

CLASTOGENIC FACTORS AS BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS AFTER RADIATION EXPOSURE

КЛАСТОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ ОКСИДАНТНОГО СТРЕССА ВСЛЕДСТВИЕ ОБЛУЧЕНИЯ

I. Emerit

Institut Santé et Développement, Université Pierre & Marie Curie
15–21, rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France.
tel./fax: 01 432 99 939

И. Эмери

Институт здравоохранения и развития, Университет им. Пьера и Марии Кюри, Париж, Франция
тел./факс: 01 432 99 939

Abstract

Clastogenic i.e. chromosome damaging substances are present in the plasma of persons with a variety of pathological conditions accompanied by oxidative stress. The clastogenic activity of plasma from more than 300 Chernobyl accident recovery workers and more than 300 children exposed after the catastrophe have been studied with this test by our laboratory between 1994 and 1999. The mean value for clastogenic scores was $6.2 \pm 4.8\%$ for 89 Armenian liquidators and 8.2 ± 4.5 for 237 Russian liquidators ($P < 0.001$ compared to controls). The frequency of CF-positive samples ($\geq 8\%$ aberrations) was 23 out of 71 (32%) for exposure data between 0–100 mGy and 57 out of 88 (65%) for exposures exceeding the allowance dose of 250 mGy. For children the frequency of CF-positive samples varied between 13% and 100% according to sites and suggested again a correlation with the degree of exposure. The highest clastogenic scores were observed for children from sites with ^{137}Cs soil contamination of 10–15 $\text{Ci} \cdot \text{km}^{-2}$ ($12.2 \pm 2.4\%$ for Bazar, Narodici, Losniza and others, 7.7 ± 1.2 for Gomel). The clastogenic activity in the plasma of CF-positive liquidators, who received antioxidants during three months returned to normal levels and remained unchanged without treatment up to 1 year.

Keywords: Clastogenic factors, oxidative stress, Chernobyl accident, ionising radiation.

INTRODUCTION

Clastogenic factors (CF) were first described in the plasma of persons who had been irradiated accidentally or therapeutically (Goh K.O., Sumner K., 1968; Hollowell H.G., Littlefield L.G., 1968). They were also observed in A-bomb survivors, where they persisted for many years after irradiation (Pant G.S., Kamada N., 1977). More recently, the presence of CF in the plasma of workers and of children exposed as a consequence of the Chernobyl reactor accident, was reported by our laboratory (Emerit I. et al., 1994b; 1995b; 1997a; 1997b).

CF are not only induced by radiation. Similar transferable clastogenic material is circulating in plasma of patients with chronic inflammatory diseases of the connective tissue, such as progressive systemic sclerosis, Sjögren's syndrome, rheumatoid arthritis, lupus erythematosus, periarteritis nodosa, dermatomyositis, as well as in chronic inflammatory diseases of the digestive tract such as ulcerative colitis and Crohn's ileocolitis (Emerit I., 1986; 1994a). CF are also regularly found in the plasma of persons infected with HIV (Fuchs J. et al., 1995). The con-

ВВЕДЕНИЕ

Кластогенные факторы (КФ) были впервые описаны в плазме у лиц, подвергшихся случайному воздействию ионизирующих излучений, или же получавших радиотерапию (Goh K.O., Sumner K., 1968; Hollowell H.G., Littlefield L.G., 1968). КФ также выявляли у жертв атомных бомбардировок на протяжении многих лет после облучения (Pant G.S., Kamada N., 1977). Позднее, наличие КФ в плазме у ликвидаторов и детей, облученных вследствие Чернобыльской катастрофы, описано в работах нашей лаборатории (Emerit I. et al., 1994b; 1995b; 1997a; 1997b).

КФ индуцируются не только облучением. Подобные переносимые кластогенные вещества циркулируют в плазме у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями соединительной ткани, такими как прогрессирующий системный склероз, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, узелковый периартериит, дерматомиозит, а также с хроническими воспалительными заболеваниями пищеварительного тракта в виде язвенного колита и болезни Крона (Emerit I., 1986; 1994a). КФ также обнаруживают в плазме у ВИЧ-инфицированных лиц

genital breakage syndromes (ataxia telangiectasia, Bloom's syndrome, Fanconi anemia) are accompanied by the formation of clastogenic factors (Emerit I., 1994a; Emerit I. et al., 1995a). In all these pathologic conditions, CF formation is the consequence of increased production of superoxide from various sources, since it is regularly inhibited or abolished by superoxide dismutase (SOD) (Emerit I. et al., 1996).

