

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

KONTRAST MADDELERİN MUTAJENİK ETKİSİ

**T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arş. Gör. Hasan ACAR
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Aynur ACAR

KONYA - 1989

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
MATERYALLER VE METODLAR	13
A- IN VIVO ÇALIŞMALAR	13
1- İncelenen Olgular	13
2- Lenfosit Kültürlerinin Hazırlanması	14
3- Kromozom Preparasyonu	15
B- IN VITRO ÇALIŞMALAR	16
1- İncelenen Olgular	16
2- Lenfosit Kültürlerinin Hazırlanması	16
C- KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMLERİNİ GÖZLEME TEKNİKLERİ	17
D- KROMOZOMLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	18
BULGULAR	20
A- IN VIVO ÇALIŞMALAR	20
1- Serebral Anjiyografik Tetkikleri Yapılan Olguların KKD Değerleri	20
2- İki Yönlü Direk Kranium Grafisi Çekilen Olgularda KKD Değerleri	22
B- IN VITRO ÇALIŞMALAR	23
TARTIŞMA	27
ÖZET	35
İNGİLİZCE ÖZET	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	46
TEŞEKKÜR	47

GİRİŞ

Son yıllarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların mutajenik potansiyellerini belirleyebilmek amacıyla çeşitli mutajenite testleri geliştirilmiştir. Bu testlerden biri olan Kardeş Kromatid Değişimi-KKD-(Sister Chromatid Exchange-SCE-) kromozomlarda gözlenebilir sayısal ve yapısal anomaliler, oluşturmaya düşük dozdaki fiziksel ve kimyasal mutajenlerin etkilerini hassas bir şekilde ortaya koyabilmektedir. Bu nedenle KKD, DNA'daki hasarın en duyarlı göstergesi olarak son yıllarda güvenilir bir biçimde kullanılmaya başlanmıştır.

Fiziksel bir ajan olan X-ışınının radyolojik tetkiklerde kullanılmaya başlanılmasından sonra, birçok araştırmacı tarafından DNA üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. Kromozom inceleme metodları ile yapılan çalışmalarda, X-ışınının kromozom ve kromatid kırıklarını, gapleri, ring kromozom oluşumunu ve kromozomlar arasında yeniden düzenlenme gibi anomalileri uyandırdığı rapor edilmiştir. Ancak, KKD ile yapılan çalışmalarda ise X-ışınının KKD oranını etkilemediği yada çok az bir etkiye sahip olduğu bildi-

rılmış ve KKD oluş mekanizması ile kromozomal anomalilerin oluş mekanizmasının farklı olduğu vurgulanmıştır.

Bununla birlikte, X-ışını vücudun bazı bölgelerini teşhis etmede yeterli olamamış ve bu bölgelerin teşhisini kolaylaştırmak amacıyla çeşitli yapılarda kontrast maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeden sonra,olgular hem kontrast madde hem de X-ışınına aynı anda maruz kalmaya başlamışlardır. Bu olgularda;X-ışını ve kontrast madde uygulamasından sonra kromozom ve kromatid kırıkları,gapler,kromozom fragmentleri ve ring kromozomu gibi anomalilerin oluştuğu gözlenmiştir. Bu anomalilerin etkenini bulmak için in vivo ve in vitro çalışmalar düzenlenmiştir.

Kromozom inceleme metodları ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda; bazı araştırmacılar kontrast maddenin tek başına kromozom anomalilerinin oluşumunu uyaran bir ajan olmadığı,ancak X-ışını ile birlikte uygulandığında,ışığın fotoelektrik etkisi ile kromozom anomalilerini artırdığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte,kontrast maddelerin tek başına kromozom anomalilerini uyaran güçlü bir ajan olduğunu rapor eden araştırmacılar da mevcuttur.

Diğer bir mutajenite testi olan Mikronükleus testi ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda,kontrast maddelerin hem tek başına hem de X-ışını ile birlikte mikronükleus sıklığını artırdığı gösterilmiştir.

Radyolojik tetkiklerde çok sıklıkla kullanılan kontrast maddelerin,olgularda semptomatik belirtiler göstermemesi nedeniyle bu alandaki mutajenite çalışmaları sadece kromozom inceleme ve mikronükleus teknikleri ile sınırlı kalmıştır. Güvenilir bir mutajenite testi olarak kullanılan Kardeş Kromatid Değişimi ile herhangi bir detaylı çalışma yapılmamıştır.

Bu nedenle,son yıllarda geliştirilmiş olan ve radyolojik tetkiklerde sıklıkla kullanılan Iopromid'in in vivo ve in vitro olarak KKD üzerindeki etkilerinin saptanması ve bu konuda yapılan çalışmalara deneysel verilerle katkıda bulunulması amacıyla mevcut çalışma gerçekleştirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

1895 yılında X-ışını keşfedilmiş ve radyolojik tetkiklerde kullanım alanına girmiştir. Bundan kısa bir süre sonra, vücudun X-ışını ile opaklaştırılmayan bölgelerini opaklaştırmak amacıyla çeşitli kimyasal bileşikler kullanılmaya başlanmış ve dışarıdan verilen bu bileşiklere kontrast maddeler adı verilmiştir (4).

İlk olarak sindirim sisteminin opaklaştırılması ile ilgili denemelerden sonra 1923 yılında Berberich ve Hirsch isimli araştırmacılar damarların opaklaştırılması amacıyla Strontium Bromide'i, 1924 de Brooks isimli araştırmacı Sodium Iodide'i kontrast madde olarak kullanmışlardır. Bu araştırmacıların kullandıkları kontrast maddelerin vücutta pek çok yan etkileri ortaya çıkardığı gözlenmiştir. Nihayet, 1928 yılında Moses Swick isimli araştırmacı kuvvetli iodinize asit tuzlarının kontrast maddeler olarak kullanılabileceğini ve bu bileşiklerin suda çok iyi çözündüklerini ve toksik etkilerinin az olduğunu, böbrek yoluyla atıldıklarını göstermiş ve bu bulgu kontrast maddelerin gelişimi için önemli bir basamak teşkil etmiştir (4). Bu gelişmeden yola

çıkılarak iyonik ve non-iyonik, monomerik ve dimerik yapıda pek çok kontrast madde geliştirilmiştir. Geliştirilen bu kontrast maddelerden biri de bugün için geniş kullanım alanı olan, anjiyografik, urografik ve CT'ik tetkiklerde en iyi kontrastlılığı sağlayan, vücuda en az zarar veren, non-iyonik, monomerik yapıda, tri-iyotlu bir kontrast madde olan Iopromid'tir (23).

Geliştirilen çok sayıdaki bu kontrast bileşikler biyokimyacılar ve sitologlar tarafından hücrelerde yoğunluk ayırımı yapabilmek ve hücre komponentlerini inceleyebilmek amacıyla olduğu kadar radyolojik tetkiklerde de büyük ölçüde kullanılmaya başlanmıştır (8). Aynı dönemlerde radyolojide kullanılan X-ışınlarının genetik harabiyete neden olduğu gözlenmeye başlanmış (7,20) ve bu harabiyetin somatik hücre mutasyonlarını uyararak karsinogenezisde rol oynadığı vurgulanmıştır (7,9,20). Geçmişte birçok radyoloğun X-ışınlarının uyardığı neoplazmlar nedeni ile ölmüş olması bu görüşleri desteklemiştir. X-ışınlarının bu zararlı etkilerinin yanı sıra o dönemlerde geliştirilen ve bazı radyolojik tetkiklerde kullanılan kontrast maddelerin toksik etkilere sahip olduğu, karaciğer, dalak ve lenf bezlerinde tümör oluşumunu uyardığı bildirilmiştir (41).

Daha sonraları geliştirilen kontrast maddelerin toksik ve tümör uyarıcı etkileri ile ilişkili klinik ve semptomatik belirtiler gözlenmediğinden bu maddelerin mutajenik etkilerini araştırmaya yönelik çalışmalar sınırlı kalmıştır. 1964 yılında Al-

lium cepa'nın kök meristem hücre kromozomlarının incelenmesi ile kontrast maddelerin mutajenik etkileri hakkında ilk deneysel veriler elde edilmiştir (5). Daha sonraları memeli hücre kültürlerinden kromozom elde etme tekniklerinin geliştirilmesi ile memeli hücre kültürlerinde de kontrast maddelerin mutajenik etkileri çalışılmaya başlanmıştır. 1975 yılında Schmid ve arkadaşları (40) Chinese hamster hücre kültürlerinde kontrast maddeler ile yaptıkları çalışmalarda, kontrast maddenin (Judoron) mitoz bölünmenin farklı evrelerinde iğ ipliklerini etkileyerek mutajenik etki gösterebileceklerine ilişkin ilk bulguları elde etmişlerdir.

