taburculuktan 2 ay sonra tekrar OCT ile değerlendirilmelidir (19, 39).



Şekil 4: Metanole bağlı oküler toksisite mekanizması (Kaynak 70'den uyarlanmıştır)

c. Gastrointestinal Sistem Bulguları

Metanol zehirlenmesi tipik olarak bulantı, kusma ve karın ağrısı gibi non-spesifik semptomlarla prezente olur. Şiddetli metanol zehirlenmesinde karaciğer, özofagus ve mide mukozasında patolojik anormallikler görülebilir (19, 39). Ayrıca şiddetli metanol zehirlenmesi ile başvuran hastalarla ilgili bildirilen vaka serilerinde hastaların bir kısmında akut pankreatit geliştiği bildirilmiştir (72). Bu hastalarda pankreatit gelişimi nedeniyle şiddetli karın ağrısı olabilir, bu hastaların laboratuvar parametrelerinde amilaz ve karaciğer aminotransferazlarında yükseklik görülebilmektedir. Fakat metanol zehirlenmesi ile başvuran hastaların gastrointestinal semptomlarının olmaması, ciddi toksisiteyi dışlamamaktadır (3).

d. Diğer sistem bulguları

Şiddetli metanol zehirlenmesi durumunda, izole böbrek hasarından ziyade diğer organların fonksiyonel bozukluklarına sekonder böbrek hasarı görülmektedir (73). Nefrotoksositeye sebep olan birçok mekanizma mevcut olmakla birlikte, bu duruma neden olan en önemli mekanizmalardan biri miyoglobinüridir. Bildirilen vaka serilerinde hastaların yaklaşık yarısında atravmatik rabdomiyoliz ve miyoglobinüri görülmektedir (19, 39, 73). Nefrotoksosite gelişmiş olan vakalarda mutlaka bir diğer toksik alkol olan etilen glikol zehirlenmesi de göz önünde bulundurulmalıdır. Etilen glikol zehirlenmesinde, toksik metabolit olan glikolik asitin bir kısmı oksalat dönüşür. Oksalat da kalsiyum ile kalsiyum oksalat kristalleri şeklinde renal tübüllerde çökerek akut böbrek hasarına neden olur. Toksik alkol zehirlenmesi şüphesiyle başvuran ve akut böbrek hasarı gelişmiş hastalarda, idrar tetkikinde kalsiyum oksalat kristallerinin gösterilmesi her iki toksik alkolün ayırıcı tanısında klinisyene yardımcı olmaktadır (74, 75).

Metanol zehirlenmesi durumunda EKG’de (Elektrokardiyografi) sinüs taşikardisi, uzamış QT aralığı, sağ dal bloğu, uzamış PR aralığı ve non-spesifik T dalga değişiklikleri bildirilmiştir. Ancak, bu bulguların hiçbirisi klinik sonuçla korelasyon göstermez ve hastalar iyileştikçe değişiklikler genellikle normale dönmektedir (19).

2.1.7. Metanol Zehirlenmesinin Tanısı

Metanol zehirlenmesinin tanısını koymak, özellikle etanolle birlikte mikst alımlarda ve öykünün alınamaması ya da öyküde metanol kullanımının söylenmemesi gibi durumlar nedeniyle zordur. Tanı için kan gazı analizi, anyon gap ve osmolar gap hesaplanmasının ardından tanıda kullanılabilecek laboratuvar bazlı ideal analitik testler; serum metanol ve format düzeylerinin ölçülmesidir (69, 76). Diğer biyokimyasal parametreler ve görüntüleme yöntemleri hem tanıyı desteklemede hem de metanol zehirlenmesinin diğer organ etkilenimleri ve komplikasyonlarını göstermeye yardımcı olmaktadır.

a. Metanol ve Metabolitlerinin Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Formaldehitin kanda metabolize olmadan kalış süresi 1-2 dakika gibi çok kısa bir süre olduğundan formaldehit düzeyinin serumda tespit edilmesi zordur. Bu nedenle metanol zehirlenmesi tanısında kullanılabilecek olan laboratuvar bazlı testler; serum metanol ve format düzeylerinin ölçülmesidir (19, 39).

Serum Metanol Konsantrasyonunun Ölçülmesi

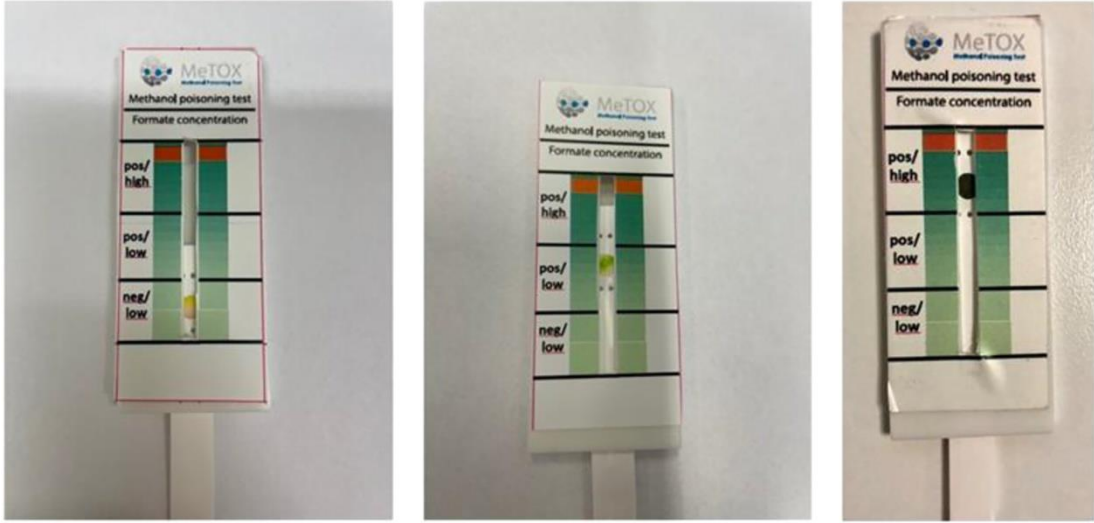
Serum metanol düzeyi, en sık gaz kromatografisi ya da kütle spektrometrisi ile ölçülmekte olup; metanol zehirlenmesi için altın standart tetkik, gaz kromatografisi ile serum metanol düzeyinin ölçülmesidir (19, 76). Geleneksel olarak 25 mg/dL'den daha büyük serum metanol düzeyleri toksik olarak kabul edilir (19, 39). Fakat metanol alımından hemen sonra erken başvuran, henüz gastrointestinal sistemden emilimi yeterince gerçekleşmemiş ve metabolik asidoz gelişmemiş hastalarda; ya da metanol alımından sonra geç başvuran hastalarda, metanolün çoğu toksik metabolitlerine metabolize olacağından yalancı negatif sonuçlar elde edilebilmektedir (3, 19, 39). Ayrıca bu tetkik, yüksek gelirli ülkelerdeki çoğu hastanede bile bulunmayan, bulunsa bile günün her saatinde çalışabilen bir tetkik olmayıp; orta ve düşük gelirli ülkelerde hiç mevcut değildir. Birçok hastanede yalnızca dış laboratuvar tetkiki olarak çalışılabilmektedir, bu durum da testin kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır (19, 76).

Serum Format Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Metanol zehirlenmesi ile başvuran hastaların çoğu geç başvuru olup, metanolün çoğu, toksik metaboliti olan formata metabolize olacağından; bu hastalarda serum format konsantrasyonlarının ölçülmesi daha anlamlı olacaktır (39). Etanolle birlikte mikst alımı olan hastaların, serum metanol düzeyleri yüksek olsa bile genellikle etanol negatifleşinceye kadar ölçülebilir format düzeyleri oluşmaz. Bu nedenle metanol zehirlenmesi şüpheleniliyorsa bu hastaların seri test edilmesi gerekir (19). Serum format düzeyleri kromatografik veya enzimatik yöntemlerle ölçülebilmektedir (69). 2012 yılında Çek Cumhuriyeti'nde meydana gelen metanol zehirlenmesi salgınında, 4 mmol/L üzerinde olan format düzeylerinin görsel toksisite ile ilişkili olduğu, 11 mmol/L üzerindeki düzeylerde kalıcı ve nörolojik sekeller geliştiği, 17.5 mmol/L üzerindeki düzeylerin ise potansiyel olarak ölümcül olduğu gösterilmiştir (19, 77).

Serum format düzeylerinin ölçümü için 2022 yılında Lao ve ark tarafından format oksidaz enzimi kullanılarak bir test üretilmiştir (Resim 1). Test, 1 mmol/L ve üzerindeki format seviyelerini %100 duyarlılık ve %97 özgüllük ile tespit edebilmektedir. Bu teste göre, 1 mmol/L ve üzerindeki format konsantrasyonları negatif, 1–10 mmol/L arası düşük pozitif, 10 mmol/L'nin üzerindeki değerler ise yüksek pozitif olarak kabul edilmektedir. Bu testin yatak başı sadece 1 damla kan ile yapılabilmesi ve dakikalar içinde sonuç vermesi nedeniyle vakaların hızlı tespiti için umut vaat etmektedir (76).

Metanol ve formatın gerçek serum konsantrasyonlarını tespit etme ve yorumlama ile ilgili sorunlar nedeniyle, şüpheli metanol zehirlenmesi olan hastayı değerlendirirken serum metanol ve format düzeylerinin ölçümünün yanında; öykü, diğer klinik veriler, kan gazı birlikte değerlendirilmeli ve hastanın ilk laboratuvar değerlendirmesi; serum elektrolitlerini, kan üre azotu, serum kreatinin konsantrasyonlarını, idrar tahlili, ölçülen serum osmolaritesi ve serum etanol konsantrasyonunu içermelidir (19, 39).



(Kaynak 69'dan alınmıştır)

Resim 1: Formatın yarı niceliksel tespiti için üç seviyeli ölçeğe sahip format testi

b. Kan Gazı Analizi ve Anyon Gap Hesaplanması

Metanol zehirlenmesinden şüphelenilen her hastada kan gazı mutlaka değerlendirilmelidir. Metanol metabolizması sonucu oluşan format, genellikle metabolik asidoza neden olmaktadır (69). Bu hastalarda metabolik asidoz gelişmesi metanol alımından sonra, 16-24 saat kadar bir zaman alabilmektedir. Ayrıca etanol mikst alımı varsa bu süre daha da uzayabilmektedir (19). Ancak zehirlenmenin erken dönemlerinde serum bikarbonatı düşerken, serum klor konsantrasyonu arttığından belirgin bir anyon gap oluşmayabilir. Bu nedenle metabolik asidoz anyon gap gelişmeden önce başlar, metanol metabolizması devam ettikçe anyon gap de artmaya başlar (3). Metabolik asidoz olmadan metanol zehirlenmesi olması durumunda genellikle hastalarda görsel disfonksiyon gelişmez. Ayrıca hastaların klinik semptomları serum metanol düzeylerinden ziyade metabolik asidoz ile daha koreledir (3).

Fizyolojik koşullarda plazmanın anyon konsantrasyonu ile katyon konsantrasyonu birbirine eşit, nötralize durumdadır. Anyon gap, ölçülen toplam plazma katyonları ile ölçülen toplam plazma anyonları arasındaki farktır (3). Anyon gap'in normal aralığı 8-16 mmol/L'dir (78). Metanol zehirlenmesinde, metanolün toksik metaboliti olan format ve histotoksik hipoksiye bağlı oluşan laktatın oluşması anyon gap'in artmasına katkıda bulunur. Anyon gap aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$\text{Anyon Gap: } [\text{Na}^+ + \text{K}^+] - [\text{HCO}_3^- + \text{Cl}^-]$$

Metanol zehirlenmesi durumunda anyon gap artmaktadır fakat anyon gap'i artıran tek patoloji metanol zehirlenmesi değildir. Hastalarda yüksek klinik şüphe yoksa mutlaka artmış anyon açıklı metabolik asidoz yapan diğer nedenler de göz önünde bulundurulmalıdır. Şelil-5'te artmış anyon açıklı metabolik asidoz yapan nedenler gösterilmektedir.

C	Carbon monoxide / Cyanide / Congenital heart failure
A	Aminoglycosides
T	Teophylline / Toluene (Glue-sniffing)
M	Methanol
U	Uremia
D	Diabetic ketoacidosis / Alcoholic ketoacidosis / Starvation ketoacidosis
P	Paracetamol / Acetaminophen / Phenformin / Paraldehyde
I	Iron / Isoniazid / Inborn errors of metabolism
L	Lactic acidosis
E	Ethanol / Ethylene glycol
S	Salicylates/ASA/Aspirin

Şekil 5: Artmış anyon açıklı metabolik asidoz yapan nedenler

c. Osmolar Gap Hesaplanması

Osmolarite 1 litre çözelti başına çözünen partikül miktarı, osmolalite ise 1 kg çözelti başına çözünen partikül miktarıdır. Osmolar gap ise ölçülen osmolalite ve hesaplanan osmolarite arasındaki farka dayanarak serumda ölçülmemiş, osmotik aktif bileşiklerin varlığını tahmin etmede kullanılır. Fizyolojik koşullarda osmolar gap kalsiyum, kalsiyum anyonları, protein ve lipidlerden oluşmaktadır. Osmolar gap, metanol, etilen glikol, propilen glikol, etanol, izopropanol ve aseton varlığında artmaktadır. Tablo-1'de çeşitli alkollerin 100 mg/dL konsantrasyonda osmolar gap'te ne kadar değişiklik yaptığı gösterilmektedir. Osmolar gap'in normal değer aralığı -14 ile +10 arasındadır ve aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmaktadır (3, 19, 69):

$$\text{Osmolar Gap} = \text{Ölçülen Osmolalite} - \text{Hesaplanan Osmolarite}$$

Ölçülen osmolalite laboratuvar birimi tarafından ölçülüp bildirilmektedir ve ölçülen osmolalitenin normal aralığı 270-290 mOsm/kg H₂O'dur. Hesaplanan osmolarite ise aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmaktadır:

$$\text{Hesaplanan Osmolarite} = 2. [\text{Na}] + [\text{Glukoz}] / 18 + [\text{BUN}] / 2.8$$

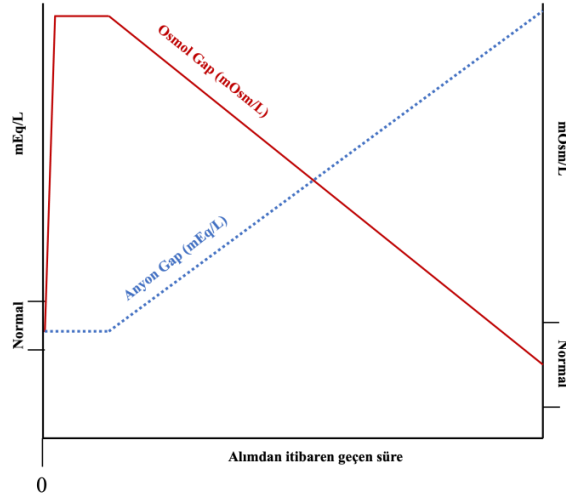
Metanol osmolar gapı artırsa bile, osmolar gapın metanol zehirlenmesine olan duyarlılığı ve özgülülüğü düşüktür. Ayrıca osmolar gap'ın artmamış olması da önemli bir metanol konsantrasyonunun varlığını dışlamamaktadır. Örneğin normalde osmolar gap'ı -10 olan bir hastanın mevcut osmolar gap'ı +5 ise bu durum potansiyel olarak 47 mg/dL'lik bir metanol konsantrasyonunu gösterebilmektedir (3, 19).

Tablo 1. Alkollerin (100 mg/dL) osmolal katkısı

	Molar kütle (g/mol)	Osmolalite (mOsm/kgH ₂ O)
Metanol	32	34
Etanol	46	24
Aseton	58	18
Izopropanol	60	17
Etilen glikol	62	17
Propilen glikol	76	14
Dietilen glikol	106	10

(Kaynak 69'dan uyarlanmıştır)

Metanol alındıktan hemen sonra, serumda konsantrasyonu arttıkça osmolar gap artar, henüz metabolize olup formata dönüşmediği için anyon açığı etkilenmez. Metanol metabolize olup formata dönüştükçe osmolar açık azalır anyon gap artmaya başlar (19). Osmolar gap ve anyon gap arasındaki bu süreç Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6: Anyon gap ve osmolal gap'in zaman içindeki ilişkisi (Kaynak 19'dan uyarlanmıştır)

d. Hematolojik ve diğer Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Metanol zehirlenmesi şüphesi ile başvuran hastada serum metanol ve etanol düzeyleri, kan gazı, anyon gap ve osmolar gap hesaplanmasının yanında; mutlaka serum elektrolitleri, tam kan sayımı, kan üre azotu, kreatinin, hepatik aminotransferaz enzimleri, serum amilaz ve kreatinin kinaz düzeyleri değerlendirilmelidir (3).

Metanol zehirlenmesi olan hastalarda miyoglobinüriye bağlı kreatinin kinaz, kreatinin ve kan üre azotu artışı, hastaların metanol zehirlenmesinin önemli bir komplikasyonu olarak pankreatit geliştirmeleri durumunda serum amilaz ve hepatik aminotransferaz düzeylerinde artış görülebilmektedir (3, 19, 39, 69).

Bu hastalarda genellikle hemoglobin, hematokrit ve lökosit sayıları normal görülmektedir. Hücresel şişmeye bağlı olarak ortalama eritrosit hacminde (MCV) artış görülebilmektedir (19).

e. Görüntüleme

Metanol zehirlenmesinde, putamen nekrozuna bağlı olarak, kontrastsız beyin tomografisinde putamende ve nucleus kaudatusta hipodansite görülebilir (3, 39, 79). Beyin BT (Bilgisayarlı tomografi) ve MR (Manyetik rezonans) görüntülemelerinde putaminal nekroz, putaminal hemoraji, beyin ödemi, özellikle insular, frontal,

oksipital ve paryetal loblarda subkortikal beyaz cevher lezyonları görülebilir. Ayrıca metanol intoksikasyonu ile ilişkili olarak nadir de olsa bilateral pontin tegmental nekroz, serebellar nekroz, subaraknoid kanama ve intrakranial kanama görülebilir (80-83).

Beyin BT ve MR görüntülerinde yukarıda belirtilen karakteristik bulgular ve komplikasyonlar görülmesine rağmen, santral görüntülemenin rutin değerlendirmedeki yeri tartışmalıdır. Fizik muayenesinde patoloji saptanmayan ve nörolojik anormallliği olmayan hastalarda rutin BT ve MR genellikle önerilmemektedir (19, 39).

2.1.8. Metanol Zehirlenmesinin Tedavisi

a. Stabilizasyon ve Destekleyici Bakım

Metanol zehirlenmesi ile başvuran hastalarda ilk olarak havayolu, solunum, dolaşım ve hayatı tehdit eden acil komplikasyonların değerlendirilmesi ve düzeltilmesi gerekmektedir. Bu hastalarda sonraki ilk yaklaşım ise henüz ortaya çıkmamışsa, komplikasyon gelişmesini önlemeye veya varsa asit-baz bozukluğunu düzeltmeye çalışmaktır (3, 19, 39).

Metanol zehirlenmesi, ciddi metabolik asidoz, solunum depresyonu ve komaya neden olabileceğinden şiddetli zehirlenmede genellikle hastaların entübasyon ve mekanik ventilasyon ihtiyacı olabilmektedir. Ayrıca alkolün hem kendisinin vazodilatasyon etkisi hem de kusmaya bağlı bu hastalarda hipotansiyon gelişebilmektedir. Böbrek fonksiyonları normal olan hastalarda, idrar çıkışını sürdürmek için, hastalara intravenöz kristaloid ile sıvı resüsitasyonu yapılmalıdır. Hastalarda nöbet gelişmesi durumunda benzodiazepinler ile tedavi edilmelidir (3, 19, 39, 69).

Metanol gastrointestinal sistemden çok hızlı emildiği için ve aktif kömüre sınırlı bağlanma gösterdiği için, metanol zehirlenmelerinde gastrointestinal dekontaminasyonun yeri yoktur (19, 69).

b. Metabolik bozuklukların düzeltilmesi

Çoğu klinik toksikolog, metabolik asidozun agresif şekilde sodyum bikarbonat tedavisi verilerek düzeltilmesini önermektedir. Hastaların ilk birkaç saat içinde 500-800 mmol (mEq) veya daha fazla sodyum bikarbonata ihtiyacı olabilmektedir. pH'ı 7.30'un üzerine çıkarmak için, pH < 7.30 ise hastalar intravenöz sodyum bikarbonat ile tedavi edilmelidir (3, 19, 69).

Metabolik asidozun tedavisindeki hedef, asidozun tam olarak düzeltilmesi olmalıdır. Bu nedenle hastalar agresif şekilde sodyum bikarbonat ile tedavi edilmelidir (69). Özellikle, henüz alkol dehidrogenaz inhibisyonu yapılmamışsa format artmaya devam edecek ve asidozu düzeltmek için çok daha yüksek dozlarda sodyum bikarbonata ihtiyaç olacaktır (19, 39, 69). Bu hastalarda sodyum bikarbonat ile birlikte mutlaka etanol veya fomepizol de verilerek metanolün metabolizmasının durdurularak formata dönüşümünün bloke edilmesi gerekmektedir. Çünkü metabolizma sonucu oluşacak olan format hastadaki metabolik asidozu sodyum bikarbonat tedavisine dirençli hale getirebilmektedir (69).

c. Antidotal tedavi: Alkol Dehidrogenaz Enziminin İnhibisyonu

Metanol zehirlenmesi ile başvuran hastaların başlangıç yönetiminin ilk resüsitasyondan sonraki en önemli parçası alkol dehidrogenaz enziminin blokajıdır. ADH enziminin blokajı hem toksik metabolitlerin oluşumunu önler hem de hemodiyaliz için hastalara zaman kazandırır (19, 69). Etanol, metanol metabolizmasını kendi tarafına kaydırarak, fomepizol ise ADH enzimini bloke ederek etkinlik gösteren antidotal tedavilerdir. Tedavide Fomepizol varsa fomepizol, yoksa etanol önerilmektedir. Etanol ve fomepizol gibi antidotal tedavilerin başlanması için önerilen endikasyonlar Tablo-2'de gösterilmektedir (69, 84). Amerika Birleşik Devletleri'nde fomepizol ve etanolün satın alım maliyeti benzerdir. Ancak özellikle gelişmekte olan ülkelerde fomepizolün satın alım maliyetinin yüksek olması kullanımını sınırlandırmaktadır (84). Bu nedenle etanol, gelişmekte olan ülkelerde hala antidotal tedavi olarak tek seçenek olarak kullanılırken, fomepizole ulaşım ve maliyetin düşük olması nedeniyle ABD'de ise nadiren kullanılmaktadır (19).

Tablo 2. Antidotal Tedavi Kriterleri^a

Önerilen Kriterler	
I	Serum metanol konsantrasyonu $\geq 10 \text{ mmol/L}$ (32 mg/dL) ^b
II	Belgelenmiş/şüpheli alım öyküsü ile birlikte osmolar gap $\geq 25 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$ ^c
III	Belgelenmiş/şüpheli alım öyküsü ile birlikte aşağıdaki kriterlerden 2 veya daha fazlası
	A : Arteriyel pH < 7.3
	B : Serum bikarbonat $< 14 \text{ mmol/L}$ veya baz defisiti (BD) $> 10 \text{ mmol/L}$
	C : Osmolar gap $> 25 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$ ^c
	D : Görme bozukluklarının varlığı
^a Toksik alkol dışlanamıyorsa antidot gecikmeden verilmelidir. Hiçbir osmolar gap değeri toksik alkolü dışlayamaz.	
^b Sadece ciddi bir metabolik asidoz yoksa (Baz açığı $< 10 \text{ mmol/L}$ (10 mEq)) veya organ toksisitesine dair hiçbir belirti yoksa kullanılır.	
^c Etanol katkısı çıkarıldıktan sonra hesaplanan osmolar gap	
(Kaynak 69'dan uyarlanmıştır)	

Etanol

Alkol dehidrogenaz enzimi hem metanol hem de etanolün metabolizasyonundaki ilk reaksiyonu katalizleyen enzimdir. ADH enziminin etanole olan ilgisi, metanolden 15-20 kat daha fazla olup, ortamda etanol olması durumunda metanol yerine etanolü metabolize etmektedir. Bu nedenle ortamda etanolün olması durumunda, metanolün toksik metabolitlerine metabolizasyonu önlenmiş olur (19).

Etanol intravenöz ya da oral olarak uygulanabilmektedir. Hem oral hem de parenteral olarak uygulanan etanol etkili ve güvenli olarak uygulanabilir fakat serum konsantrasyonunu terapötik aralıkta tutmak zordur (3, 19). %10'luk Etanol çözeltisi Tablo-3'te belirtilen başlangıç ve yükleme dozlarında, santral venöz kateter ya da geniş bir periferik damardan, serum etanol konsantrasyonlarını 100-150 mg/dL'de tutacak şekilde intravenöz infüzyon pompası ile uygulanır ve gerekirse yüklemeden sonraki infüzyon hızı titre edilir. Etanol tedavisine, serum metanol konsantrasyonu $< 20 \text{ mg/dL}$, arteriyel pH'ı normal düzeye gelene ve hasta asemptomatik olana kadar

devam edilmelidir. Kural olarak hemodiyaliz sırasında etanolün bakım dozu en az iki katına çıkarılmalıdır. Serum etanol konsantrasyonlarını 100-150 mg/dL aralığında tutmak için 1-2 saatte bir serum etanol düzeyi takip edilmelidir. Hedeflenen aralığa ulaşıldıktan sonra serum etanol düzeyi 2-4 saatte bir takip edilmeye devam edilmelidir (3, 19, 39, 56, 69, 85).

Tablo 3. Etanolün Oral ve İntravenöz Tedavi Dozları

	Etanol miktarı	Hacim (%40'lık Oral Solüsyon)	Hacim (%10'luk IV Solüsyon)
Yükleme dozu	600 mg/kg	2 mL/kg	7.5 mL/kg
Standart idame dozu (Düzenli alkol kullanımı olmayan)	66 mg/kg/h	0.25 mL/kg/h	1-2 mL/kg/h
Standart idame dozu (Kronik alkol kullanımı olan)	154 mg/kg/h	0.50 mL/kg/h	2-4 mL/kg/h
Diyaliz sırasında standart idame dozu (Düzenli alkol kullanımı olmayan)	169 mg/kg/h	0.50 mL/kg/h	2-3.5 mL/kg/h
Diyaliz sırasında standart idame dozu (Kronik alkol kullanımı olan)	257 mg/kg/h	1 mL/kg/h	3-5 mL/kg/h

(Kaynak 3, 69 ve 86'dan uyarlanmıştır)

Etanol infüzyonu sırasında hipotansiyon, flushing, hipoglisemi, hiponatremi, pankreatit, gastrit, solunum depresyonu ve santral sinir sistemi depresyonu gibi komplikasyonlar görülebilmektedir. Bu nedenle özellikle santral sinir sistemi ve solunum depresyonu belirtilerinin gözlenmesi amacıyla mutlaka bu hastalar yoğun bakım ünitesinde takip edilmelidir (3, 19, 69, 86).

Fomepizol (4-Metilpirazol)

Fomepizol, ADH enziminin yarışmalı antagonistidir. Fomepizol oral yolla da hızlı emilir fakat ilaç intravenöz olarak uygulanmaktadır. İntravenöz olarak uygulanırsa izotonik salin ya da dekstroz içinde seyreltilmeli ve verilecek olan doz 30 dakika boyunca infüzyon şeklinde verilmelidir (3, 19).

Fomepizolün başlangıç yüklem dozu 15 mg/kg olup, yüklem dozunun ardından 12 saatte bir 10 mg/kg dozunda intravenöz olarak uygulanmalıdır. 48

saatlik tedaviden sonra fomepizol kendi metabolizmasını indüklediği için, dozu her 12 saatte bir 15 mg/kg'a çıkarılmalıdır. Ayrıca 12 saatte bir olarak uygulanan idame tedavi, hemodiyaliz sırasında 4 saatte bir, sürekli renal replasman tedavisi modellerinde (CRRT) 8 saatte bir uygulanmalıdır (3, 19, 39, 69). Fomepizol tedavisine de etanol ile tedavi edilen hastalarda olduğu gibi serum metanol konsantrasyonu <20 mg/dL'nin altına düşene kadar devam edilmelidir (69).

Fomepizol tedavisinin etanole göre birçok avantajı bulunmaktadır. Etanol gibi hipoglisemiye neden olmaz (3, 84). Santral sinir sistemi ve solunum depresyonu yapmadığından hastaların bu tedaviyi alırken yoğun bakım ünitesinde takip edilmesine gerek yoktur (39, 87). Etanol tedavisinde serum etanol düzeylerinin takip edilmesi gerekirken fomepizol tedavisinde düzey takibine gerek yoktur (19, 39, 69, 84, 87). Ayrıca fomepizol tedavisi, hastanede kalış süresini kısaltabilmekte ve hemodiyaliz ihtiyacını azaltabilmektedir (88, 89). Ancak fomepizol tedavisi sırasında da bradikardi, hipotansiyon, baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı ve nistagmus gibi yan etkiler gelişebilmektedir (19, 90, 91). Bu nedenle her doz uygulanması sırasında ve sonrasında vital bulgular yakından izlenmelidir (19). Ayrıca yapılan çalışmalarda, metanol zehirlenmesi ile başvuran hastalarda etanol ve metanol tedavilerinin terapötik etkinlik anlamında birbirine üstünlükleri gösterilememiştir (29, 30). Ek olarak her iki tedavinin de maliyeti ülkeden ülkeye değişmekle birlikte, çoğu ülkede etanole ulaşım daha kolay olmaktadır (39, 69, 84).

d. Hemodiyaliz

Metanol metabolizması etanol veya fomepizol tarafından bloke edildiğinde, metanolün eliminasyonu çok yavaşlar. Bu durumda yarılanma ömrü yaklaşık olarak 50 saat olur ve eliminasyon ağırlıklı olarak pulmoner ya da renal atılım ile olur (92). Fomepizolün antidotal tedavi olarak kullanıldığı bazı hastalarda hemodiyalizin önlendiği ya da ertelenebildiği gösterilmesine rağmen, bu durum tüm hastalarda mümkün olmamaktadır (84, 93-95). Bu nedenle hangi antidotal tedavi uygulanacaksa uygulansın, bu hastalarda tek başına antidotal tedavinin kabul edilemez (69).