CF are mixtures of prooxidants with chromosome damaging properties and not single factors, as thought by the first observers (Goh K.O., Sumner K., 1968; Hollowell H.G., Littlefield L.G., 1968; Faguet G.G. et al., 1984). Biochemical analysis identified peroxidation products of arachidonic acid, released from membrane phospholipids, cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF α), and unusual nucleotides, such as inosine di- and triphosphate (ITP). The clastogenic properties of these components of CF were confirmed by cytogenetic studies of the corresponding commercial standards (Emerit I., 1994a). The various components of CF exert their clastogenic effects by different mechanisms. The aldehyde 4-hydroxynonenal, a breakdown product of lipid peroxides, is a well known genotoxic agent, which inactivates functional SH groups of DNA polymerases and forms mono-adducts with cellular thiols such as glutathione and cysteine (Wavra E. et al., 1986). ITP may induce genotoxic effects by inhibition of DNA topoisomerases (Osheroff N. et al., 1983). Besides these superoxide-independent pathways of clastogenesis, certain components may be clastogenic due to their superoxide-stimulating properties (Emerit I. 1990b), well known for TNF α (Progrebniak H.W. et al., 1990) and ITP (Kuhns D.B. et al., 1988). Added to cell cultures, these components will induce further superoxide-mediated CF production. Given that superoxide generation leads to the formation of clastogenic substances themselves generating superoxides, the system is self-sustaining and may be responsible for long-lasting genotoxic processes. SOD and other superoxide scavenging substances protect by interrupting this vicious circle. More detailed descriptions of CF formation and superoxide-mediated clastogenesis may be seen in two recent reviews (Emerit I., 1994a; Emerit I. et al., 1996).

METHODS

CF-induced clastogenesis is comparable to chemical clastogenesis except that these clastogens are of endogenous origin. A cytogenetic test system, the CF-test, has been developed for their detection (Emerit I., 1990a). Given that the components of CF act synergistically to induce chromosomal damage, the test is a very sensitive indicator for the presence of these circulating pro-oxidants, which separately may not always reach detectable levels for biochemical analysis.

(Fuchs J. et al., 1995). Врожденные синдромы разрывов хромосом (телеангиэктатическая атаксия, синдром Блума, анемия Фанкони) сопровождаются образованием КФ (Emerit I., 1994a; Emerit I. et al., 1995a). При всех этих патологических состояниях КФ образуются вследствие повышенной продукции перекисных соединений различного происхождения, что постоянно подавляется или нивелируется супероксиддисмутазой (СОД) (Emerit I. et al., 1996).

КФ — смесь прооксидантов с хромосомоповреждающими свойствами, а не отдельные факторы, как считали ранее (Goh K.O., Sumner K., 1968; Hollowell H.G., Littlefield L.G., 1968; Faguet G.G. et al., 1989). Методами биохимического анализа идентифицированы продукты перекисидации арахидоновой кислоты, высвобождаемой из фосфолипидов мембран, цитокины в виде α -фактора некроза опухолей (α -ФНО), а также атипичные нуклеотиды — инозин-ди- и трифосфаты (ИТФ). Свойства этих компонентов подтверждены данными цитогенетических исследований (Emerit I., 1994a). Различные компоненты КФ проявляют свои качества по-разному. Альдегид 4-гидроксиноненал, продукт распада перекисей липидов, представляет собой известный генотоксический агент, инактивирующий функциональные SH-группы ДНК-полимераз и образующий монофрагменты с такими клеточными тиолами, как глутатион и цистеин (Wavra E. et al., 1986). ИТФ способен индуцировать генотоксические эффекты путем ингибирования ДНК (Osheroff N. et al., 1983). Помимо таких перекисно-независимых путей кластогенеза, ряд соединений проявляют себя как кластогены благодаря перекисно-стимулирующим свойствам, хорошо изученным α -ФНО (Progrebniak H.W. et al., 1990) и ИТФ (Kuhns D.B. et al., 1988). При добавлении в клеточную культуру эти соединения вызывают дальнейшую перекисно-модулированную продукцию КФ. При условии, что образование перекисей ведет к образованию кластогенных веществ, в свою очередь образующих перекиси, такая система является самоподдерживающей и может обуславливать продолжительный генотоксический процесс. СОД и прочие соединения, удаляющие перекиси, обладают протекторными свойствами, т.к. разрывают данный порочный круг. Подробно образование КФ и перекисно-опосредованного кластогенеза описаны в двух обзорах (Emerit I., 1994a; Emerit I. et al., 1996).

МЕТОДЫ

КФ-индуцированный кластогенез сравним с химическим кластогенезом, но в данном случае кластогены имеют эндогенное происхождение. Для их определения разработана цитогенетическая тестовая система — КФ-тест (Emerit I., 1990a). Поскольку компоненты КФ при индукции повреждения хромосом действуют синергически, тест является чрезвычайно чувствительным индикатором таких циркулирующих прооксидантов, каждый из которых в отдельности не всегда достигает порога чувствительности биохимического анализа.