Bundan kısa bir süre sonra Adams ve arkadaşları (2) Renografin 76 kullanarak kardioanjiografi uygulanan çocuklarda anjiografiden sonra kromozom anomalilerinin arttığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar sağlıklı donörlerden hazırladıkları ve kontrast madde ilave ettikleri lenfosit kültürlerini X-ışınlarına maruz bıraktıklarında kromozom anomalilerinde önemli artışlar ortaya çıktığını göstermişlerdir.

Yine Nikula ve Kiviniitty (26) isimli araştırmacılar Metrizoate verilerek kardioanjiografi uygulanan çocukların lenfositlerinde anjiografiden sonra kromozom anomalilerinin arttığını göstermişlerdir. Ancak kullanılan kontrast madde konsantrasyonu ve maruz kalınan radyasyon süresi ile kromozom anomalilerinin sıklığı arasında önemli bir korelasyon saptayamamışlardır. Bu

araştırıcılar kontrast madde ilave ettikleri ve etmedikleri in vitro lenfosit kültürlerini düşük doz X-ışınına maruz bıraktıklarında kromozom anomalilerinin sıklığında önemli bir artış gözleyememişlerdir . Buna bağlı olarak,in vivo çalışmalarda gözlenen kromozom anomalisi artışlarının kontrast maddeden ziyade X-ışınlarının etkisi ile meydana gelmiş olabileceğini vurgulamışlardır.

Bu bulguların aksine, Norman ve arkadaşları (29) X-ışınına maruz kalmayan kültürlerde bile kontrast maddelerin periferal lenfositlerde kromozom anomalileri uyardığını bildirmişlerdir.

Ancak,Matsubara va arkadaşları (21) yaptıkları detaylı çalışmalarda Maglumine,Iothalamate verilerek serebral anjiografi uygulanan olgularda anjiografiden sonra kromozom anomalilerinin önemli derecede arttığını gözlemişlerdir. Bu artışın kontrast madde uygulamaksızın X-ışınına maruz bırakılan in vitro lenfosit kültürlerinde gözlenen değerlerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. In vitro olarak kontrast madde ile birlikte X-ışını uygulaması durumunda,kontrast madde konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak disentrik ve ring kromozomları sayısının arttığını ve bu artışın yalnızca radyasyona maruz bırakılan kültürlerden yaklaşık olarak 10 kat daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı araştırıcılar kontrast madde ilave ettikleri ancak X-ışınına maruz bırakmadıkları lenfosit kültürlerinde aynı kromozom düzensizliklerinde istatistiksel olarak önemli bir artış

gözleyemediklerini rapor etmişlerdir (21).

Benzer şekilde, Hadnagy ve arkadaşları (14) yaptıkları in vitro çalışmalarda kullanılan kontrast maddelerin (Urografin ve Hexabrix) tek başına kromozom anomalilerininin artışına neden olmadığını ancak kontrast maddenin X-ışınları ile birlikte uygulanması durumunda kromozom anomalilerinde önemli artışlar ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Buna karşılık, Wheeler, Norman ve arkadaşları (44) Ames Salmonella/mikrozom test sistemini kullanarak yaptıkları çalışmalarda kontrast maddenin (Renografın 76) kendisinin mutajenik etki göstermediğini ancak amin türevlerinden 3,5-diamin bileşiklerinin mutajenik olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar çalışmalarının diğer bir bölümünde kontrast madde (Renografın 76) uygulanan bireylerin idrarlarından elde ettikleri amin bileşiklerinin mutajenik potansiyelinin yüksek olduğunu tesbit etmişlerdir.

Kullanılan bu test sistemlerine ilave olarak " Mikronükleus" testi ile de kontrast maddelerin mutajenik etkileri incelenmiştir. Mikronükleus, DNA boyaları ile boyanabilen, sitoplazmada hücre çekirdeğinin yakınında yer alan, eritrosit çapının 1/5 - 1/20 si kadar bir çapa sahip ekstra nükleer bir parça yada mitotik bölünmede yavru hücre çekirdeğine dahil olamayan asentrik fragmentler olarak tanımlanmaktadır (13,34,39). Mikronükleus test sistemi kullanılarak yapılan çalışmalarda kontrast maddelerin mikronükleus sayısında önemli artışlara neden olduğu gösteril-

miştir (2,3,29).Parvez ve arkadaşları (33,34) iyonik ve non-iyonik kontrast maddeler kullanılarak yaptıkları geniş çaplı çalışmalarda X-ışınına maruz kalmayan in vitro lenfosit kültürlerinde hem iyonik hem de non-iyonik kontrast maddelerin mikronükleus oluşumunu uyardığını, aynı artışın anjiografi uygulamalarında kontrast madde ile birlikte X-ışınına maruz kalan olgularda da gözleendiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (35) rat kemik iliği ile yaptıkları in vivo çalışmalar sonucunda bu bulgularını destekleyen veriler elde etmişlerdir. Ayrıca kontrast maddelerin toksik kimyasal bileşikler olduğunu ve hücre seviyesinde harabiyetler oluşturduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (19,27,37).

Bununla birlikte, DNA daki harabiyetin en hassas göstergesi olarak son yıllarda geliştirilen ve duyarlı bir mutajenite testi olarak kabul edilen Kardeş Kromatid Değişimi inceleme yöntemleri ile kontrast maddelerin mutajenik etkilerini ortaya koymaya yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (21,24).

Kardeş Kromatid Değişimi, kromozom morfolojisi değişmeksizin kromatidler arasında özdeş segmentlerin simetrik değişimi sonucu ortaya çıkar (31). Çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle kromozom DNA sında meydana gelen ve replikasyon sırasında onarılamayan hatalar kardeş kromatid değişimlerinin ortaya çıkmasına yada sayıca artmasına neden olur. Bu nedenle, KKD mutajen ve kar-sinojenlerin oluşturduğu genetik harabiyetin hızlı, duyarlı ve

kantitatif ölçümler için son yıllarda çok yaygın ve güvenilir bir biçimde kullanılmaya başlanmıştır (10,31,38).

KKD ini ilk olarak Taylor (43) isimli araştırmacı bitki mitotik kromozomlarda yaptığı otoradyografik çalışmalarla gözlemeyi başarmıştır. Daha sonra, Zakharow ve Egolina (47) isimli araştırmacılar 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) kullanarak Chinese hamster hücrelerinde KKD lerini gözlemişlerdir. Buna göre; KKD oluşumunda Timin bazının analogu olan BrdU, replikasyon sırasında DNA'nın yapısına girmekte ve Timindeki metil grubunun yerini Brom (Br) atomunun alması ile DNA molekülünde bir seri fizikokimyasal değişiklikler ortaya çıkarmaktadır. Bu fizikokimyasal değişiklikler BrdU içeren DNA bölgelerinin Timin içeren DNA bölgelerinden daha farklı afinite ile DNA boyalarına cevap vermesi sonucunu doğurmaktadır (47). DNA'daki BrdU ile DNA boyaları arasındaki etkileşimin mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte kardeş kromatidlerdeki farklı boyanmayı gösteren çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (6,16,42). Bu boyama yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda BrdU mevcudiyetinde üretilen hücrelerde belirli KKD ortalaması bulunmasına karşın, aynı hücrelerde çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenlere cevap olarak yüksek oranda KKD gözlenmiştir (1,12,17,30). Bu bulgular, KKD inceleme tekniklerinin çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerin mutajenik potansiyellerini ölçmede güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bunun üzerine, KKD lerinin oluş mekanizmasını izaha yönelik çalışmalar genişletilmiştir. Mekanizması

kesin olarak açıklanmamış olmakla birlikte, KKD lerinin kromozomların duplike olmuş bölgeleri arasında genetik materyalin karşılıklı olarak değiş tokuşu esasına dayandığı ve KKD oluşumu için DNA nın dört zincirinde de değiş tokuşu mümkün kılacak kırılma ve yeniden birleşme olaylarının gerçekleşmesi gerektiği geniş ölçüde kabul edilmiştir (32,45).

Daha sonraları yapılan çalışmalarla KKD lerinin memeli hücrelerindeki, malign transformasyon ve mutasyon oranı ile ilişkili olabileceğini düşündüren kuvvetli deliller elde edilmiştir. Böylece KKD inceleme metodlarının ökaryotik kromozomlarda mutajen ve karsinojenlerin oluşturduğu genetik harabiyetin en hassas göstergesi olduğu inancı yaygın bir görüş halini almıştır (32,45).