Metanol zehirlenmesi ile başvuran semptomatik hastalar için kesin tedavi hemodiyalizdir. Hemodiyaliz, metabolik asidozun düzeltilmesi, metanol ve toksik

metaboliti formatın vücuttan uzaklaştırılması, hastanede kalış süresinin kısaltılması için önerilmektedir (3, 39, 69). Bu hastalarda hem aralıklı hem de sürekli hemodiyaliz yöntemleri kullanılabilir. Ancak aralıklı hemodiyalizin daha etkin olduğu gösterilmiştir (92). Hemodiyaliz, diyalizden sonraki ilk birkaç saat içinde tüm metanolü ve toksik metabolitlerini uzaklaştırır, metanolün yeniden dağılımıyla hemodiyalizden sonra metanol konsantrasyonları yükselebilmektedir (96).

Metanol zehirlenmesinde hemodiyaliz için kesin endikasyonlar oluşturmak zor olmakla birlikte Zehirlenmelerde Ekstrakorporeal Tedaviler (EXTRIP) grubu metanol zehirlenmesinde diyaliz için rehber yayımlamıştır. Tablo-4’de metanol zehirlenmesi ile başvuran hastalar için önerilen ECTR endikasyonları belirtilmektedir (19, 85).

Tablo 4. Metanol ECTR endikasyonları

Aşağıdaki koşullardan herhangi biri mevcutsa ECTR önerilir:

1. Ciddi metanol zehirlenmesi

- Koma
- Nöbet
- Yeni görme defisiti
- Metabolik asidoz
 - Kan pH ≤ 7.15
 - Yeterli destek ve antidotal tedaviye rağmen persistan metabolik asidoz
- Serum anyon gap > 24 mmol/L ($[\text{Na}^+] - ([\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-])$ formülüyle hesaplanmış)

2. Serum metanol konsantrasyonu

- Fomepizol tedavisi altında >70 mg/dL olması
- Etanol tedavisi altında >60 mg/dL olması
- ADH bloke edici ajan tedavisi almayan hastada >50 mg/dL olması
- Serum metanol konsantrasyonu ölçülemiyorsa osmolar gap bilgilendirici olabilir

3. Bozulmuş böbrek fonksiyonu varlığı

Ekstrakorporeal tedavinin sonuçlarını optimize etmek için:

- 4.** Aralıklı hemodiyaliz, metanol zehirlenmesinde tercih edilen yöntemdir. Aralıklı hemodiyalizin mümkün olmadığı durumlarda sürekli yöntemler kabul edilebilir alternatiflerdir.
- 5.** Hemodiyaliz sırasında ADH inhibitörleri ve folik asit tedavisine devam edilmelidir.
- 6.** Metanol konsantrasyonu <20 mg/dL olduğunda ve klinik iyileşme gözlemlendiğinde ekstrakorporeal tedavi sonlandırılabilir.

Kaynak 19 ve 80’den uyarlanmıştır.

e. Destek tedaviler

Folinik asit (Lökovorin)

Metanolün metabolizasyonu sonucunda oluşan, metanolün toksisitesinden asıl sorumlu metaboliti olan format, endojen folat bağımlı bir reaksiyon ile karbondioksit ve suya metabolize olur (19). Folinik asitin hayvan modellerinde formatın metabolizasyonunu artırdığı gösterilmiştir (97, 98). Folat tedavisiyle format eliminasyonunun arttığını gösteren yalnızca bir insan vaka raporu bulunmaktadır (67). Ayrıca metanol zehirlenmesinden sağ kurtulan 79 hastanın incelendiği bir çalışmada, folat veya folinik asit ile tedavi edilen hastaların, tedavi edilmeyenlere göre daha iyi görsel sonuçlara sahip olduğu gösterilmiştir, ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (99).

Metanol zehirlenmesi olan hastalarda Folinik asit, 4-6 saatte bir 1 mg/kg dozunda maksimum 50 mg olacak şekilde, %5 dextroz içinde seyreltilerek 30-60 dakika içinde intravenöz infüzyon şeklinde önerilmektedir (39, 69). Ayrıca bu hastalarda, tiamin ve piridoksin kullanımı da önerilmektedir (19).

Kortikosteroidler (Metilprednizolon)

Metanol zehirlenmesine bağlı retinal hasar gelişen ve oküler bulguları olan hastalarda, metilprednizolon tedavisinin erken dönemde başlanması; hastaların görme bulgularında iyileşme sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda kortikosteroidlerin anti-inflamatuar, nöroprotektif ve immunsupresif etkilerinin retinal inflamasyon ve optik sinir ödemi azalttığı gözlemlenmiştir (39, 100, 101). Vaka serilerinde hastalara 4 gün boyunca 6 saatte bir 250 mg intravenöz metilprednizolon uygulanmış sonrasında da 10 gün boyunca oral prednizolon tedavisine devam edilen hastaların görme keskinliğinin arttığı gösterilmiştir (7).

Prognostik Faktörler

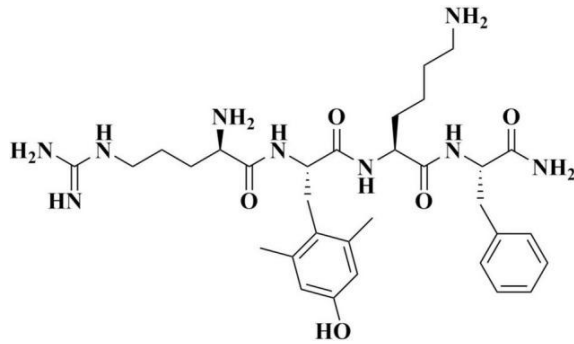
Metanol zehirlenmesi ile ilişkili kötü prognostik faktörler aşağıda belirtilmiştir (3, 29, 34, 39, 52, 72, 102-104):

- Geç başvuru (>24 saat)

- Koma
- Nöbet
- Düşük GKS (Glaskow Koma Skalası) puanı
- Respiratuar arrest
- Hipotermi
- Hiperglisemi
- Ciddi metabolik asidoz ($\text{pH} < 7.22$)
- Ciddi metabolik asidozu olan hastalarda pCO_2 artışı
- Laktat > 7 mmol/L olması
- Serum metanol düzeyinin yüksek olması
- Format düzeyinin > 78.8 mg/dL olması
- Kreatinin artışı

2.2. Elamipretid

Elamipretid (MTP-131, SS 31), “H-d-Arg-2',6'-dimetilTyr-Lys-Phe-NH₂” yapısında, küçük bir moleküler ağırlığa sahip, suda çözünür bir tetrapeptiddir (Şekil 9) (105).



Şekil 7: Elamipretid'in biyokimyasal yapısı

Yapılan çalışmalarda elamipretidin kan-beyin bariyerini geçebildiği, özellikle nöronal hücrelere yüksek geçirgenlik sergileyebildiği gösterilmiştir (13). Elamipretid, hücre içine girdikten sonra, membran potansiyelinden bağımsız olarak

mitokondri tarafından hızla emilmektedir (14, 105, 106). Mitokondriye girdikten sonra da esas olarak ETZ'nin bulunduğu iç mitokondriyal membranı hedef alır ve iç mitokondriyal membranda kardiyolipine bağlanır (18, 107, 108).

Kardiyolipin, sitokrom C'yi iç mitokondriyal membrana bağlayan, ETZ'de ATP sentez kapasitesini artırmak ve optimal elektron transferini sağlamak için sitokrom C'yi ETZ komplekslerine yakınlaştıran bir mitokondriyal iç membran fosfolipitidir. Böylece ETZ sisteminde Kompleks III'ten Kompleks IV'e elektron taşınımını destekleyerek Kompleks IV'ün aktivitesini artırmaktadır (13). Ayrıca kardiyolipin, Kompleks IV'ün peroksidaz aktivitesine bağlı olarak parçalanmaktadır. Bu durum, sitokrom C'nin serbest kalmasına, iç mitokondriyal membrandan ayrılarak mitokondri dışına yani sitoplazmaya giderek kaspaz sistemini aktive etmesi sonucu hücrenin apoptozuna neden olmaktadır (14, 18). Elamipretid, hem kardiyolipine bağlanıp Kompleks IV'ün peroksidaz aktivitesini inhibe ederek apoptozun aktifleşmesini önler, hem de Kompleks IV aktivitesini ve kompleksler arası elektron transportunu destekleyerek ETZ'nin optimal kapasitede çalışmasını desteklemiş olur (14, 18). Ayrıca Elamipretid'in nöral oksidatif stresi (hidrojen peroksit, lipid peroksidasyonu ve ROS) ve nöroinflamasyonu azalttığı da gösterilmiştir (18).

Yapılan çalışmalarda Elamipretid'in, kalp (109, 110), böbrek (111-113), nöronlar (114, 115) ve iskelet kası (116, 117) dahil olmak üzere birçok organda sağlıklı mitokondri üzerinde hiçbir olumsuz etki olmaksızın elektron taşınmasını iyileştirdiği, ROS oluşumunu azalttığı, hücresel ATP sentezini arttırdığı gösterilmiştir (14). Molekülün esas olarak iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine etkileri incelenmişken (12, 118, 119), Huntington hastalığı, Alzheimer (120, 121) ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresi ve nöroinflamasyonu, nöral apoptozu azalttığı, miyokard infarktüsle hayvan modellerinde infarktüsün boyutunu azalttığı saptanmıştır (15-17).

Elamipretid, birkaç göz hastalığı ile ilgili olarak da incelenmiştir ve ratlarda deneysel olarak oluşturulmuş glokom (2) ve travmatik optik nöropati modellerinde nöroprotektif etkilere sahip olduğu (122), insan retinal endotel hücrelerinde diyabet ilişkili hasarı önlediği (123, 124) ve oksidatif stres durumunda, retina ganglion

hücreleri üzerinde antioksidan ve anti-apoptotik etkilere sahip olduğu (17) gösterilmiştir.

Bu çalışma antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar ve nöroprotektif özellikleri olan Elamipretid ve Metilprednizolon'un, metanolün neden olduğu toksik optik nöropati ve retina hasarını, ayrıca beyinde iskemi, inflamasyon, oksidasyon, apoptoza sekonder meydana gelen etkileri azaltabileceği ya da önleyebileceği hipotezi ile planlanmıştır. Bu çalışmada deneysel olarak metanol zehirlenmesi oluşturulan ratlar üzerinde, bu ajanların histopatolojik ve biyokimyasal olarak koruyucu etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi, Yeri, Zamanı ve Araştırma İzni

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı'nda planlandı. 2023/28 protokol numarası ile 04.08.2023 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan onay alındıktan sonra Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütüldü. Çalışmanın biyokimyasal olarak değerlendirilmesi Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda, histopatolojik araştırmaları Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.2. Araştırmanın Evreni

Araştırmanın evrenini, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yetiştirilen Wistar Albino cinsi erkek ratlar oluşturdu.

3.3. Örneklem Büyüklüğü ve Yöntemi

Bu çalışmada, 40 adet 8-10 haftalık, 275 ± 25 g Wistar Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Grup başına düşen rat sayıları hesaplanırken, istatistiksel güç analizleri dikkate alındı. Deneyde kullanılacak olan toplam rat sayısı ve grup başına düşen rat sayısı, G Power programında %95 güven aralığı, %80 güç, 2 etki büyüklüğü ile grup başına 6 rat olmak üzere toplamda 36 rat olarak hesaplandı. Metanol zehirlenmesine bağlı ölüm riski nedeniyle metanol alan gruplar olan Grup 3, 4 ve 5'te 7'şer rat kullanıldı.

Çalışma gününe kadar ratlar, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsü altında, günde iki kez standart kemirgen yemi verilerek ve istedikleri kadar suya erişim sağlanarak, standart çelik kafeslerde tutuldu.

3.4. Deney Protokolü

Bu çalışmada, 40 adet 8-10 haftalık, 275 ± 25 gram Wistar Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Çalışma gününe kadar ratlar, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsü altında, günde iki kez standart kemirgen yemi verilerek ve istedikleri kadar suya erişim sağlanarak, standart çelik kafeslerde tutuldu. Ratların folat metabolizması, insanlara göre daha hızlı olduğundan ve karaciğerlerindeki folat içeriği daha yüksek olduğundan, formik asit birikimi ve metabolik asidoz gelişmesi zordur. Deneysel çalışmalarda Metotrexat'ın (MTX) ratlarda folat içeriğini azalttığı gösterilmiştir (125). Bu nedenle ratlarda insanlara benzer metanol intoksikasyonu geliştirmek ve folat metabolizmasını yavaşlatmak için, hayvanlar rastgele 6 gruba ayrılarak; çalışma gününe kadar kontrol grubunda bulunan ratlar haricindeki tüm ratlara 7 gün boyunca $0,3 \text{ mg/kg/gün}$ dozda MTX intraperitoneal (ip) olarak uygulandı (126). Kontrol grubundaki ratlara ise 1 ml Serum fizyolojik (SF) intraperitoneal olarak uygulandı. 8. günde kontrol grubu haricindeki tüm ratlara 3 g/kg dozunda %30 metanol gastrik gavaj ile verilerek deneysel metanol intoksikasyonu modeli oluşturuldu. Metanol %99'luk solüsyondan izotonik ile seyreltilerek oluşturuldu. Yapılan çalışmalarda ratlar için önerilen maksimum oral dozaj hacmi 10 ml/kg 'dır (127). Bu durum göz önüne alındığında %20 metanol uygulandığında ratların maksimum oral dozaj hacmi aşılabacağından, %30 metanol uygulandı.

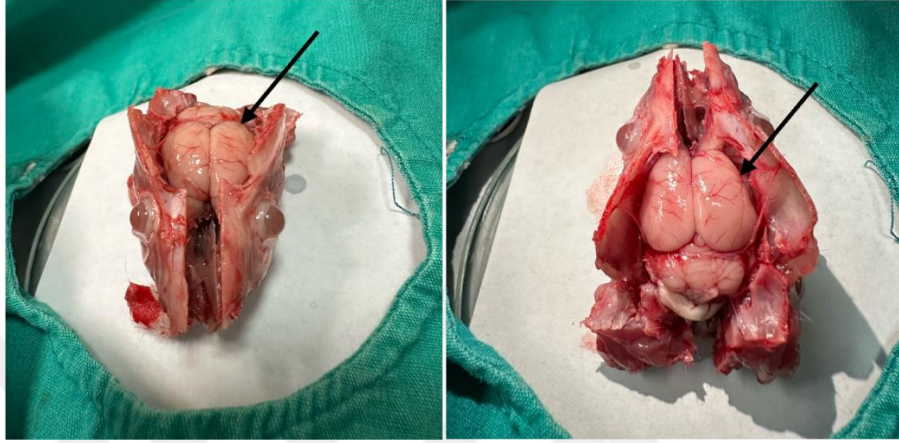
Deneysel metanol intoksikasyonu modeli oluşturulup, Metanol verildikten 4 saat sonra, belirlenen gruplara Elamipretid 3 gün boyunca intraperitoneal olarak 5 mg/kg/gün dozunda ve MPZ 3 gün boyunca intraperitoneal olarak 1 mg/kg/gün dozunda uygulandı. Metanol ve uygulanacak olan ilaçlar izotonik ile seyreltilerek hazırlandı.

Etanol, her ne kadar insanlarda gelişen metanol toksisitesinde temel antidotlardan biri olarak kullanılıyor olsa da, hayvanlarda yapılan çalışmalar, insanlardaki mekanizmanın aksine, ratlarda etanol uygulamasının, metil alkol toksisitesini artırdığı ayrıca etanol verilen ratlarda mortalitenin daha fazla olduğu göstermiştir (128). Bu sebeple deneysel metanol toksisitesi oluşturulan bu çalışmada, etanol uygulanan grup bulunmamaktadır.

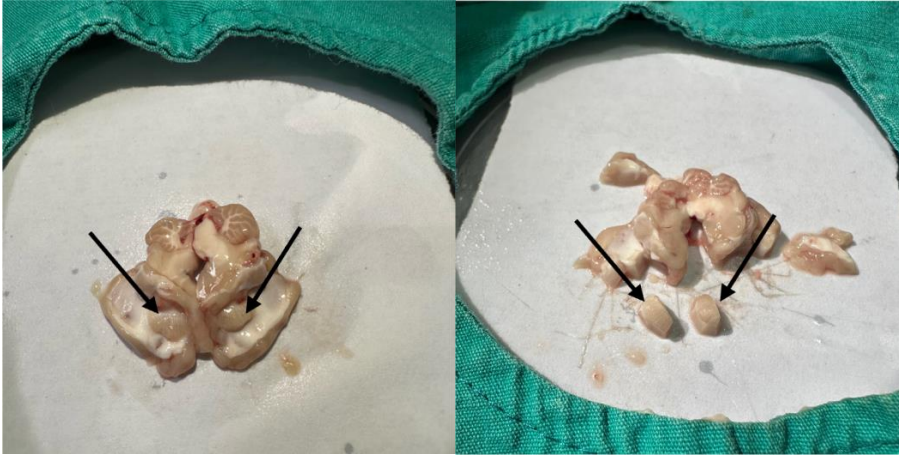
Çalışma için toplamda 6 grup planlanmıştır:

1. **Grup I (Sham grubu – SF, n=6);** Sadece intraperitoneal olarak izotonik uygulanan olan gruptur.
2. **Grup II (MTX grubu, n=6);** 7 gün boyunca 0.3 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal MTX uygulanan gruptur. Bu gruptaki ratlara MTX dışında başka ilaç verilmedi.
3. **Grup III (MTX + Metanol grubu, n=6);** 7 gün boyunca 0.3 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal MTX uygulandıktan sonra 8. Gün 3 g/kg dozunda orogastrik gavaj ile metanol uygulanan gruptur. Bu gruptaki ratlara tedavi edici bir ajan uygulanmadı.
4. **Grup IV (MTX + Metanol + MPZ grubu, n=6);** 7 gün boyunca 0.3 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal MTX uygulandıktan sonra 8. Gün 3 g/kg dozunda orogastrik gavaj ile metanol uygulanan; ilk dozu metanol uygulandıktan 4 saat sonra olacak şekilde 3 gün boyunca 1mg/kg/gün dozda ip MPZ uygulanan gruptur.
5. **Grup V (MTX + Metanol + Elamipretid grubu n=6);** 7 gün boyunca 0.3 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal MTX uygulandıktan sonra 8. Gün 3 g/kg dozunda orogastrik gavaj ile metanol uygulanan; ilk dozu metanol uygulandıktan 4 saat sonra olacak şekilde 3 gün boyunca 5 mg/kg/gün dozda ip Elamipretid uygulanan gruptur.
6. **Grup VI (MTX + Metanol + Elamipretid + MPZ grubu, n=6);** 7 gün boyunca 0.3 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal MTX uygulandıktan sonra 8. Gün 3 g/kg dozunda orogastrik gavaj ile metanol uygulanan; ilk dozu metanol uygulandıktan 4 saat sonra olacak şekilde 3 gün boyunca 5 mg/kg/gün dozda ip Elamipretid ve 1 mg/kg/gün dozda ip MPZ uygulanan gruptur. MPZ, elamipretid her uygulandıktan 1 saat sonra verildi.

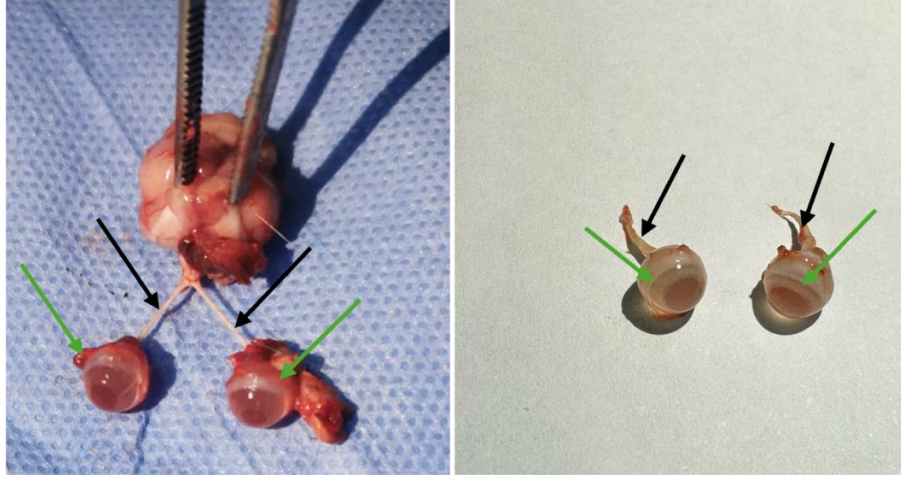
Son ilaç dozu uygulandıktan 8 saat sonra ratlara intraperitoneal anestezi madde uygulaması sonrası, ratlardan serum oksidatif hasar ve inflamatuvar sitokin düzeylerini değerlendirmek üzere intraaortik kan alındı ve sonrasında beyin (Resim 1-2) ve putamen (Resim 3-4) dokusu kraniotomi ile, göz dokusu ve optik sinir (Resim 5-6) enükleasyon ile çıkarılarak histopatolojik inceleme yapıldı.



Resim 2-3: Beyin (ok)



Resim 4-5: Putamen (ok)



Resim 6-7: Göz küresi (yeşil ok) ve Optik sinir (siyah ok)

3.5. Dokuların Histopatolojik Analizi:

Retina, Optik sinir ve Putamenin Histopatolojik Analizi:

Parafine gömülen putamen, göz ve optik sinir dokularının histopatolojik değerlendirmesi döner kollu mikrotom (Leica RM2255, Nussloch, Germany) kullanılarak 5 µm'lik kesitler alınmasının ardından H&E boyası ile boyandıktan sonra değerlendirmeye tabi tutuldu. İşlem, KTÜ Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan DP 71 (Olympus, Tokyo, Japan) dijital fotoğraf makinası aparatına sahip ışık mikroskobu ile (Olympus, BX51, Japan) yapıldı. Elde edilen kesitler, fotoğraf çekilmesi için yine aynı mikroskop kullanarak, değerlendirildi. Kesit alınan preparatlar, deparafinizasyon için 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletildikten sonra aşağıdaki protokole tabii tutuldu.

Tablo 5. Hematoksilen eozin boyama protokolü.

İşlem sırası	Kimyasal / solüsyon / boya / işlem	Bekleme Süresi
1-	Ksilen.....	2 x 5 dk
2-	% 100'lük alkol.....	5 dk
3-	% 96'lık alkol.....	5 dk
4-	% 70'lik alkol.....	5 dk
5-	Distile su.....	2-3 dk
6-	Hematoksilen.....	2.30 dk
7-	Musluk suyu.....	5 dk
8-	Asit alkol	1 kez batırılıp çıkarılır
9-	Distile su.....	1 dk
10-	Amonyaklı su.....	10 sn
11-	Distile su.....	1 dk
12-	Eozin	1.45 dk
13-	Distile su.....	1 dk
14-	% 70'lik alkol.....	5 dk
15-	% 96'lık alkol.....	5 dk
16-	% 100'lük alkol.....	5dk
17-	Ksilen	2 x 5 dk
18-	Entellan ile kapatıldı	

Retina, Optik sinir ve Putamenin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Retinanın Histopatolojik Değerlendirilmesi

Retina ve katmanları El-bakary ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan puanlama sistemine göre değerlendirildi (129). Bu puanlama sistemi ile hücrelerin düzenliliği, şişmesi ve gangliyon hücrelerinin vakuolizasyonu değerlendirildi. Bu puanlama sistemi şu şekildedir:

Grade 5: Normal yapı, hücresel şişme yok

Grade 4: Hücrelerin <%50'sinde yapısal anomali mevcut, hücrelerin %20'si hücresel şişme gösteriyor, vakuolizasyon <%50

Grade 3: Hücrelerin %50-80'inde yapısal anomali mevcut, hücrelerin <%50'si hücrel şişme gösteriyor, vakuolizasyon <%50

Grade 2: Hücrelerin >%80'inde yapısal anomali mevcut, hücrelerin <%50'si hücrel şişme gösteriyor, vakuolizasyon <%50

Grade 1: Hücrelerin >%80'inde yapısal anomali mevcut, hücrelerin >%50'si hücrel şişme gösteriyor, vakuolizasyon >%50

Normal yapı Anormal hücre görülmeksizin retinal tabakanın düzenli, lineer bir düzlemde görülmesi durumudur. Hücrel şişme durumunda retinal tabaka hücreleri büyük ölçüde ödemli görünmektedir.

Optik Sinirin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Optik sinir, vakuolizasyon, anjiyogenezis, sinir rejenerasyonu ve astrosit hücrelerinin çoğalması açısından değerlendirilerek 0 ile 3 puan arasında puanlandı. Bu puanlama şu şekildedir:

0 puan: Değişiklik yok

1 puan: Hafif derecede değişiklik

2 puan: Orta derecede değişiklik

3 puan: Şiddetli derecede değişiklik

Caudatoputamenin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Caudatoputamen dokusu değerlendirilirken, nöronal değişiklikler aşağıdaki puanlama sistemine göre puanlandı. Bu puanlama sistemi şu şekildedir:

Grade 1: Hafif büzüşmüş nöronlar sitoplazmik vakuolizasyon olan /olmayan grup

Grade 2: Orta derecede büzüşmüş nöronlar (eozinofilik sitoplazma), ve artmış nükleer bazofili / veya vakuollü sitoplazma ve veziküler nükleus

Grade 3: Şiddetli büzüşmüş nöronlar (eozinofilik sitoplazma), piknotik nükleus.

Caudatoputamende 100 nöronal hücre sayılarak dejeneratif nöron yüzdesi ışık mikroskop altında 200X büyütmede Analysis 5 Research program (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) kullanılarak sayıldı. Hücre gövdesinde büzüşme, sitoplazmada nissl kaybı ve eozinofili, koyu renkli, küçülmüş nükleuslu hücreler dejeneratif nöronlar olarak değerlendirildi.

Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı nick-end etiketleme (TUNEL) boyama ile apoptoz değerlendirilmesi:

Metanol ile indüklenen nöronların apoptozu ve gözün retina tabakasındaki gangliyon hücrelerinin apoptozunu değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay) tekniği kullanıldı. Rastgele seçilmiş kesitlerden 400X büyütmede gangliyon hücreleri sayılarak apoptotik indeks (AI) hesaplandı (AI: TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı X 100).

TUNEL Boyama Protokolü

Putamen ve retinada ilgili apoptotik hücrelerin varlığını belirlemek amacıyla TUNEL metodu kullanıldı. Dokular doku takip prosedürüne tabii tutulduktan sonra parafine gömüldü ve ardından aynı işlem uygulanarak 5 µm'lik kesitler alındı. Yapılan immunohistokimyasal boyama işleminden sonra aynı düzenekler kullanılmak suretiyle inceleme ve fotoğraf çekimi gerçekleştirildi.

Apoptotik değerlendirmede deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonu baz alınarak değerlendirme gerçekleştirildi. Buna göre, kahve rengi nükleusa sahip hücreler TUNEL pozitif (+) olarak kabul edildi (130). Apoptotik indeksin (AI) tespiti için her denekten alınan örneklerle ait kesitlerde 5 ayrı bölgede apoptotik ve normal hücreler sayılarak AI hesaplandı (131).

$$AI = \text{TUNEL (+) hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı} \times 100$$

TUNEL boyamada *in situ* cell death detection kit kullanıldı. Hazırlanan preperatlar 60 °C'lik etüvde 1 saat tutulduktan sonra deparafinize edilerek aşağıdaki prosedür uygulandı.

Tablo 6. TUNEL boyama protokolü.