The procedure for isolation of CF consists principally of ultrafiltration of the plasma through a filter with a cut off at 30 kDa in order to remove all high molecular mass components, which might disturb culture growth due to blood group incompatibilities. The filtration step also eliminates all residual cells from the exposed person's blood.

Aliquots (0.25 ml ultrafiltrate or 0.1 ml after failure of the first culture) are added to test cultures set up with 0.4 ml whole blood from blood donors (courtesy of the Blood Transfusion Centre, Paris), suspended in 4 ml culture medium RPMI 1640 and 1 ml fetal calf serum, both from Gibco, France. Lymphocyte proliferation is stimulated by addition of phytohemagglutinin (Wellcome Diagnostics, Dartford UK). After 48 h of incubation at 37°C, the mitoses are arrested in metaphase by addition of colchicine, 3 h before harvesting. Microscopic slides are prepared for chromosomal analysis according to standard procedures. The chromosomes are examined on coded slides for the presence of breaks, fragments, exchanges, rings, dicentric and other morphologically abnormal chromosomes. The number of chromosomal aberrations observed in 50 mitoses is multiplied by 2 to give a numerical score, called a percent for convenience. A series of ultrafiltrates is tested the same day on the cultures set up with the blood of the same donor. Two additional cultures without ultrafiltrate serve as controls for the establishment of the spontaneous chromosomal aberration rate of the donor's lymphocytes. This background is subtracted from the aberration rate in the ultrafiltrate-treated cultures of the same donor. The difference between the two values is called the adjusted clastogenic score (ACS). This method of treating results is necessary in order to allow comparison of results for plasma samples taken in a patient at different time periods and studied on different test cultures.

Several series of experiments, in which background levels were determined for 10 parallel cultures of the same donor blood, ascertained that the variation in background levels of aberrations does not exceed $\pm 6\%$, and that the range is the same for two independent observers. Therefore a plasma sample is considered to be clastogenic, if it induces more than 6% additional aberrations. In agreement herewith, the majority of 100 control samples were not clastogenic at all or induced ACS of +2 or +4 per 100 cells. Only in 5% of the healthy blood donors, the ultrafiltrates induced ACS of 6%. Higher values were not observed. The mean value for CF in these 100 healthy adults was 0.8 ± 1.0 (Emerit et al. 1995 b). On the basis of these data, ACS in the range between 0 and +4 are considered as negative for CF, ACS of more than 7 as positive for CF. ACS of +6, detected with a frequency of 5% in the control population, are scored as CF \pm .

Методика выделения КФ основана, главным образом, на ультрафильтрации плазмы через фильтр 30 кДа в целях удаления всех прочих компонентов с большей молекулярной массой, которые способны нарушить рост культуры ввиду несовместимости по группам крови. На этапе фильтрации происходит также удаление резидуальных клеточных элементов крови.

В тестовую культуру — 0,4 мл цельной крови доноров (центр переливания крови, Париж), помещенной в 4 мл среды RPMI 1640 с добавлением 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Франция) добавляли 0,25 мл ультрафильтрата или 0,1 мл в случае неудачи первой попытки культивирования. Пролиферацию лимфоцитов стимулировали фитогемагглютинином (Wellcome Diagnostics, Dartford UK). После инкубации в течение 48 ч при температуре 37°C митозы останавливали в метафазе добавлением колхицина за 3 ч до получения результатов. Микропрепараты для хромосомного анализа готовили по стандартной методике. Препараты хромосом, фиксированные на маркированных предметных стеклах, исследовали на наличие разрывов, фрагментации, обмена фрагментами, кольцевых форм, дицентриков и иных разновидностей морфологически аномальных хромосом. Количество хромосомных aberrаций, наблюдаемых при 50 митозах, умножали на 2 для получения величины параметра, называемого для удобства процентом. Серию ультрафильтратов тестировали в тот же день на культурах крови того же донора. Две дополнительные структуры без ультрафильтрата служили контролем для установления частоты спонтанных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови доноров. Эту фоновую величину вычитали из общего числа aberrаций в препарате культуры того же донора с добавлением ультрафильтрата. Разница этих двух значений называется истинной величиной кластогенности (ИВК). Такой способ обработки данных необходим для сравнения результатов исследования плазмы крови у больных в разные временные периоды и с использованием разных тестовых культур.

Несколько серий экспериментов по определению фонового уровня для 10 параллельных культур крови одного донора показали, что колебание фонового уровня aberrаций не превышает 6% и данная частота одинакова при ее определении двумя независимыми исследователями. Пробы плазмы крови считают кластогенными, если индуцируется более 6% дополнительных aberrаций. В большинстве контрольных проб у 100 доноров не выявлено кластогенной активности или ИВК составляли от +2 до +4 на 100 клеток. Лишь у 5% доноров ультрафильтраты индуцировали ИВК 6%. Более высокие величины не наблюдали. Средний уровень КФ у доноров составлял $0,8 \pm 1,0$ (Emerit I. et al., 1995b). На основании этих данных при ИВК в пределах от 0 до +4 результат КФ-теста считали отрицательным, 7 или более — положительным. ИВК +6, регистрируемая с частотой 5% в контрольной популяции, расценивается как пограничное значение (КФ \pm).