Bu nedenle, çalışmamızda kontrast maddelerin mutajenik etkilerinin en hassas mutajenite testi olarak kabul edilen KKD inceleme tekniği ile araştırılması planlanmıştır. Bunun için Iopromid kullanılarak serebral anjiografik tetkikleri yapılan olgularda anjiografi uygulamasından önce ve sonra periferik kan lenfosit kültürleri hazırlanmış ve KKD oranları tesbit edilmiştir. Anjiografik tetkiklerde olgular kontrast madde ile birlikte X-ışınlarına da maruz kaldıklarından, X-ışınlarının KKD lerini uyarımadaki katkılarını gözleyebilmek amacıyla kontrast madde uygulanmadan önce ve sonraki KKD leri incelenmiş ve sonuçlar birbiri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, X-ışınlarının KKD lerini uyarma-

daki muhtemel etkilerinden sakınmak amacıyla in vitro lehfosit kültürlerinde çeşitli konsantrasyonlardaki kontrast maddenin (Iopromid) mutajenik etkileri KKD inceleme yöntemi ile araştırılmıştır.

Bu yolla, kontrast maddelerin mutajenik etkileri ile ilişkili hassas kantitatif değerler elde edilmesi, mutajenik etkileri gözlenmesi durumunda uyarılar getirilmesi ve bu konuda yapılan çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

MATERYALLER VE METODLAR

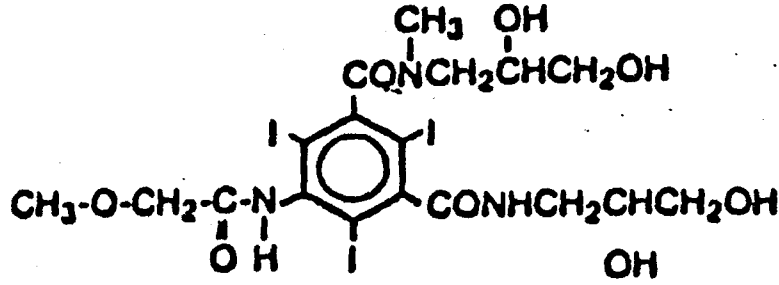
Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarında yapıldı. Kontrast madde olan Iopromid'in (Ultravist -300-Shering) mutajenik etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar in vivo ve in vitro olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi.

A- In Vivo Çalışmalar

1- İncelenen Olgular

Toplam 30 olgunun ele alındığı in vivo çalışmalar iki bölümde yapıldı.

In vivo çalışmaların ilk bölümünde Iopromid uygulaması ile ön-arka ve yan olmak üzere iki yönlü serebral anjiyografik tetkikleri yapılan, yaşları 24-57 arasında değişen, 10 erkek ve 5 kadından oluşan 15 olgu ele alındı. Olgulara anjiyografik uygulamalarda 25-40 ml Iopromid verildi. Iopromid'in kimyasal yapısı 5-Methoxy acetamino 2,4,6-triiodosophthalic acid (2,3-dihidroxy-N-methypropyl)-(2,3-dihidroxypropyl) diamine olup, triiodo-isophthlamid asitin bir türevidir (Şekil 1). Non-iyonik, monome-



Sekil 1 : Kontrast maddenin (Iopromid) halkasal yapısı

rik kimyasal özelliğe sahip bir kontrast madde olan bu bileşiğin molekül ağırlığı 791,ozmolalitesi 0.63 mol/kg.H₂O dur. Anjiografik tetkikler esnasında olgulara kontrast madde ile birlikte uygulanan X-ışını dozu 76 kW, 220 mA ve süresi 0.25-0.32 saniye arasında idi.

Anjiografik tetkiklerde kullanılan X-ışını dozunun kontrast maddenin mutajenik etkilerine muhtemel katkılarını ayırdedebilmek amacıyla in vivo çalışmaların ikinci bölümünde kontrast madde uygulamadan iki yönlü direk kranium grafileri çekilen 15 olgu ele alındı. Bu olgular 8 kadın,7 erkekten oluşuyordu ve yaşları 18-30 arasında idi. Olgulara uygulanan X-ışını dozu 45-55 kW ile 32-40 mA,kullanılan X-ışını süresi 0.28 saniye idi.

2- Lenfosit kültürlerinin hazırlanması

In vivo çalışmalara alınan 15 ine serebral anjiografi,15 ine iki yönlü direk kranium grafisi uygulanan toplam 30 olgunun an-

jiografi ve X-ışını uygulamalarından hemen önce ve uygulamalardan 1 saat sonra heparinlenmiş enjektör ile periferik kan örnekleri alındı. Alınan örnekler %20 fetal Calf Serumu (Gibco), %3 Phytohemagglutinin-M (Gibco) içeren 5 ml lik MC Coys 5 A (Gibco) besi ortamına siteril olarak ilave edildi ve 37 °C lik etüvde üremeye bırakıldı. Kültürlere Kardeş Kromatid Değişimini gözleyebilmek amacıyla kültür periyodunun ilk 24. saatinde 10 µg/ml 5Bromo-2-deoxyuridine (BrdU-Sigma) ilave edildi. Işığın fotolitik etkisinden korumak amacıyla aliminyum kağıtlara sarılan kültürler 72 saatlik kültür süresini tamamlamak üzere 37 °C lik etüve kaldırıldı. Üreme süresinin son iki saatinde her bir kültür ortamına mitozu durdurmak amacıyla 10 µg/ml Colcemid (Gibco) ilave edildi ve tekrar aliminyum kağıtlara sarılan kültürlerin 37 °C de üreme periyodunu tamamlaması sağlandı.

3- Kromozom preparasyonu

Kromozom preparasyonu için Moorhead ve arkadaşlarının tekniği bazı değişikliklerle uygulandı (22). 72 saatlik üreme periyodu tamamlandığı zaman kültürler konik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 1000 rpm'de 7' santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve süspanse edilen hücre kümesi üzerine 5 ml 0.075 M KCl (hipotonik) çözeltisi ilave edilerek 8', 37 °C lik etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda hücreler tekrar 1000 rpm'de 7' santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve dikkatle süspanse edilen hücre kümesi üzerine taze olarak hazırlanmış tesbit solusyonundan (3:1;Metanol:Asetik

asit- Merck) 5-6 ml ilave edilerek 1000 rpm de 7' santrifüj edildi. Tesbit solüsyonu ile yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Son santrifüjden sonra süpernatant atılarak elde edilen hücre kümesi üzerine birkaç damla taze hazırlanmış tesbit solusyonu ilave edildi. Süspanse edilen hücreler temiz ve kuru lamlara damlatıldı, havada kurutuldu ve kodlandı.

B- In Vitro Çalışmalar

1- İncelenen olgular

In vitro çalışmalarda, yaşları 17-19 arasında değişen 4 erkek ve 4 kadından oluşan toplam 8 olgu ele alındı. Sigara ve alkol gibi bilinen mutajenleri kullanma alışkanlığı olmayan sağlıklı bireyler arasından seçilen bu olguların, KKD düzeylerini etkileyebileceği düşünülen X-ışını, antibiyotik ve enfeksiyon gibi etkenlerle son birkaç ay içinde karşılaşmamış olmalarına özen gösterildi.

2- Lenfosit kültürlerinin hazırlanması

In vitro çalışmalarda donör olarak kullanılan 8 olgudan heparinlenmiş enjektör ile periferik kan örnekleri alındı. Elde edilen kan örnekleri in vivo çalışmalarda kullanılan oranlarla hazırlanmış kültür ortamlarına steril koşullarda ilave edildi. Her bir olgu için 4 ayrı kültür hazırlandı ve kültürler 37°C lik etüve kaldırıldı. 72 saatlik kültür süresinin ilk 24 saatinde herbir olgu için hazırlanmış olan 4 kültür ortamından 3 tanesine

0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml ve 0.20 mg/ml konsantrasyonlarda kontrast madde (Iopromid) ilave edildi. Kontrast madde ilave edilmeyen bir kültür, kontrol tüpü olarak değerlendirilmek üzere ayrıldı. Aynı anda tüm kültür ortamlarına KKD lerini gözleyebilmek amacıyla 10 µg/ml BrdU ilave edildi ve kültürler aliminyum kağıtlara sarılarak 72 saatlik kültür periyodunu tamamlamak üzere tekrar 37 °C lik etüve kaldırıldı.