	Kimyasal / solüsyon / boya / işlem	Bekleme süresi
1-	Ksilen.....	3×5 dk
2-	%100 etanol.....	5 dk
3-	%95 etanol.....	5 dk
4-	%70 etanol.....	5 dk
5-	Distile su ile yıkanır	
6-	%3'lük H ₂ O ₂ 'de bekletilir.....	15 dk
7-	Distile su ile yıkanır	
8-	PBS (fosfat tampon solüsyonu)'de yıkanır.....	2×15dk
9-	Oda ısısında Large Volume UV (Ultra -V) blok solüsyonda 75 µg Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µl TdT/dUTP karışımı ile dokuların üzeri kaplanır ve 37°C'lik etüvde 1,5 saat nemli ortamda tutulur.	10 dk
10-	PBS'de yıkanır.....	2×5 dk
11-	100 µ Converter peroksidaz dokuyu kapatacak şekilde damlatılır ve 37°C'lik etüvde bekletilir.	30 dk
12-	PBS'de yıkanır.....	2×5 dk
13-	100µl DAB ile karanlıkta oda ısısında bekletilir.....	3-5 dk
14-	Distile su ile yıkanır	
15-	HE ile 15 sn boyanır ve çeşme suyu ile yıkanır	
16-	% 70'lik etanol.....	2×5 dk
17-	% 95'lik etanol.....	2×5 dk
18-	% 100'lük etanol.....	2×5 dk
19-	Ksilen.....	2×5 dk
20-	Kurutulup üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatılır	

3.6. Serum ve Dokuların Biyokimyasal Analizi:

Rat Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) Düzeylerinin Belirlenmesi

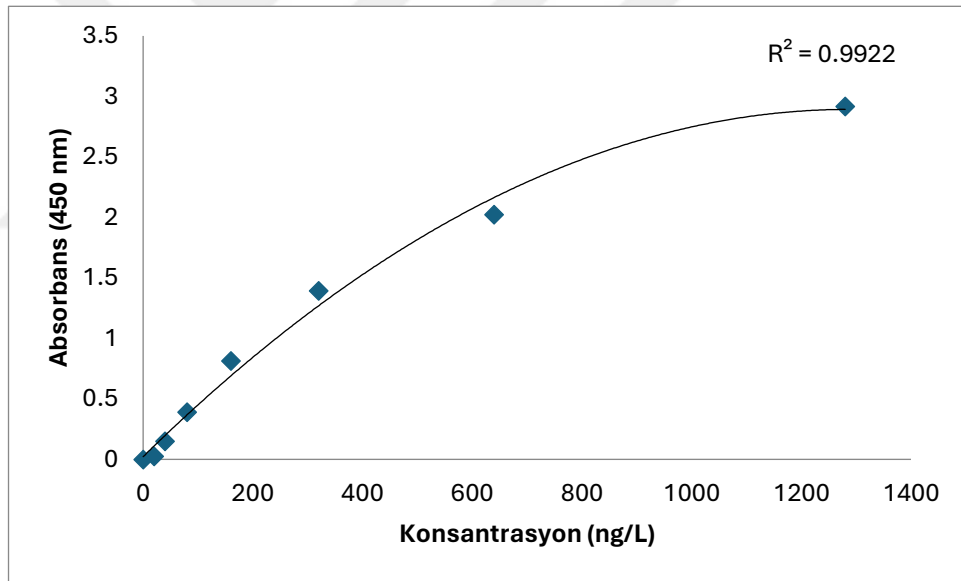
Rat serum ve doku örneklerinde TNF α seviyeleri üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kiti (Bioassay Technology Laboratory, Cat No: E0764Ra, Shanghai, China) kullanılarak sandviç ELISA yöntemiyle belirlendi.

Örneklerin ELISA Pleytine Aktarılması ve Ölçüme Hazırlanması

- -80 °C'deki muhafaza edilen serumlar oda sıcaklığına getirildi.
- Dokular tartılarak pH:7.4 fosfat tampon salin (PBS) çözeltisi ile homojenize edildi.
- Homojenizasyon için 9500 rpm (4x10s, 4°C)' de Ultra-Turrax homejenizatör (model T25, Jane and Kunkel, Germany) kullanıldı.
- TNF- α standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı ve 50 μ L olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- ELISA pleytinde numuneler için ayrılan kuyucuklara 40 μ L serum ve doku örnekleri ilave edildi ve sadece numune kuyucuklarına 10 μ L anti-TNF α antikor eklendi.
- Daha sonra kör (blank) kuyucuğu hariç her bir kuyucuğua 50 μ L streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, önce içindeki sıvı uzaklaştırılıp yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı ile 5 kez yıkandı.

Numunelerin Renklendirilmesi ve Ölçüm

- Renklendirme için her bir kuyucuğa önce 50 µL Substrat çözeltisi A eklendi. Ardından bütün kuyucuklara 50 µL Substrat çözeltisi B ilave edildi. 37°C’de karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Örneklerin absorbansları BIO-RAD (iMark , Japan) marka mikro pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü.
- Serum örneklerinin sonuçları ng/L ve doku örneklerinin sonuçları pg TNFα /mg protein olarak verildi.



Şekil 8. TNF-α Standart Grafiği

Rat Nuclear Factor kappa B (NF-κB) Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat serum ve doku örneklerinde NF-κB seviyeleri üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kiti (Bioassay Technology Laboratory, Cat No: E0287Ra, Shanghai, China) kullanılarak sandviç ELISA yöntemiyle belirlendi.

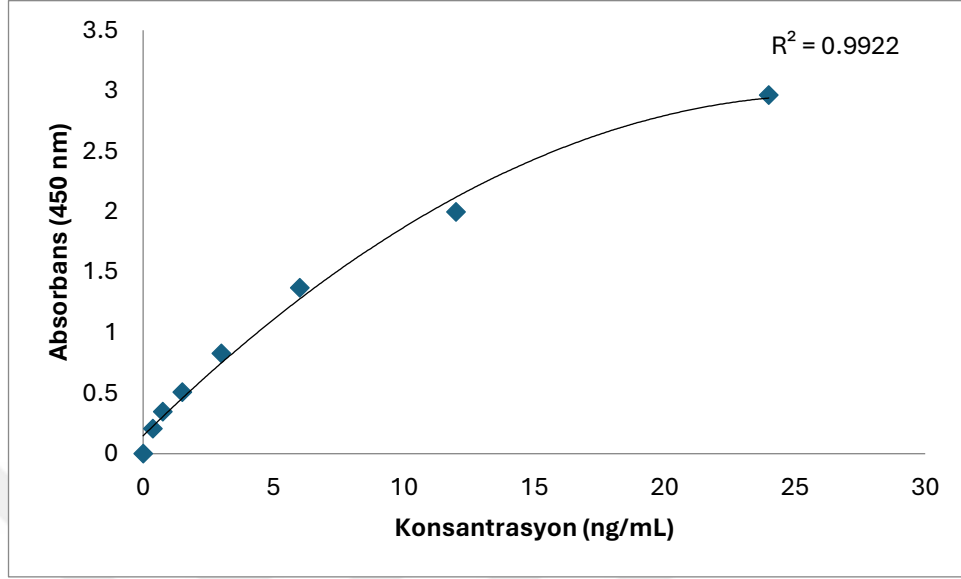
Örneklerin ELISA Pleytine Aktarılması ve Ölçüme Hazırlanması

- -80 °C'deki muhafaza edilen serumlar oda sıcaklığına getirildi.
- Dokular tartılarak pH:7.4 fosfat tampon salin (PBS) çözeltisi ile homojenize edildi.
- Homojenizasyon için 9500 rpm (4x10s, 4°C)' de Ultra-Turrax homejenizatör (model T25, Jane and Kunkel, Germany) kullanıldı.
- NF-κB standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı ve 50 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- ELISA pleytinde numuneler için ayrılan kuyucuklara 40 µL serum ve doku örnekleri ilave edildi ve sadece numune kuyucuklarına 10 µL anti-NF-κB antikor eklendi.
- Daha sonra kör (blank) kuyucuğu hariç her bir kuyucuğa 50 µL streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C'de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, önce içindeki sıvı uzaklaştırılıp yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı ile 5 kez yıkandı.

Numunelerin Renklendirilmesi ve Ölçüm

- Renklendirme için her bir kuyucuğa önce 50 µL Substrat çözeltisi A eklendi. Ardından bütün kuyucuklara 50 µL Substrat çözeltisi B ilave edildi. 37°C'de karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Örneklerin absorbansları BIO-RAD (iMark , Japan) marka mikro pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

- Serum örneklerinin sonuçları ng/mL ve doku örneklerinin sonuçları ng NF-κB /mg protein olarak verildi.



Şekil 9. NF-κB Standart Grafiği

Rat Glutathione (GSH) Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat serum ve doku örneklerinde GSH seviyeleri üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kiti (Bioassay Technology Laboratory, Cat No: EA0113Ra, Shanghai, China) kullanılarak yarışmalı ELISA yöntemiyle belirlendi.

Örneklerin ELISA Pleytine Aktarılması ve Ölçüme Hazırlanması

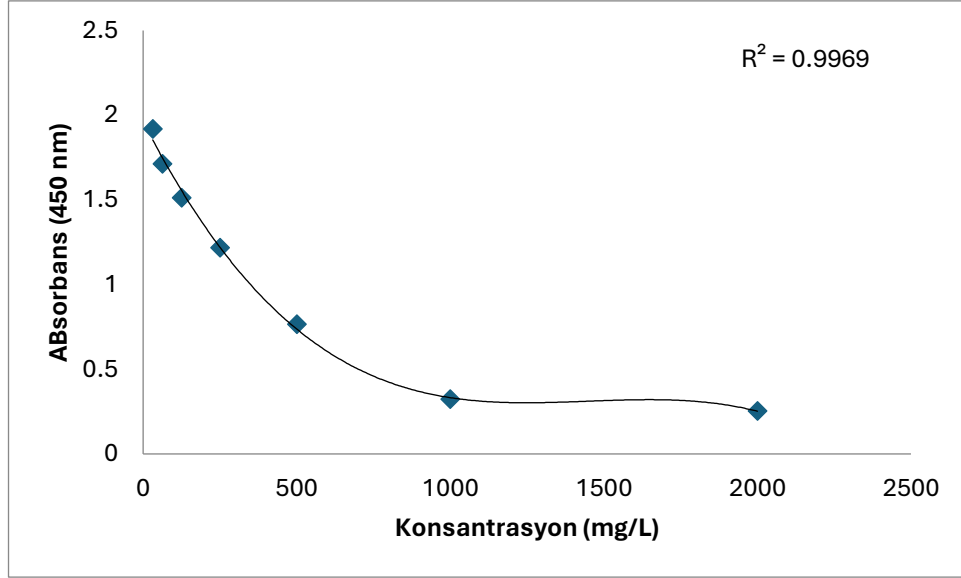
- -80 °C'deki muhafaza edilen serumlar oda sıcaklığına getirildi.
- Dokular tartılarak pH:7.4 fosfat tampon salin (PBS) çözeltisi ile homojenize edildi.
- Homojenizasyon için 9500 rpm (4x10s, 4°C)' de Ultra-Turrax homejenizatör (model T25, Jane and Kunkel, Germany) kullanıldı.
- GSH standartları kit prosedürlerine uygun olarak hazırlandı ve 50 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

- ELISA pleytinde numuneler için ayrılan kuyucuklara 50 µL serum ve doku örnekleri ilave edildi ve kör (blank) kuyucuğu hariç herbir kuyucuğa kuyucuklarına 50 µL biyotin işaretli antikor eklendi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C’de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, önce içindeki sıvı uzaklaştırılıp yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı ile 5 kez yıkandı.
- Daha sonra kör (blank) kuyucuğu hariç her bir kuyucuğa 50 µL streptavidin-HRP çözeltisi ilave edildi.
- Pleyt, folyo ile kapatılarak 37°C’de çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında pleyt, önce içindeki sıvı uzaklaştırılıp yıkama tamponu ile pleyt yıkayıcısı ile 5 kez yıkandı.

Numunelerin Renklendirilmesi ve Ölçüm

- Renklendirme için her bir kuyucuğa önce 50 µL Substrat çözeltisi A eklendi. Ardından bütün kuyucuklara 50 µL Substrat çözeltisi B ilave edildi. 37°C’de karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- Örneklerin absorbansları BIO-RAD (iMark , Japan) marka mikro pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

Serum örneklerinin sonuçları mg/L ve doku örneklerinin sonuçları µg GSH /mg protein olarak verildi.



Şekil 10. GSH Standart Grafiği

Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

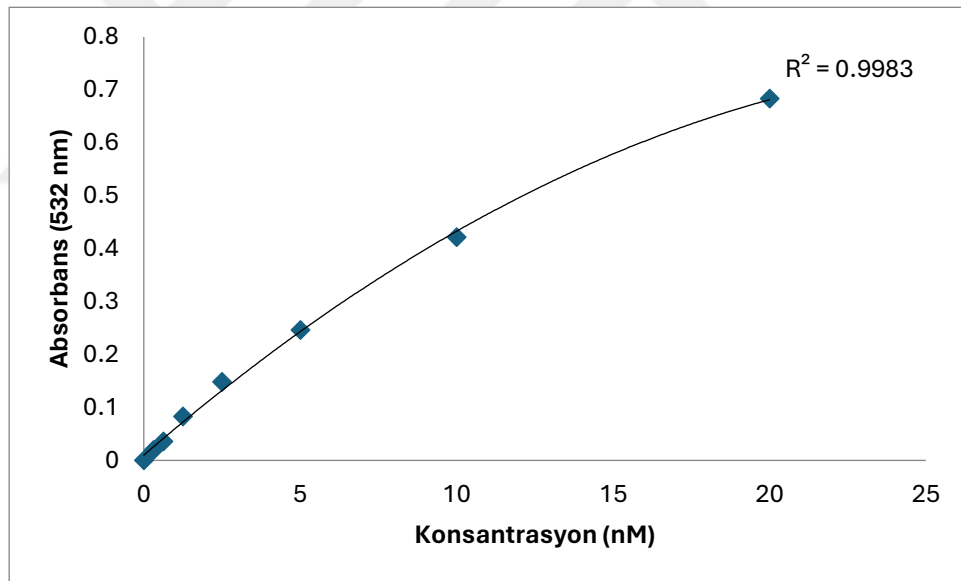
Serum örnekleri biyokimyasal analizler yapılana kadar -80 C°' de saklandı. Serum örneklerinde malondialdehit miktarı Yagi (1984) tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) methodu kullanılarak tayin edildi (132). Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tiyobarbitürikasit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

Deneyin yapılışı :

1. Bir deney tüpüne 150 µL serum, 1.2 mL H₂SO₄ ve 150 mL fosfotungistik asit eklendi, iyice karıştırıldı.
2. Karışım 1800 g' de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve yeniden çözününceye kadar karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı.

4. 1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksiopropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C’ de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden çalışma standartları hazırlandı.
5. Standartlar da dahil her bir tüpe 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100 °C’ de inkübe edildi.
6. İnkübasyonun ardından tüpler 1800 g’de 10 dk. santrifüjlendi.
7. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

Standart konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorban değerleri kullanılarak standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak serum MDA miktarı nM olarak belirlendi.



Şekil 11. Serum MDA Standart Grafiği

Ratlarda doku Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Rat dokularında MDA düzeyi Mihara ve Uchiyama tarafından geliştirilen metod ile tayin edildi (133).

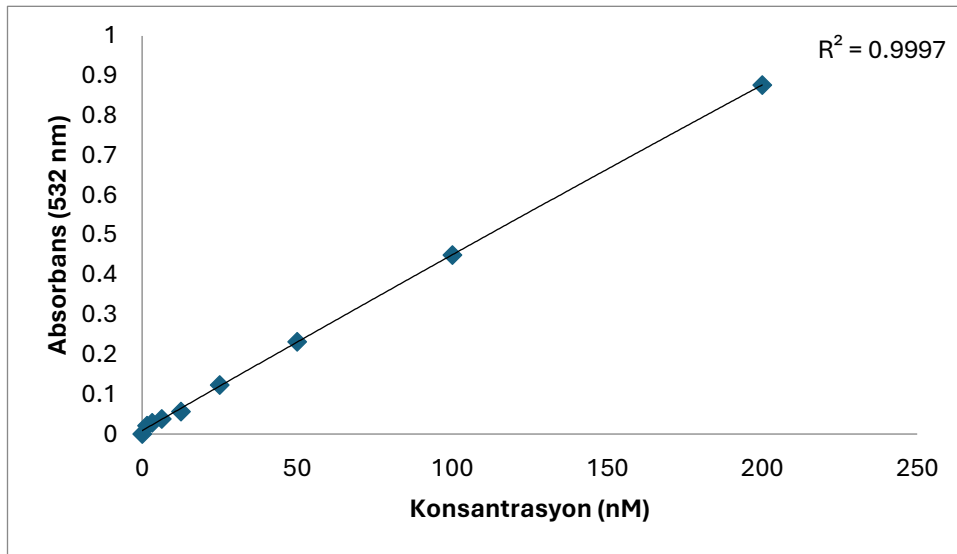
Örneklerin Hazırlanışı :

Dokular tartılarak 0,5mL/L triton-X 100 içeren %1,15 KCl çözeltisi ile homojenize edildi (% 10 ağırlık/hacim). Homojenizasyon için 9500 rpm (4x10s, 4°C)' de Ultra-Turrax homejenizatör (model T25, Jane and Kunkel, Germany) kullanıldı.

Deneyin Yapılışı :

1. 500 µL homojenata 3 mL % 1' lik H₃PO₄ eklenerek karıştırıldı.
2. Karışıma 1 mL % 0,672 lik tiyobarbitürik asit (TBA) eklendikten sonra 45 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi.
3. Oda sıcaklığında 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Organik faz alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 50, 25,10, 5, 2.5,1,25, 0.625, 0.312, 0156 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak doku MDA miktarı nmol MDA/mL olarak hesaplandı. Sonuçlar, nmol MDA /g ıslak doku olarak verildi.



Şekil 12. Doku MDA Standart Grafiği

Toplam Oksidan Seviye Tayini (TOS)

Serum ve doku örneklerinde TOS düzeyleri ticari kitler kullanılarak ölçüldü (Rel Assay, Cat No:RL0024, Gaziantep Türkiye). Kolorimetrik ölçüm prensibine dayalı bu yöntemde; örnekteki oksidanlar Fe^{2+} iyon-o-dianisidin kompleksini Fe^{3+} iyonuna kümülatif olarak oksitler. Fe^{3+} iyonları da asidik ortamda “Ksilenol Turuncusu” ile renkli bir kompleks oluştururlar. Oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür ve örnekte bulunan oksidan miktarıyla orantılı olarak artar. Standart konsantrasyonu 10 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L’dir.

Deneyin yapılışı:

TOS ölçümleri Tablo 1’e uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 7. TOS deney prosedürü

Reaktifler	Örnek (μL)	Standart (μL)
Standart	-	45
Numune	45	-
Reaktif I (Tampon Çözeltisi, 25 mM, pH 1.75 H_2SO_4)	300	300
30 s sonra 530 nm’de ilk absorbans (A1) okuma		
Reaktif II (Substrat Çözeltisi, 25 mM, pH 1.75 H_2SO_4 , 5 mM Fe^{2+} iyonu, 10 mM o-dianizidin)	15	15
Oda sıcaklığında 10 dk bekleme ve 530 nm’de ikinci absorbans (A2) okuma		

Hesaplama:

Her bir örnek ve standart için elde edilen A2 absorbansından A1 absorbansı çıkarılarak absorbans değişimi hesaplandı ($\Delta A = A2 - A1$).

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta A \text{ Örnek})}{(\Delta A \text{ Standart})} \times \text{Standart Konsantrasyonu } (\mu\text{mol/L})$$

Serum örneklerinin sonuçları $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri /L ve doku örneklerinin sonuçları $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri /g protein olarak verildi.

Toplam Antioksidan Seviyenin Tayini (TAS)

Serum ve doku örneklerinde TAS tayini kolorimetrik ticari kitler kullanılarak yapıldı (Rel Assay, Cat No: RL0017, Gaziantep Türkiye). Bu ölçüm metodunun prensibi, örnekteki antioksidanların koyu mavi yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna dönüştürmesi esasına dayanır. Örneğin total antioksidan seviyesi, 660 nm'deki ölçülen renk şiddeti ile ters orantılıdır. Bu metodun standart çözeltisi troloks eşdeğeri (Vitamin E analog) ile hazırlanır. Standart konsantrasyonu 1.0 mmol eşdeğeri/L'dir.

Deneyin yapılışı:

TAS ölçümleri Tablo 2'da verilen deney prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 8. TAS deney prosedürü

Reaktifler	Örnek (µL)	Standart (µL)	H ₂ O (µL)
Deiyonize su	-	-	15
Standart	-	15	-
Numune	15	-	-
Reaktif I (Tampon Çözeltisi, 0.4 mol/L pH 5.8 Asetat Tamponu)	300	300	300
30 s sonra 660 nm'de ilk absorbans (A1) okuma			
Reaktif II (Prokromojen Çözeltisi, 0.4 mol/L pH 3.6 Asetat Tamponu, 30 mmol/L ABTS)	45	45	45
Oda sıcaklığında 10 dk bekleme ve 660 nm'de ikinci absorbans (A2) okuma			

Hesaplama:

Her bir örnekte, standart ve su için tespit edilen absorbansların (A2 ve A1) farkı alınarak absorbans değişimi hesaplandı ($\Delta A = A2 - A1$).

$$TAS = \frac{(\Delta AH_2O) - (\Delta A_{\text{Örnek}})}{(\Delta AH_2O) - (\Delta A_{\text{Standart}})}$$

Serum örneklerinin sonuçları mmol troloks eşdeğeri/L ve doku örneklerinin sonuçları mmol troloks eşdeğeri /g protein olarak verildi.

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplanması

TOS/TAS oranı alınarak OSI değeri hesaplandı. Hesaplama sırasında, TAS değerlerinin birimi, mmol Troloks eşdeğeri /L cinsinden µmol Troloks eşdeğeri/L cinsine dönüştürüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$OSI = [(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (TAS, \mu\text{mol troloks eşdeğeri /L}) \times 100]$$

Göz-Sinir ve Beyin Dokularında Protein Tayini

Göz ve Sinir dokularında homojenatlarında $TNF\alpha$, $NF-\kappa B$, GSH, MDA, TAS ve TOS seviyelerini ve beyin dokusunda MDA, TAS ve TOS seviyelerini standardize etmek için bulunan değerler doku protein seviyelerine bölünerek değerlendirildi. Protein tayini Bradford metoduna göre yapıldı (134). Bu metodun prensibi, organik bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbanı göstermesi esasına dayanmaktadır

Numunelerin Alınması ve Muhafazası

Ratların kanları antikoagulanızsız, EDTA' lı ve heparin içeren tüplere alınarak 3000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek sırasıyla serum ve plazma numuneleri elde edildi. Ratların retina ve beyin dokuları çıkartıldıktan sonra bir kısmı histopatolojik ve bir kısmı biyokimyasal analizler için ayrıldı. Biyokimyasal analizler için alınan numuneler analiz gününe kadar -80°C ' de saklandı.

ELISA ve Kolorimetrik Yöntem ile Tayinler

Retina, beyin dokularında ve serum numunelerinde TAS, TOS düzeyleri kolorimetrik kitler kullanılarak tayin edildi. Doku homojenizasyon işlemleri ticari firmanın önerilerine göre gerçekleştirildi. Dokulardaki konsantrasyon seviyeleri, toplam (mg) protein başına verildi.

Doku Protein Seviyesinin Belirlenmesi

Elde edilen doku homojenatlarında toplam protein miktarı Bradford metodu kullanılarak belirlendi (134).

3.7. Araştırmada Kullanılan İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analizler SPSS for mac versiyon 26 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (**histogram ve olasılık grafikleri**) ve analitik yöntemlerle (**Kolmogorov- Smirnov/ Shapiro-Wilk testleri**) incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapmalar kullanılarak verildi. Normal dağılım gösteren numerik veriler bağımsız gruplar **Anova (post hoc bonferoni)**, Normal dağılım göstermeyen veriler için bağımsız **Kruskall Wallis Testi (post hoc Mann Whitney U Testi)** uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Metanol zehirlenmesi deney modeli oluşturularak yapılan bu deneyde, tüm gruplara ait ratların, göz, optik sinir ve caudatoputamen dokuları histopatolojik olarak incelendi ve intraaortik kan alınarak serumdan TAS, TOS, OSI, MDA, GSH, TNF- α , NF- κ B seviyeleri; ayrıca göz dokusundan TAS, TOS, OSI, MDA, GSH, TNF- α , NF- κ B seviyeleri, caudatoputamen dokusundan ise TAS, TOS, OSI ve MDA değerlerinin ölçümü yapıldı.

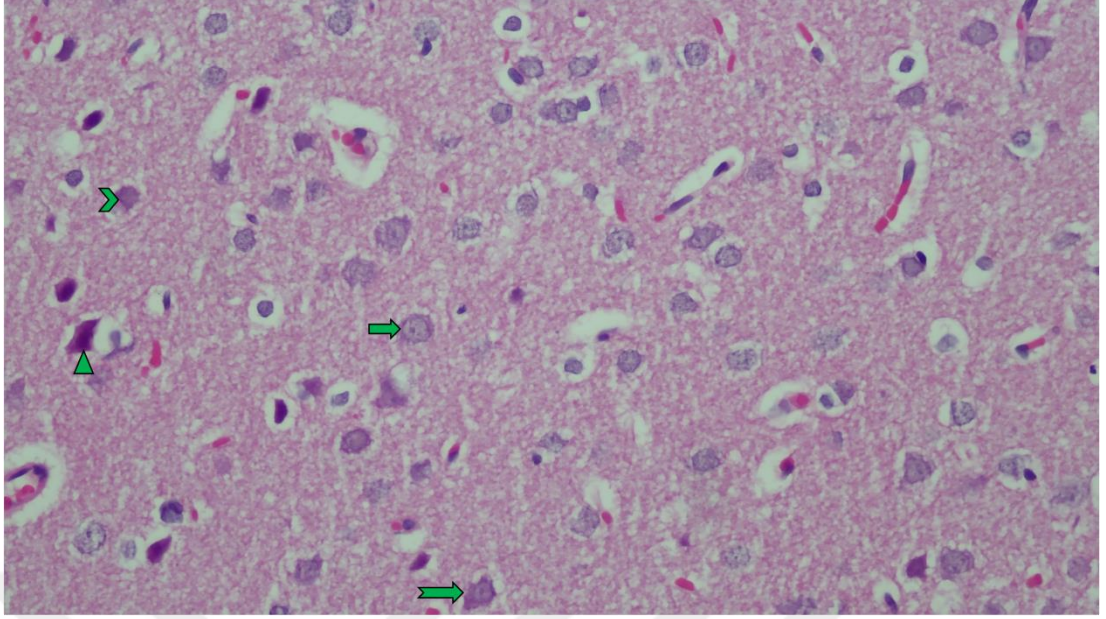
Çalışmada toplam 40 rat kullanıldı ve metanol zehirlenmesine bağlı hayvanlarda ölüm gözlenmedi. Fakat optik sinir ve göz dokusunun elde edilmesindeki zorluklar nedeniyle her grupta 6'şar rat istatistiklere dahil edildi. Grupların özellikleri ve dağılımı Tablo 9'da sunuldu.

Tablo 9. Grupların Dağılımı ve Özellikleri

Grup No	n	%	Özellik
Grup 1	6	16,6	Kontrol
Grup 2	6	16,6	MTX
Grup 3	6	16,6	MTX+Metanol
Grup 4	6	16,6	MTX+Metanol+MPZ
Grup 5	6	16,6	MTX+Metanol+Elamipretid
Grup 6	6	16,6	MTX+Metanol+Elamipretid+MPZ

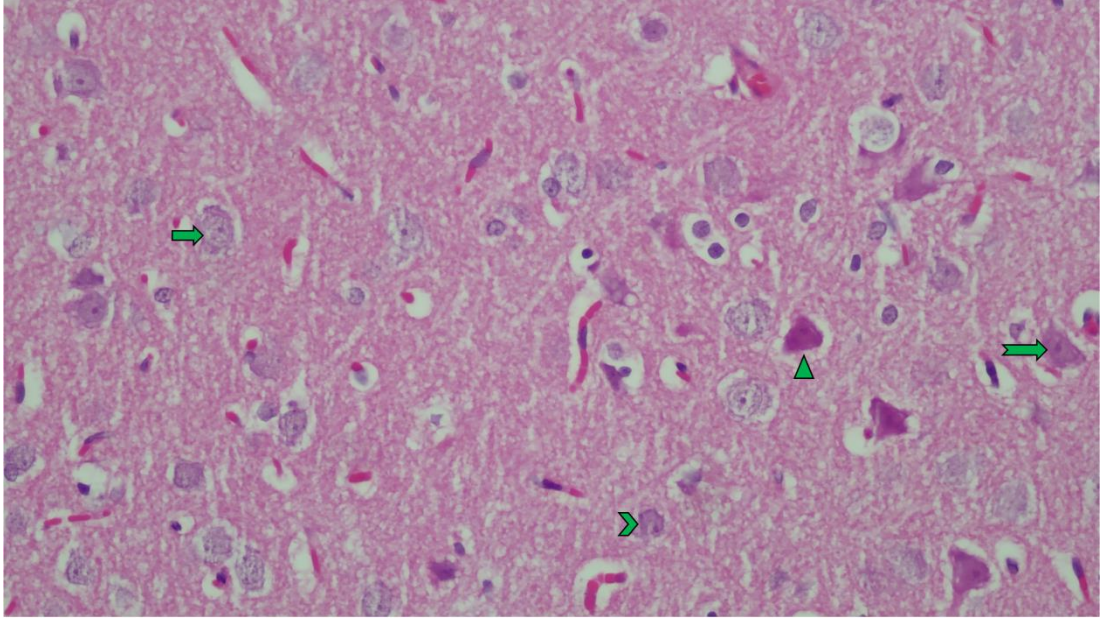
Gruplara ait caudatoputamen dokularının ışıklı mikroskopik değerlendirmesinde;

Grup 1'de normal caudatoputamen dokusu morfolojisi ve nöron histolojik yapısı izlendi (Resim 8).