When correlations between CF and other biomarkers of oxidative stress were studied, a good correlation was noted between ACS and O₂-production measured with the cytochrome c assay. Also there was a strong correlation between ACS and low plasma thiols, indicating a decrease in the antioxidant defenses of the organism. On the other hand, there was only a weak correlation between malondialdehyde levels and ACS. This is not astonishing, since lipid peroxidation products are responsible only for part of the clastogenic activity.

RESULTS AND DISCUSSION

The CF-Test in Chernobyl accident recovery workers (liquidators)

The first samples studied by our laboratory in liquidators were provided by the Centre of Radiation Medicine in Yerevan, Armenia (cooperation with N. Oganessian, A. Pogossian, R. Arutyunyan and T. Sarkisian). Among 89 liquidators, 37 were positive for CF (42%). In 11 (13%), the ACS was +8, while 26 (29%) had ACS of +10 and higher. The mean values were $6.16 \pm 4.83\%$ aberrations, statistically different ($P < 0.001$) from the values of healthy blood donors (mean ACS $0.8 \pm 1.0\%$) (Emerit I. et al., 1995b).

CF+ liquidators were more frequent among those, for whom the physical dosimetry indicated values higher than the allowance dose of 250 mGy (86% CF+ individuals compared to 21% with exposures of less than 100 mGy). Also those, who had been in Chernobyl in 1986 were more often positive for CF than those, who were on site in 1987 and 1988. There were no differences with respect to the duration of the stay, probably because exposure depended on the professional, activities. The percentage of CF+ ultrafiltrates was 65% for those working at the reactor site and 43% for those working elsewhere in the 11–30-km zone. If site of work, date of commenced work, duration of work, type of work, use of protective clothes, changes in blood counts etc were combined as weighting factors, liquidators with a score of >10 weighting factors were more often positive for CF than workers with a score of <10 weighting factors (62 and 43% respectively). There was a good correlation between weighting factors and data provided by physical dosimetry.

The observations in Armenian liquidators could be confirmed in the following by a larger series of Russian liquidators (Emerit I. et al., 1997c), whose health status is regularly checked at the All Russian Centre for Ecological Medicine in St. Petersburg (cooperation with N. Nikiforov, G. Katashkova, N. Zybina). The overall frequency of liquidators positive for CF was 63% for the total of 237 liquidators studied, a percentage higher than that found in Armenia. The reason for this is that the liquidators from the Institute in Yerevan were studied randomly in order of

После изучения корреляционных взаимоотношений КФ и прочих биомаркеров оксидантного стресса была отмечена корреляция ИВК и продукции O₂, измеряемой путем определения цитохрома С. Кроме того, была установлена сильная корреляция ИВК и низкого уровня тиолов плазмы, что свидетельствовало о снижении антиоксидантной защиты организма. С другой стороны, между уровнями малонового диальдегида (МДА) и ИВК существовала лишь слабая корреляция. Это не является неожиданным, так как перекисное окисление липидов (ПОЛ) лишь отчасти обуславливает кластогенную активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

КФ-тест у участников ликвидации последствий Чернобыльской аварии (ликвидаторов)

Первые образцы сывороток, взятые у ликвидаторов, исследованные в нашей лаборатории, были предоставлены Центром радиационной медицины в Ереване, Армения (при сотрудничестве с Н. Оганесяном, А. Погосьяном, Р. Арутюняном и Т. Саркисяном). Из 89 ликвидаторов у 37 (42%) КФ-тест был положительным. У 11 (13%) человек ИВК составляла +8, у 26 (29%) +10 и выше. Средние значения составляли $6,16 \pm 4,83\%$ aberrаций и достоверно отличались ($p < 0,001$) от показателей у доноров крови (средняя ИВК — $0,8 \pm 1,0\%$) (Emerit I. et al., 1995b).

КФ чаще обнаруживали у ликвидаторов, у которых результаты физической дозиметрии свидетельствовали о превышении величины допустимой дозы 250 мГр (86% по сравнению с 21% при облучении в дозах до 100 мГр). Кроме того, у ликвидаторов 1986 г. чаще выявляли КФ, чем у ликвидаторов 1987 и 1988 гг. Продолжительность пребывания в зоне отчуждения на данные факторы не влияла, вероятно, из-за того, что доза облучения зависела от рода деятельности. Удельный вес ультрафильтратов с КФ+ составлял 65% среди тех, кто работал в непосредственной близости от разрушенного реактора и 43% — среди работавших в 11–30-километровой зоне. Отягощающими факторами были дата начала работ, их продолжительность, род деятельности, использование защитной одежды, изменения формулы крови и т.д. КФ-тест у ликвидаторов при сумме отягощающих факторов выше 10, более часто был положительными, чем при сумме факторов менее 10 (у 62 и 43% соответственно). Выявлена корреляция отягощающих факторов и данных физической дозиметрии.