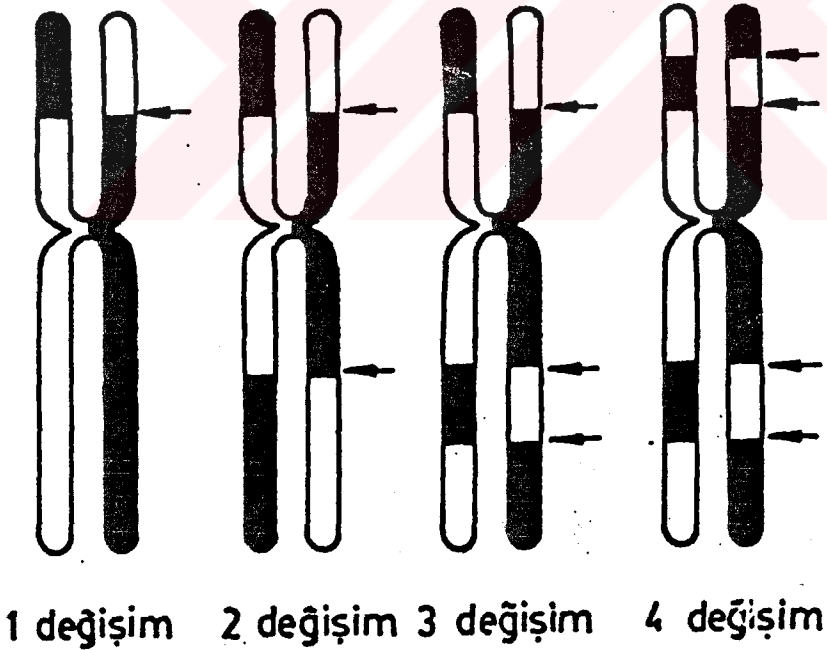
Bu şekilde hazırlanmış olan in vitro kültürlerden, in vivo kültürlerde kullanılan kromozom preparasyonu yöntemleri ile kromozomlar elde edilerek kodlandı ve boyamaya hazır hale getirildi.

C- Kardeş Kromatid Değişimlerini Gözleme Teknikleri

KKD lerini gözlemede Korenberg ve Freedlender'in (16) önerdikleri boyama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiliye 10 M NaOH (Merck) ilave edilerek pH'ı 8.00-8.10'a ayarlandı. Daha sonra çözelti su banyosuna yerleştirildi ve su banyosu sıcaklığının 88 °C ye gelmesi ve bu sıcaklıkta sabit kalması sağlandı. Kodlanarak 1-3 gün oda sıcaklığında bekletilen preparatlar 88 °C deki tuz solusyonuna daldırılarak 10' bekletildi. Bu süre sonunda hızla iki kez distile sudan geçirilen preparatlar 4-8 dakika % 5 lik Giemsa (Merck) solusyonu ile boyandı. Boyanan preparatlar hızla iki kez distile sudan geçirildi ve kurutuldu. Mikroskoptaki ilk incelemeleri takiben iyi boyanmış preparatlar Entellan (Merck) ile kapatıldı.

D- Kromozomların Değerlendirilmesi

In vivo ve in vitro çalışmalara dahil edilen tüm olguların boyalı preparatlarından herbir olgu için iyi dağılmış 20 metafazın kromozomları KKD oranlarını belirlemek üzere 100x lık objektif altında incelendi. İncelenen metafazlardaki kromozomlar boyları ve sentromer pozisyonları dikkate alınarak A_1 , A_2 , A_3 , B, C-X, D, E, F ve G-Y olmak üzere 9 grupta değerlendirildi. Her kromozom veya kromozom grubunda gözlenen değişimler Özkınay'ın(30) metoduna göre sayıldı (Şekil-2) ve özel olarak hazır-



Şekil 2 : KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler.

lanan formlara kaydedildi. Bu yolla, her metafazda gözlenen toplam değişim ve toplam 20 metafazda gözlenen ortalama değişim değeri hesaplandı. Hesaplamalar, serebral anjiyografik tetkiki yapı-

lan ve iki yönlü direk kranium grafileri çekilen olguların uygulamadan önce ve uygulamadan sonra elde edilen metafaz kromozomları için ayrı ayrı yapıldı. In vitro çalışmalarda her bireyin kontrol ve üç farklı konsantrasyonda kontrast madde içeren kültürlerinden elde edilen metafaz kromozomları da aynı şekilde değerlendirildi. Sonuçlar, Student's t testi ile karşılaştırıldı.



BULGULAR

Iopromid uygulanarak serebral anjiografik tetkikleri yapılan 15 olgunun ve iki yönlü direk kranium grafileri çekilen 15 olgunun ele alındığı in vivo çalışmalarda; ayrıca çeşitli konsantrasyonlarda Iopromid ilave edilerek hazırlanmış olan 8 in vitro lenfosit kültüründe gözlenen KKD leri ayrı ayrı değerlendirilerek bulguların istatistiksel olarak önem kontrolü yapılmıştır.

A- In Vivo Çalışmalar

1- Serebral anjiografik tetkikleri yapılan olguların KKD değerleri

Serebral anjiografi uygulanacak olan toplam 15 olgunun anjiografi uygulamasından önce hazırlanan lenfosit kültürlerinden elde edilen metafaz kromozomlarında toplam 2955 değişim gözlenmiş ve bir hücredeki ortalama KKD değerinin 9.72 ± 2.39 olduğu saptanmıştır. Olgularda gözlenen KKD dağılımınının 2-24 arasında değiştiği görülmüştür. Aynı olguların 25-40 ml arasında değişen konsantrasyonlarda Iopromid; 76 kW, 220 mA ve 0.25-0.32 saniyeler arasında değişen değerlerde X-ışını verilerek uygulanan anjiografik tetkiklerden bir saat sonra lenfosit kültürleri hazırlan-

mıştır. Bu kültürlerden elde edilen metafaz kromozomlarında ise, 15 olguda toplam 3621 değişim gözlenmiş, KKD dağılımının 3-27 arasında değiştiği ve bir hücredeki ortalama değişim değerinin 12.01 ± 2.07 olduğu ve bu değerinin anjiografik uygulamadan önce elde edilen ortalama değişim değeri olan 9.72 ± 2.39 dan istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$) (Şekil 3) (Tablo 1).



Şekil 3 : Kardeş kromatid değişimini gösteren bir metafaz örneği

Tablo 1 : Anjiografi çekilen olgularda anjiografi öncesi ve sonrası elde edilen MKD değerleri.

Yas, Cin. sayisi	Anjiografi öncesi		Anjiografi Sonrası		Değişim Sayisi	Dağılım	Ort.± S.H	Dağılım	Kontrast madde(ml)
	Ort.± S.H	Dağılım	Ort.± S.H	Dağılım					
1- 25E 172	8.60±2.19	5-17	9.45±1.96	3-17	189		9.45±1.96	3-17	25
2- 37E 162	8.10±1.31	5-16	10.05±1.11	7-15	201		10.05±1.11	7-15	30
3- 24E 137	6.85±1.39	3-14	8.50±0.74	5-11	170		8.50±0.74	5-11	30
4- 35E 170	8.50±0.65	4-14	10.50±2.76	6-20	218		10.50±2.76	6-20	25
5- 57K 153	7.65±2.18	4-13	10.25±2.68	5-19	205		10.25±2.68	5-19	25
6- 32E 211	10.55±2.68	5-17	11.45±1.61	6-18	239		11.45±1.61	6-18	30
7- 26E 210	10.05±1.00	6-15	11.85±1.46	8-18	237		11.85±1.46	8-18	40
8- 57K 171	8.55±2.60	4-15	11.60±1.42	9-18	232		11.60±1.42	9-18	25
9- 30E 254	12.10±1.90	6-18	16.10±2.49	11-23	322		16.10±2.49	11-23	35
10- 55E 196	8.90±2.46	4-18	11.20±2.67	7-20	224		11.20±2.67	7-20	32
11- 54K 195	9.75±5.88	2-20	11.45±2.24	7-18	229		11.45±2.24	7-18	30
12- 53K 243	12.15±2.54	8-17	16.05±3.99	10-23	321		16.05±3.99	10-23	40
13- 52K 262	13.10±4.61	7-24	15.75±1.83	10-20	315		15.75±1.83	10-20	40
14- 53E 250	12.50±2.53	7-21	15.75±3.15	10-27	315		15.75±3.15	10-27	35
15- 36E 169	8.45±2.05	4-16	10.20±1.02	7-15	204		10.20±1.02	7-15	35
Top:2955 Ort:	9.72±2.39	Dağ:2-24	Top:3621* Ort:12.01±2.07	Dağ:3-27					

X: 1 ml. çözelti içerisinde 0.623 mg Iopromid bulunmaktadır.