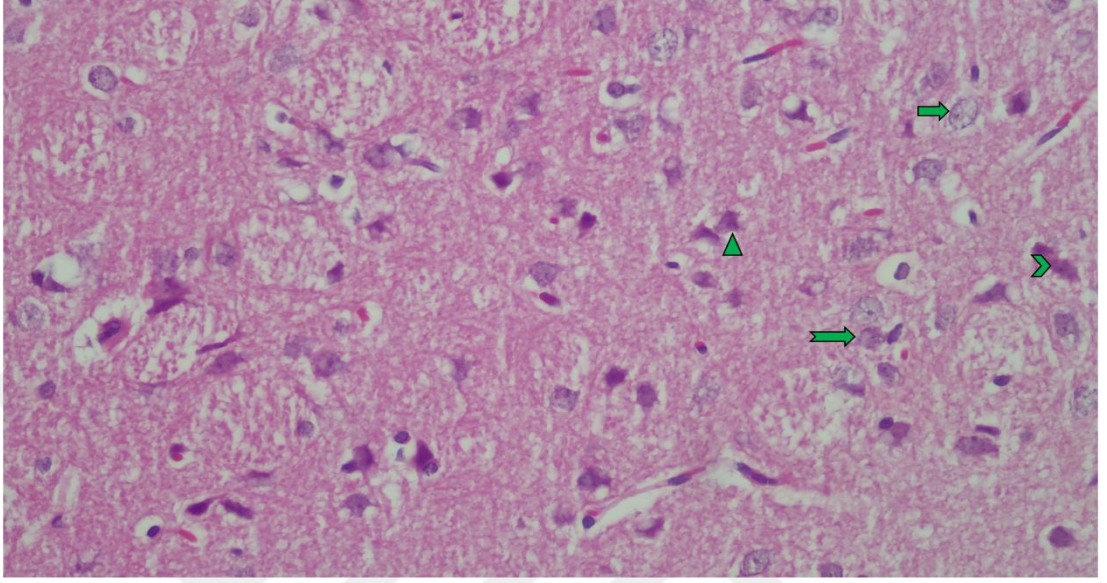
Resim 8: Grup 1 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal yapıda nöron (Ok), Grade 1 Nöron (Çentikli Ok), Grade 2 Nöron (Çentikli Ok Başı), Grade 3 Nöron (Üçgen) ((H/E, 400X)

Grup 2’de de Grup 1’dekine benzer şekilde normal caudatoputamen dokusu morfolojisi ve nöron histolojik yapıları izlendi (Resim 9).



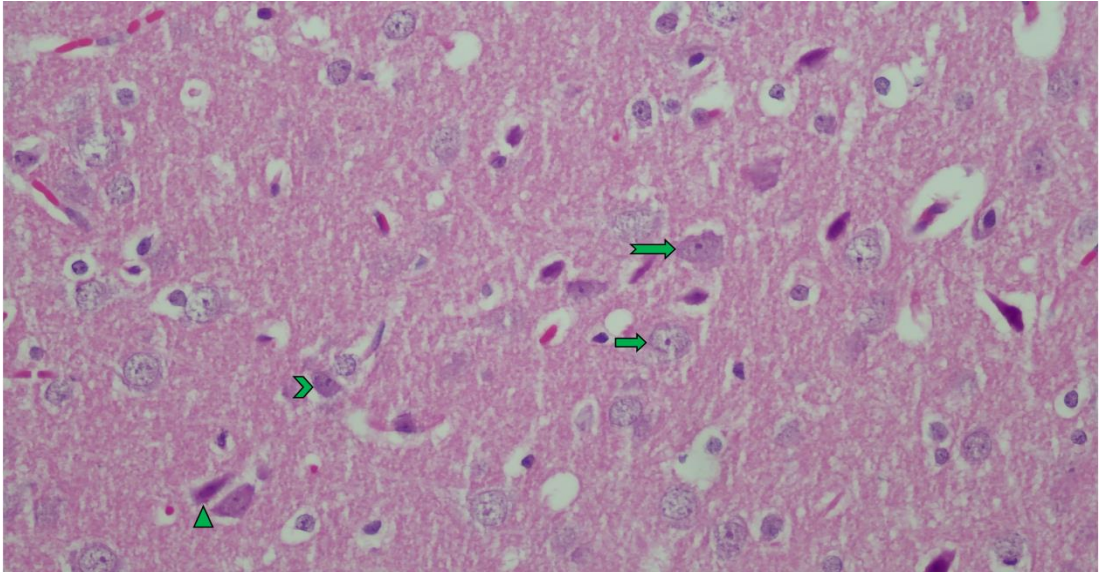
Resim 9: Grup 2 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal yapıda nöron (Ok), Grade 1 Nöron (Çentikli Ok), Grade 2 Nöron (Çentikli Ok Başı), Grade 3 Nöron (Üçgen) ((H/E, 400X)

Grup 3'te normal nöronların yanında tüm caudatoputamene dokusunda yaygın olarak eozinofilik sitoplazmalı, piknotik çekirdekli şiddetli büzüşmüş dejeneratif nöronlar izlendi (Resim 10).



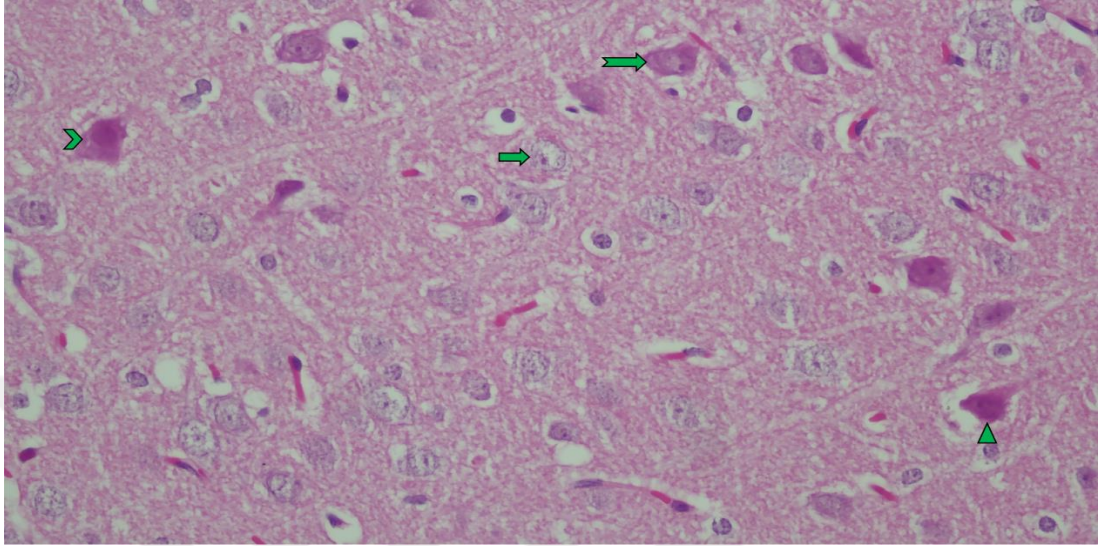
Resim 10: Grup 3 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal yapıda nöron (Ok), Grade 1 Nöron (Çentikli Ok), Grade 2 Nöron (Çentikli Ok Başı), Grade 3 Nöron (Üçgen) ((H/E, 400X)

Grup 4'te normal nöronların yanında Grup 3'e göre daha az miktarda eozinofilik sitoplazmalı büzüşmüş dejeneratif nöronlar izlendi (Resim 11).



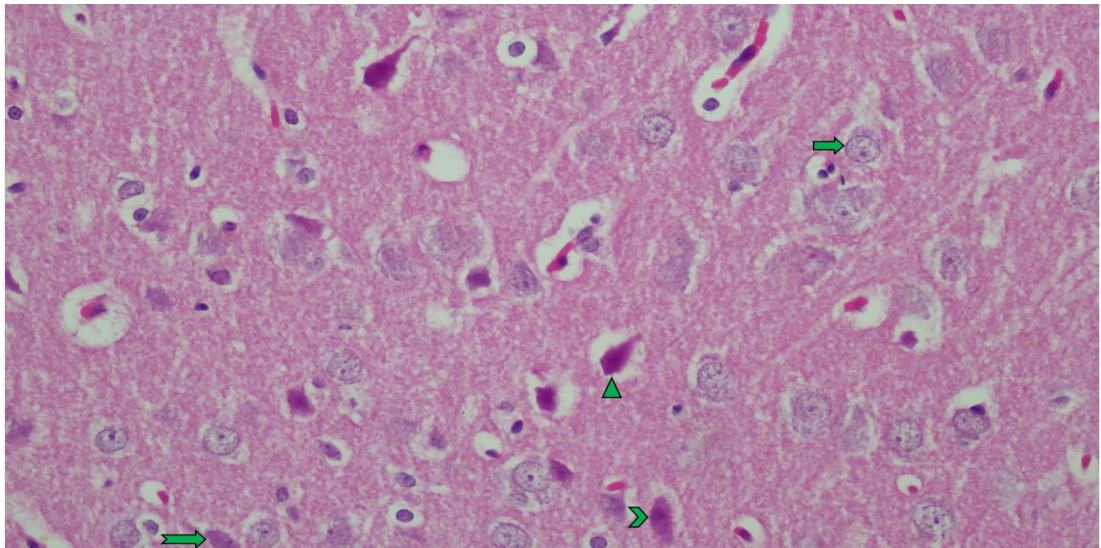
Resim 11: Grup 4 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal yapıda nöron (Ok), Grade 1 Nöron (Çentikli Ok), Grade 2 Nöron (Çentikli Ok Başı), Grade 3 Nöron (Üçgen) ((H/E, 400X)

Grup 5'te Grup 4'e benzer şekilde normal nöronların yanında Grup 3'ten daha az miktarda olmak üzere eozinofilik sitoplazmalı dejeneratif nöronlar mevcuttu (Resim 12).



Resim 12: Grup 5 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal yapıda nöron (Ok), Grade 1 Nöron (Çentikli Ok), Grade 2 Nöron (Çentikli Ok Başı), Grade 3 Nöron (Üçgen) ((H/E, 400X)

Grup 6'da normal nöronların sayısı Grup 1'e oranla daha az olsa da eozinofilik sitoplazmalı, piknotik çekirdekli dejeneratif nöron miktarları birbirine yakındı. (Resim 13).



Resim 13: Grup 6 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal yapıda nöron (Ok), Grade 1 Nöron (Çentikli Ok), Grade 2 Nöron (Çentikli Ok Başı), Grade 3 Nöron (Üçgen) ((H/E, 400X)

Gruplara ait caudatoputamen dokularının dejenerasyon gradelerinin değerlendirilmesinde;

Grupların caudatoputamen dokularının histopatolojik olarak gradelenerek kıyaslanması Tablo 10’da sunuldu. Buna göre;

Tablo 10. Grupların Caudatoputamen Dokularının Histolojik Gradelerinin Kıyaslanması

		n	Ort	SS	Medyan	p	Post Hoc
Normal	Grup 1	6	71,00	2,37	70,50	0,001*	G1>G2>G6>G5>G4>G3
	Grup 2	6	64,00	1,27	63,50		
	Grup 3	6	34,00	2,53	34,00		
	Grup 4	6	41,33	1,63	41,50		
	Grup 5	6	45,50	1,05	45,50		
	Grup 6	6	57,00	1,27	57,50		
Grade 1	Grup 1	6	22,33	2,73	21,50	0,001*	G3>G6>G1-G2 G4>G6>G1-G2 G5>G6>G1-G2
	Grup 2	6	23,00	1,90	23,00		
	Grup 3	6	45,00	2,00	45,00		
	Grup 4	6	44,50	1,64	45,00		
	Grup 5	6	43,67	1,21	43,50		
	Grup 6	6	33,17	1,72	33,50		
Grade 2	Grup 1	6	4,50	1,52	4,50	0,001*	G3>G1-G2 G3>G4-G5-G6
	Grup 2	6	9,17	2,23	9,00		
	Grup 3	6	15,33	3,56	16,50		
	Grup 4	6	9,33	3,08	8,50		
	Grup 5	6	6,83	1,47	6,50		
	Grup 6	6	6,17	1,47	6,50		
Grade 3	Grup 1	6	2,00	1,27	1,50	0,004^	G3>G1 G4>G1
	Grup 2	6	3,83	1,33	4,00		
	Grup 3	6	5,67	1,37	5,50		
	Grup 4	6	4,83	1,17	5,00		
	Grup 5	6	4,00	0,89	4,00		
	Grup 6	6	3,67	1,03	4,00		

*One Way Anova Testi, ^Kruskall Wallis Testi

Gruplar arası caudatoputamen dokusundaki normal hücreler değerlendirildiğinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (p=0.001). Metanole maruz bırakılan gruplardaki (Grup 3, 4, 5 ve 6) normal hücre

miktarı metanol maruziyeti olmayan gruplara göre daha azdı ($p=0.001$). Diğer gruplar arasında anlamlı ilişki Tablo 10'da detaylı şekilde sunuldu.

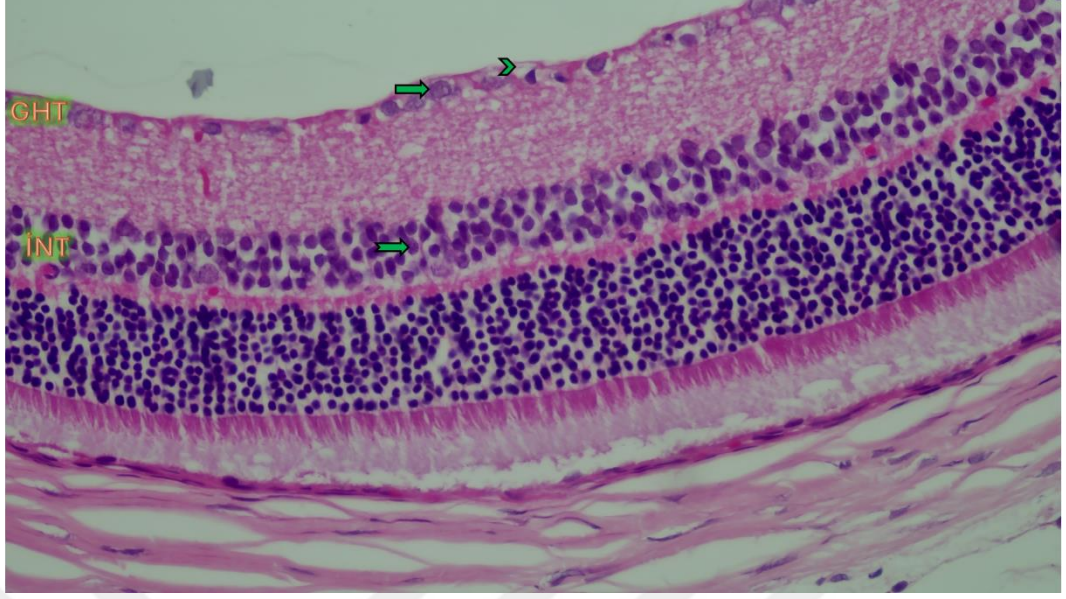
Caudatoputamen dokusundaki grade 1 hücreler değerlendirildiğinde gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde yalnız metanol alan grupta (Grup 3) grade 1 hücresel hasar en fazla iken, yalnız MPZ tedavisi alan (Grup 4) ve yalnız Elamipretid (Grup 5) tedavisi alan gruplar arasında Grade 1 hücresel hasar açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. Fakat hem MPZ hem de Elamipretid alan gruptaki (Grup 6) grade 1 hücresel hasar Grup 3'e göre daha azdı ($p=0.01$).

Caudatoputamen dokusundaki grade 2 hücreler değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yalnız metanol maruziyeti olan gruptaki (Grup 3) grade 2 hücresel hasar diğer gruplara göre daha yüksekti. Gruplar arasındaki ilişki Tablo 10'da detaylı şekilde sunuldu.

Gruplar arası caudatoputamen dokusundaki Grade 3 hücreler değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p = 0.004$). Yapılan post hoc analizde Grup 3'te grade 3 hasar en yüksekti ($p=0.001$). Yalnız Metilprednizolon tedavisi alan grupta (Grup 4) grade 3 hücre hasarı Grup 1'e göre daha fazla olup, Elamipretid alan gruplar (Grup 5 ve Grup 6) ile kontrol grubu (Grup 1) arasında grade 3 hücre hasarı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiş olup diğer gruplar arasındaki ilişki Tablo 10'da detaylı şekilde sunuldu. Ayrıca gruplar arasında Grade 2 ve Grade 3 hücresel hasar değerlendirildiğinde hem Grade 2 hem de Grade 3 hücresel hasar miktarı tedavi gruplarında (Grup 4,5,6) yalnız metanol maruziyeti olan gruba göre (Grup 1) azalmış olmasına rağmen, Grup 4,5 ve Grup 6 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu.

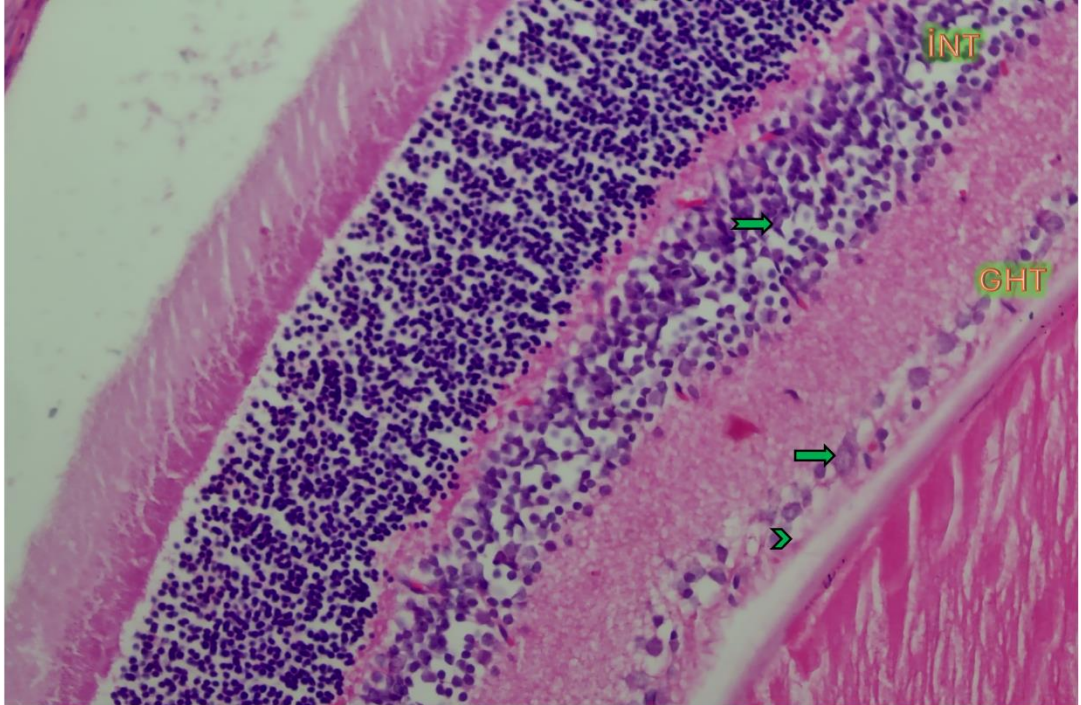
Gruplara ait retina dokularının ışıklı mikroskopik değerlendirmesinde;

Grup 1'de normal retinal tabaka morfolojisi ve normal hücre histolojik yapısı izlendi (Resim 14).



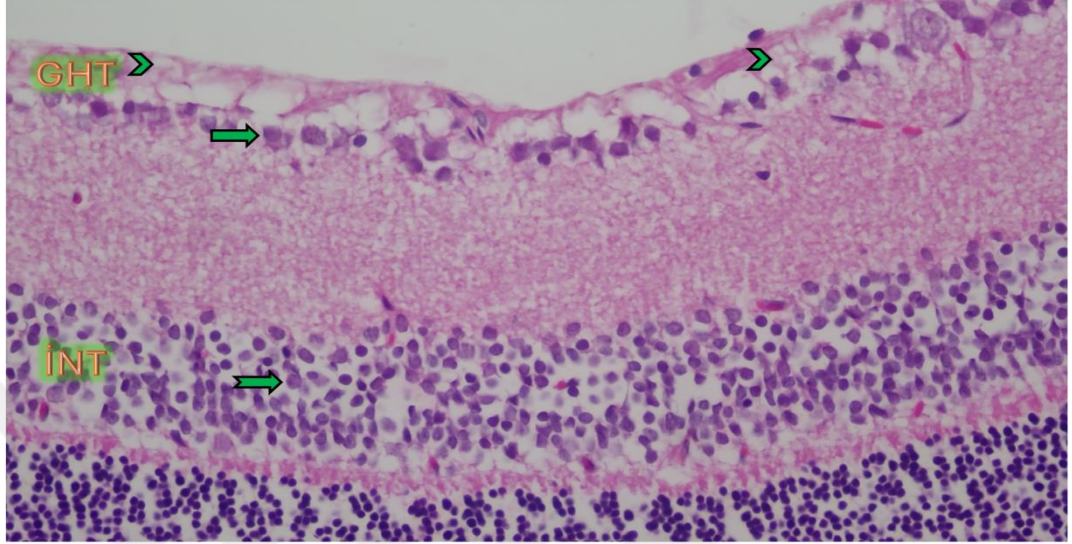
Resim 14. Grup 1 retinaya ait fotomikrograf. GHT: Gangliyon hücre Tabakası, İNT: İç Nükleer Tabaka. Gangliyon hücreleri (Ok), İç Nükleer Tabaka Nöronları (Çentikli Ok), Ödem (Çentikli Ok Başı) (H/E, 400X)

Grup 2’de normal retinal tabaka morfolojisi ve normal hücre histolojik yapısı izlendi (Resim 15).



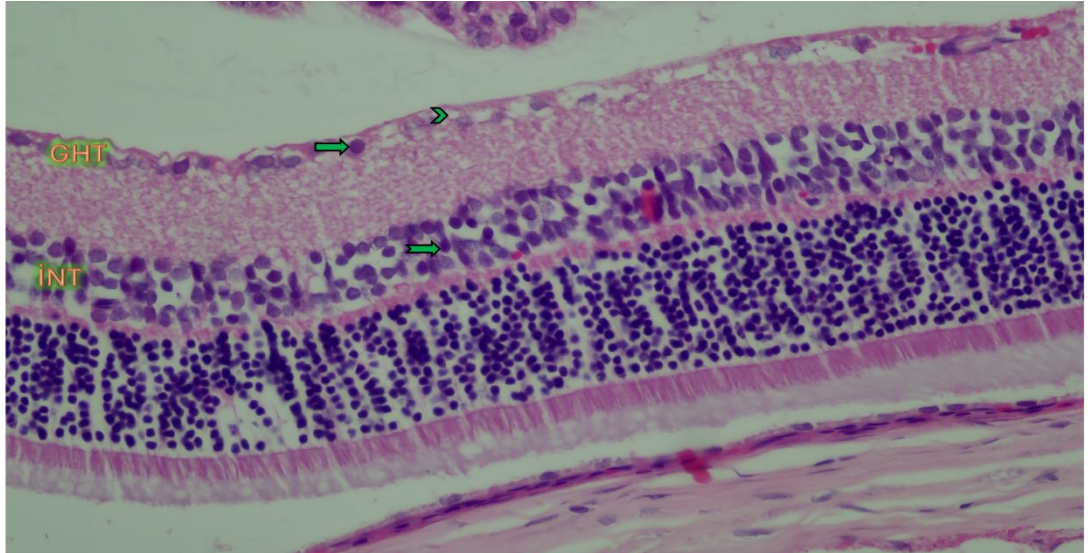
Resim 15. Grup 2 retinaya ait fotomikrograf. GHT: Gangliyon hücre Tabakası, İNT: İç Nükleer Tabaka. Gangliyon hücreleri (Ok), İç Nükleer Tabaka Nöronları (Çentikli Ok), Ödem (Çentikli Ok Başı) (H/E, 400X)

Grup 3’de normal hücrelerin yanında hücrelerin çoğunda hücresel şişme, vakuolizasyon ve yapısal anomali mevcuttu, retinal tabaka hücreleri ödemli görünümdeydi. (Resim 16).



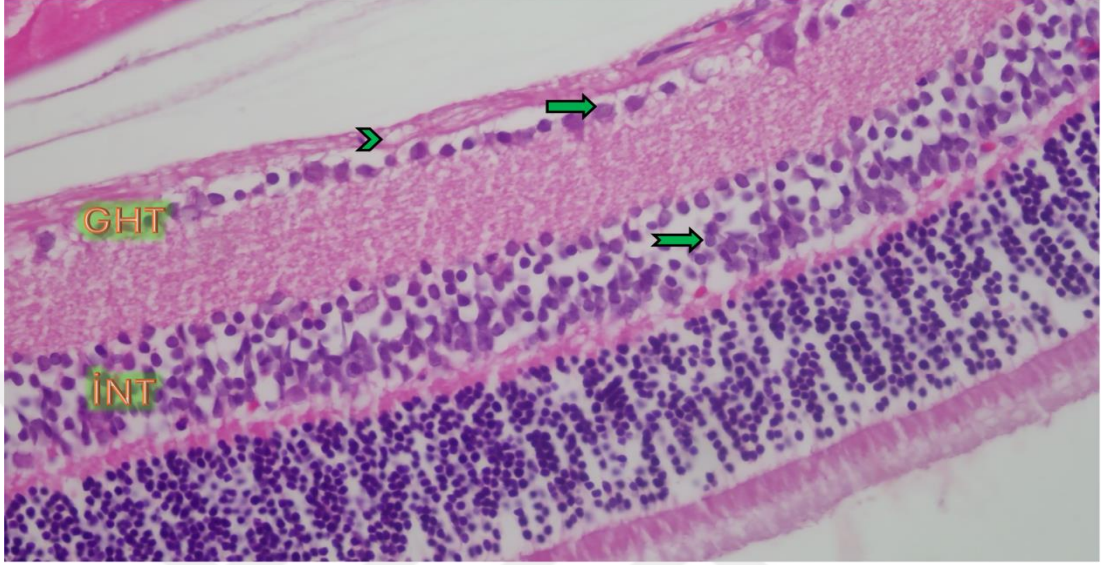
Resim 16. Grup 3 retinaya ait fotomikrograf. GHT: Gangliyon hücre Tabakası, İNT: İç Nüklear Tabaka. Gangliyon hücreleri (Ok), İç Nüklear Tabaka Nöronları (Çentikli Ok), Ödem (Çentikli Ok Başı) (H/E, 400X)

Grup 4’te Grup 3 ile benzer şekilde normal hücrelerin yanında hücrelerin çoğunda hücresel şişme, vakuolizasyon ve yapısal anomali mevcuttu, retinal tabaka hücreleri ödemli görünümdeydi (Resim 17).



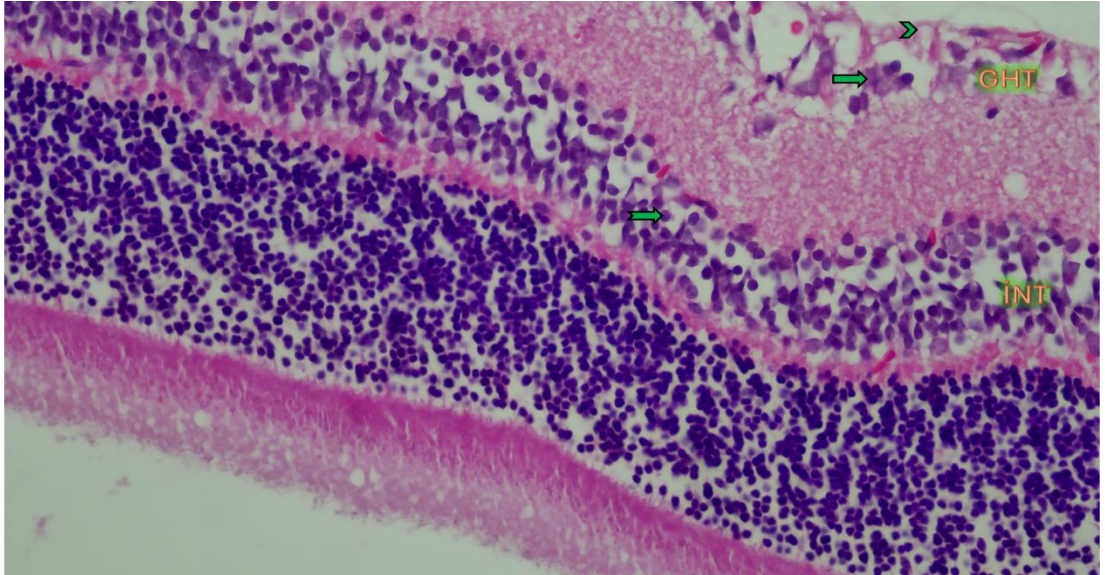
Resim 17. Grup 4 retinaya ait fotomikrograf. GHT: Gangliyon hücre Tabakası, İNT: İç Nüklear Tabaka. Gangliyon hücreleri (Ok), İç Nüklear Tabaka Nöronları (Çentikli Ok), Ödem (Çentikli Ok Başı) (H/E, 400X)

Grup 5’de de Grup 3 ile benzer şekilde normal hücrelerin yanında hücrelerin çoğunda hücresel şişme, vakuolizasyon ve yapısal anomali mevcuttu, retinal tabaka hücreleri ödemli görünümdeydi (Resim 18).