Данные обследования ликвидаторов в Армении подтверждены результатами, полученными в большей когорте ликвидаторов из России (Emerit I. et al., 1997c), чье состояние здоровья регулярно контролирует Всероссийский центр экологической медицины в Санкт-Петербурге (в сотрудничестве с А. Никифоровым, Г. Каташковой и Н. Зыбиной). КФ были выявлены у 63% из 237 обследованных ликвидаторов, что превышает показатели, полученные в Армении. Следует отметить, что в Армении ликвидаторов обследовали по мере их обращения, а в Санкт-

their arrival for check-up, while the liquidators in St. Petersburg were selected for inclusion in a clinical trial. Again CF positivity was higher for exposures of >250 mGy compared to exposures of <100 mGy (73 and 37% respectively). The results obtained for Armenian and Russian liquidators are shown in table 1. Another group of 44 liquidators was studied after their emigration to Israel in cooperation with J. Goldsmith, M. Quastel and E. Riklis, Beer Shewa, Israel (Emerit I. et al., 1994b). Only 27% of these workers were positive for CF. Exposure data are not available for these persons.

Петербурге производили отбор ликвидаторов для включения в клиническое исследование. КФ чаще обнаруживали у лиц, облученных в дозах более 250 мГр, чем у облученных в дозах до 100 мГр (73 и 37% соответственно). Результаты, полученные в Армении и России, представлены в таблице 1. Еще 44 ликвидатора были обследованы (при сотрудничестве с J. Goldsmith, M. Quastel и E. Riklis, Беер Шева, Израиль) после их эмиграции в Израиль (Emerit I. et al., 1994b). Лишь у 27% из них КФ-тест был положительным. Дозиметрические данные этих ликвидаторов отсутствуют.

RESULTS OBTAINED WITH THE CF-TEST IN CHERNOBYL-EXPOSED WORKERS (LIQUIDATORS) (%)

TABLE 1

РЕЗУЛЬТАТЫ КФ-ТЕСТА У ЛИЦ, ОБЛУЧЕННЫХ ВСЛЕДСТВИЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС (ЛИКВИДАТОРОВ) (%)

ТАБЛИЦА 1

ACS	Liquidators*	Liquidators**	Referents***
0	11	6	52
<6	37	18	43
6	10	133	5
8	13	25	0
>8	29	38	0
Mean	6.2±4.8	8.2±4.5	0.8±1.0

Note. * — Centre of Radiation Medicine, Yerevan, Armenia, n=89; ** — All-Russian Centre for Ecological Medicine, St. Petersburg, Russia, n=237; *** — blood donors from Armenia and France, n=100.

Примечание. * — Центр радиационной медицины, Ереван, Армения, n=89; ** — Всероссийский центр экологической медицины, Санкт-Петербург, Россия, n=237; *** — доноры из Армении и Франции, n=100.

Since the liquidators did not return to Chernobyl and are now living in a non-contaminated environment, the persistence of clastogenic factors cannot be explained by persisting radiation exposure. Irradiation of blood *in vitro* showed that a radiation dose of 500 mGy results in significant clastogenic activity and that cells incubated in fresh culture medium continue to produce CF in culture (Emerit I. et al., 1994b; 1997c). The doses received by the liquidators were sufficient for initiation of the vicious circle of CF formation.

Поскольку ликвидаторы не возвращались в Чернобыль и в настоящее время проживают в радиологически благоприятных условиях, персистенция у них КФ не может быть объяснено продолжающимся облучением. Результаты облучения крови *in vitro* показали, что доза 500 мГр вызывает значительное повышение кластогенной активности, а инкубированные в свежей культуральной среде облученные клетки продолжают вырабатывать КФ в культуре (Emerit I. et al., 1994b; 1997c). Дозы, полученные ликвидаторами, могли быть достаточными для инициации порочного круга образования КФ.