xx: P < 0.001

2- İki yönlü direk kranium grafisi çekilen olgularda KKD değerleri

Kontrast maddelerin mutajenik etkilerinin incelenmesi amacıyla ele alınan ve serebral anjiyografi uygulanan olgular kontrast madde İopromid'in yanısıra X-ışınlarına da maruz kalmışlardır. Bu nedenle, in vivo çalışmaların ikinci bölümünde X-ışınlarının KKD üzerine olan muhtemel etkilerini incelemek üzere kontrast madde verilmeksizin iki yönlü direk kranium grafisi çekilen 15 olgu ele alınmıştır. Bu olguların X-ışını uygulamasından önce ve sonra periferik kan kültürleri hazırlanmış ve elde edilen metafaz kromozomlarında KKD lerinin dağılımı incelenmiştir. Bu yolla, serebral anjiyografi uygulanan olgularda anjiyografi sonrası saptanan önemli derecedeki KKD artışına, kullanılan X-ışınlarının katkısı hakkında fikir edinilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmalarda ele alınan 15 olgunun incelenen metafaz kromozomlarında, X-ışını uygulamasından önce toplam 2534 değişim gözlenmiş, gözlenen değişimlerin bir hücredeki ortalamasının 8.44 ± 2.21 olduğu ve değişimlerin 2-19 arasında dağılım gösterdiği saptanmıştır. Aynı olguların 0.28 saniyede 45-55 kW ile 32-40 mA arasında değişen değerlerde X-ışınına maruz kalmasından bir saat sonra hazırlanan lenfosit kültüründen elde edilen metafaz kromozomlarında ise, toplam 2522 değişim gözlenmiştir. Gözlenen değişimlerin bir hücredeki ortalamasının 8.40 ± 1.50 olduğu ve değişimlerin 3-17 arasında dağılım gösterdiği saptanmıştır. X-ışınına maruz kalmadan önce (8.44 ± 2.21) ve sonra (8.40 ± 1.50) elde

edilen ortalama değişim değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($F > 0.05$) (Tablo 2).

B- In Vitro Çalışmalar

Serebral anjiografik tetkiklerde kullanılan Iopromid'in in vitro lenfosit kültürlerindeki mutajenik etkilerini incelemek amacıyla toplam 8 sağlıklı bireyden kan kültürleri hazırlanmıştır. Her birey için 4 ayrı kültür kullanılmış ve bu kültürlerden biri kontrol tüpü olarak ayrıldıktan sonra kalan üç tüpe sırası ile 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.20 mg/ml Iopromid ilave edilmiştir. Iopromid ilave edilmeyen kültürlerden elde edilen metafazlarda 1191 değişim gözlenmiş ve bir hücredeki ortalama değişim değerinin 7.49 ± 1.30 olduğu saptanmıştır. 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml, 0.20 mg/ml Iopromid ilave edilen kültürlerde ise, gözlenen toplam değişim değerlerinin sırasıyla 1331, 1359 ve 1469 olduğu, bu değişimlerin bir hücredeki ortalamalarının sırasıyla 8.31 ± 1.16 , 8.49 ± 1.43 ve 9.18 ± 1.23 olduğu tesbit edilmiştir (Tablo 3). Değerler birbiri ile karşılaştırıldığında 0.05 mg/ml Iopromid ilave edilen kültürlerdeki ortalama değişim değeri (8.31 ± 1.16) ile kontrol grubunun ortalama değişim değeri (7.49 ± 1.30) arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($F > 0.05$). Buna karşılık, 0.10 mg/ml Iopromid ilave edilen kültürlerdeki ortalama değişim değeri (8.49 ± 1.43) ile 0.20 mg/ml Iopromid ilave edilen kültürlerdeki ortalama değişim değerlerinin (9.18 ± 1.23) kontrol grubunun ortalama değişim değeri olan 7.49 ± 1.30

dan farklı anlam seviyelerinde olmakla birlikte önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla, $P < 0.05$ ve $P < 0.001$)(Tablo 3).



Tablo 2 : X-ray uygulanan olgularda X-ray öncesi ve sonrası elde edilen KKD degerleri

	<u>X-Ray</u>			<u>Öncesi</u>			<u>X-Ray</u>			<u>Sonrası</u>		
	<u>Yaş, Değişim</u> <u>Cin. sayısı</u>	<u>Ort.±</u> <u>S.H</u>	<u>Dağılım</u>	<u>Değişim</u> <u>Sayısı</u>	<u>Ort.±</u> <u>S.H</u>	<u>Dağılım</u>	<u>Değişim</u> <u>Sayısı</u>	<u>Ort.±</u> <u>S.H</u>	<u>Dağılım</u>			
1- 18K	171	8.55±2.07	2-13	163	8.15±1.32	4-13						
2- 22E	182	9.40±4.70	4-17	186	9.30±1.46	4-13						
3- 18K	178	8.90±6.04	5-17	159	7.95±0.82	4-11						
4- 19K	159	7.95±4.37	4-13	150	7.50±1.56	4-11						
5- 20K	202	10.10±2.72	4-19	181	9.05±1.54	6-15						
6- 30E	182	9.10±1.55	5-15	187	9.35±1.84	3-17						
7- 23K	169	8.45±1.02	4-13	185	9.25±1.92	3-14						
8- 25E	200	10.00±3.46	4-21	181	9.05±1.25	5-13						
9- 18K	191	9.55±2.01	4-17	182	9.10±1.26	5-13						
10- 18E	160	8.00±0.65	5-11	158	7.90±1.29	4-15						
11- 28E	142	7.10±0.84	3-10	151	7.55±1.54	3-14						
12- 20E	134	6.70±0.61	4-10	153	7.65±1.55	3-14						
13- 19K	155	7.75±0.21	3-12	161	8.05±1.58	4-12						
14- 23E	139	6.95±1.42	2-12	145	7.25±0.79	3-11						
15- 25K	170	8.50±1.56	4-14	180	9.00±2.80	4-16						
Top:2534		Ort:8.44±2.21	Dağ:2-19	Top:2522x	Ort:8.40±1.50	Dağ: 3-17						

x:F>0.05

Tablo 3 : Iopromid ilave edilen in vitro lenfosit kültürlerinde gözlenen KKD değerleri.

Yaş, Cin.	Kontrast madde (0 mg/ml)		Kontrast madde (0.05 mg/ml)		Kontrast madde (0.10 mg / ml)		Kontrast madde (0.20 mg /ml)	
	Değişim Sayısı	Ortalama ± St. Hata	Değişim Sayısı	Ortalama ± St. Hata	Değişim Sayısı	Ortalama ± St. Hata	Değişim Sayısı	Ortalama ± St. Hata
1- 19K	153	7.65 ± 1.18	170	8.50 ± 1.09	185	9.25 ± 4.19	191	9.55 ± 1.56
2- 18E	149	7.45 ± 0.74	166	8.30 ± 2.35	163	8.15 ± 0.35	197	9.85 ± 1.79
3- 17E	151	7.95 ± 1.07	158	7.90 ± 1.02	163	8.15 ± 1.63	168	8.40 ± 0.76
4- 19K	152	7.60 ± 1.79	160	8.00 ± 1.34	167	8.35 ± 0.87	170	8.50 ± 1.00
5- 19E	141	7.05 ± 1.40	162	8.10 ± 1.33	165	8.25 ± 1.10	179	8.95 ± 0.97
6- 18K	144	7.20 ± 1.35	175	8.75 ± 0.84	176	8.80 ± 1.14	199	9.95 ± 1.32
7- 19E	150	7.50 ± 1.75	165	8.25 ± 0.56	164	8.20 ± 0.88	179	8.95 ± 1.35
8- 18K	151	7.55 ± 1.14	175	8.75 ± 0.77	176	8.80 ± 1.30	186	9.30 ± 1.13
Top:1191 Ort:7.49±1.30			Top:1331* Ort:8.31±1.16		Top:1359** Ort:8.49 ±1.43		Top:1469*** Ort:9.18±1.23	

*: P>0.05

** : P<0.05

*** : P<0.001

TARTIŞMA

Radyolojide çeşitli vücut bölgelerindeki damarların belirginleştirilmesi amacıyla anjiografik tetkiklerde kullanılan, modern kontrast maddelerin vücutta gözlenebilir zararlı etkileri mevcut olmadığından bu maddeler ile ilgili çok fazla çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmalarda, kontrast madde kullanarak gerçekleştirilen anjiografik uygulamalarda, uygulama sonrası elde edilen lenfosit hücrelerinde kromozom anomalilerinin arttığı, bu artışın kromatid kırıkları ve gapler ile disentrik ve ring kromozom düzensizlikleri şeklinde olduğu gösterilmiştir (21,29). Ancak anjiografik uygulamalarda olgular kontrast maddenin yanısıra X-ışınına da maruz kalmakta ve X-ışınının tek başına kromozom kırıklarının ortaya çıkışını uyaran bir etken olduğu bilinmektedir (9,15,18,28). Bu nedenle, anjiografi uygulanan olgularda uygulamalardan sonra gözlenen artmış kromozom düzensizliklerinin kullanılan kontrast maddelere, maruz kalınan X-ışınına yada kontrast maddeler ile X-ışınının birlikte etkisiyle mi ortaya çıkmış olabileceği konusunda tartışmalar doğmuştur.

