

**Atf İçin:** Çobanoğlu H, 2021. Gadoterik Asit'in *In Vitro* Koşullarda Kardeş Kromatid Değişimi ve Mitotik İndeks Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(3): 1803-1808.

**To Cite:** Çobanoğlu H, 2021. Evaluation of Gadoteric Acid's Effect on Sister Chromatid Exchange and Mitotic Index Under *In Vitro* Conditions. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(3): 1803-1808.

## Gadoterik Asit'in *In Vitro* Koşullarda Kardeş Kromatid Değişimi ve Mitotik İndeks Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Hayal ÇOBANOĞLU<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Gadoterik asit manyetik rezonans (MR) görüntülemeye teşhis amaçlı kullanılan ekstraselüler gadolinyumlu kontrast maddedir. Bu çalışmada gadoterik asit'in insan periferal lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmada kardeş kromatid değişimi (KKD) yöntemi kullanıldı. KKD genotoksititeyi temsil eden, mitotik indeks (MI) sitotoksititeyi temsil eden parametreler olarak kullanıldı. Gadoteric acid'in 1, 2.5, 5, ve 25 mM konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde hem genotoksitite hem de sitotoksitite parametreleri değerlendirildi. Gadoteric acid'in hiçbir konsantrasyonda MI değerleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı, KKD'ni ise sadece en yüksek konsantrasyonda (25 mM) anlamlı derecede arttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Bu bulgular gadoterik asit'in sitotoksik bir potansiyelinin olmadığını buna karşın zayıf bir genotoksik potansiyelinin olabileceğine işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gadoterik asit, kardeş kromatid değişimi, mitotik indeks

### Evaluation of Gadoteric Acid's Effect on Sister Chromatid Exchange and Mitotic Index Under *In Vitro* Conditions

**ABSTRACT:** Gadoteric acid is extracellular gadolinium based contrast agent used for diagnostic purposes in magnetic resonance (MR) imaging. In this study, it was aimed to evaluate the *in vitro* genotoxic and cytotoxic effects of gadoteric acid on human peripheral lymphocytes. Sister chromatid exchange (SCE) was used in the study. SCE and mitotic index (MI) were used as genotoxicity and cytotoxicity parameters respectively. Both genotoxicity and cytotoxicity parameters were evaluated in human peripheral lymphocytes treated with 1, 2.5, 5, and 25 mM concentrations of gadoteric acid for 48 hours. It was determined that gadoteric acid did not cause a significant change on MI values at any concentration and SCE values increased significantly only at the highest concentration (25 mM). These findings indicate that gadoteric acid does not have a cytotoxic potential, but it may have a weak genotoxic potential.

**Keywords:** Gadoteric acid, sister chromatid exchange, mitotic index

<sup>1</sup>Hayal ÇOBANOĞLU (Orcid ID: 0000-0001-9640-3354), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Çanakkale, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hayal ÇOBANOĞLU, e-mail: hayaltok@comu.edu.tr

Bu çalışma 22-24 Ocak 2021 tarihinde Afyonkarahisar'da düzenlenen "Cumhuriyet 4. Uluslararası Uygulamalı Bilimler" kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuş olup özet metin olarak kongre özet kitabında yer almaktadır.

Bu makalede yer alan deneyler için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun Tarih:03.06.2020, Karar no: 2020-08 ile etik kurul onayı alınmıştır.

## GİRİŞ

İyonlaştırıcı radyasyonun kullanıldığı X ışını ve radyoizotop görüntüleme tekniklerine göre daha güvenli olduğu kabul edilen manyetik rezonans görüntüleme (MRG), tıpta teşhis amacıyla yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Simi, 2008; Hill, 2018). MRG kullanımı tüm dünyada her geçen gün artmaktadır (OECDilibrary). Günümüzde MRG uygulamalarının %40'ında gadolinyumlu kontrast ajanlar kullanılmakta ve dünya genelinde hastalara yıllık yaklaşık 30 milyon doz gadolinyumlu kontrast ajan uygulanmaktadır (Rozenfeld, 2018). Pek çok ülkede yürütülen çalışmalarda insan kaynaklı gadolinyumun, atık su arıtma tesislerinden temiz su tahliyesi ile nehirlere, göllere, yeraltı sularına ve musluk suyuna ulaştığı rapor edilmiştir. Bu nedenle insan kaynaklı gadolinyum bazlı kontrast maddeler, aynı zamanda bir mikro tıbbi çevre kirleticisi haline gelmiştir (Bau, 2006; Kulaksız 2011, 2013; Perat, 2017).