The formation of CF after radiation exposure is probably similar to CF formation in chronic inflammatory diseases. Inflammatory reactions have been proposed to explain the neutrophilia in A-bomb survivors (Neriishi K., 1991), in whom persistence of CF was noted by a study done 30 years after the Hiroshima nuclear bomb attack (Pant G.S., Kamada N., 1977). Moderate neutrophilia was also observed in Armenian liquidators (Oganesian N. et al., 1991), together with lymphopenia consisting primarily in a reduced number of T-lymphocytes. The formation as well as the chromosome damaging effects of radiation-induced CF were preventable by SOD (Emerit I. et al., 1994b; 1997c). The latter is another argument for similarities with CF in chronic inflammatory diseases. Lipid peroxidation products and TNF α are probably also the clastogenic components of CF in liquidators' blood. MDA levels and conjugated dienes were found to be increased, as well in the Armenian (Emerit I. et al., 1995b) as in the Russian study group (Emerit I. et al., 1997c). It is

Образование КФ вследствие облучения может происходить так же, как при хронических воспалительных заболеваниях. Воспалительные реакции были предложены для объяснения нейтрофилии у жертв атомных бомбардировок (Neriishi K., 1991), когда персистенция КФ было у них отмечено спустя 30 лет после ядерной бомбардировки Хиросимы (Pant G.S., Kamada N., 1977). У ликвидаторов из Армении также выявляли умеренно выраженную нейтрофилию (Oganesian N. et al., 1991) наряду с лимфопенией, преимущественно проявлявшееся снижением числа Т-лимфоцитов. Образование радиационно-индуцированных КФ, также как и их эффекты повреждения хромосом, нивелировались СОД (Emerit I. et al., 1994b; 1997c). Последнее — еще один аргумент в пользу подобия КФ таковым при хронических воспалительных заболеваниях. Продукты ПОЛ и α -ФНО, вероятно, являются кластогенными компонентами КФ в крови ликвидаторов. Обнаружено повышение МДА и конъюгированных диенов в крови у ликвидаторов из Армении (Emerit I. et al., 1995b) и России (Emerit I. et al., 1997c). Известно, что

known from the literature that TNF mRNA and protein are increased after exposure of cells to ionizing radiation (Hallahan D.E. et al., 1989).

The CF-Test in Chernobyl-exposed children

A first group of 170 children, who had emigrated to Israel in 1990, have been studied in cooperation with J. Goldsmith, M. Quastel and E. Riklis, Beer Sheva (Emerit I. et al., 1997a). A high percentage of these plasma ultrafiltrates exerted clastogenic effects in test cultures set up with blood from healthy donors. The differences were highly significant in comparison to children immigrated from “clean” cities of the former Soviet Union and healthy Israeli children, in whom the mean ACS were 1.9 ± 1.1 and 1.0 ± 0.7 respectively (table 2). The percentage of CF+ children and the mean values of adjusted clastogenic scores were higher for those coming from Gomel and Mozyr, which are high exposure sights (IEAE measurements), compared to those coming from Kyiv.

после воздействия ионизирующих излучений повышается уровень мРНК и протеина ФНО (Hallahan D.E. et al., 1989).

КФ-тест у детей, пострадавших вследствие Чернобыльской аварии

Обследование первой группы (170 детей) эмигрировавших в Израиль в 1990 г. выполнено при сотрудничестве с J. Goldsmith, M. Quastel и E. Riklis, Беер Шева (Emerit I. et al., 1997a). Ультрафильтраты плазмы крови этих детей зачастую проявляли кластогенные эффекты в тестовых культурах клеток крови здоровых доноров. Пострадавшие дети существенно отличались от детей, эмигрировавших из “чистых” городов бывшего Советского Союза, и здоровых детей из Израиля, у которых средние значения ИВК составляли $1,9 \pm 1,1$ и $1,0 \pm 0,7$ соответственно (таблица 2). Содержание КФ и средние значения ИВК были выше у детей из гг. Гомель и Мозырь — сильно загрязненных населенных пунктов (данные дозиметрии МАГАТЭ), чем у детей, эмигрировавших из Киева.

RESULTS OBTAINED WITH THE CF-TEST IN CHERNOBYL EXPOSED CHILDREN (%)

TABLE 2

РЕЗУЛЬТАТЫ КФ-ТЕСТА У ОБЛУЧЕННЫХ ДЕТЕЙ (%)

ТАБЛИЦА 2

Group of children	n	CF+, %	Mean ACS
I Emigrated to Israel*			
Kiev	67	31	5.9 ± 1.2
Gomel	95	52	7.7 ± 1.2
II Children living in Ukraine**			
Kiev	93	30	4.9 ± 4.4 , $p < 0.01$
Bazar	27	100	12.2 ± 2.4 , $p < 0.001$
Kotsubinskoje	58	43	6.5 ± 3.7 , $p < 0.01$
Goncharovsk	49	14	2.8 ± 3.7
III Controls			
Israel	48	2	1.0 ± 0.7
Paris	50	6	2.2 ± 2.9
Clean cities	24	8	1.9 ± 1.1

Note. * — in cooperation with J. Goldsmith, M. Quastel, Israel; ** — in cooperation with Y. Antipkin, Kyiv.

Примечание. * — в сотрудничестве с J. Goldsmith, M. Quastel, Израиль; ** — в сотрудничестве с Ю. Антипкиным, Киев.