Bu tartışmalara açıklık getirecek nitelikteki çalışmalardan biri Nikula ve Kiviniitty (26) isimli araştırmacılar tarafından

gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar, kontrast madde ilave ettikleri ve etmedikleri lenfosit kültürlerini düşük dozda X-ışınına maruz bırakmışlar ve her iki durumda da hücrelerde kromozom anomalisi artışı gözleyememişlerdir. Bu bulgu, anjiyografik tetkiklerden sonra gözlenen kromozom anomalisi artışlarının, kullanılan kontrast maddenin etkisinden çok, maruz kalınan X-ışınının dozuna bağlı olarak ortaya çıktığı görüşünün gelişmesine neden olmuştur (26).

Benzer şekilde, Matsubara ve arkadaşları (21) düzenledikleri in vitro çalışmalarında, hazırladıkları periferik kan lenfosit kültürlerinin birinci serisini yalnızca kontrast maddelere, ikinci serisini yalnızca X-ışınına, üçüncü serisini kontrast madde ile X-ışınının birlikte etkisine maruz bırakmışlardır. Sonuçta, yalnızca X-ışınının etkisinde kalan lenfositlerde kromozom anomalilerinin artmış olduğunu gözlemişler ve X-ışınının kromozom kırıklarını uyaran bir ajan olduğunu öne süren görüşleri destekleyen bulgular elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar yalnızca kontrast maddenin etkisinde bırakılan hücrelerde kromozom anomalilerinin sayısında önemli artışlar ortaya çıkmadığını gözlemişlerdir. Bu bulgular ile kontrast maddelerin tek başlarına kromozom kırıklarını uyaran bir etken olduğunu öne süren Norman ve arkadaşlarının (29) bulgularını desteklemediklerini bildirmişlerdir. Çalışmalarının üçüncü serisinde ise kontrast maddeyle birlikte X-ışınına da maruz bırakılan hücrelerde, yalnızca X-ışınının etkisinde kalan hücrelerden 10 kat daha fazla kromozom

anomaliyi ortaya çıktığını gözlemişlerdir (21). Benzer şekilde, Hadnagy ve arkadaşları (14) kontrast maddelerin tek başına kromozom anomalilerini uyarmasa bile X-ışını ile beraber uygulandığında kromozom anomalilerinin arttığını bildirmişlerdir. Bu bulgulardan hareket ederek, anjiyografik uygulamalardan sonra gözlenen kromozom kırığı artışlarında X-ışını ile kontrast maddelerin birlikte etkileşiminin rol oynadığı sonucuna varmışlardır(14,21).

Kromozom kırıklarının uyarmada X-ışını ve kontrast maddelerin birlikte etkileşiminin mekanizması, kontrast maddelerde bulunan iyot atomunun fotoelektrik etkisiyle absorbe edilen X-ışını dozunun artmış olması ve buna bağlı olarak kromozomlarda da tek zincir kırıklarının oluşumunun uyarıldığı şeklinde izah edilmiştir (21). Benzer şekilde Norman ve arkadaşları (29) kontrast madde ve X-ışınının birlikte kullanılması durumunda lenfositlerde gözlenen kromozom kırığı sayısının artmış olduğunu bildirmişler ve bu artışın Matsubara ve arkadaşlarının (21) öne sürdüğü mekanizmaya benzer bir mekanizma ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Yine Nelson ve arkadaşları (25) iyot içeren kontrast maddelerin X-ışınının zararlı etkilerinin artmasında rol oynadığını bildiren bulgular yayınlamışlardır.

Diğer yandan, kontrast maddelerin mikronükleus oluşumunu uyarmadaki etkilerinin ele alındığı Parvez ve arkadaşlarının (33,34,35) çalışmalarında, X-ışınına maruz bırakılmadan yalnızca

kontrast madde ilave edilen lenfosit kültürlerinde mikronükleus sayısının artmış olduğu bildirilmiştir. Kontrast maddelerin tek başlarına mikronükleus oluşumunu uyardığını gösteren bu çalışmanın sonuçları, kontrast maddelerin kromozom kırıklarını uyardığını bildiren çalışmalar ile uyumsuz gibi görülmektedir. Ancak, mikronükleusların oluş mekanizmasının kromozom anomalilerinin oluş mekanizmasından farklı olduğu vurgulanmıştır. Kesin olarak gösterilmemiş olmakla birlikte, mikronükleus oluşumunda kontrast maddelerin iğ iplikcikleri üzerine etki ederek bazı kromozomların iğ iplikciklerine tutunmasına engel olduğu ve kutuplara çekilemeyen bu kromozomların mikronükleuslar şeklinde gözlendiği bildirilmiştir(33,46). Bu durumda, sitogenetik bir etkiden ziyade sitotoksik bir etki ile mikronükleusların oluştuğu kabul edilmiş ve kontrast maddelerin sitogenetik etkilerini ortaya koyacak KKD gibi daha hassas test sistemlerinin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (33). Ancak literatür taramalarında bu konu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu sonuçlardan hareketle, çalışmamızda, DNA daki harabiyetin en duyarlı göstergesi olarak kabul edilen KKD inceleme yöntemleri kullanılarak kontrast maddelerin genetik materyal üzerine olan mutajenik etkileri araştırılmıştır. Çalışmalarımızda in vivo ve in vitro yöntemler kullanılmıştır. In vivo çalışmalarımızın birinci bölümünde kontrast madde olarak Iopromid kullanarak serebral anjiyografik tetkikleri yapılan olgular ele alınmıştır. Bu olgularda, anjiyografi sonrası gözlenen KKD değerlerinin anjiyografi

öncesi KKD değerlerinden önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$). Ancak kontrast madde kullanılarak anjiyografik tetkikleri yapılan olgularda KKD düzeylerini inceleyen çalışmalara literatürde rastlanmadığı için bu bulgularımızın literatür ışığında tartışması yapılamamıştır. Anjiyografi sonrası gözlenen bu KKD artışına, olguların maruz kaldığı X-ışını dozunun etki edip etmediğini gözlemek amacıyla kontrast madde kullanılmadan iki yönlü direk kranium grafilere çekilen olguların ele alındığı ikinci seri in vivo çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda X-ışını uygulamasından önce ve X-ışını uygulamasından sonra gözlenen KKD değerleri arasında anlamlı değişiklikler mevcut olmadığı gözlenmiştir ($P > 0.05$). Bu durum X-ışınının tek başına kromozom kırıklarının uyardığını bildiren çalışmaların sonuçları ile uyumsuz gibi görünmektedir. Ancak, kromozom kırıklarının uyaran bir etken olan X-ışınının KKD lerini uyarmada etkisiz yada çok az etkili olduğunu bildiren ve bu durumu kromozom kırıklarının oluş mekanizması ile KKD lerinin oluş mekanizmasının farklı olmasına bağlayan çalışma sonuçları ile uyumludur (11,12,32). Bunun sonucunda X-ışınının KKD lerinin kromozom kırıklarından farklı bir mekanizma ile ortaya çıktığı görüşü benimsenmiştir.

Bu değerlendirmelerden sonra serebral anjiyografi tetkikleri yapılan olgularda anjiyografiden sonra gözlenen KKD artışının, kontrast maddenin mutajenik etkisi ile yada kontrast madde ile X-ışınının birlikte etkileşimi sonucu ortaya çıkmış olabileceği ihtimalleri üzerinde durulmuştur. Bu ihtimalleri incelemek ama-

ciyla düzenelenen in vitro çalışmalarımızda kontrast maddelerin tek başına mutajenik etki gösterip göstermeyeceği araştırılmıştır. Bu amaçla üç farklı konsantrasyonda Iopromid ilave edilen lenfosit kültürlerinde KKD oranları incelenmiş ve elde edilen veriler Iopromid ilave edilmeyen kontrol grubundan elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Sonuçta 0.05 mg/ml Iopromid ilave edilen kültürlerden elde edilen lenfositlerde kontrol grubuna göre önemli bir KKD artışı gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Ancak, 0.10 mg/ml ve 0.20 mg/ml Iopromid ilave edilen kültürlerden elde edilen lenfositlerde gözlenen KKD oranının kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla, $P < 0.05$, $P < 0.001$). In vitro çalışmalardan elde ettiğimiz bu bulgular Matsubara ve arkadaşlarının (21) kontrast madde olarak Meglumine, totalamete kullanıldığında insan lenfositlerinde KKD lerinin uyarıldığını bildiren çalışmalarının sonuçları ile uyumludur.