Resim 18. Grup 5 retinaya ait fotomikrograf. GHT: Gangliyon hücre Tabakası, İNT: İç Nükleer Tabaka. Gangliyon hücreleri (Ok), İç Nükleer Tabaka Nöronları (Çentikli Ok), Ödem (Çentikli Ok Başı) (H/E, 400X)

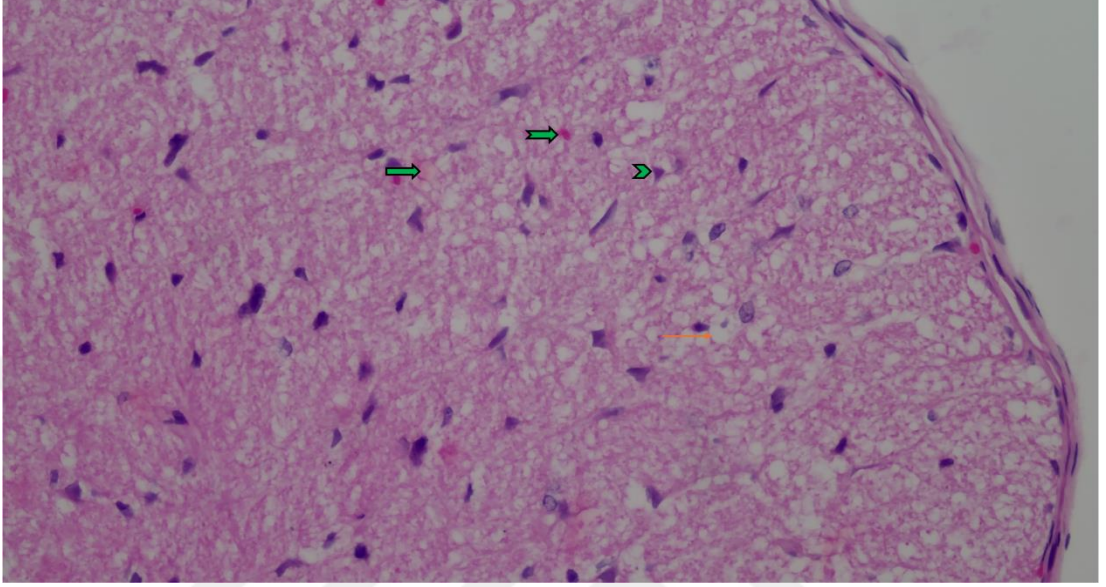
Grup 6’da normale yakın retinal tabaka morfolojisi ve normal hücre histolojik yapısı izlendi (Resim 19).



Resim 19. Grup 6 retinaya ait fotomikrograf. GHT: Gangliyon hücre Tabakası, İNT: İç Nükleer Tabaka. Gangliyon hücreleri (Ok), İç Nükleer Tabaka Nöronları (Çentikli Ok), Ödem (Çentikli Ok Başı) (H/E, 400X)

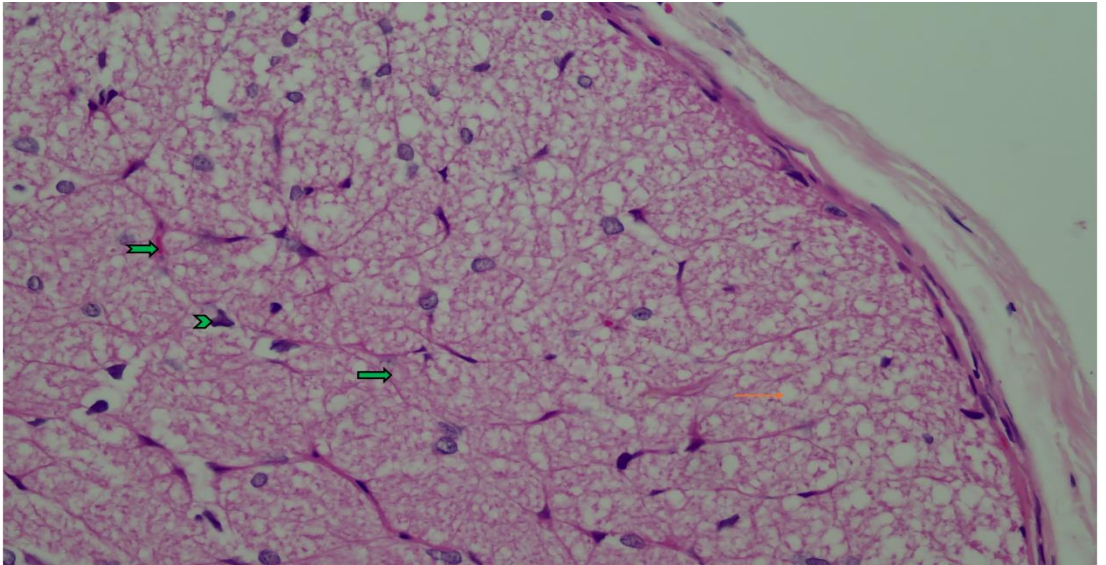
Gruplara ait optik sinirlerin ışıklı mikroskopik değ erlendirmesinde;

Grup 1’de normal optik sinir morfolojisi ve normal hücre histolojik yapısı izlendi (Resim 20).



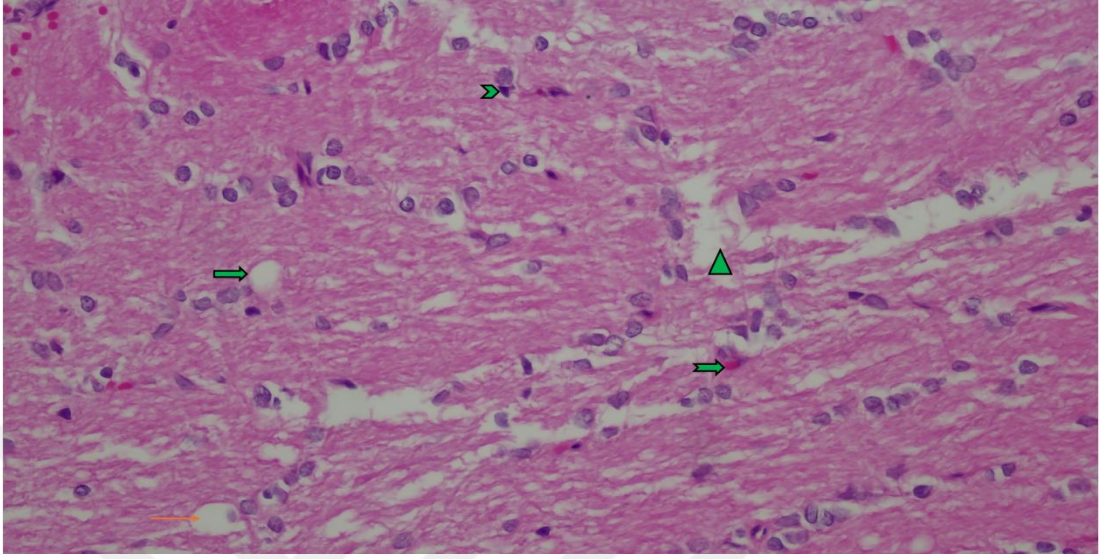
Resim 20. Grup 1 optik sinire ait fotomikrograf. Vakuolizasyon (Ok), Vaskülarizasyon ( entikli Ok), Astrosit ( entikli Ok Başı), Myelin boşluğu ( izgi Ok) (H/E, 400X)

Grup 2’de normale yakın optik sinir morfolojisi varken vaskülarizasyon Grup 1’den daha fazla olarak izlendi (Resim 21).



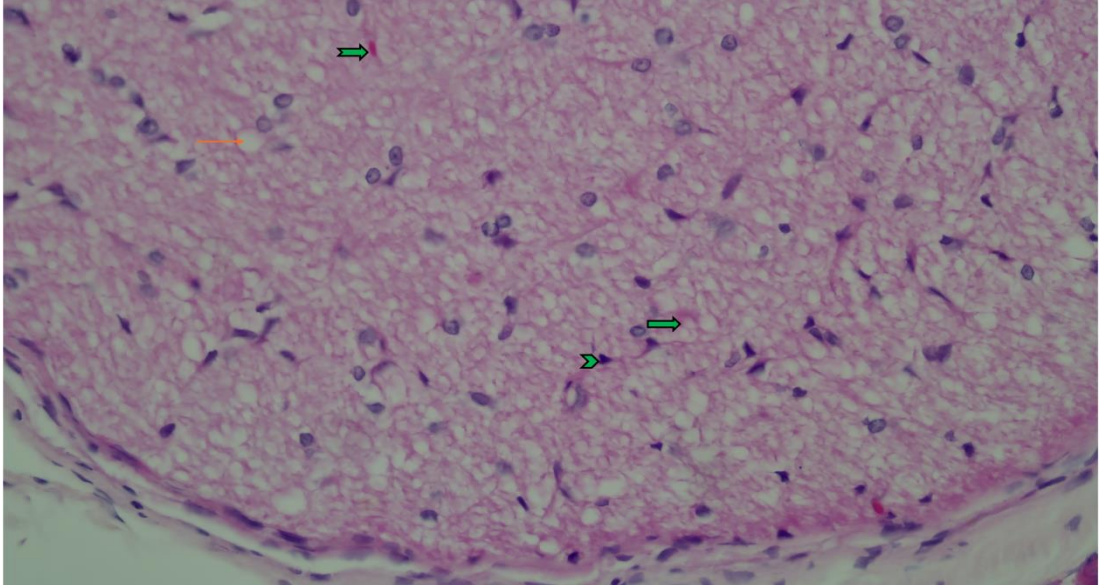
Resim 21. Grup 2 optik sinire ait fotomikrograf. Vakuolizasyon (Ok), Vaskülarizasyon ( entikli Ok), Astrosit ( entikli Ok Başı), Myelin boşluğu ( izgi Ok) (H/E, 400X)

Grup 3’de optik sinirde yaygın vakuolizasyon, vaskülarizasyon ve dokuda astrosit hücre artışı izlendi (Resim 22).



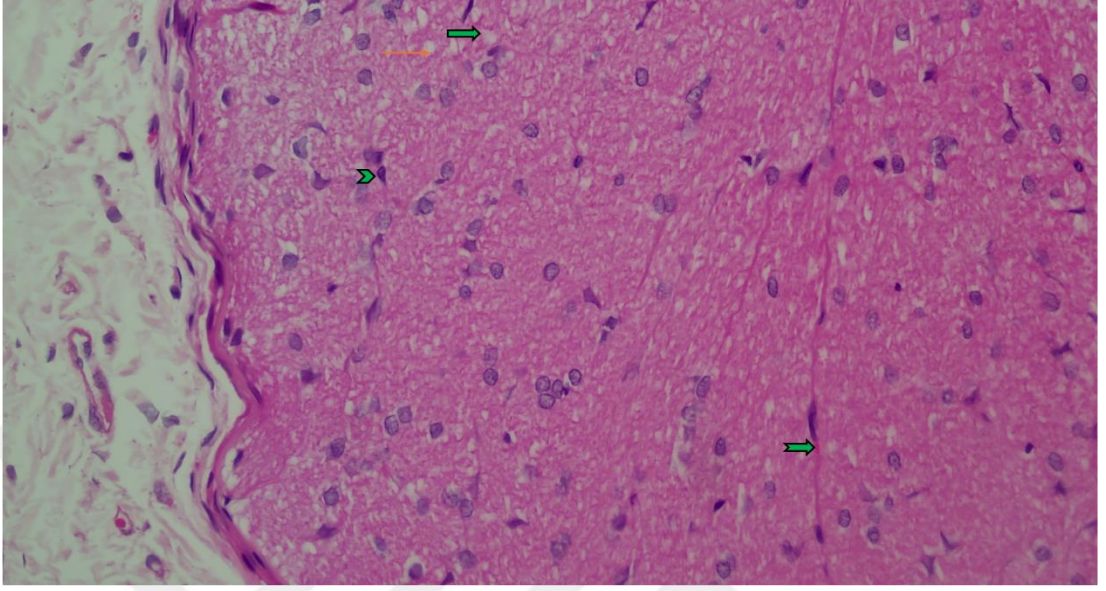
Resim 22. Grup 3 optik sinire ait fotomikrograf. Vakuolizasyon (Ok), Vaskülarizasyon (Çentikli Ok), Astrosit (Çentikli Ok Başı), Myelin boşluğu (Çizgi Ok) (H/E, 400X)

Grup 4’de Grup 3’ten daha az miktarda olmak üzere optik sinirdeki vakuolizasyon, vaskülarizasyon ve astrosit hücre artışı gözlemlendi (Resim 23).



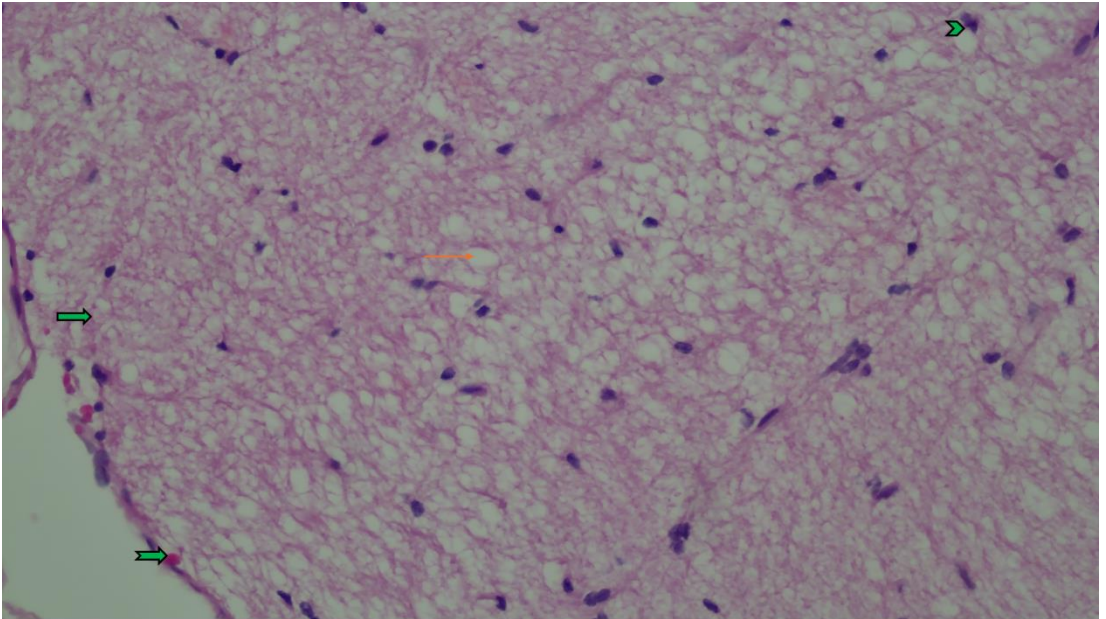
Resim 23. Grup 4 optik sinire ait fotomikrograf. Vakuolizasyon (Ok), Vaskülarizasyon (Çentikli Ok), Astrosit (Çentikli Ok Başı), Myelin boşluğu (Çizgi Ok) (H/E, 400X)

Grup 5’de optik sinir dokusundaki vakuolizasyon ve astrosit artışı Grup 4 ile benzerken, Grup 5’te vaskülarizasyon artışı izlendi (Resim 24).



Resim 24. Grup 5 optik sinire ait fotomikrograf. Vakuolizasyon (Ok), Vaskülarizasyon (Çentikli Ok), Astrosit (Çentikli Ok Başı), Myelin boşluğu (Çizgi Ok) (H/E, 400X)

Grup 6’da normale yakın optik sinir morfolojisi ve normal hücre histolojik yapısı izlendi (Resim 25).



Resim 25. Grup 6 optik sinire ait fotomikrograf. Vakuolizasyon (Ok), Vaskülarizasyon (Çentikli Ok), Astrosit (Çentikli Ok Başı), Myelin boşluğu (Çizgi Ok) (H/E, 400X)

Gruplara ait retina dokularının gradelenerek değerdendirmesinde;

Grupların retina dejenerasyon skorları kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, yalnız metanol alan grupta (Grup 3) retina dejenerasyon puanının en düşük olduğu, yalnız MPZ (Grup 4) ve yalnız Elamipretid (Grup 5) alan gruplar ile Grup 3 arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığı, ancak elamipretid ve MPZ tedavilerini birlikte alan grupta (Grup 6) retina dejenerasyon puanının Grup 3'ten daha yüksek olduğu ve Grup 6 ile Grup 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi. Grupların retina dokularının histopatolojik olarak gradelenerek dejenerasyon puanlarının kıyaslanması Tablo 11'de sunuldu.

Gruplara ait optik sinir dokularının gradelenerek değerdendirmesinde;

Grupların optik sinir dokularının histopatolojik özellikleri (Vakuolizasyon, Vaskülarizasyon, Astrosit artışı) kıyaslanarak Tablo 11'de sunuldu. Buna göre;

Optik sinirin vakuolizasyonu değerdendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yalnız metanol alan grupta (Grup 3) optik sinir vakuolizasyonu en yüksek saptanırken, metanol almayan gruplarda (Grup 1 ve 2) optik sinir vakuolizasyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük saptandı ($p=0.01$). Ayrıca Elamipretid ve MPZ tedavilerinin her ikisini alan grupta (Grup 6) vakuolizasyon Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak tespit edildi ($p=0.01$).

Optik sinirin vaskülarizasyonu değerdendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p=0.007$). Optik sinir vaskülarizasyonu yalnız Metotreksat alan grup (Grup 2), yalnız metanol alan grupta (Grup 3) ve yalnız elamipretid tedavisi alan grupta (Grup 5) en yüksekti ve bu üç grup arasında (Grup 2,3,5) istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Tedavilerinde MPZ olan gruplarda (Grup 4 ve 6) Grup 3'e göre anlamlı şekilde vaskülarizasyon daha az tespit edildi ($p=0.01$).

Optik sinir dokusunda astrosit artışı değerdendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p=0.021$). Yapılan post hoc analizde, yalnız metanol alan grup (Grup 3), tedavi olarak yalnız MPZ (Grup 4) ve yalnız elamipretid (Grup 5)

alan gruplarda astrosit artışının kontrol grubundan (Grup 1) daha yüksek olduğu saptandı.

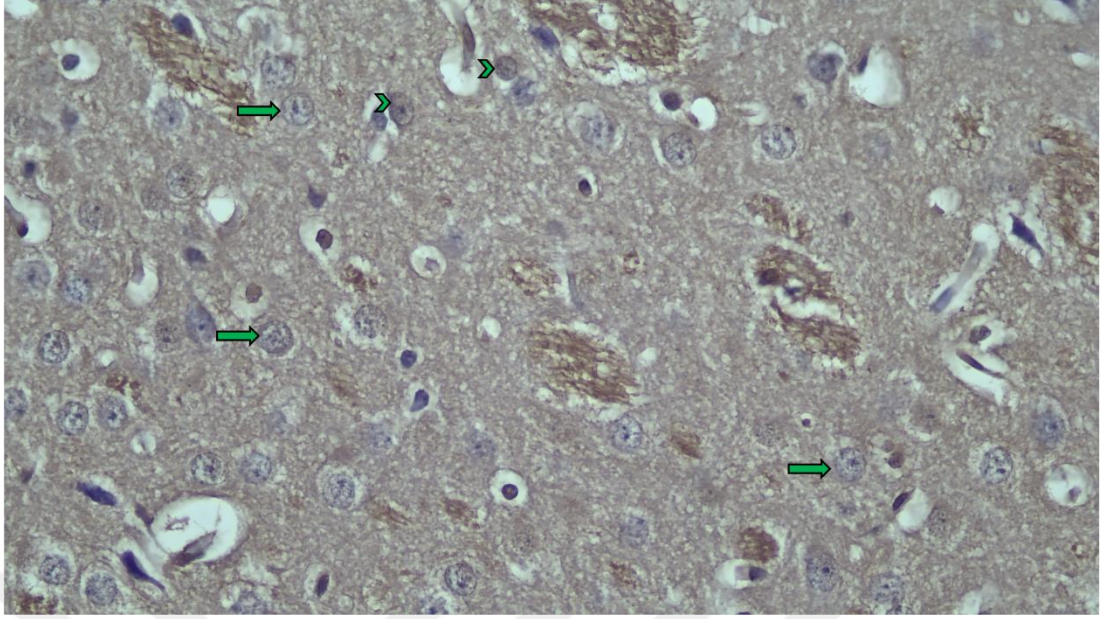
Tablo 11. Grupların Optik Sinir ve Retina Dejenerasyon Skorlarının Kıyaslanması

		n	Ort	SS	Medyan	p	Post Hoc
Retina	Grup 1	6	4,67	0,52	5,00		G1-G2>G3-G4-G5
Dejenerasyon	Grup 2	6	4,17	0,41	4,00		G6>G3
Puanı	Grup 3	6	2,67	0,52	3,00	0,001^	
	Grup 4	6	3,33	0,52	3,00		
	Grup 5	6	3,33	0,52	3,00		
	Grup 6	6	4,00	0,63	4,00		
Optik Sinir	Grup 1	6	0,50	0,55	0,50		G3-4>G1-G2
Vakuolizasyon	Grup 2	6	1,00	0,00	1,00		G3>G6
	Grup 3	6	2,17	0,41	2,00	0,001^	
	Grup 4	6	1,67	0,52	2,00		
	Grup 5	6	1,33	0,52	1,00		
	Grup 6	6	1,17	0,41	1,00		
Optik Sinir	Grup 1	6	0,17	0,41	0,00		G2>G4-G6>G1
Vaskülarizasyon	Grup 2	6	1,33	0,52	1,00		G3>G4-G6>G1
	Grup 3	6	1,33	0,52	1,00	0,007^	G5>G4-G6>G1
	Grup 4	6	1,17	0,41	1,00		
	Grup 5	6	1,33	0,52	1,00		
	Grup 6	6	1,17	0,41	1,00		
Optik Sinir	Grup 1	6	0,50	0,55	0,50		G3>G1
Astrosit artışı	Grup 2	6	0,83	0,41	1,00		G4>G1
	Grup 3	6	1,50	0,55	1,50	0,021^	G5>G1
	Grup 4	6	1,50	0,55	1,50		
	Grup 5	6	1,50	0,55	1,50		
	Grup 6	6	1,33	0,52	1,00		

^Kruskall Wallis Testi

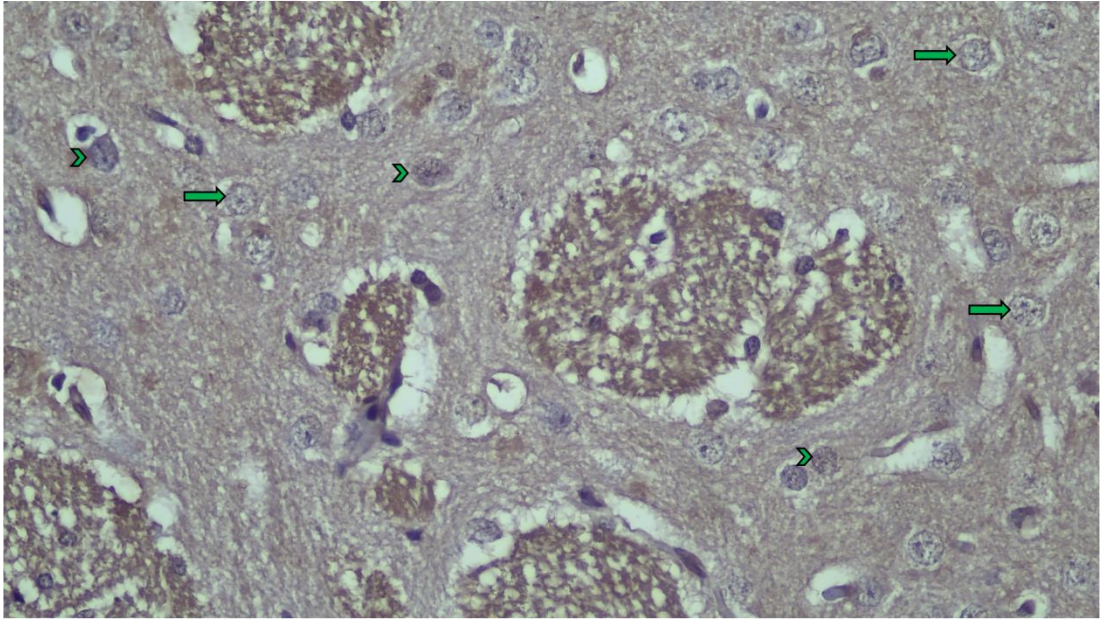
Gruplara ait beyin dokularının Tunel boyama ile apoptoz indeksinin değerlendirmesinde;

Grup 1’de normal bir caudatoputamen ve nöron histolojik yapısı izlendi ve yer yer apoptotik hücreler görüldü (Resim 26).



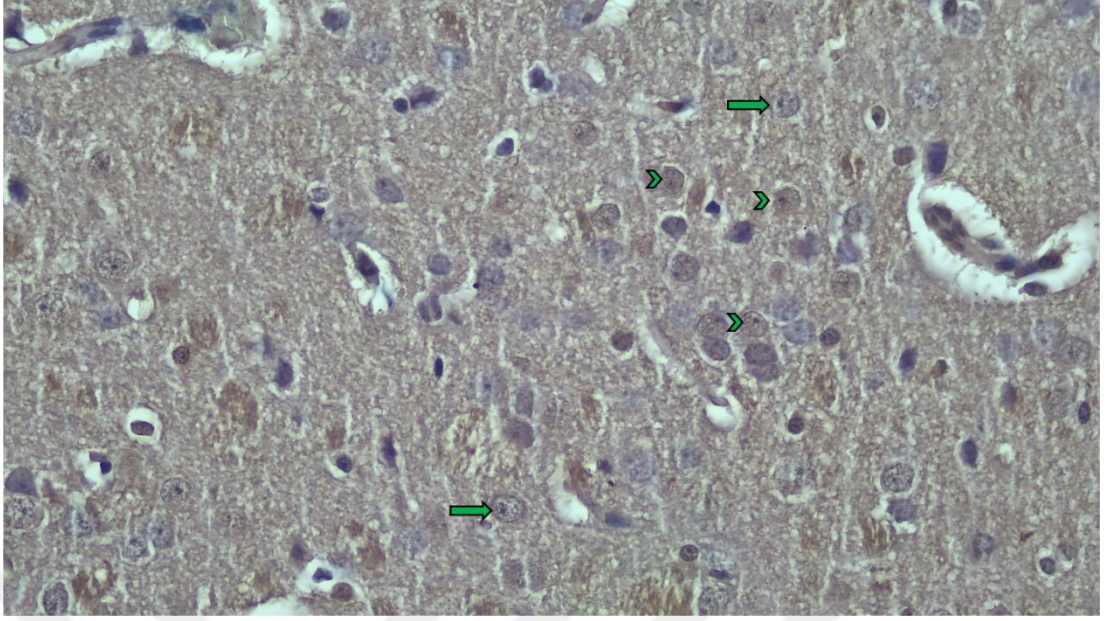
Resim 26. Grup 1 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 2’de normal bir caudatoputamen ve nöron histolojik yapısı izlendi ve yer yer apoptotik hücreler görüldü (Resim 27).



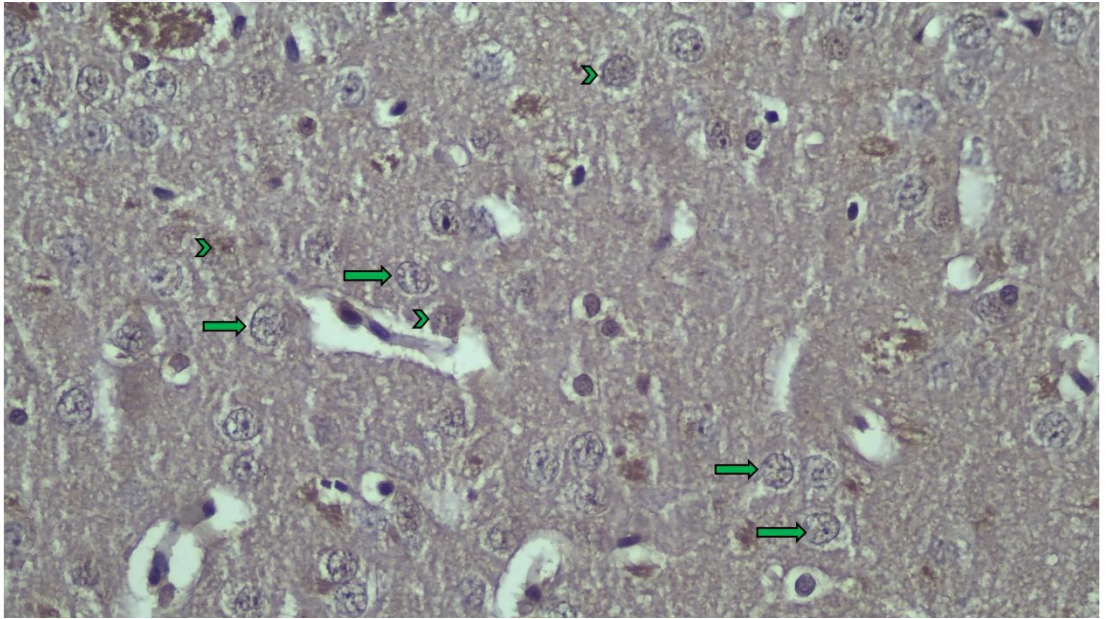
Resim 27. Grup 2 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 3’de normal nöronların yanında çoğunlukla kromatini yoğunlaşmış piknotik çekirdekli apoptotik nöronlar izlendi (Resim 28).