A second group of children have been studied in cooperation with U. Antipkine, Institute for Pediatrics, Gynaecology and Obstetrics in Kyiv, Ukraine (Emerit I. et al., 1997c). The frequency of CF+ plasma samples varied between 14 and 100% as a function of their origin (table 2). Interestingly, the percentage of CF+ samples was the same (30%) for children emigrated from Kyiv to Israel and children still living in Kiev. The highest values were observed in 27 children, who had been evacuated from a zone, in which ^{137}Cs levels in the soil were between 10 and $15 \text{ Ci} \cdot \text{km}^{-2}$ (Bazar, Losniza, Narodici and others). Another group of children are at present living in controlled territories, such as the Chernigov region, a zone known for important contamination with radioactive iodine. Significant differences were observed between children from two different places in this region, Goncharovsk and Kotsubinskoje village. This was true as well for mean ACS (2.78 and 6.45 respectively) as for the

Вторая группа детей была обследована совместно с Ю. Антипкиным, Институт педиатрии, акушерства и гинекологии в Киеве, Украина (Emerit I. et al., 1997c). Частота КФ-положительных образцов плазмы варьировала от 14 до 100% в зависимости от места жительства ребенка (см. таблицу 2), и была одинакова (30%) как у детей, эмигрировавших из Киева в Израиль, так и у продолжающих жить в Киеве. Наиболее высокие показатели наблюдали у 27 детей, эвакуированных из зоны, где уровень загрязнения почвы ^{137}Cs составлял 10–15 $\text{Ки} \cdot \text{км}^{-2}$ (населенные пункты Базар, Лосница, Народичи и др.). Были также обследованы дети, которые в настоящее время проживают на контролируемой территории Черниговской области — зоне, подвергшейся интенсивному загрязнению радиоактивным йодом. Существенные различия показателей выявлены у детей двух населенных пунктов данного региона: Гончаровска и Коцюбинское. Средние значения ИВК составили 2,78 и 6,45 соответственно, частота обнаружения КФ — 14 и 44% (см. таблицу 2). Средние величины доз

percentages of CF+ children (14 and 44% respectively) (table 2). Averages of thyroid irradiation, measured in 1986, were higher for Goncharovsk than for Kotsubinskoje. However, since goiter is endemic in Kotsubinskoje, the radioactive iodine may have been fixed more intensively on the thyroid gland. Other data are not in favor of a correlation between thyroid radiometry in 1986 and positive CF-tests ten years later: 1) the number of children positive for CF was practically the same for thyroid dosimetric measurements of $>2,000$ and <300 mGy (50 and 44% respectively); 2) no relationship have been revealed between enlargement of the thyroid gland and CF-positivity in children emigrated to Israel. The contamination with ^{137}Cs was higher for Kotsubinskoje than for Goncharovsk, if the levels in milk were considered, but the reverse was true for soil contamination.

As in liquidators and in A-bomb survivors, persistence of irradiation seems not to be necessary for persistence of CF in children.

Because of difficulties in obtaining plasma samples from unexposed Ukrainian children, fifty French children served as controls for this study group (cooperation with D. Porquet, Dep. Biochemistry, Robert Debré Hospital, Paris). Three of them were CF+ with a mean ACS of $2.2 \pm 2.9\%$. The French data correspond to those of children from the former Soviet Union, but are higher than those of the Israeli children. The latter were healthy school children, while the French children had been consulting for various reasons. The differences between Chernobyl exposed children and the control groups are highly significant.

Results obtained with the CF-test in clinical trials with antioxidants

It has been suggested that CF are risk factors for the development of late effects in irradiated persons (Faguet G.G. et al., 1984; Emerit I., 1994a). Not only cancer but also other health problems observed in the workers could be related to oxidative stress. Since the DNA-damaging effects of CF are mediated by oxygen-derived free radicals, antioxidants may be proposed for prevention of subsequent disease. SOD was consistently anticlastogenic, but cannot be administered by the oral route. Therefore other products with confirmed superoxide-scavenging properties were used for two open clinical trials, conducted in Yerevan with the authorization of the Armenian Ministry of Health. Thirty liquidators were treated with EGb 761, an extract from *Ginkgo biloba* leaves containing 24% *Ginkgo flavone glycosides* and 6% *Ginkgolides-bilobalides* (trade name Tanakan, IPSEN Lab., Paris, France) (Emerit I. et al., 1995b). Another group of 20 Armenian liquidators received the Antioxidant Biofactor AOB from AOA Company, Kobe, Japan (Emerit I. et al., 1997b). AOB is extracted from soybean, rice, wheat, green tea, yeast and sesame. It contains var-

облучения щитовидной железы, по данным 1986 г., были выше для Гончаровска, чем для Коцюбинского. Поскольку Коцюбинское является населенным пунктом, расположенным на эндемичной по зубо территории, возможно, радиоактивный йод более интенсивно накапливался в щитовидной железе его жителей. Данные радиометрии щитовидной железы 1986 г. не соответствуют положительным результатам КФ-теста спустя десять лет. КФ-тест был положительным практически одинаково часто при величинах доз облучения щитовидной железы как >2000 мГр, так и <300 мГр (соответственно 50 и 44%); у детей, эмигрировавших в Израиль, не удалось установить какой-либо зависимости между увеличением щитовидной железы и положительными результатами КФ-теста. Уровень загрязнения ^{137}Cs молока была выше в Коцюбинском, чем в Гончаровске, однако в отношении плотности загрязнения почвы результаты носили противоположный характер.