In vivo ve in vitro çalışmalarımızdan elde edilen bulgular, birlikte değerlendirildiğinde, serebral anjiyografi uygulanan olgularda anjiyografiden sonra gözlenen KKD artışının maruz kalınan X-ışınının etkisinden çok kontrast maddenin kendisinin veya kontrast maddenin metabolik ürünlerinin mutajenik etkileri sonucunda ortaya çıkmış olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuca götüren deneysel veriler, yalnızca X-ışınına maruz kalan olgularda X-ışınının uygulamasından sonra KKD değerlerinde artış gözlenmemesi, buna karşın yalnızca kontrast maddeye maruz bırakılan lenfosit kültürlerinde kontrast madde ilavesine bağlı olarak KKD oranlarında önemli artışlar gözlenmesi şeklindedir (Tablo 4).

Tablo 4 : Serebral anjiografi, X-ray uygulaması öncesi ve sonrası elde edilen ortalama KKD değerleri ile Iopromid ilave edilen in vitro lenfosit kültüründe gözlenen ortalama KKD değerleri.

A- IN VIVO

<u>Gruplar</u>	<u>Grupların Ortalama KKD Değerleri</u>	<u>Önem Kontrolü</u>
Anjiografi öncesi- Sonrası (15 olgu)	9.72±2.39 - 12.01±2.07	önemli (P<0.001)
X-Ray öncesi-Sonra- sı (15 olgu)	8.44±2.21 - 8.40±1.50	önemsiz (P>0.05)

B- IN VITRO

<u>Kontrast madde (mg/ml)</u>	<u>Ort.Değişim/Hücre ± Standart Hata</u>	<u>Önem Kontrolü</u>
0-0.05	7.49±1.30 - 8.31±1.16	önemsiz (P>0.05)
0-0.10	7.49±1.30 - 8.49±1.43	önemli (P<0.05)
0-0.20	7.49±1.30 - 9.18±1.23	önemli (P<0.001)

Çalışmalarımın sonucunda; anjiografi uygulanan olgularda anjiografiden sonra gözlenen önemli derecedeki KKD artışının kontrast maddenin X-ışını ile etkileşimine bağlı olup olmadığını izah edecek kesin deneysel veriler elde edilememiştir. Bu nedenle, anjiografi sonrası gözlenen KKD artışının kromozom kırıklarını uyardığı gibi, kontrast maddelerin X-ışını ile etkileşimine bağlı olarak da ortaya çıkabileceği olasılığının gözönünde tutulması gerektiği görüşüne varılmıştır. Ancak literatürde böyle bir etkileşimin mekanizmasını açıklığa kavuşturacak herhangi bir hipoteze rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, bulgularımızın ışığında kromozom anomalisi artışlarında çok az etkili veya etkisiz olduğu bildirilen kontrast maddelerin KKD lerini uyaran güçlü bir ajan olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonucun, genetik harabiyeti göstermede kromozom kırıklarından çok daha hassas bir test sistemi olan KKD lerini inceleme yöntemleri ile elde edilmiş olması kontrast maddelerin tek başlarına etkin mutajenler olduğunu güvenilir bir biçimde öne sürülebilmesini sağlamıştır.

Serebral anjiyografik uygulamalardan sonra gözlenen KKD artışının, mutajenik bir ajan olarak kabul edilen kontrast maddenin direk etkisi ile ortaya çıkmış olabileceği gibi X-ışınının da dolaylı olarak kontrast maddenin mutajenik etkilerini artırarak KKD oluşumunu uyarabileceği düşünülmüştür. Bu durumda, mekanizması kesin olarak açıklanmamış olmakla birlikte, anjiyografi uygulamalarında olguların genetik harabiyete neden olan mutajenik ajanlar ile karşı karşıya bırakıldıklarının unutulmaması; uygulamalarda endikasyon sınırlarının ve kullanılan kontrast madde miktarının iyi tesbit edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Araştırmamızda, radyolojik tetkiklerde çok sıklıkla kullanılan Iopromid'in (Ult ravisit -300) Kardeş Kromatid Değişimi üzerine olan in vivo ve in vitro etkileri incelenmiştir.

In vivo çalışmalarda, Iopromid kullanılarak serebral anjiografi uygulanan 15 olgunun anjiografi uygulamasından sonra elde edilen ortalama KKD değeri 12.01 ± 2.07 olarak bulunmuş ve bu değer anjiografi uygulamasından önce elde edilen değerden (9.72 ± 2.39) istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($P < 0.001$).

Anjiografi uygulamalarında gözlenen KKD artışına X-ışınının katkısını belirleyebilmek amacıyla gerçekleştirilen in vivo çalışmaların ikinci bölümünde, iki yönlü direk kranium grafisi çekilen 15 olguda X-ışını uygulamasından önce ve sonra gözlenen ortalama KKD değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık mevcut olmadığı gözlenmiştir (Sırasıyla, ortalama $KKD = 8.44 \pm 2.21$, 8.40 ± 1.50 , $P > 0.05$).

Çalışmamızda, serebral anjiografik tetkiklerde kontrast madde olarak kullanılan Iopromid'in çeşitli konsantrasyonlarının

in vitro lenfosit kültürlerinde KKD oranı üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Sonuçta; 0.05 mg/ml Iopromid uygulanan in vitro lenfosit kültürlerinde gözlenen ortalama KKD değerinin 8.31 ± 1.16 olduğu ve bu değer ile Iopromid ilave edilmeyen kontrol kültürlerinde gözlenen değişim değerleri (7.49 ± 1.30) arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur ($P > 0.05$). Buna karşın, 0.10 mg/ml ve 0.20 mg/ml Iopromid ilave edilen in vitro kültürlerde gözlenen değişimlerin sıra ile, 8.49 ± 1.43 ve 9.18 ± 1.23 olduğu ve bu değerlerin kontrol grubunun ortalama KKD değeri olan 7.49 ± 1.30 dan farklı anlam seviyelerinde olmakla birlikte istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$ ve $P < 0.001$). Bulguların ışığında, kontrast madenin mutajenik etkileri ve bu etkilerin muhtemel mekanizmaları tartışılmıştır.

SUMMARY

Iopromid (Ultravist-300) is commonly used X-ray contrast media. In vivo and in vitro studies have been carried out to find the effect of Iopromid on Sister Chromatid Exchange (SCE) values.

In vivo investigations revealed that the mean SCE value (12.01 ± 2.07) after 15 cases found to be statistically significant ($F < 0.001$) than the value (9.72 ± 2.39) obtained before injection of the radiological contrast medium for cerebral angiography.

The significant difference found in the mean SCE values were studied further to elucidate the contribution of X-ray radiation and later it was found that the contribution of X-ray radiation alone on the mean SCE values was insignificant ($P > 0.05$) (the mean SCE values found to be 8.44 ± 2.21 and 8.40 ± 1.50 , respectively before and after the X-ray radiation without contrast medium).

In our study, it is also included the SCE values of in vitro lymphocyte cultures due to varying concentration of Iopromid.

Low concentration of Iopromid (0.05 mg/ ml) did not enhance the SCE values significantly (8.31 ± 1.16 versus to 7.49 ± 1.30) in in vitro lymphocyte cultures ($P > 0.05$). In contrast to low concentration of Iopromid, higher concentrations 0.10 mg/ ml and 0.20 mg/ ml resulted 8.49 ± 1.43 and 9.80 ± 1.23 SCE values respectively, and this differed significantly than the mean value of 7.49 ± 1.30 ($P < 0.05$ and $F < 0.001$).

Additionally, with respect to SCE values obtained above, the possible mechanism for the mutagenicity of radiologic contrast medium is discussed in this study.

KAYNAKLAR

1- Acar,A.,Lüleci,G.(1989).Increased incidence of SCE among workers in a ferrochromium factory.Hacettepe Med. Jour. Vol.22,No.3,july 1989 da yayınlanmak üzere kabul edilmiştir.

2- Adams,F.H.,Norman,A., Mello,R.S. and Bass,D.(1977).Effect of radiation and contrast media on chromosomes: Preliminary report Radiology,124:823-826.

3- Adams,F.H.,Norman,A., Bass,D. and Oku,G.(1978).Chromosome damage in infants and children after cardiac catheterization and angiocardiology. Pediatrics,Vol.62,No.3:312-316.