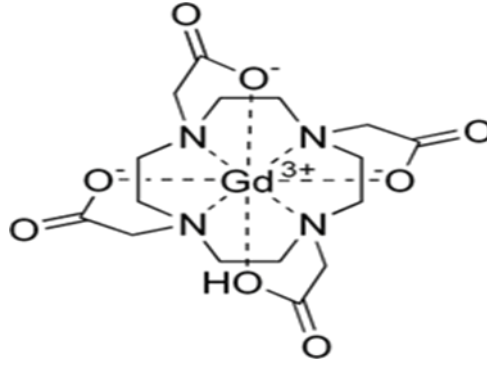
Bir görüntünün kontrastını artırmak için MRG'de çok fayda sağlayan gadolinyum (Gd) iyonunun yaşayan tüm organizmalar için toksik olduğu bilinmektedir (Parant, 2019). Gd'un toksisitesini etkisizleştirmek için Gd başka bir moleküle şelatlanır yani Gd'lu kontrast maddeler Gd iyonu içeren şelatlardır. Klinik tanı için önemli bir araç olan ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılan MRG'de kullanılan gadolinyum bazlı kontrast maddeler iki ana sınıfa ayrılır; makrosiklik kompleks ve lineer kompleks. (Perrat, 2017). Gadolinyumlu kontrast maddelerin stabilitesi hangi guruba dahil olduklarına göre değişmektedir. Lineer şelatlar Gd iyonuna güçlü bir şekilde bağlanmazlar oysa makrosiklik şelatlar Gd iyonuna daha sıkı bağlanırlar ve serbest Gd iyonu salınımına çok az eğilimlidirler (Morcos, 2008).

Kardeş kromatid değişimi (KKD), kimyasalların genotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesinde sıklıkla başvurulan DNA hasarının nitel ve nicel olarak belirlenmesinde çok faydalı hızlı ve hassas bir yöntemdir (Tucker,1996; Lialiaris, 2013). Hücre döngüsünün sentez evresinde meydana gelen KKD; normal hücrelerde meydana gelen spontan KKD'leri ve uyarılmış KKD'leri olarak 2 sınıfa ayrılır. DNA tamir inhibitörleri, mutajenler, X ışını, elektromanyetik alanlar ve kanser, kromozom kararsızlık sendromları gibi bazı hastalıklar KKD'yi uyaran faktörler arasındadır (Willson, 2007; Lialiaris, 2013).

Bu çalışmada ülkemizde ve dünyada MR görüntülemeye yaygın olarak kullanılmasından dolayı gadoterik asit (Dotarem®) (şekil 1) ile çalışıldı. Gadoterik asit bugüne kadar, dünya genelinde 79 ülkede kullanımı onaylanmış, Mart 2017'den bu yana Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından Avrupa'da da kullanımına izin verilen, iyonik makrosiklik ekstraselüler gadolinyum bazlı kontrast bir maddedir (Parant, 2019; FDA,2017). Literatürde gadoterik asidin insanlarda genotoksik ve sitotoksik etkilerine ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden bu çalışmada gadoterik asidin *in vitro* koşullarda KKD yöntemi ile insan periferik lenfositleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik potansiyelinin araştırılması amaçlandı. Genotoksisite için KKD/hücre, sitotoksisite için mitotik indeks (MI) parametreleri kullanıldı.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada KKD yöntemi kullanıldı. Kirsch-Volders et al. (2003)'e göre *in vitro* genotoksisite çalışmalarda %60 toksisitenin altında konsantrasyonlar çalışılmalıdır. Bu yüzden gönüllü sağlıklı iki donörden alınan periferik kan örnekleri gadoterik asidin (Dotarem®, Guarbet) ön denemelerle belirlenen %60 toksisitenin altında 4 farklı konsantrasyonu (1, 2.5, 5 ve 25 mM) ile 48 saat muamele edildi. Pozitif kontrol olarak; klastojenik bir ajan olduğu bilinen mitomisin C (MMC / 0.05 µg ml<sup>-1</sup>) kullanıldı. Negatif kontrollere bir ekleme yapılmadı. Çalışmanın etik kurul izini Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verildi (Etik kurul karar no: 2020-08).