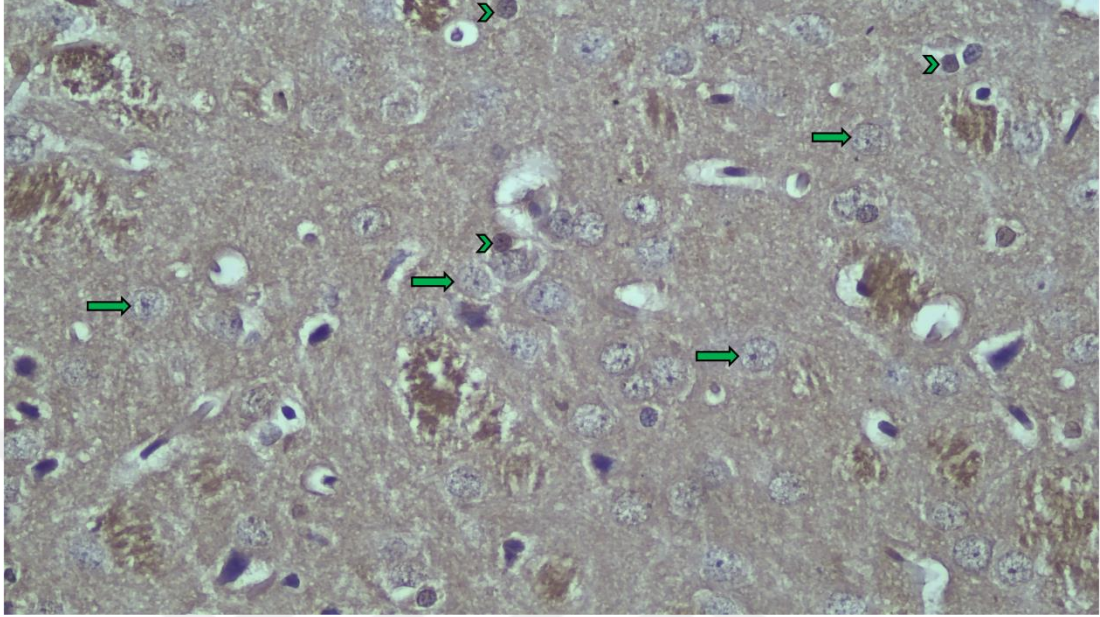
Resim 28. Grup 3 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 4’de normal nöronların yanında kromatini yoğunlaşmış piknotik çekirdekli apoptotik nöronlar izlendi (Resim 29).



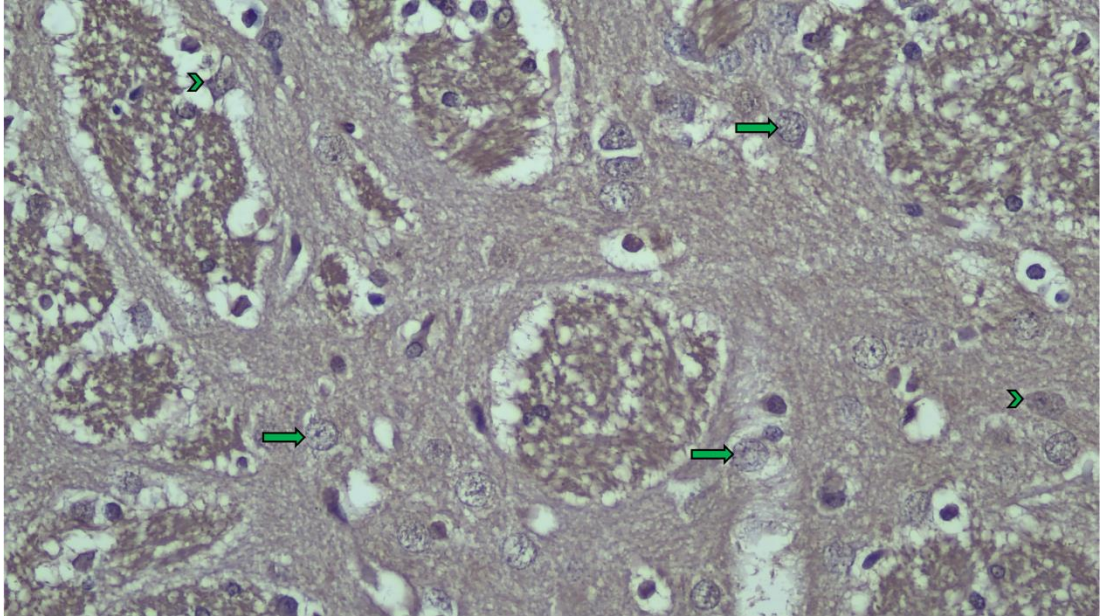
Resim 29. Grup 4 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 5’de normal nöronların yanında kromatini yoğunlaşmış piknotik çekirdekli apoptotik nöronlar izlendi (Resim 30).



Resim 30. Grup 5 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

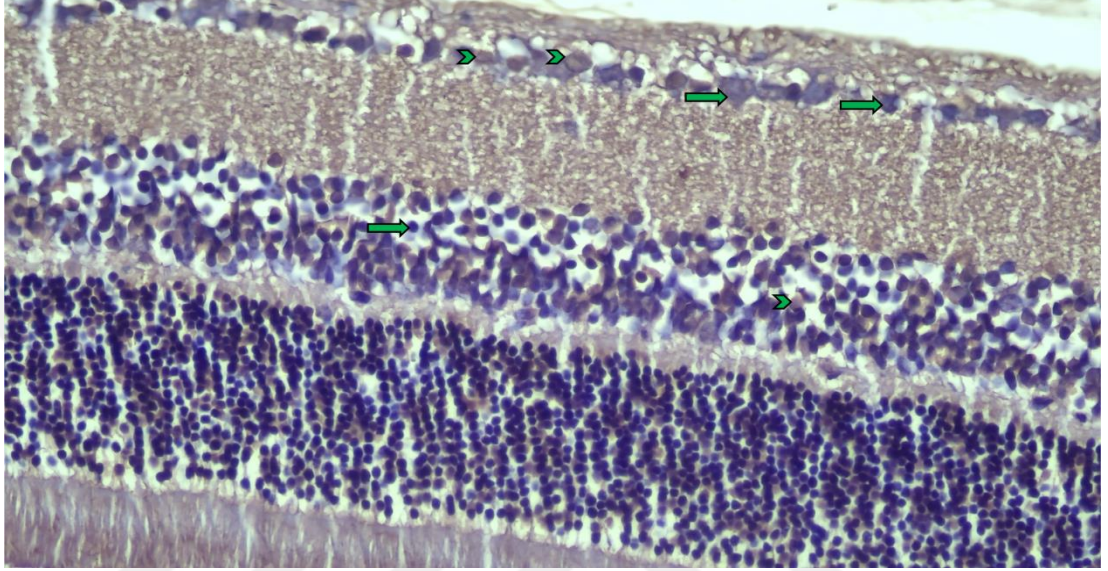
Grup 6’da normale yakın bir caudatoputamen ve nöron histolojik yapısı izlendi ve yer yer apoptotik hücreler görüldü (Resim 31).



Resim 31. Grup 6 beyin caudatoputamene ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

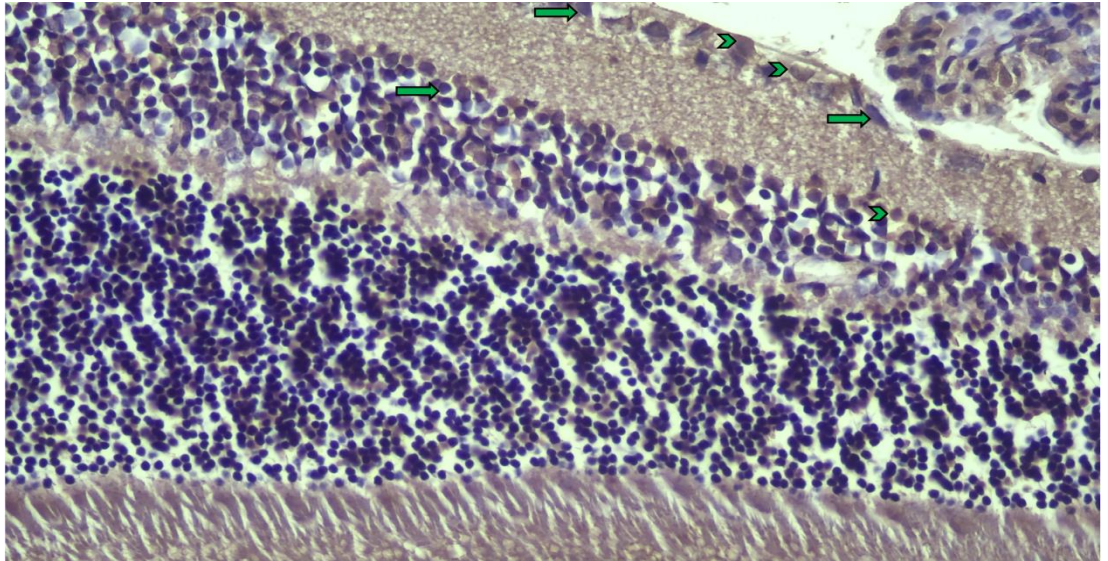
Gruplara ait retina dokularının Tunel boyama ile apoptoz indeksinin değerlendirmesinde;

Grup 1’de normal retinal gangliyon hücreleri ve i  nüklear tabaka hücreleri izlendi. Yer yer apoptotik hücreler görüldü (Resim 32).



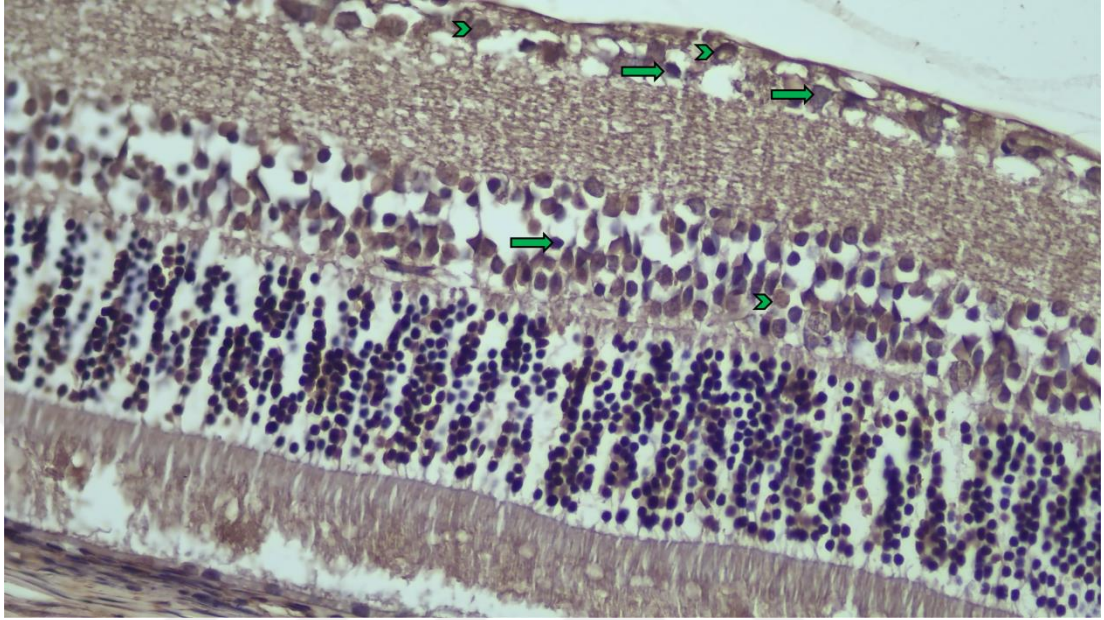
Resim 32. Grup 1 retinaya ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre ( entikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 2’de normale yakın retinal gangliyon hücreleri ve i  nüklear tabaka hücreleri izlendi. Yer yer apoptotik hücreler görüldü (Resim 33).



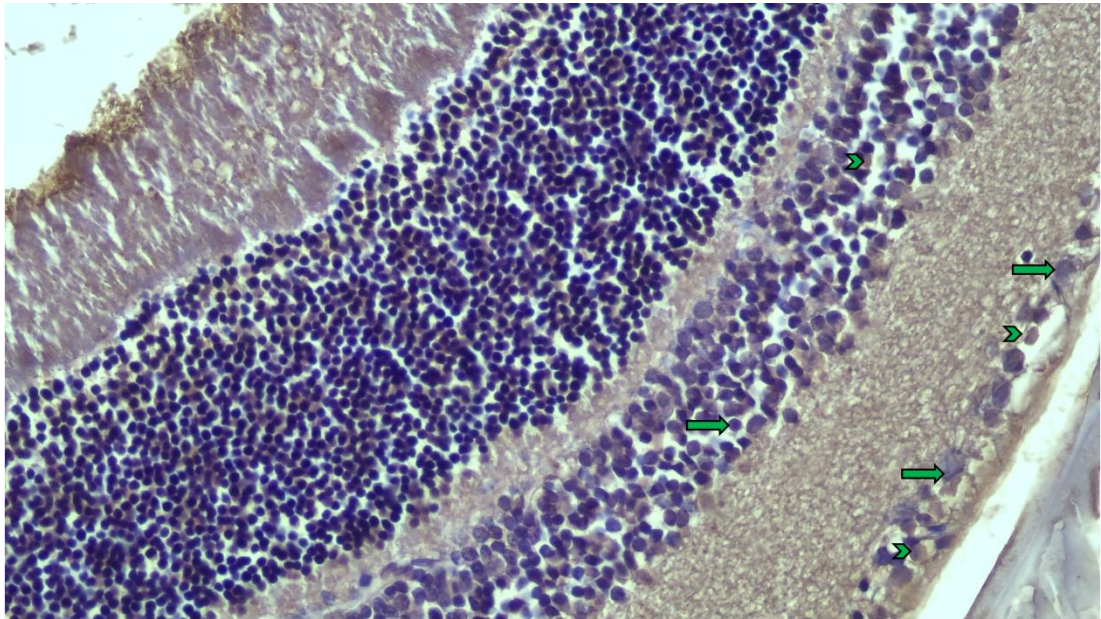
Resim 33. Grup 2 retinaya ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre ( entikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 3’de yaygın miktarda kromatini yoğunlaşmış piknotik çekirdekli apoptotik retinal gangliyon hücreleri ve iç nükleer tabaka hücreleri izlendi (Resim 34).



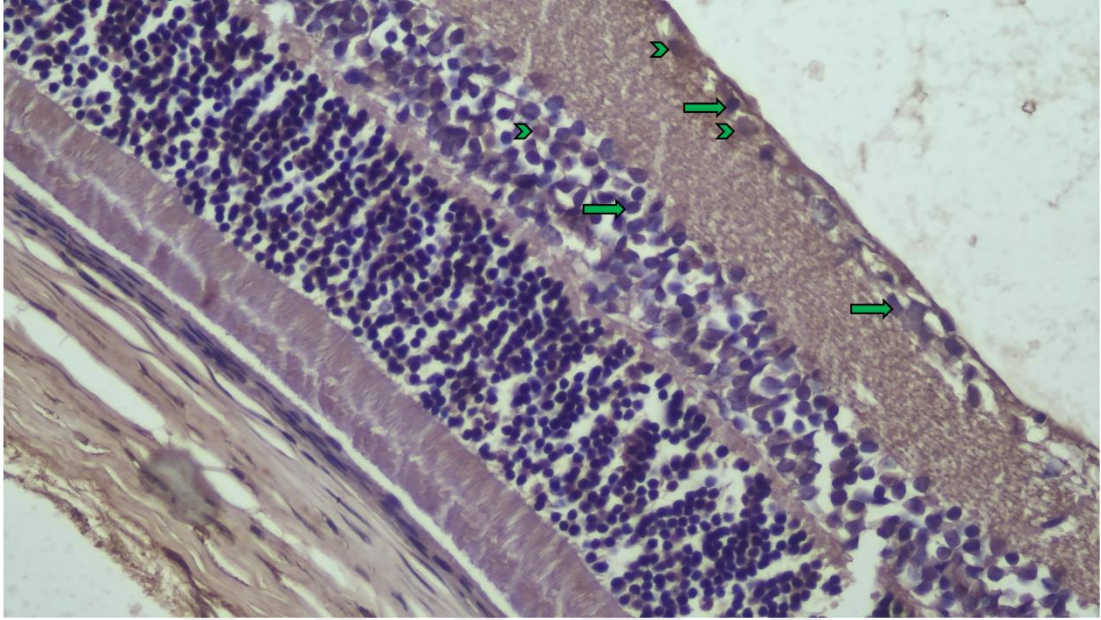
Resim 34. Grup 3 retinaya ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 4’de normale yakın retinal gangliyon hücreleri ve iç nükleer tabaka hücreleri izlendi. Yer yer apoptotik hücreler görüldü (Resim 35).



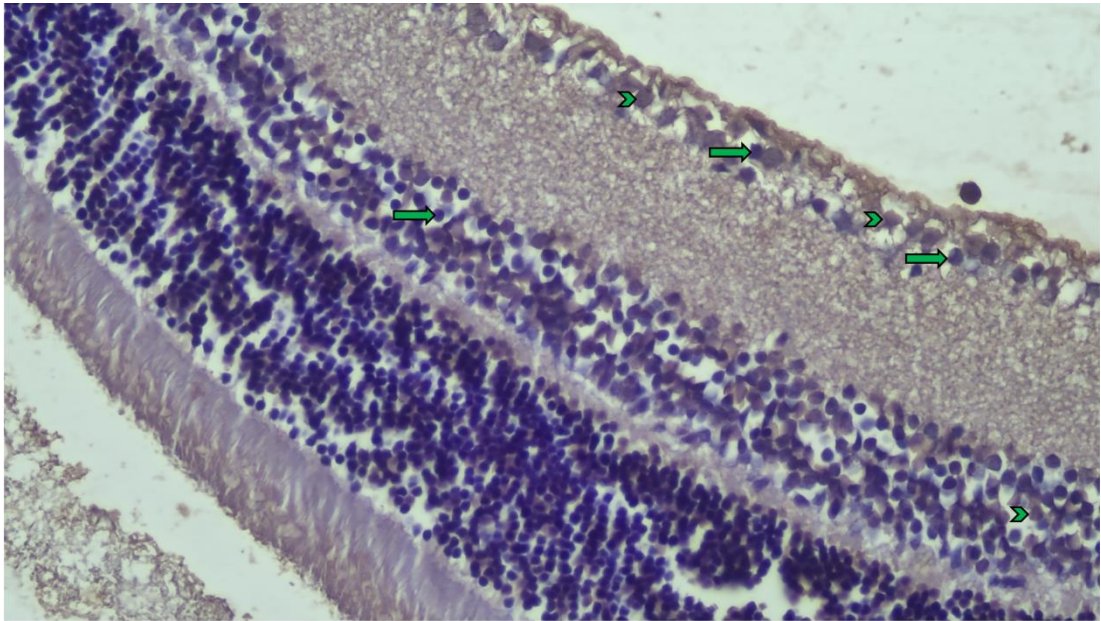
Resim 35. Grup 4 retinaya ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 5’de normal hücrelerin yanında kromatini yoğunlaşmış piknotik çekirdekli apoptotik retinal gangliyon hücreleri ve iç nükleer tabaka hücreleri izlendi (Resim 36).



Resim 36. Grup 5 retinaya ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Grup 6’da normale yakın retinal gangliyon hücreleri ve iç nükleer tabaka hücreleri izlendi. Yer yer apoptotik hücreler görüldü (Resim 37).



Resim 37. Grup 6 retinaya ait fotomikrograf. Normal hücre (Ok), Apoptotik hücre (Çentikli Ok Başı) (TUNEL, 400X)

Gruplara ait retina ve beyin dokularının apoptoz indeksinin değerlendirilmesinde;

Grupların Retina ve Caudatoputamen Dokularının Apoptoz İndekslerinin Karşılaştırılması Tablo 12’de sunuldu.

Grupların retinadaki apoptoz indeksleri karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.001$). Yalnız metanol alan grup (grup 3) ve yalnız Elamipretid alan grupta (grup 5) apoptotik indeks en yüksek saptandı. Tedavilerinde MPZ olan gruplarda ise (Grup 4 ve Grup 6) kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Grupların caudatoputamen dokularının apoptoz indeksleri karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.001$). Yapılan post hoc analizde, hem MPZ hem de elamipretid tedavisi alan Grup 6’nın apoptotik indeksi yalnız metanol alan gruba (Grup 3) göre daha düşük saptandı. Ayrıca hem MPZ hem de elamipretid tedavisi alan Grup 6 ile kontrol grubunda (Grup 1) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 12. Grupların Retina ve Caudatoputamen Dokularının Apoptoz İndekslerinin Karşılaştırılması

		n	Ort	SS	Medyan	p	Post Hoc
Retina Apoptoz (%)	Grup 1	6	27,20	2,58	27,67	<0,001	G3>G1
	Grup 2	6	32,68	1,79	32,08		G5>G1
	Grup 3	6	37,36	1,97	37,77		G3>G6
	Grup 4	6	32,99	2,82	32,57		
	Grup 5	6	35,48	2,34	35,05		
	Grup 6	6	30,72	1,72	31,04		
Caudatoputamen Apoptoz (%)	Grup 1	6	15,95	2,17	16,3	<0,001	G3>G1
	Grup 2	6	18,70	0,83	18,7		G4>G1
	Grup 3	6	30,01	1,39	30,4		G3>G2
	Grup 4	6	22,93	2,02	23,38		G3>G6
	Grup 5	6	22,73	3,10	23,75		
	Grup 6	6	19,09	1,5	19,01		

Kruskall Wallis Testi

Gruplara ait caudatoputamen doku proteinlerinin biyokimyasal değerlendirmesinde;

Grupların caudatoputamen doku proteinlerinin biyokimyasal olarak kıyaslanması Tablo 13'te sunuldu. Buna göre;

Gruplar arası MDA düzeylerinde istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ($p=0.001$). Yapılan post hoc analizde yalnız metanol alan grupta (Grup 3) MDA değerlerinin en yüksek olduğu ve tedavi alan grupların (Grup 4, 5, 6) MDA değerlerinin Grup 3'e göre daha düşük olduğu saptandı.

Gruplar arası TOS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0.003$). Yapılan post hoc analizde, yalnız metanol alan grubun (Grup 3) TOS düzeylerinin, tedavi alan gruplara (Grup 4, 5, 6) göre daha yüksek olduğu belirlendi.

Gruplar arası TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Gruplar arası OSI indekslerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 3'ün Grup 5 ve Grup 6'dan daha yüksek olduğu olduğu belirlendi.

Tablo 13. Grupların Caudatoputamen Doku Proteinlerinin Biyokimyasal Olarak Karşılaştırılması

		n	Ort	SS	Medyan	p	Post Hoc
MDA	Grup 1	6	480	171	457		G3>G2>G1
nmol /gram	Grup 2	6	1480	144	1495		G3>G4-G5-G6
ıslak doku	Grup 3	6	2465	516	2560	0,001	G4-G5>G1
	Grup 4	6	1368	313	1426		
	Grup 5	6	1542	501	1358		
	Grup 6	6	919	205	940		
TOS	Grup 1	6	0,48	0,36	0,57	0,003	G3>G4-G5-G6
mmol H2O2	Grup 2	6	0,87	0,51	0,74		G3>G1
Eq/L	Grup 3	6	1,29	0,43	1,27		
	Grup 4	6	0,52	0,21	0,50		
	Grup 5	6	0,40	0,27	0,26		
	Grup 6	6	0,28	0,05	0,27		
TAS	Grup 1	6	0,19	0,03	0,19	0,282	
mmol	Grup 2	6	0,22	0,10	0,20		
trolox/eqL	Grup 3	6	0,17	0,03	0,17		
	Grup 4	6	0,20	0,02	0,21		
	Grup 5	6	0,18	0,05	0,17		
	Grup 6	6	0,23	0,06	0,22		
OSI	Grup 1	6	0,25	0,18	0,35	0,001	G3>G5-G6
	Grup 2	6	0,39	0,20	0,35		
	Grup 3	6	0,73	0,14	0,76		
	Grup 4	6	0,25	0,09	0,26		
	Grup 5	6	0,20	0,07	0,16		
	Grup 6	6	0,12	0,02	0,12		

Kruskall Wallis Testi

Gruplara ait göz doku proteinlerinin biyokimyasal değerlendirmesinde;

Grupların göz doku proteinlerinin biyokimyasal olarak kıyaslanması Tablo 14'te sunuldu Buna göre;

Gruplar arasında TNF- α düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, yalnız metanol verilen grubun (Grup 3) TNF- α düzeylerinin tedavi verilen gruplara göre (Grup 4, 5, 6) daha yüksek olduğu, ayrıca tedavi gruplarında MPZ ve elamipretid tedavilerini birlikte alan Grup 6'da TNF- α düzeylerinin diğer tedavi alan gruplarına (Grup 5 ve 6) göre daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca post hoc analizde Grup 2'nin TNF- α düzeylerinin Grup 1'den yüksek olduğu saptandı.

Gruplar arasında NF- κ B düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, yalnız Metanol alan grupta (Grup 3) NF- κ B düzeylerinin Grup 1'e göre daha yüksek olduğu saptandı. Ayrıca kombine tedavi alan grup (Grup 6) ile Grup 1 arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Gruplar arasında GSH düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 1'in GSH düzeylerinin Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'e göre daha yüksek olduğu, Grup 1 ile Grup 6'nın GSH düzeyleri arasında ise istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadığı tespit edildi.

Gruplar arasında MDA düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, MDA düzeyleri en yüksek Grup 3'te saptanmışken, Grup 3 ile Grup 4, Grup 5 ve Grup 6 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Ayrıca Grup 1 ile Grup 6'nın MDA düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu.

Gruplar arasında TOS düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 1'in tüm gruplardan düşük değerde olduğu ve Grup 2 ile Grup 3'ün Grup 6'dan daha yüksek olduğu saptandı.

Gruplar arasında TAS düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 2'nin Grup 1'den daha yüksek olduğu belirlendi.

Gruplar arasında OSI indeksleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 3'ün Grup 1 ve Grup 6'dan daha yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 14. Grupların Göz doku proteinlerinin biyokimyasal olarak Karşılaştırılması

		n	Ort	SS	Medyan	p	Post Hoc
pg TNF- α /mg protein	Grup 1	6	12,30	2,23	12,18	0,001	G3>G4-G5>G6>G1 G2>G4-G5>G6>G1
	Grup 2	6	71,79	9,34	71,21		
	Grup 3	6	88,72	12,01	87,01		
	Grup 4	6	38,62	7,14	40,48		
	Grup 5	6	39,42	6,81	40,71		
	Grup 6	6	26,49	3,97	27,71		
ng NF- κ B /mg protein	Grup 1	6	0,23	0,04	0,23	0,001	G2>G1 G3>G1 G3>G6
	Grup 2	6	0,97	0,25	0,92		
	Grup 3	6	1,61	0,56	1,53		
	Grup 4	6	0,38	0,11	0,36		
	Grup 5	6	0,41	0,07	0,43		
	Grup 6	6	0,30	0,03	0,29		
μ g GSH/mg protein	Grup 1	6	115,02	22,34	117,0	0,001	G1-G6>G5>G3 G1-G6>G4 G1-G6>G2
	Grup 2	6	46,49	22,41	41,20		
	Grup 3	6	22,08	8,75	19,45		
	Grup 4	6	54,98	22,55	51,79		
	Grup 5	6	73,84	13,54	76,52		
	Grup 6	6	114,13	13,47	111,14		
MDA nmol /gram ıslak doku	Grup 1	6	544	158	529	0,001	G3>G2>G6-G1 G3>G4-G5>G6-G1
	Grup 2	6	1366	403	1228		
	Grup 3	6	2919	1121	2517		
	Grup 4	6	1351	185	1354		
	Grup 5	6	1454	510	1362		
	Grup 6	6	783	213	727		
TOS μ mol H2O2 Eq/L	Grup 1	6	0,08	0,04	0,08	0,001	G2>G6>G1 G3> G6>G1 G5>G1 G4>G1
	Grup 2	6	1,47	0,75	1,70		
	Grup 3	6	1,84	1,07	1,49		
	Grup 4	6	0,74	0,13	0,75		
	Grup 5	6	0,79	0,16	0,82		
	Grup 6	6	0,40	0,22	0,34		
TASmmol trolox/eqL	Grup 1	6	0,17	0,02	0,16	0,001	G6>G1 G2>G1
	Grup 2	6	0,40	0,10	0,43		
	Grup 3	6	0,26	0,13	0,23		
	Grup 4	6	0,25	0,05	0,25		
	Grup 5	6	0,28	0,05	0,29		
	Grup 6	6	0,35	0,06	0,34		
OSI	Grup 1	6	0,05	0,02	0,46	0,001	G2>G1 G3>G1 G3>G6
	Grup 2	6	0,34	0,16	0,41		
	Grup 3	6	0,71	0,12	0,74		
	Grup 4	6	0,29	0,01	0,30		
	Grup 5	6	0,28	0,03	0,27		
	Grup 6	6	0,12	0,07	0,09		

Kruskall Wallis Testi

Gruplara ait kan serum örneklerinin biyokimyasal değerlendirmesinde;

Grupların Kan Serum Örneklerinin Biyokimyasal Olarak Karşılaştırılması Tablo 15’de sunulmuştur. Buna göre;

Gruplar arasında TNF- α düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 3’ün Grup 4, Grup 5 ve Grup 6’dan daha yüksek olduğu, Grup 2’nin Grup 4, Grup 5 ve Grup 6’dan daha yüksek olduğu, ayrıca Grup 3’ün Grup 1’den daha yüksek olduğu belirlendi.

Gruplar arasında NF- κ B düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 3’ün Grup 1, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6’dan daha yüksek olduğu, ayrıca Grup 2’nin Grup 1, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6’dan daha yüksek olduğu belirlendi.

Gruplar arasında GSH düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 1’in Grup 3 ve Grup 6’dan; Grup 6’nın ise Grup 2, Grup 3 ve Grup 4’ten daha yüksek olduğu belirlendi.

Gruplar arasında MDA düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.004$). Yapılan post hoc analizde, Grup 3’ün Grup 1 ve Grup 4’ten daha yüksek olduğu ayrıca Grup 5’in Grup 1’den daha yüksek olduğu belirlendi.

Gruplar arasında TOS düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 3’ün Grup 1 ve Grup 4’ten daha yüksek olduğu belirlendi.

Gruplar arasında TAS düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık saptandı ($p = 0.014$). Yapılan post hoc analizde, Grup 1’in Grup 3’ten daha yüksek olduğu belirlendi.