4- Aytac,S.,Sanlıdilek,U.,Berk,U., Akyar,S. (1987).iyonik ve non-iyonik röntgen kontrast maddeler: GATA Bülteni,29:441-449.

5- Bauchinger,M.(1964).Untersuchungen über die cytogenetische Wirkung von Wasserlöslichen Röntgenkontrastmitteln Z.Zellforschung,63:506-537.

6- Becher,R.,Sondberg,A.A.(1982). Rapid method for Giemsa staining of sister cromatids.Cancer Genet Cytogenet.,7:223-225.

7- Bloom,A.D. and Tijo,J.H.(1964). In vivo effects of diagnostic X-irradiation on human chromosomes. The New England Journal of Medicine, 270,(25):1341-44.

8- Boyle,J.A., Seegmiller,J.E.(1971). Preparation and processing of small samples of human material."Methods in Enzmology XXII". Ed. W.B.Jokoby. 154-160,Academic Press,New York.

9- Bushan, S.C. (1976). Pregnancy in diagnostic radiology: Radiation control procedures. *Appl. Radiol.*, 5:63-68.

10- Carrano, A. V., Thomson, L. H., Lindl, P. H. and Minkler, J.L. (1978). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*, vol. 271:551-553

11- Galloway, S.M. (1977). Ataxia telangiectasia: The effects of chemical mutagen and X ray on SCE in blood lymphocytes. *Mutation Res.*, 45:323-349.

12- Gebhard, A. (1981). SCE and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genet.*, 58:235-254.

13- Heddle, J.A., Benz, R.D., Countryman, P.I. (1978). Measurement of chromosomal breakage in cultured cell by the micronuclei technique. "Mutagen-induced chromosome damage in man". Ed. H.J. Evans, D. Lloyd. 191-200, Yale University press, New Haven.

14- Hadnagy, W., Stephan, G. and Kossel, F. (1982). Enhanced yield of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro using contrast media in X - irradiation. *Mutation Res.*, 104:249-254.

15- Kano, Y., and Little, J.B. (1984). Persistence of X-ray induced chromosomal rearrangements in long-term cultures of human diploid fibroblasts. *Cancer Research*, 44:3706-3711.

16- Korenberg, J.R., Freedlender, B.I. (1974). Giemsa technique for the detection of SCEs. *Chromosoma (Berl.)* 48:3706-3711.

17- Kram, D., Schneider, B.L., Senula, C.C., Nakanishi, Y. (1979). Spontaneous and mitomycin C induced SCEs. Comparison of in vivo and in vitro systems. *Mutation Res.*, 60:339-347.

18- Kucerova, M., Polivkova, Z., Hradcova, L. (1976). Influence of diagnostic roentgen doses on human chromosomes and influence of age on the aberration yield. *Acta Radiologica Therapy Physics Biology.*, 15:91-96.

19- Laerum, F. (1983). Acute damage to human endothelial cells by brief exposure to contrast media in vitro. *Radiology*, 147:681-684.

20- Little, J.B. (1966). Environmental hazards: Ionizing radiation. *N. Eng. J. Med.*, 275: 329-338.

21- Matsubara, S., Suzuki, S., Suzuki, H., Kowabara, Y. and Okano, T. (1982). Effects of contrast medium on radiation - induced chromosome aberration. *Radiology*, 144: 295- 301.

22- Moorhead, P.S. and Nowel, P.C., Mellman, W.J. (1961). Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20:613-616.

23- Mutzel, W. (1987). Preclinical evaluation of Ultravist a new non-ionic contrast medium. In "Contrast media from the past to the future". Ed. F. Felix. 33-40, New York.

24- Nelson, J.A. (1984). Are contrast media mutagenic? In "Radiocontrast agents". Ed. M. Sovak. 533-542, New York.

25- Nelson, J.A., Wallen, C.A. and Livingston, G. (1984). Iodinated contrast enhanced radiation effects. *Invest. Radiol.*, 19: S 104.

26- Nikula, E., and Kiviniitty, K. (1987). Cytogenetic effects of cardioangiography on blood lymphocytes in children and in vitro effects of contrast medium and low dose radiation. *Acta. Oncologica*, 26:69-74.

27- Nordby, A., Halgunset, J. and Haugen, O.A. (1986). Effects of contrast media on monolayer cell culture. *Invest Radiol.*, 21: 234-239.

28- Nordenson, I., Beckman, G. and Lemperg, R. (1980). Chromosomal aberrations in children exposed to the diagnostic X-ray. *Hereditas*, 93: 177-182.

29- Norman, A., Adam, F.H. and Riley, R.F. (1978). Cytogenetic

effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivatives in human lymphocytes. *Radiology*,129: 199-203.

30- Özkınay,C.(1982). Kromozomlarda kardeş kromatid değişimini etkileyen dış kaynaklar ve DNA onarımı. E.Üniv. Tıp Fak. Dergisi,Cilt 21, Sayı 1: 15-18.

31- Özkınay,C.(1982). Kromozomlarda kardeş kromatid değişimi..Üniv.Tıp FFak. Dergisi,Cilt 21, Sayı 1 : 1-4.

32- Painter,R.B.(1980). A replication model for sister chromatid exchange. *Mutation Res.*, 70: 332-341.

33- Parvez,Z.,Kormano,M.,Moncado,R. and Eklund,R. (1986). Contrast media-induced chromosomal damage in human lymphocyte culture.*Invest. Radiol.*,21: 864-870.

34- Parvez,Z., Kormano,M., Satokari,K., Moncada,R., and Eklund,R.(1987). Induction of mitotic micronuclei by X-ray contrast media in human peripheral lymphocytes. *Mutation Res.*,188: 233-239.

35- Parvez,Z.,Moncada,R.,and Gragasın,M. (1988). Cytogenetic interation of contrast media and antineoplastic drugs. *Invest. Radiol.*,23:389-393.

36- Pery,P.,Evans,H.J.(1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*,258: 121-125.

37- Reininko,R. (1979). Role of hypertonicity in the endothelial injury caused by angiographic contrast media. *Acta.Radiologica Diagnosis*, 20: 410-416.

38- Sasaki,M.S.(1977).Sister chromotid exchange and chromatid interchange as possible manifestation of different DNA repair progress. *Nature*,269: 623-625.

39- Schmid,W.(1975). The micronucleus test. *Mutation Res.*, 31: 9-15.

40- Schmid,E. and Bauchinger,M. (1976). The cytogenetic effects an X-ray contrast medium in Chinese hamster cell cultures. *Mutation Res.*,344: 291-298.

41- Symposium on distribution, retention and lake effects of thoriumdioxide. (1967). *Ann.N.Y. Acad. Sci.*:145.

42- Takoyama,S.,Sakonishi,S.(1979). Sister Chromattid differential staining by direct staining in NaH PO₄-Giemsa solution and the mechanism involved. *Chromosoma (Berl.)*, 75: 37-44.

43- Taylor,J.H.(1958). Sister chromatid exchange in tritium labeled chromosomes. *Genetics*, 43:515-529.

44- Wheeler,L.A., Norman,A. and Riley,R. (1980). Mutagenicity of diatrizoate and other triiodobenzoic acid derivatives in Ames Salmonella /microsome test. Proc. West. Pharmacol.,23: 249-253.

45- Wolff,S.(1979). Sister chromatid exchange: the most sensitive mammalian system for determining the effects of mutagenic carcinogens. "Genetic damage in many caused by environmental agent". Ed. K.Berg, Academic, New York.

46- Woolverton,C.J.,Fotos.P.G,Mokas,J.,Mermigas,M.E. (1986). Evaluation of eugenol for mutagenicity by the mouse micronucleus test. J.Oral. Pathol.,15: 450-453.

47- Zaharov, A.F., Egolina,N.A.(1972).Differential spirali-
zation a long mammalian mitotic chromosomes
1- BrdU revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes.
Chromosoma (Berl.), 38: 241-265.

ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Banaz'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Banaz'da tamamladım. 1981 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim. 1986 yılında bu fakülteden mezun oldum. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım ve ilgilerini esirgemyen sayın hocam ve tez yöneticim Yrd.Doç.Dr.Aynur ACAR'a, çalışmalarım sırasında gereken kolaylıkları sağlayan anabilim dalımız başkanı sayın hocam Prof.Dr. Ferhan PAYDAK'a ve çalışmalarım sırasında emeği geçen sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Sennur DEMIREL'e teşekkür ederim.

Olguların temin edilmesinde gereken ilgiyi gösteren Nöroşirürji Anabilim dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Osman ACAR'a ve Araştırma Görevlisi Dr.Erdal KALKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.