Şekil 1. Gadoterik asidin kimyasal yapısı.

### Kimyasallar

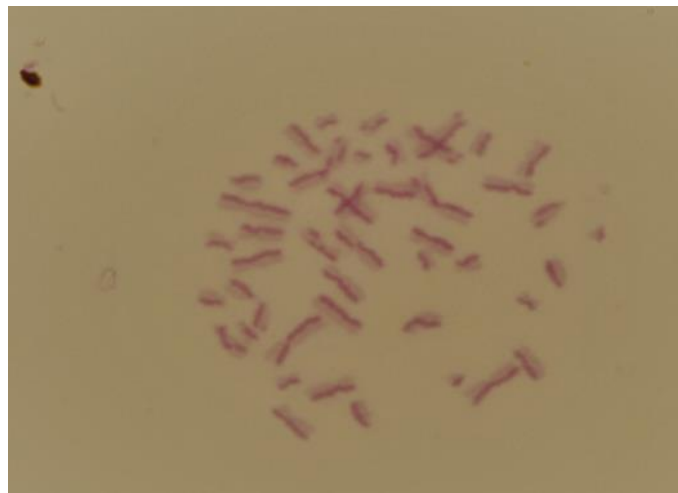
Çalışmada kullanılan kimyasallar şu firmalardan temin edildi; RPMI 1640, fetal calf serum, MMC, bromodeoksiürüdin (BrdU), sitokalasin B, kolsemid Sigma (USA); fitohemagultinin (PHA) Biological Industries (İsrail); metanol, asetik asit ve etanol Merck (Almanya).

### *In vitro* KKD Yöntemi

Hücre kültürü Moorhead (1960)'a göre yapıldı. Her deney iki tekrar olarak yapıldı. 4 ml RPMI 1640, 0.2 ml PHA, 1 ml serum'dan oluşan medyum karışımı hazırlandı. Bu karışıma 0.5 ml tam kan eklendi. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve tüm konsantrasyonlara kültürün başladığı anda BrdU ( $10\mu\text{g ml}^{-1}$ ) eklendi. Kültür tüpleri 72 saat boyunca  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildiler. Kültür başladıktan 24 saat sonra gadoterik asit 1, 2.5, 5 ve 25 mM konsantrasyonlarda kültürlerle eklendi. Hücreleri metafaz aşamasında durdurmak için 70. saatte kolsemid ( $0.3\mu\text{g ml}^{-1}$ ) eklendi ve 72. saatte kültür sonlandırıldı. Fiksasyon aşamasında hücreler önce hipotonik çözeltide ( $0.075\text{ M KCl}$ ) 5 dakika bekletilip santrifüj edildi. Üstteki dökelti atıldıktan sonra, hücreler 3 kez metanol / asetik asit karışımı ile yıkandı. En son lamlara damlatılan örnekler Perry ve Wollf (1974)'e göre Floresan artı Giemsa yöntemiyle boyandı.

### Mikroskopik İnceleme

Her konsantrasyon, negatif ve pozitif kontrol için iyi dağılmış 46 kromozomdan oluşan 25 M2 aşamasındaki metafaz ışık mikroskopunda  $100\times$  büyütmede değerlendirildi (Şekil 2). Toplamda her konsantrasyon, negatif ve pozitif kontrol için 100 metafaz (2 donör  $\times$  2 tekrar) değerlendirilerek hücre başına düşen ortalama KKD sayısı (KKD/hücre) belirlendi. MI'in belirlenmesi için 1000 hücre değerlendirildi ve 1000 hücre içinde kaç tane hücrenin metafaz aşamasında olduğu tespit edildi. MI hesaplaması şu formül ile yapıldı;  $MI=100 \times \text{metafazdaki hücre sayısı} / 1000$ .