Grupların OSI indeksleri arasında farklılık saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p = 0.001$). Yapılan post hoc analizde, Grup 3’ün Grup 1, Grup 4 ve Grup 6’dan daha yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 15. Grupların Kan Serum Örneklerinin Biyokimyasal Olarak Karşılaştırılması

		n	Ort	SS	Medyan	p	Post Hoc
pg TNF- α /mg protein	Grup 1	6	119,82	35,32	126,0	0,001	G3>G4-G5>G6 G2>G4- G5>G6 G3>G1
	Grup 2	6	351,79	122,43	303,15		
	Grup 3	6	589,35	101,32	552,60		
	Grup 4	6	167,31	31,05	171,78		
	Grup 5	6	131,60	34,58	129,59		
	Grup 6	6	79,89	20,06	79,99		
ng NF- κ B /mg protein	Grup 1	6	2,37	0,80	2,17	0,001	G3>G4-G5-G6-G1 G2>G4-G5-G6-G1
	Grup 2	6	8,17	2,00	7,26		
	Grup 3	6	11,94	3,36	11,96		
	Grup 4	6	4,93	1,41	4,57		
	Grup 5	6	4,48	1,82	3,66		
	Grup 6	6	3,09	0,26	3,07		
μ g GSH/mg protein	Grup 1	6	258,69	63,83	255,0	0,001	G6>G2-G3-G4 G1>G6 G1>G3
	Grup 2	6	117,91	20,47	108,87		
	Grup 3	6	108,03	2,36	108,45		
	Grup 4	6	120,18	13,30	118,48		
	Grup 5	6	122,88	24,01	113,56		
	Grup 6	6	161,09	23,92	157,53		
MDA nmol /gram ıslak doku	Grup 1	6	2,62	1,96	7,40	0,004	G3>G4 G3>G1 G5>G1
	Grup 2	6	8,13	4,08	7,40		
	Grup 3	6	12,32	4,93	12,43		
	Grup 4	6	6,40	2,06	5,68		
	Grup 5	6	10,40	4,35	10,15		
	Grup 6	6	6,50	2,44	6,58		
TOS μ mol H2O2 Eq/L	Grup 1	6	2,74	0,38	2,85	0,001	G3>G4 G3>G1
	Grup 2	6	5,71	2,38	5,92		
	Grup 3	6	7,85	3,66	8,10		
	Grup 4	6	2,86	0,41	2,98		
	Grup 5	6	3,89	1,08	3,64		
	Grup 6	6	3,47	0,70	3,30		
TASmmol trolox/eqL	Grup 1	6	3,00	0,13	3,00	0,014	G1>G3
	Grup 2	6	2,78	0,12	2,76		
	Grup 3	6	2,66	0,09	2,66		
	Grup 4	6	2,84	0,11	2,85		
	Grup 5	6	2,77	0,17	2,76		
	Grup 6	6	2,73	0,15	2,73		
OSI	Grup 1	6	0,09	0,01	0,09	0,001	G3>G6 G3>G4 G3>G1 G2>G1
	Grup 2	6	0,21	0,09	0,20		
	Grup 3	6	0,29	0,13	0,31		
	Grup 4	6	0,10	0,01	0,10		
	Grup 5	6	0,14	0,04	0,13		
	Grup 6	6	0,13	0,03	0,12		

Kruskall Wallis Testi

5. TARTIŞMA

Akut metanol zehirlenmesi ile başvuran hastaların görme bozukluklarında genellikle zehirlenmeden sonraki 2-3 hafta içinde düzelme görülebilmekle birlikte, hastaların %33-40'ından fazlasında kalıcı görsel ve nörolojik sekellerin geliştiği gösterilmiştir (70, 135, 136). Görsel ve nörolojik sekelleri önlemek ve en aza indirmek adına metanol ilişkili optik sinir, retina ve bazal gangliyon hasarı için Metilprednizolon (7), Eritropoetin (1) gibi moleküllerin yanı sıra İdebenon (8), ATP (9), Kafeik asit (10), Sitikolin (137), Taksifolin (138), Koenzim Q₁₀ (139) gibi birçok antioksidan molekül tedavide denenmiş olup, bu tedavilerin görme bulgularında iyileşme sağladığı fakat hiçbirinin kesin tedavi edici olmadığı gösterilmiştir. Bu bağlamda görsel ve nörolojik sekellerin önlenmesi veya tedavisi adına yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma ile antioksidan, nöroprotektif ve antiapoptotik etkileri bilinen Elamipretid ve Metilprednizolon tedavilerinin, akut metanol zehirlenmesinin optik sinir, retina ve caudatoputamen hasarı üzerine olan olumlu etkilerini histopatolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmeyi amaçladık.

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre, metanol zehirlenmesinin ratların caudatoputamen dokularında nöronal hücre dejenerasyonunu artırdığı, caudatoputamen nöronlarında apoptoza neden olduğu; ayrıca yine beyin dokusunda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyini ve TOS düzeylerini artırdığı tespit edildi. Caudatoputamen dokusunda TAS düzeylerini ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmadığı tespit edildi.

Retina dokusunda ise metanol zehirlenmesinin retinal hücrelerinin dejenerasyonuna neden olarak retina dejenerasyon puanlarını azalttığı, optik sinirde vakuolizasyon, vaskülarizasyon ve astrosit artışına neden olarak optik sinir dejenerasyonuna neden olduğu, retinal hücrelerde apoptozu artırdığı; göz dokusunda lipid peroksidasyonuna neden olduğu, proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve NF- κ B değerlerini artırdığı, GSH düzeylerini düşürdüğü ve oksidatif stres indeksini (OSI) artırdığı tespit edildi.

Çalışmamızdaki tedavi edici ajan olarak seçilen ajanlar değerlendirildiğinde; MPZ ve Elamipretid tedavilerinin birlikte uygulandığı grubun (Grup 6), metanol zehirlenme modeli oluşturulan ancak tedavi edici ajan verilmeyen gruba (Grup 3) göre caudatoputamen dokusundaki Grade-1 dejeneratif nöronlarda azalma sağladığı, caudatoputamen dokusundaki nöronlarda apoptozu azalttığı, hatta Grup 1 ile karşılaştırıldıklarında apoptotik indeksleri arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığı, ayrıca bu dokudaki lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres indeksini azalttığı tespit edildi. Ayrıca MPZ ve Elamipretid tedavilerinin birlikte uygulanmasının retina ve optik sinir üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde; bu tedavinin Grup 6'daki ratların retina dokusunda retinal hücrelerin dejenerasyonunu azaltarak, retina dejenerasyon puanlarını Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı, retinal hücrelerdeki apoptozu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı, optik sinirde vakuolizasyon ve vaskülarizasyonu Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltarak optik sinir dejenerasyonunu azalttığı tespit edildi. Yine bu tedavinin göz dokusunda TNF- α ve NF- κ B, TOS, OSI ve MDA düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü, GSH ve TAS düzeylerini ise istatistiksel anlamlı şekilde artırdığı tespit edildi.

Hücre içi ROS savunma sisteminin, ROS üretimiyle başa çıkamaması, oksidatif strese yol açar ve bu durum hücre hasara ve hücre ölümüne neden olur (140). ROS savunma sisteminin en önemli enzimlerinden biri olan Glutasyon peroksidaz, GSH'ı kullanarak ROS ürünlerinden biri olan hidrojen peroksidin suya indirgenmesini sağlar (141). Metanolün toksik metaboliti olan formik asit, ETZ'de Kompleks IV'ü inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu bozar; hücre metabolizması anaerobik metabolizmaya kayar ve hücre içi pH'ta düşme meydana gelir. Hem hücre içi pH'ın düşüşü hem de Kompleks IV'ün inhibisyonu, hücre içi reaktif oksijen ürünlerinde artışa neden olur (70, 142). GSH'ın hem ROS ürünlerinin indirgenmesinde kullanılması, hem de formaldehiti formik aside metabolize eden enzim olan FDH'nin kofaktörü olarak kullanılması, metanol zehirlenmesinde GSH rezervinin azalmasına neden olmaktadır (143). Skrzydlewska ve ark.'nın yapmış oldukları bir çalışmada, metanol intoksikasyonu modeli oluşturulmuş ve metanol zehirlenmesinin serum GSH düzeyinin yanında toplam antioksidan durumu gösteren serum TAS düzeyini de azalttığı gösterilmiştir (144). Benzer şekilde metanol

intoksikasyon modeli oluşturularak yapılan diğer çalışmalarda; serum GSH ve serum TAS düzeyinin yanında toplam oksidan durumu gösteren serum TOS düzeyi ve Oksidatif stres indeksi de değerlendirilmiş ve metanol intoksikasyonunun oksidatif strese neden olarak serum GSH ve serum TAS düzeylerinde azalma, serum OSI ve serum TOS düzeylerinde ise artışa neden olduğu gösterilmiştir (9, 11, 138, 145). Ahiskali ve ark. benzer çalışmayı optik sinir dokusunda yapmış ve optik sinir dokusunda da benzer sonuçları bulmuştur (138). Çalışmamızda da literatürdeki verilere benzer şekilde metanol zehirlenme modeli oluşturulan ratların (Grup 3), kontrol grubundaki (Grup 1) ratlara göre serum GSH ve serum TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, serum OSI ve serum TOS düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi.

Yine çalışmamızda metanol zehirlenme modeli oluşturulan Grup 3'teki ratların göz dokusunda da benzer şekilde Grup 1'e göre GSH düzeylerinde azalma, TOS ve OSI indeksinde istatistiksel anlamlı artış saptandı. Ancak Ahiskali ve ark. (138) ve Sahin ve ark. (10) yaptığı çalışmaların aksine bizim çalışmamızda göz dokusunda Grup 3'teki ratlarda Grup 1'e göre TAS düzeyinde azalma değil artış tespit ettik fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Liberski ve ark.'nın metanole sekonder optik nöropati üzerine yayınladıkları reviewde; literatürde metanol toksisitesine sekonder göz dokusundaki TAS düzeylerinde her ne kadar azalma olduğu ile ilgili yayınlar olsa da, göz dokusundaki patofizyolojinin oldukça karmaşık olduğu ve ilgili literatürdeki patofizyolojinin açıklandığı Şekil-2'de bu toksisitenin optik dokuda TAS, TOS ve OSI düzeylerinin artışa sebep olabileceğinden bahsetmiştir. Liberski ve ark. literatürden farklı olarak göz dokusunda Şekil-2'de bahsedilen bu TAS artışının hangi yollarla gerçekleştiği ile ilgili bir açıklamada bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda da metanol zehirlenmesi yapılan ancak tedavi verilmeyen grupta göz dokusundaki TAS düzeyinin istatistiksel olarak olmasa da rakamsal olarak artışı Liberski ve ark. çalışmasında bahsetmiş olduğu patofizyoloji ile açıklanabilir.

Caudatoputamen dokusunda oksidatif stres parametreleri değerlendirildiğinde ise Grup 3'teki ratlarda Grup 1'e göre TOS düzeylerinde istatistiksel anlamlı artış saptanırken, yine Grup 3'teki ratlarda Grup 1'e göre OSI indeksinde de artış saptandı

fakat aradaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Caudatoputamen dokuda Grup 3'teki ratlarda Grup 1'e göre TAS düzeylerinde rakamsal olarak bir azalma saptansa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. Aynı şekilde Grup 4-5-6'da Grup 3' e göre tedavi edici ajanlarla birlikte TAS düzeylerinin artışa geçtiği görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Oksidatif parametreler değerlendirildiğinde çalışmamızın sonuçları literatürdeki verileri desteklemekte olup bilindiği kadarıyla caudatoputamen dokusunda TAS düzeyleri daha önce çalışılmadığı için çalışmamızın sonuçları bu konuda ilk olup, daha yeterli veriye sahip olmak için bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

ROS artışıyla meydana gelen oksidatif stres, hücre membranlarındaki fosfolipitlerin peroksidasyonu sonucu Malondialdehit (MDA) oluşumuna neden olur (146). MDA, hem optik sinir hem de beyin dokusundaki oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla birçok çalışmada kullanılmış ve MDA yüksekliği, histopatolojik hasarın şiddeti ile ilişkilendirilmiştir (9, 11, 138, 147, 148). Literatürde yapılan çalışmalarda metanol zehirlenmesinin MDA düzeylerini hem optik sinir dokusunda (138) hem de serumda artırdığı gözlemlenmiştir (9). Ancak Nalçacıoğlu ve arkadaşlarının, metanolün neden olduğu toksik optik nöropati üzerinde 1 aylık İdebenon ve metilprednizolon tedavilerinin ayrı ayrı ve kombine olarak etkinliklerini inceledikleri bir çalışmada, gruplar arası serum MDA düzeylerinde anlamlı bir istatistiksel farklılık saptanmamıştır (8). Skrzydlewska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, metanol zehirlenmesi modeli oluşturulan ratlarda, herhangi bir tedavi edici ajan uygulanmadan gruplar arası serum MDA seviyelerinin günlere göre nasıl değiştiği incelenmiştir. Çalışmada, metanol uygulandıktan sonra serum MDA seviyelerinin günlere bağlı olarak değiştiği, metanol uygulamasından 12 saat sonra artmaya başladığı ve 7. güne kadar bu artışın devam ettiği, 7. günden sonra ise serum MDA seviyelerinin kontrol grubuna yaklaştığı gösterilmiştir (149). Skrzydlewska ve ark. yapmış olduğu bu çalışmada, serum MDA düzeylerindeki bu farklılığın, MDA düzeylerinin alım günlerinin farklılığından kaynaklanabileceği gösterilmiştir. Bu sebeple 1. Ayın sonunda serum MDA düzeylerini ölçen Nalçacıoğlu ve ark. yapmış olduğu çalışmada serum MDA seviyelerinde anlamlı farklılık bulunmaması, bizim çalışmamızda ise Grup 3'teki ratlarda Grup 1'e göre 3 günlük tedavi sonrası serum, göz ve caudatoputamen dokularında MDA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı

şekilde yüksek olması Skrzydlewska ve ark. yaptığı çalışma ile örtüşmektedir. Ancak daha önce caudatoputamen dokusunda MDA bilindiği kadarıyla çalışılmamıştır bu sebeple bizim çalışmamızdaki caudatoputamende metanol toksisitesi ile birlikte görülen MDA artışı ile ilgili daha fazla literatür verisine ihtiyaç duyulmaktadır.

Ayrıca yapmış olduğumuz bu çalışmanın sonuçlarına göre, Elamipretid ve MPZ tedavilerinin tek başlarına uygulandıklarında başarılı şekilde göz dokusunda lipid peroksidasyonunu azaltarak MDA düzeylerini düşürdüğü, ancak birlikte uygulandıklarında daha etkin şekilde lipid peroksidasyonunu azalttığı, hatta her iki tedaviyi birlikte alan grubun (Grup 6) MDA düzeyleri ile Grup 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi. Yapılan çalışmalarda Metilprednizolonun reaktif oksijen ürünleri ve lipid peroksidasyonunu azaltarak dokuların iyileşmesini ve hasarlı bölgenin korunmasını desteklediği gösterilmiştir (150). Ayrıca Elamipretidin epileptik sıçanların hipokampusu üzerindeki etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, Elamipretidin ROS düzeylerini azalttığı, ve GSH düzeylerini artırdığı lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'yı azalttığı gösterilmiştir (151). Benzer şekilde Elamipretidin santral sinir sistemi, hipokampus, renal doku gibi birçok dokuda reaktif oksijen ürünlerini ve lipid peroksidasyonunu azaltarak oksidatif stresi azalttığına dair yapılmış birçok çalışma mevcuttur (15, 152-155). Kompleks IV'ün inhibisyonunun hücre içi ROS ve oksidatif stresi artırdığı, Metanolün Kompleks IV'ü inhibe ederek oksidatif solunumu bozup ROS artışıyla oksidatif strese neden olduğu; Metilprednizolonun ROS ürünleri ve lipid peroksidasyonunu azalttığı ve Elamipretid'in ise kardiyolipine bağlanarak Kompleks IV'ün aktivitesini artırarak ROS üretimini azalttığı göz önüne alındığında, her iki ajanın da farklı mekanizmalar üzerinden lipid peroksidasyonunu düşürerek MDA seviyelerini azaltması, bu iki ajanın birlikte verildiğinde farklı mekanizmalar üzerinden etki ederek kombine şekilde lipid peroksidasyonunu daha fazla azaltmasını açıklamaktadır.

Mitokondriyal disfonksiyon sonucu ortaya çıkan ROS, hücre ölüm ve inflamatuvar sinyal yollarını tetikler (156, 157). Metanol zehirlenmesinde mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle, intoksikasyonun akut evresinde proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artar. Proinflamatuvar sitokinler, mikrogliaları

aktive ederek özellikle beyin ve optik sinirde hipoksik ve iskemik hasarın sitotoksik etkilerinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Kan beyin bariyerinin bozulmasının yanında mikrogliaların aktivasyonunun bir sonucu olarak beyin ödemi, optik sinir ödemi ve bu dokularda nekrotik hasar görülebilir. Metanolün immün sistem hücrelerindeki inflamatuvar yanıtı olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hem in vivo hem de in vitro olarak bir proinflamatuvar sitokin olan TNF- α üretimini upregüle ettiği gösterilmiştir (158). Benzer şekilde Taşlı ve ark yapmış olduğu bir çalışmada metanol ilişkili toksik optik nöropati tedavisinde Rutinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada metanolün serum TNF- α düzeylerini artırdığı gözlenmiştir (11). Ahiskalı ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada da metanol zehirlenmesinin optik sinir dokusunda TNF- α ve NF- κ B düzeylerini artırdığı gözlenmiştir (138). Bizim çalışmamızda hem göz hem de serumda TNF- α ve NF- κ B düzeyleri incelenmiş olup, sonuçlarımız her iki çalışmadaki verileri de destekler nitelikte olup; Grup 3'teki ratlarda metanolün hem göz dokusunda hem de serumda TNF- α ve NF- κ B düzeylerini Grup 1'e oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığını tespit ettik.

Ayrıca hem metilprednizolon hem de elamipretidin tek başına uygulandığında serumda TNF- α ve NF- κ B'yı Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı, kombine tedavi alan grubun serum TNF- α ve serum NF- κ B düzeylerinin ise bu iki gruptan da istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu gözlemlendi. Ayrıca Grup 1 ve Grup 6 arasında serum TNF- α düzeyleri açısından istatistiksel farklılık saptanmadı. Bu durum kombine tedavinin ratların serum TNF- α ve serum NF- κ B düzeylerini etkin bir şekilde azalttığını göstermektedir. Ayrıca göz dokusunda TNF- α ve NF- κ B düzeyi incelendiğinde; yine Grup 3'e göre Grup 4 ve 5'te istatistiksel anlamlı farklılık saptanarak TNF- α düzeylerinin düştüğü, Grup 6'da ise Grup 3'e göre bu düşüşün yine istatistiksel olarak anlamlı bulunması yanında, Grup 6 kombine tedavinin Grup 4 ve 5'e göre daha etkili olduğu sonucu çıkarılabilir. NF- κ B düzeyleri göz dokusunda incelendiğinde, Grup 3-4-5 arasında istatistiksel bir farklılık olmamasına rağmen rakamsal olarak NF- κ B düzeylerinde azalma olduğu, öte yandan Grup 6 kombine tedavinin Grup 3 ile istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde NF- κ B düzeylerini göz dokusunda azalttığı ve hatta grup 1 ile grup 6 arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre Elamipretid ve MPZ tek başına TNF- α ve NF- κ B proinflamatuvar sitokinleri azaltarak hücrel hasar

tedavi etmede tek başına başarılı olduğu ancak bunların kombine tedavisinin bu ajanların tek başına uygulanmasına göre hem serum hem de göz dokusunda proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve NF- κ B'yı azaltma konusunda daha da başarılı olduğu anlaşılmıştır. Yapılan bir çalışmada Elamipretidin ROS üretimini azaltarak hücrelerdeki inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir (15). Ayrıca, Elamipretidin temel olarak mitokondriyal ROS ürünlerini temizleyerek NF- κ B aktivasyonunu önlediği, dolayısıyla da TNF- α ve IL-1 β düzeylerini azaltarak proinflamatuvar yanıtı baskıladığı gösterilmiştir (159, 160). Metilprednizolonun ise santral sinir sisteminde antiinflamatuvar etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, T hücrelerinin aktivasyonunu baskılayarak proinflamatuvar yanıtın azalmasını sağladığı ve beyin omurilik sıvısında proinflamatuvar yanıtı baskılayan bir sitokin olan TGF- β 1 düzeylerini artırarak TNF- α düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (161). Metilprednizolon ile elamipretidin farklı mekanizmalar üzerinden proinflamatuvar yanıtı baskılaması, kombine tedavide daha fazla proinflamatuvar yanıtı baskılamasını açıklamaktadır.

Metanol zehirlenmesi oksidatif solunumun blokajına neden olur. Mitokondriyal membranın hasar görmesine bağlı olarak sitokrom C, apoptozu başlatmak için zarlar arası boşluktan sitoplazmaya sızar. Sitokrom C, Apaf-1 ile birleşerek apoptozomu oluşturur ve kaspaz sistemini aktifleştirerek hem retinal gangliyon hücrelerinde hem de santral sinir sistemi nöronları gibi pek çok hücrenin apoptozuna neden olur (162). Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre metanol zehirlenme modeli oluşturulan Grup 3'te, hem retinada hem de caudatoputamen dokusunda apoptozun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını tespit ettik. Ayrıca çalışmamızda caudatoputamen dokusunda yalnız metilprednizolon ve yalnız elamipretid tedavisi alan grupların istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptozu azalttığı, kombine tedavinin ise hem caudatoputamen dokuda hem de göz dokusunda Grup 3'e göre daha fazla apoptozu azalttığı, hatta kombine tedavi alan grup ile kontrol grubunun apoptoz indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi. Elamipretidin kardiyolipin aracılığı ile sitokrom C'yi membrana stabilize ederek, sitokrom C'nin mitokondriden sitozole geçişini ve kaspaz-3'ün bölünmesini engelleyerek apoptozu ve nöronal hasarı engellediği gösterilmiştir (14, 18). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada

Metilprednizolonun anti-apoptotik protein olan Bcl-2 seviyelerini artırdığı ve kaspaz aktivasyonunu da inhibe ettiği gösterilmiştir (163). Bu bulgular, kombine tedavide apoptozun daha etkin azalmasını açıklamaktadır.

Ratların folik asit metabolizması hızlı çalıştığı için, ratlarda metanol zehirlenme modeli geliştirilmesi veya oluşturulması zordur. Yapılan çalışmalarda folik asit eksikliği olan ratlarda 1 günlük metanol maruziyetinin hem retina hem optik sinir hem de beynin tüm dokularında oksidatif hasara neden olabileceği gösterilmiştir ve ratlarda metanol intoksikasyon modeli oluşturabilmek amacıyla Metotreksat tedavisi kullanılmıştır (125, 143). Bir folik asit antagonisti olan Metotreksat doza, uygulama yoluna ve diğer potansiyel nörotoksik ajanların eş zamanlı kullanımına bağlı olarak, beyin, serebellum, hipokampus ve omurilik gibi dokularda oksidan/antioksidan dengeyi bozarak reaktif oksijen ürünlerini artırıp, nöronal dokuları etkileyerek nörotoksisite ve retinotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (164-167). Aslankoç ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada Astaksantin Metotreksatın neden olduğu kortikal hasarı iyileştirmedeki rolü araştırılmış, sadece Metotreksat alan grubun kontrol grubuna göre serebral korteks TAS düzeyinin azaldığı, TOS ve OSI indeksinin arttığı gözlenmiştir (167). Ayrıca Rajamani ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada yalnız Metotreksat verilen grubun, retina, optik sinir ve beyin dokularında, kontrol grubuna oranla oksidatif stresi artırdığı ve GSH düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da literatürdeki bu çalışmalara benzer şekilde Metotreksat uygulamasının Grup 1'e göre göz dokusunda TNF- α , NF- κ B, MDA, TOS, TAS ve OSI değerlerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı, GSH düzeylerini ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü tespit edildi. Beyin dokusunda da benzer şekilde MDA düzeyini istatistiksel anlamlı şekilde artırdığı, OSI ve TAS değerlerini ise rakamsal olarak artırdığı fakat bu artışın istatistiksel anlamlı fark oluşturmadığı görüldü. Bu verilerden yola çıkarak Metotreksat uygulamasının dokularda oksidatif stresi artırdığını söyleyebiliriz.

5.1. Çalışmanın Kısıtlılıkları

Hayvan hakları ve etik değerler nedeniyle çalışmamızı gerçekleştirirken mümkün olan en az sayıda rat kullandık. Uygulanan tedavinin etkinliğini karşılaştırmak için hayvan sayısı yeterli olmayabilir. Ayrıca hayvan ve insan metabolizması arasındaki farklılık deney sonucunu etkilemiş olabilir. Yine çalışmamız 3 günlük bir çalışma olup, takip ve tedavi süresinin kısa olması deney sonuçlarını etkilemiş olabilir. Ayrıca literatürde elamipretidin farmakokinetiği hakkında sınırlı veri mevcut olup ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Kit yetersizliğinden dolayı GSH, TNF- α ve NF- κ B düzeylerini caudatoputamen dokusunda çalışamadığımızdan, tedavinin caudatoputamen dokusu ve göz dokusunda etkinliklerinin değerlendirilmesi konusunda kısıtlılık yaşadık.

6. SONUÇ

Bu çalışmada deneysel metanol zehirlenmesi modeli oluşturulan ratlarda, Elamipretid ve Metilprednizolon tedavilerinin kombine olarak uygulanmasının caudatoputamen dokusundaki nöronal dejenerasyonunda, optik sinir ve retinal dejenerasyonda iyileşme sağladığı, bu dokularda oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu azalttığı, özellikle beyin dokusunda apoptozu azalttığı görülmüştür.

Güçlü anti-oksidatif özelliği ile Elamipretid, hem tek başına hem de güncel tıp pratiğinde metanole sekonder toksik optik nöropati tedavisinde aktif olarak kullanılan Metilprednizolon ile kombine kullanıldığında histopatolojik düzeyde beyin ve göz dokusundaki doku hasarının önlenmesinde etkili olmuştur. Ancak Elamipretidin metanol toksisitesine bağlı end organ hasarı üzerindeki uzun vadeli klinik etkileri, etkinliği, güvenilirliği ve etkin dozunu belirlemek için daha fazla klinik deney ve çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Pakravan M, Esfandiari H, Sanjari N, Ghahari E. Erythropoietin as an adjunctive treatment for methanol-induced toxic optic neuropathy. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*. 2016;42(6):633-9.
2. Wu X, Pang Y, Zhang Z, Li X, Wang C, Lei Y, et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS-31 mediates neuroprotection in a rat experimental glaucoma model. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2019;51(4):411-21.
3. Poisoning AAoCTAHCotTGfM, Barceloux DG, Randall Bond G, Krenzelok EP, Cooper H, Allister Vale J. American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *Journal of toxicology: Clinical toxicology*. 2002;40(4):415-46.
4. Skrzydlewska E. Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. *Toxicology mechanisms and methods*. 2003;13(4):277-93.
5. Liesivuori J, Savolainen, Heikki. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. *Pharmacology & toxicology*. 1991;69(3):157-63.
6. Deniz S, Oppenheim C, Lehericy S, Sharshar T, Lalam T, Dormont D, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in a case of methanol intoxication. *Neurotoxicology*. 2000;21(3):405-8.
7. Abrishami M, Khalifeh M, Shoayb M, Abrishami M. Therapeutic effects of high-dose intravenous prednisolone in methanol-induced toxic optic neuropathy. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. 2011;27(3):261-3.
8. Nalcacioglu P, Kavuncu S, Taskin Turkmenoglu T, Sonmez CA. The effect of idebenone and corticosteroid treatment on methanol-induced toxic optic nerve and retinal damage in rats: biochemical and histopathological examination. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2022;41(3):250-6.
9. Icel E, Suleyman H, Yazici GN, Bakan N, Sunar M. Effects of adenosine triphosphate on methanol-induced experimental optic nerve damage in rats: biochemical and histopathological evaluation. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2020;39(3):244-8.
10. Şahin A, Kaya S, Türkcü G, Cingü AK, Yüksel H, Türkcü FM, et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester in acute methanol toxicity on rat retina and optic nerve. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2013;32(4):263-7.

11. Taşlı NG, Çimen FK, Karakurt Y, Uçak T, Mammadov R, Süleyman B, et al. Protective effects of Rutin against methanol induced acute toxic optic neuropathy: an experimental study. *International journal of ophthalmology*. 2018;11(5):780.
12. Szeto HH, Liu S, Soong Y, Seshan SV, Cohen-Gould L, Manichev V, et al. Mitochondria Protection after Acute Ischemia Prevents Prolonged Upregulation of IL-1 β and IL-18 and Arrests CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(5):1437-49.
13. Nhu NT, Xiao S-Y, Liu Y, Kumar VB, Cui Z-Y, Lee S-D. Neuroprotective effects of a small mitochondrially-targeted tetrapeptide elamipretide in neurodegeneration. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2022;15:747901.
14. Szeto HH. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *British journal of pharmacology*. 2014;171(8):2029-50.
15. Liu Y, Fu H, Wu Y, Nie B, Liu F, Wang T, et al. Elamipretide (SS-31) Improves Functional Connectivity in Hippocampus and Other Related Regions Following Prolonged Neuroinflammation Induced by Lipopolysaccharide in Aged Rats. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:600484.
16. Allen ME, Pennington ER, Perry JB, Dadoo S, Makrecka-Kuka M, Dambrova M, et al. The cardiolipin-binding peptide elamipretide mitigates fragmentation of cristae networks following cardiac ischemia reperfusion in rats. *Commun Biol*. 2020;3(1):389.
17. Chen M, Liu B, Ma J, Ge J, Wang K. Protective effect of mitochondria-targeted peptide MTP-131 against oxidative stress-induced apoptosis in RGC-5 cells. *Mol Med Rep*. 2017;15(4):2179-85.
18. Birk AV, Liu S, Soong Y, Mills W, Singh P, Warren JD, et al. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;24(8):1250-61.
19. Wiener SW. Household Products: Toxic Alcohols. In: Hoffman RS, Howland MA, Lewin NA, Nelson LS, Goldfrank LR, Flomenbaum NE, editors. *Goldfrank's Toxicological Emergencies*. 11th ed. United States: Mc Graw Hill Education; 2019. p. 1421-34.
20. Dalena F, Senatore A, Marino A, Gordano A, Basile M, Basile A. Methanol production and applications: an overview. *Methanol*. 2018:3-28.
21. Tijm P, Waller F, Brown D. Methanol technology developments for the new millennium. *Applied Catalysis A: General*. 2001;221(1-2):275-82.
22. Sheldon D. Methanol production-a technical history. *Johnson Matthey Technology Review*. 2017;61(3):172-82.