Şekil 2. M2 aşamasında metafaz plağı

### İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler GraphPad Prism programı kullanılarak yapıldı. Çalışmadan elde edilen genotoksisite ve sitotoksisite verilerine Kruskal Wallis H testi ve daha sonra Dunn testi uygulandı. Elde edilen sonuçlar negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Çizelge1 gadoterik asidin KKD üzerine etkisini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar gadoterik asidin KKD değerini tüm konsantrasyonlarda arttırdığını ancak bu artışın yalnızca en yüksek konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi ( $p < 0.05$ ).

**Çizelge 1.** Gadoterik asidin KKD/hücre üzerine etkisi

Konsantrasyon	1. donör ortalama KKD/hücre	2. donör ortalama KKD/hücre	Ortalama KKD/hücre
Negatif kontrol	3.94	4.04	3.99
MMC (0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	21.25	19.1	20.18
1 mM	4.52	3.98	4.25
2.5 mM	4.49	4.13	4.31
5 mM	3.94	4.3	4.12
25 mM	4.5	4.76	4.63*

Kısaltmalar: MMC: mitomisin-C, KKD: kardeş kromatid değişimi, \* $p < 0.05$ .

Çizelge 2 gadoterik asidin MI üzerine etkisini göstermektedir. Sonuçlar gadoterik asidin MI üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi ( $p > 0.05$ ).

**Çizelge 2.** Gadoterik asidin MI üzerine etkisi

Konsantrasyon	1. donör MI	2. donör MI	Ortalama MI
Negatif kontrol	3	2.8	2.9
MMC (0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-	-	-
1 mM	4.1	2.9	3.5
2.5 mM	4	2.9	3.5
5 mM	3.9	2.5	3.2
25 mM	3.5	2.6	3.1

Kısaltmalar: MMC: mitomisin-C, MI: mitotik indeks.

Bu *in-vitro* çalışmada gadoterik asidin 4 farklı konsantrasyonu ile (1, 2.5, 5, 25 mM) 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD sıklığı ve MI negatif kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olup olmadığı araştırıldı. Sonuçlar, gadoterik asidin sadece en yüksek konsantrasyonda KKD/hücre değerini, negatif kontrol KKD/hücre değerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselttiğini ancak MI üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi.

Bilindiği kadarıyla, literatürde gadoterik asidin insan periferik lenfositleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik potansiyelinin araştırıldığı *in vitro* bir çalışma yok. Fakat, tıbbi görüntüleme için kullanılan çeşitli kontrast ajanların farklı hücre tipleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkileri ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar vardır. Bazı kontrast maddelerin (diatrizoate, ioxaglate, iopromide, iotrolan) insan vasküler endotel hücrelerinde apoptosisi uyardığı ve hücre proliferasyonunu inhibe ettikleri bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2000). Çeşitli radyokontrast maddelerin sitotoksisitesi ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada, kontrast maddelerin renal tübül hücreleri üzerinde de sitotoksik olduğu bildirilmiştir (Haller, 2004). Bu güncel çalışmaya da araştırma konusu olan gadoterik asidin sitotoksik etkisi zebrafish cell line'lar üzerinde MTT testi ile araştırılmış ve gadoterik asidin sitotoksik bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Parant, 2019). Parant ve ark (2019) elde ettikleri sonuç bu çalışmada insan periferik lenfositleri üzerinde elde edilen sonuç ile uyumludur. Literatürde yukarıda özetlenen sitotoksisite çalışmalarının yanı sıra farklı kontrast maddelerle farklı şekillerde dizayn edilmiş genotoksisite çalışmaları da vardır.

Gönüllü hastalardan kontrastlı MR görüntüleme öncesi ve sonrasında alınan periferik kan örneklerinde genetik hasarın karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda, kontrastlı MRG'nin genotoksik etkisi rapor edilmiştir (Fiechter, 2013; Azimi, 2017; Yıldız, 2011). Bazı çalışmalarda ise kontrastlı MRG'nin genotoksik etkiyi uyarmadığı rapor edilmiştir (Brand, 2015).

Bu güncel çalışmada, gadoterik asidin sitotoksik etkisini ölçmek için MI parametresi kullanıldı. Gadoterik asidin test edilen konsantrasyonların hiçbirinde MI değerinde bir düşüşe neden olmadığı görüldü. Bu durum gadoterik asidin sitotoksik bir potansiyelinin olmadığını göstermektedir. Gadoterik asidin genotoksik etkisini ölçmek için KKD parametresi kullanıldı. KKD hücre siklusunun sentez evresinde ve DNA replikasyonu sırasında meydana gelmektedir. KKD, bir kromozomun homolog lokusundaki kardeş kromatitler arasındaki DNA segmentlerinin karşılıklı fiziksel olarak yer değişimini temsil etmektedir (Willson, 2007). KKD'nin gadoterik asidin sadece en yüksek konsantrasyonu ile muameleye cevap olarak anlamlı derecede artmış olması gadoterik asidin zayıf genotoksik bir potansiyelinin olabileceğine işaret etmektedir. Gadolinium'un yaşayan tüm organizmalar için toksik bir iyon olduğu, hücre içi reaktif oksijen türlerini arttırdığı ve oksidatif stresi, apoptosisi uyardığı bilinmektedir (Xia, 2011, Parant, 2019). Aynı zamanda gadolinium bazlı kontrast maddelerin stabilitesinin lineer yada makrosiklik olmalarına göre farklılık gösterdiği ve gadoterik asit gibi iyonik makrosiklik gadolinium bazlı kontrast maddelerin vücutta serbest gadolinium iyonu salınımına en az eğilimli ilaçlar olduğu da bilinmektedir (Mocros, 2008). Bu çalışmada gadoterik asidin sitotoksik bir etkisinin olmamasının ve zayıf bir genotoksik potansiyelinin olabileceğinin gözlenmiş olmasının muhtemel nedeninin ortama serbest gadolinium iyonları bırakmaya az eğilimli bir grupta yer alması olduğu düşünülmektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak, gadoterik asidin sitotoksik bir etkisinin olmadığı, zayıf bir genotoksik potansiyelinin olabileceği tespit edildi. Ancak genotoksik ve sitotoksik etkilerinin farklı moleküler mekanizmalarla oluşan DNA hasarı indikatörü farklı tekniklerle de araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

## Çıkar Çatışması

Makaleye ait çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve makalenin yazılması aşamalarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanmasının, yürütülmesinin ve yazılmasının makale tek yazarı olarak tarafıma yapıldığı beyan ederim.

## KAYNAKLAR

- Azimi S, Mozdarani H, Mahmoudzadeh A, 2017. Induction of DNA Damage, Apoptosis and Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes Following Injection of Contrast Media in Patients with Abdominal CT Scan. *International Journal of Radiation Research*, 15(2): 149-155.
- Bau M, Knappe A, Dulski P, 2006. Anthropogenic Gadolinium as a Micropollutant in River Waters in Pennsylvania and in Lake Erie, Northeastern United States. *Chemie der Erde Geochemistry*, 66: 143-152.
- Brand M, Ellmann S, Sommer M, May M S, Eller A, Wuest W, Engert C, Achenbach S, Kuefner M A, Baeuerle T, Lell M, Uder M, 2015. Influence of Cardiac MR Imaging on DNA Double-Strand Breaks in Human Blood Lymphocytes. *Radiology*, 277(2): 406-412.
- FDA, 2017, <https://www.fda.gov/media/107506/download> (erişim tarihi:02.02.2021).
- Fiechter M, Stehli J, Fuchs T A, Dougoud S, Gaemperli O, Kaufmann P A, 2013. Impact of Cardiac Magnetic Resonance Imaging on Human Lymphocyte DNA Integrity. *European Heart Journal*, 34: 2340-2345.