23. Kostic MA, Dart RC. Rethinking the toxic methanol level. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2003;41(6):793-800.
24. Buller F, Wood CA. POISONING BY WOOD ALCOHOL. CASES OF DEATH AND BLINDNESS FROM COLUMBIAN SPIRITS AND OTHER METHYLATED PREPARATIONS. *Journal of the American Medical Association*. 1904;43(16):1117-23.
25. HARROP GA, Benedict E. ACUTE METHYL ALCOHOL POISONING ASSOCIATED WITH ACIDOSIS: REPORT OF CASE. *Journal of the American Medical Association*. 1920;74(1):25-7.
26. Marc-Aurele J, Schreiner GE. The dialysance of ethanol and methanol: a proposed method for the treatment of massive intoxication by ethyl or methyl alcohol. *The Journal of Clinical Investigation*. 1960;39(5):802-7.
27. Pressman P, Clemens R, Sahu S, Hayes AW. A review of methanol poisoning: a crisis beyond ocular toxicology. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2020;39(3):173-9.
28. Mousavi-Roknabadi RS, Arzhangzadeh M, Safaei-Firouzabadi H, Mousavi-Roknabadi RS, Sharifi M, Fathi N, et al. Methanol poisoning during COVID-19 pandemic; A systematic scoping review. *The American journal of emergency medicine*. 2022;52:69-84.
29. Paasma R, Hovda KE, Tikkerberi A, Jacobsen D. Methanol mass poisoning in Estonia: outbreak in 154 patients. *Clinical toxicology*. 2007;45(2):152-7.
30. Zakharov S, Pelclova D, Urban P, Navratil T, Diblik P, Kuthan P, et al. Czech mass methanol outbreak 2012: epidemiology, challenges and clinical features. *Clinical toxicology*. 2014;52(10):1013-24.
31. Rostrup M, Edwards JK, Abukalish M, Ezzabi M, Some D, Ritter H, et al. The methanol poisoning outbreaks in Libya 2013 and Kenya 2014. *PloS one*. 2016;11(3):e0152676.
32. Hassanian-Moghaddam H, Nikfarjam A, Mirafzal A, Saberinia A, Nasehi AA, Masoumi Asl H, et al. Methanol mass poisoning in Iran: role of case finding in outbreak management. *Journal of public health*. 2015;37(2):354-9.
33. Md Noor J, Hawari R, Mokhtar M, Yussof S, Chew N, Norzan N, et al. Methanol outbreak: a Malaysian tertiary hospital experience. *International journal of emergency medicine*. 2020;13:1-7.
34. Hovda KE, Hunderi OH, Tafjord AB, Dunlop O, Rudberg N, Jacobsen D. Methanol outbreak in Norway 2002–2004: epidemiology, clinical features and prognostic signs. *Journal of internal medicine*. 2005;258(2):181-90.

35. Askarian M, Khakpour M, Taghrir MH, Akbarialiabad H, Borazjani R. Investigating the epidemiology of methanol poisoning outbreaks: a scoping review protocol. *JBHI evidence synthesis*. 2021;19(6):1388-93.
36. Soltaninejad K. Methanol Mass Poisoning Outbreak: A Consequence of COVID-19 Pandemic and Misleading Messages on Social Media. *Int J Occup Environ Med*. 2020;11(3):148-50.
37. Graw M, Haffner H-T, Althaus L, Besserer K, Voges S. Invasion and distribution of methanol. *Archives of toxicology*. 2000;74:313-21.
38. Clay KL, Murphy R, Watrins WD. Experimental methanol toxicity in the primate: analysis of metabolic acidosis. *Toxicology and applied pharmacology*. 1975;34(1):49-61.
39. Nekoukar Z, Zakariaei Z, Taghizadeh F, Musavi F, Banimostafavi ES, Sharifpour A, et al. Methanol poisoning as a new world challenge: A review. *Annals of medicine and surgery*. 2021;66:102445.
40. Røe O, Enoksson P. Species differences in methanol poisoning. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 1982;10(4):275-86.
41. Osterloh JD, D'Alessandro A, Chuwers P, Mogadeddi H, Kelly TJ. Serum concentrations of methanol after inhalation at 200 ppm. *Journal of occupational and environmental medicine*. 1996;38(6):571-6.
42. Perkins RA, Ward KW, Pollack GM. Comparative toxicokinetics of inhaled methanol in the female CD-1 mouse and Sprague–Dawley rat. *Toxicological Sciences*. 1995;28(2):245-54.
43. Choi J-H, Lee SK, Gil Y-E, Ryu J, Jung-Choi K, Kim H, et al. Neurological complications resulting from non-oral occupational methanol poisoning. *Journal of Korean medical science*. 2017;32(2):371.
44. Ryu J, Lim KH, Ryu D-R, Lee HW, Yun JY, Kim S-W, et al. Two cases of methyl alcohol intoxication by sub-chronic inhalation and dermal exposure during aluminum CNC cutting in a small-sized subcontracted factory. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*. 2016;28:1-8.
45. Bebarta VS, Heard K, Dart RC. Inhalational abuse of methanol products: elevated methanol and formate levels without vision loss. *The American journal of emergency medicine*. 2006;24(6):725-8.
46. Givens M, Kalbfleisch K, Bryson S. Comparison of methanol exposure routes reported to Texas poison control centers. *Western journal of emergency medicine*. 2008;9(3):150.

47. Kleiman R, Nickle R, Schwartz M. Medical toxicology and public health--update on research and activities at the Centers for Disease Control and Prevention, and the Agency for Toxic Substances and Disease Registry inhalational methanol toxicity. *J Med Toxicol.* 2009;5(3):158-64.
48. Darwish A, Roth C, Duclos P, Ohn S, Nassar A, Mahoney F, et al. Investigation into a cluster of infant deaths following immunization: evidence for methanol intoxication. *Vaccine.* 2002;20(29-30):3585-9.
49. Karaduman F, Asil T, Balci K, Temizoz O, Unlu E, Yilmaz A, et al. Bilateral basal ganglionic lesions due to transdermal methanol intoxication. *Journal of Clinical Neuroscience.* 2009;16(11):1504-6.
50. Adanir T, Ozkalkanli M, Aksun M. Percutaneous methanol intoxication: case report. *European journal of anaesthesiology.* 2005;22(7):560-1.
51. Soysal D, Yilmaz S, Tatar E, Ozatli T, Yildiz B, Ugur O. Transdermal methanol intoxication: a case report. *Acta anaesthesiologica scandinavica.* 2007;51(6):779-80.
52. Jacobsen D, Jansen H, Wiik-Larsen E, Bredesen JE, Halvorsen S. Studies on methanol poisoning. *Acta Medica Scandinavica.* 1982;212(1-2):5-10.
53. Kruse J. Methanol poisoning. *Intensive care medicine.* 1992;18:391-7.
54. Eells JT, McMartin KE, Black K, Virayotha V, Tisdell RH, Tephly TR. Formaldehyde poisoning: rapid metabolism to formic acid. *Jama.* 1981;246(11):1237-8.
55. Martinasevic MK, Green MD, Baron J, Tephly TR. Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in human and rat retina: relation to methanol toxicity. *Toxicology and applied pharmacology.* 1996;141(2):373-81.
56. McMartin KE, Ambre JJ, Tephly TR. Methanol poisoning in human subjects: role for formic acid accumulation in the metabolic acidosis. *The American journal of medicine.* 1980;68(3):414-8.
57. Brent J, McMartin K, Phillips S, Aaron C, Kulig K. Fomepizole for the treatment of methanol poisoning. *New England Journal of Medicine.* 2001;344(6):424-9.
58. Erecińska M, Wilson DF. Inhibitors of cytochrome c oxidase. *Pharmacology & Therapeutics.* 1980;8(1):1-20.
59. Martin-Amat G, Tephly TR, McMartin KE, Makar AB, Hayreh MS, Hayreh SS, et al. Methyl alcohol poisoning: II. Development of a model for ocular toxicity in methyl alcohol poisoning using the rhesus monkey. *Archives of Ophthalmology.* 1977;95(10):1847-50.

60. Ochs S, Ranish N. Metabolic dependence of fast axoplasmic transport in nerve. *Science*. 1970;167(3919):878-9.
61. Sharma R, Marasini S, Sharma AK, Shrestha JK, Nepal BP. Methanol poisoning: ocular and neurological manifestations. *Optometry and vision science*. 2012;89(2):178-82.
62. McLean DR, Jacobs H, Mielke BW. Methanol poisoning: a clinical and pathological study. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1980;8(2):161-7.
63. Symon L, Pasztor E, Dorsch N, Branston NM. Physiological responses of local areas of the cerebral circulation in experimental primates determined by the method of hydrogen clearance. *Stroke*. 1973;4(4):632-42.
64. Sharpe JA, Hostovsky M, Bilbao JM, Rewcastle NB. Methanol optic neuropathy: a histopathological study. *Neurology*. 1982;32(10):1093-.
65. Gîrlescu N, Knieling A, Maria Diac M, Timofte A, Moraru M, Iliescu DB. MORPHOPATHOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS IN METHANOL INTOXICATION. *Romanian Journal of Functional & Clinical, Macro & Microscopical Anatomy & of Anthropology/Revista Română de Anatomie Functionala si Clinica, Macro si Microscopica si de Antropologie*. 2023;22(2).
66. BENNETT Jr IL, CARY FH, MITCHELL Jr GL, COOPER MN. Acute methyl alcohol poisoning: a review based on experiences in an outbreak of 323 cases. *Medicine*. 1953;32(4):431-63.
67. Jacobsen D, McMartin KE. Methanol and ethylene glycol poisonings: mechanism of toxicity, clinical course, diagnosis and treatment. *Medical toxicology*. 1986;1(5):309-34.
68. Sefidbakht S, Rasekhi A, Kamali K, Borhani Haghighi A, Salooti A, Meshksar A, et al. Methanol poisoning: acute MR and CT findings in nine patients. *Neuroradiology*. 2007;49:427-35.
69. Hovda KE, McMartin K, Jacobsen D. Methanol and formaldehyde poisoning. *Critical care toxicology Second Edition* Brent J, Megarbane B, Palmer R, Hatten B, Burkhart K (Eds) New York, Springer Publishing. 2017.
70. Liberski S, Kaluzny BJ, Kocięcki J. Methanol-induced optic neuropathy: A still-present problem. *Archives of Toxicology*. 2022;96(2):431-51.
71. Swartz RD, Millman RP, Billi JE, Bondar NP, Migdal SD, Simonian SK, et al. Epidemic methanol poisoning: clinical and biochemical analysis of a recent episode. *Medicine*. 1981;60(5):373-82.
72. Hantson P, Mahieu P. Pancreatic injury following acute methanol poisoning. *Journal of toxicology: Clinical toxicology*. 2000;38(3):297-303.

73. Verhelst D, Moulin P, Haufrond V, Wittebole X, Jadoul M, Hantson P. Acute renal injury following methanol poisoning: analysis of a case series. 2004.
74. McQuade DJ, Dargan PI, Wood DM. Challenges in the diagnosis of ethylene glycol poisoning. *Annals of clinical biochemistry*. 2014;51(2):167-78.
75. Zimmerman HE, Burkhart KK, Donovan JW. Ethylene glycol and methanol poisoning: diagnosis and treatment. *Journal of emergency nursing*. 1999;25(2):116-20.
76. Lao YE, Heyerdahl F, Jacobsen D, Hovda KE. An enzymatic assay with formate oxidase for point-of-care diagnosis of methanol poisoning. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2022;131(6):547-54.
77. Zakharov S, Kurcova I, Navratil T, Salek T, Komarc M, Pelclova D. Is the measurement of serum formate concentration useful in the diagnostics of acute methanol poisoning? A prospective study of 38 patients. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2015;116(5):445-51.
78. Lolekha PH, Vanavanan S, Lolekha S. Update on value of the anion gap in clinical diagnosis and laboratory evaluation. *Clinica chimica acta*. 2001;307(1-2):33-6.
79. Keleş GT, Örgüç S, Toprak B, Özasan S, Sakarya M. Methanol poisoning with necrosis corpus callosum. *Clinical Toxicology*. 2007;45(3):307-8.
80. Askar A, Al-Suwaida A. Methanol Intoxication with Brain Hemorrhage: Catastrophic outcome of late presentation. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 2007;18(1):117-22.
81. Sebe A, Satar S, Uzun B, Topal M, Yesilagac H, Avci A. Intracranial hemorrhage associated with methanol intoxication. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 2006;73(8).
82. Paliwal V, Uniyal R, Azim A, Neyaz Z, Muzaffar S, Baronia A. Haemorrhagic putaminal necrosis, optic atrophy and coma: a triad suggestive of methanol poisoning. *Anaesthesia and Intensive Care*. 2016;44(5):636-7.
83. Taheri MS, Moghaddam HH, Moharamzad Y, Dadgari S, Nahvi V. The value of brain CT findings in acute methanol toxicity. *European journal of radiology*. 2010;73(2):211-4.
84. McMartin K, Jacobsen D, Hovda KE. Antidotes for poisoning by alcohols that form toxic metabolites. *British journal of clinical pharmacology*. 2016;81(3):505-15.
85. Roberts DM, Yates C, Megarbane B, Winchester JF, Maclaren R, Gosselin S, et al. Recommendations for the role of extracorporeal treatments in the management of acute methanol poisoning: a systematic review and consensus statement. *Crit Care Med*. 2015;43(2):461-72.

86. McCoy HG, Cipolle RJ, Ehlers SM, Sawchuk RJ, Zaske DE. Severe methanol poisoning: application of a pharmacokinetic model for ethanol therapy and hemodialysis. *The American Journal of Medicine*. 1979;67(5):804-7.
87. McMartin K, Brent J. Analysis of fomepizole elimination in methanol-and ethylene glycol-poisoned patients. *Journal of Medical Toxicology*. 2022;1-11.
88. Hovda K, Jacobsen D. Expert opinion: fomepizole may ameliorate the need for hemodialysis in methanol poisoning. *Human & experimental toxicology*. 2008;27(7):539-46.
89. Lepik KJ, Levy AR, Sobolev BG, Pursell RA, DeWitt CR, Erhardt GD, et al. Adverse drug events associated with the antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning: a comparison of ethanol and fomepizole. *Annals of emergency medicine*. 2009;53(4):439-50. e10.
90. Lepik KJ, Brubacher JR, DeWitt CR, Lam GS, Lawson EJ, Erhardt GD, et al. Bradycardia and hypotension associated with fomepizole infusion during hemodialysis. *Clinical Toxicology*. 2008;46(6):570-3.
91. Benitez JG, Swanson-Biearman B, Krenzelok EP, Krenzelok E. Nystagmus secondary to fomepizole administration in a pediatric patient. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2000;38(7):795-8.
92. Zakharov S, Pelclova D, Navratil T, Belacek J, Kurcova I, Komzak O, et al. Intermittent hemodialysis is superior to continuous veno-venous hemodialysis/hemodiafiltration to eliminate methanol and formate during treatment for methanol poisoning. *Kidney international*. 2014;86(1):199-207.
93. Hovda K, Froyshov S, Gudmundsdottir H, Rudberg N, Jacobsen D. Fomepizole may change indication for hemodialysis in methanol poisoning: prospective study in seven cases. *Clinical nephrology*. 2005;64(3).
94. Brent J. Fomepizole for ethylene glycol and methanol poisoning. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(21):2216-23.
95. Mégarbane B, Borron SW, Trout H, Hantson P, Jaeger A, Krencker E, et al. Treatment of acute methanol poisoning with fomepizole. *Intensive care medicine*. 2001;27:1370-8.
96. Hassanian-Moghaddam H, Zamani N. A brief review on toxic alcohols: management strategies. *Iranian journal of kidney diseases*. 2016;10(6):344.
97. Noker P, Eells J, Tephly T. Methanol toxicity: treatment with folic acid and 5-formyl tetrahydrofolic acid. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1980;4(4):378-83.
98. Noker P, Tephly T. The role of folates in methanol toxicity. *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems-IV: Springer*; 1980. p. 305-15.

99. Zakharov S, Nurieva O, Navratil T, Diblik P, Kuthan P, Pelclova D. Acute methanol poisonings: Folate administration and visual sequelae. *Journal of Applied Biomedicine*. 2014;12(4):309-16.
100. Shah S, Pandey V, Thakore N, Mehta I. Study of 63 cases of methyl alcohol poisoning (hooch tragedy in Ahmedabad). *J Assoc Physicians India*. 2012;60(34):6.
101. Shukla M, Shikoh I, Saleem A. Intravenous methylprednisolone could salvage vision in methyl alcohol poisoning. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2006;54(1):68-9.
102. Sanaei-Zadeh H. Response to "Methanol and ethylene glycol acute poisonings—predictors of mortality". *Clinical Toxicology*. 2012;50(3):225-.
103. Liu JJ, Daya MR, Carrasquillo O, Kales SN. Prognostic factors in patients with methanol poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 1998;36(3):175-81.
104. Hassanian-Moghaddam H, Pajoumand A, Dadgar S, Shadnia S. Prognostic factors in methanol poisoning. *Human & experimental toxicology*. 2007;26(7):583-6.
105. Szeto H, Birk A. Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2014;96(6):672-83.
106. Dai D-F, Chiao Y-A, Martin G, Marcinek D, Basisty N, Quarles E, et al. Mitochondrial-targeted catalase: extended longevity and the roles in various disease models. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2017;146:203-41.
107. Zhao K, Zhao G-M, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, et al. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(33):34682-90.
108. Chavez JD, Tang X, Campbell MD, Reyes G, Kramer PA, Stuppard R, et al. Mitochondrial protein interaction landscape of SS-31. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(26):15363-73.
109. Lee FY, Shao PL, Wallace CG, Chua S, Sung PH, Ko SF, et al. Combined Therapy with SS31 and Mitochondria Mitigates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
110. Liu Y, Yang W, Sun X, Xie L, Yang Y, Sang M, et al. SS31 Ameliorates Sepsis-Induced Heart Injury by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation*. 2019;42(6):2170-80.

111. Liu S, Soong Y, Seshan SV, Szeto HH. Novel cardiolipin therapeutic protects endothelial mitochondria during renal ischemia and mitigates microvascular rarefaction, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(9):F970-80.
112. Duan SB, Yang SK, Zhou QY, Pan P, Zhang H, Liu F, et al. Mitochondria-targeted peptides prevent on contrast-induced acute kidney injury in the rats with hypercholesterolemia. *Ren Fail*. 2013;35(8):1124-9.
113. Hou Y, Li S, Wu M, Wei J, Ren Y, Du C, et al. Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(6):F547-59.
114. Wu J, Zhang M, Li H, Sun X, Hao S, Ji M, et al. BDNF pathway is involved in the protective effects of SS-31 on isoflurane-induced cognitive deficits in aging mice. *Behavioural brain research*. 2016;305:115-21.
115. Yang L, Zhao K, Calingasan NY, Luo G, Szeto HH, Beal MF. Mitochondria targeted peptides protect against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(9):2095-104.
116. Lee HY, Kaneki M, Andreas J, Tompkins RG, Martyn JA. Novel mitochondria-targeted antioxidant peptide ameliorates burn-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress in the skeletal muscle of mice. *Shock*. 2011;36(6):580-5.
117. Roshanravan B, Liu SZ, Ali AS, Shankland EG, Goss C, Amory JK, et al. In vivo mitochondrial ATP production is improved in older adult skeletal muscle after a single dose of elamipretide in a randomized trial. *PLoS One*. 2021;16(7):e0253849.
118. Imai T, Matsubara H, Nakamura S, Hara H, Shimazawa M. The Mitochondria-targeted Peptide, Bendavia, Attenuated Ischemia/Reperfusion-induced Stroke Damage. *Neuroscience*. 2020;443:110-9.
119. Shang L, Ren H, Wang S, Liu H, Hu A, Gou P, et al. SS-31 Protects Liver from Ischemia-Reperfusion Injury via Modulating Macrophage Polarization. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6662156.
120. Reddy PH, Manczak M, Yin X, Reddy AP. Synergistic Protective Effects of Mitochondrial Division Inhibitor 1 and Mitochondria-Targeted Small Peptide SS31 in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(4):1549-65.
121. Reddy PH, Manczak M, Kandimalla R. Mitochondria-targeted small molecule SS31: a potential candidate for the treatment of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26(8):1483-96.

122. Brian CT, Dvorianchikova G, Tao W, Gallo RA, Lee JY, Ivanov D, et al. Mitochondrial targeted therapy with elamipretide (MTP-131) as an adjunct to tumor necrosis factor inhibition for traumatic optic neuropathy in the acute setting. *Experimental eye research*. 2020;199:108178.
123. Li J, Chen X, Xiao W, Ma W, Li T, Huang J, et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):349-56.
124. Huang J, Li X, Li M, Li J, Xiao W, Ma W, et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 protects the retinas of diabetic rats. *Curr Mol Med*. 2013;13(6):935-45.
125. Theobald J, Lim C. Folate as an adjuvant therapy in methanol poisoning. *Nutrition in Clinical Practice*. 2019;34(4):521-7.
126. Eells J, Henry M, Lewandowski M, Seme M, Murray T. Development and characterization of a rodent model of methanol-induced retinal and optic nerve toxicity. *Neurotoxicology*. 2000;21(3):321-30.
127. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008;60(1):63-70.
128. Gilger AP, Potts AM, Johnson LV. Studies on the visual toxicity of methanol: II. The effect of parenterally administered substances on the systemic toxicity of methyl alcohol. *American Journal of Ophthalmology*. 1952;35(5):113-26.
129. El-Bakary AA, El-Dakrory SA, Attalla SM, Hasanein NA, Malek HA. Ranitidine as an alcohol dehydrogenase inhibitor in acute methanol toxicity in rats. *Human & experimental toxicology*. 2010;29(2):93-101.
130. Bancroft JD SA, editor. *Theory and practice of histological techniques*. New York: Churchill Livingstone; 1996.
131. Odacı E, Özyılmaz C. Exposure to a 900 MHz electromagnetic field for 1 hour a day over 30 days does change the histopathology and biochemistry of the rat testis. *International journal of radiation biology*. 2015;91(7):547-54.
132. Yagi K. [39] Assay for blood plasma or serum. *Methods in enzymology*. 105: Elsevier; 1984. p. 328-31.
133. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*. 1978;86(1):271-8.
134. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.

135. Zakharov S, Pelclova D, Diblik P, Urban P, Kuthan P, Nurieva O, et al. Long-term visual damage after acute methanol poisonings: Longitudinal cross-sectional study in 50 patients. *Clinical toxicology*. 2015;53(9):884-92.
136. Nurieva O, Diblik P, Kuthan P, Sklenka P, Meliska M, Bydzovsky J, et al. Progressive chronic retinal axonal loss following acute methanol-induced optic neuropathy: four-year prospective cohort study. *American Journal of Ophthalmology*. 2018;191:100-15.
137. Laksmi YA, Sidik M, Siregar NC, Nusanti S. Neuroprotective effects of citicoline on methanol-intoxicated retina model in rats. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2021;37(9):534-41.
138. Ahiskali I, Pinar CL, Kiki M, Cankaya M, Kunak CS, Altuner D. Effect of taxifolin on methanol-induced oxidative and inflammatory optic nerve damage in rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2019;38(4):384-9.
139. Sovani I, Mose JC. Retinal ganglion cell density after coenzyme Q10 treatment in a rat model of methanol toxic optic neuropathy. *Neuro-Ophthalmology Japan*. 2017;34(2):239-43.
140. Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E. Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. *Methods in cell biology*. 2007;80:379-93.
141. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 2013;13(2):71-82.
142. Yoon Y-S, Lee J-H, Hwang S-C, Choi KS, Yoon G. TGF β 1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene*. 2005;24(11):1895-903.
143. Rajamani R, Muthuvel A, Senthilvelan M, Sheeladevi R. Oxidative stress induced by methotrexate alone and in the presence of methanol in discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve. *Toxicology letters*. 2006;165(3):265-73.
144. Skrzydlewska E, Farbiszewski R. Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. *Drug and alcohol dependence*. 1999;57(1):61-7.
145. Kozak HH, Kılınç İ, Özkürkçüler A. Biochemical evaluation of the effects of quercetin on experimental acute methanol intoxication in rats. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2020;32(20):195-201.
146. Kowalczyk A, Czerniawska Piątkowska E. Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process. *Andrology*. 2021;9(4):1275-81.

147. Ahiskali I, Ferah Okay I, Mammadov R, Okay U, Keskin Cimen F, Kurt N, et al. Effect of taxifolin on cisplatin-associated oxidative optic nerve damage in rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2021;40(1):1-6.
148. Ucak T, Karakurt Y, Tasli G, Cimen FK, Icel E, Kurt N, et al. The effects of thiamine pyrophosphate on ethanol induced optic nerve damage. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2019;20:1-7.
149. Farbiszewski ESR. Lipid peroxidation and antioxidant status in the liver, erythrocytes, and serum of rats after methanol intoxication. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 1998;53(8):637-49.
150. Hall ED, Braugher JM. Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. *Surgical neurology*. 1982;18(5):320-7.
151. Liu X, Wang F-y, Chi S, Liu T, Yang H-l, Zhong R-j, et al. Mitochondria-targeting peptide SS-31 attenuates ferroptosis via inhibition of the p38 MAPK signaling pathway in the hippocampus of epileptic rats. *Brain Research*. 2024;1836:148882.
152. Zhou J, Shen R, Makale EC, Zhong W, Chen Z, Huang Q. SS31 confers cerebral protection by reversing mitochondrial dysfunction in early brain injury following subarachnoid hemorrhage, via the Nrf2-and PGC-1 α -dependent pathways. *Neurochemical Research*. 2023;48(5):1580-95.
153. Wu J, Zhang M, Hao S, Jia M, Ji M, Qiu L, et al. Mitochondria-targeted peptide reverses mitochondrial dysfunction and cognitive deficits in sepsis-associated encephalopathy. *Molecular neurobiology*. 2015;52:783-91.
154. Szeto HH, Liu S, Soong Y, Wu D, Darrah SF, Cheng F-Y, et al. Mitochondria-targeted peptide accelerates ATP recovery and reduces ischemic kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(6):1041-52.
155. Miyamoto S, Zhang G, Hall D, Oates PJ, Maity S, Madesh M, et al. Restoring mitochondrial superoxide levels with elamipretide (MTP-131) protects db/db mice against progression of diabetic kidney disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(21):7249-60.
156. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *cell*. 1997;91(4):479-89.
157. Vieira HL, Belzacq A-S, Haouzi D, Bernassola F, Cohen I, Jacotot E, et al. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene*. 2001;20(32):4305-16.

158. Désy O, Carignan D, Caruso M, de Campos-Lima PO. Methanol induces a discrete transcriptional dysregulation that leads to cytokine overproduction in activated lymphocytes. *Toxicological Sciences*. 2010;117(2):303-13.
159. Wu J, Li H, Sun X, Zhang H, Hao S, Ji M, et al. A mitochondrion-targeted antioxidant ameliorates isoflurane-induced cognitive deficits in aging mice. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138256.
160. Zhao W, Xu Z, Cao J, Fu Q, Wu Y, Zhang X, et al. Elamipretide (SS-31) improves mitochondrial dysfunction, synaptic and memory impairment induced by lipopolysaccharide in mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16:1-19.
161. Sellebjerg F, Christiansen M, Jensen J, Frederiksen J. Immunological effects of oral high-dose methylprednisolone in acute optic neuritis and multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2000;7(3):281-9.
162. Prihatningtias R, Wildan A, Yuliana C, Krisnugroho I. Comparisons of Caspase-3 and Caspase-7 Expression from Retinal Ganglion Cells Apoptosis Post Folic Acid and Methylcobalamine Administrations In Methanol Toxic Wistar Rats Models. *PAKISTAN JOURNAL OF MEDICAL & HEALTH SCIENCES*. 2018;12(3):1360-2.
163. Lu G-b, Niu F-w, Zhang Y-c, Du L, Liang Z-y, Gao Y, et al. Methylprednisolone promotes recovery of neurological function after spinal cord injury: association with Wnt/ β -catenin signaling pathway activation. *Neural Regeneration Research*. 2016;11(11):1816-23.
164. Brock S, Jennings HR. Fatal acute encephalomyelitis after a single dose of intrathecal methotrexate. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2004;24(5):673-6.
165. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, et al. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology*. 2006;218(2-3):125-33.
166. Uzar E, Koyuncuoglu HR, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Kilbas S, et al. The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006;291:63-8.
167. Aslankoc R, Ozmen O, Yalcin A. Astaxanthin ameliorates damage to the cerebral cortex, hippocampus and cerebellar cortex caused by methotrexate. *Biotechnic & Histochemistry*. 2022;97(5):382-93.