- Haller C, Hizoh I, 2004. The Cytotoxicity of Iodinated Radiocontrast Agents on Renal Cells *In Vitro*. *Investigative Radiology*, 39(3): 149-154.
- Hill M A, 2018. Cardiac MR Imaging Genotoxicity. *European Heart Journal*, 39: 313–315.
- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate M, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surrallés J, Vanhauwaert A, Wakata A, 2003. Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Mutation Research*, 540: 153–163.
- Kulaksız S, Bau M, 2011. Anthropogenic Gadolinium as a Microcontaminant in Tap Water Used as Drinking Water in Urban Areas and Megacities. *Applied Geochemistry*, 26:1877–1885.
- Kulaksız S, Bau M, 2013. Anthropogenic Dissolved and Colloid/Nanoparticle-Bound Samarium, Lanthanum and Gadolinium in The Rhine River and The Impending Destruction of The Natural Rare Earth Element Distribution in Rivers. *Earth and Planetary Science Letters*, 362: 43–50.
- Lialiaris TS, 2013. Sister Chromatid Exchange, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840013711> (erişim tarihi: 02.02.2021).
- Moorhead P S, Nowell P C, Mellman W J, Battips D M, Hungerford D A, 1960. Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured From Human Peripheral Blood. *Experimental Cell Research*, 20: 613–616.
- Morcos S K, 2008. Extracellular Gadolinium Contrast Agents: Differences in Stability. *European Journal of Radiology*, 66:175–179.
- OECDilibrary, Magnetic resonance imaging (MRI) exams, [https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/magnetic-resonance-imaging-mri-exams-total-2014-1\\_mri-exam-total-table-2014-1-en](https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/magnetic-resonance-imaging-mri-exams-total-2014-1_mri-exam-total-table-2014-1-en) (erişim tarihi: 02.02.2021).
- Parant M, Sohm B, Flaya J, Perrat E, Chuburu F, Cadiou C, Rosin C, Cossu-Leguille C, 2019. Impact of Gadolinium-Based Contrast Agents on The Growth of Fish Cells Lines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182: 1-7.
- Perrat E, Parant M, Sebastien Py J, Rosin C, Leguille C C, 2017. Bioaccumulation of Gadolinium in Freshwater Bivalves. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:12405–12415.
- Perry P, Wolff S, 1974. New Giemsa Method For The Differential Staining of Sister Chromatids. *Nature*, 251: 156–158.
- Rozenfeld M N, Podberesky D J, 2018. Gadolinium-Based Contrast Agents in Children. *Pediatric Radiology*, 48:1188–1196.
- Simi S, Ballardina M, Casella M, De Marchi D, Hartwig V, Giovannetti G, Vanello N, Gabbriellini S, Landini L, Lombardi M, 2008. Is The Genotoxic Effect of Magnetic Resonance Negligible? Low Persistence of Micronucleus Frequency in Lymphocytes of Individuals After Cardiac Scan. *Mutation Research* 645: 39–43.
- Tucker J D, Preston R J, Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges, And Cancer Risk Assessment. *Mutation Research*, 365: 147–159.
- Wilson D M, Thompson L H, 2007. Molecular Mechanisms of Sister chromatid Exchange. *Mutation Research*, 616: 11–23.
- Xia Q, Feng X, Huang H, Du L, Yang X, 2011. Gadolinium-Induced Oxidative Stress Triggers Endoplasmic Reticulum Stress in Rat Cortical Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 117: 38-47.
- Yildiz S, Cece H, Kaya I, Celik H, Taskin A, Aksoy N, Kocyigit A, Eren M A, 2011. *Clinical Biochemistry*, 44: 975–979.
- Zhang H, Holt C M, Malik N, Shepherd L, Morcos K, 2000. Effects of Radiographic Contrast Media on Proliferation And Apoptosis of Human Vascular Endothelial Cells. *The British Journal of Radiology*, 73:1034-1041.