Как у ликвидаторов, так и у жертв атомной бомбардировки продолжение облучения не являлось необходимым условием для персистенции КФ.

Ввиду трудностей получения материала плазмы необлученных детей из Украины для контроля использовали данные исследований 50 французских детей (при сотрудничестве с D. Porquet, отдел биохимии госпиталя Robert Debré, Париж). КФ-положительными были 3 из них, средняя ИВК — $2,2 \pm 2,9\%$. Эти данные согласуются с результатами исследования детей из бывшего СССР, но превышают таковые у здоровых детей школьного возраста из Израиля. Во Франции обследованы дети, обращавшиеся за консультативной помощью. Тем не менее, различия показателей детей, испытавших воздействие Чернобыля, и контрольной группы были высоко значимыми.

Результаты КФ-теста при клинических испытаниях антиоксидантов

Предполагается, что КФ являются факторами риска развития отдаленных эффектов облучения (Faguet G.G. et al., 1984; Emerit I., 1994a). Возникновение заболеваний, не только онкологических, у ликвидаторов может быть связано с оксидантным стрессом. Поскольку ДНК-повреждающие эффекты КФ опосредуются свободными радикалами, выделяющими кислород, в качестве превентивных средств могут быть предложены антиоксиданты. При существенной антикластогенной активности не следует назначать СОД-препараты для энтерального применения. Поэтому в двух открытых клинических испытаниях использовали другие препараты с подтвержденными антиперекисными свойствами. Испытания проводили в Ереване с официального разрешения Министерства здравоохранения Армении. Тридцать ликвидаторов принимали EGb 761 — экстракт из листьев *Ginkgo biloba*, содержащий 24% флавоновых гликозидов Гинкго и 6% гинкголид-билобалидов (коммерческое название Tanakan, IPSEN Lab., Париж, Франция) (Emerit I. et al., 1995b); 20 — Антиоксидантный биофактор (АОБ) производства AOA Company, Kobe, Япония (Emerit I. et al., 1997b). АОБ получают из растительного сырья (соевые бобы, рис, пшеница, зе-

ious flavonoids, in particular daidzein, genistein and rutin, in addition to small amounts of oligoelements and antioxidant vitamins. A CF-test had been performed before and after a 3 month treatment. Even after a treatment-free period of 6 to 12 months, CF did not reach detectable levels in the majority of liquidators. The workers experienced improvement of their general condition and working capacity. Both antioxidants will now be studied in a double blind, placebo-controlled trial. The studies indicated that the use of antioxidants can be discontinuous, which is of considerable interest for cost evaluations of long-term prophylactic treatments.

CONCLUSION

On the basis of the reported data, CF can be considered as biomarkers of a prooxidant state. The CF-test is useful as an intermediate endpoint in intervention clinical trials. The cytogenetic test system appears preferable to biochemical analysis of the various clastogenic and pro-oxidant components, since their synergistic action renders the test particularly sensitive. The study of the clastogenic effects of patient's plasma on cells of healthy blood donors instead of looking for chromosome damage in lymphocytes of exposed persons, has the advantage that the plasma can be frozen and studied when convenient. The induction of chromosomal aberrations by the plasma of a patient demonstrates that the circulating clastogenic prooxidants have reached levels which are no longer counterbalanced by the antioxidant defenses and the DNA repair system of the organism. Oxidative stress is one of the non-specific consequences of irradiation, even at low doses. It is our aim to draw attention to health problems related to oxidative stress in Chernobyl-exposed workers and children, since they might be successfully influenced by antioxidants.

REFERENCES

- Emerit I. Oxygen-derived free radicals and DNA damage in autoimmune diseases. In: J.E. Johnson (Ed.) Free radicals, ageing and degenerative disease, Alan R Liss, New York, 1986, pp. 307–324.
- Emerit I. Clastogenic factors: detection and assay. In: L. Packer, A.N. Glazer (Eds), Methods in enzymology, Academic Press, New York, 1990a, pp. 555–564.
- Emerit I. Superoxide production by clastogenic factors. In: A. Crastes de Paulet, L. Douste-Blazy, R. Paoletti (Eds), Free radicals, lipoproteins and membrane lipids, Plenum Press, New York, 1990b, pp. 99–104.
- Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. Free Radic. Biol. Med. 1994a, 16: 99–109.

ленные сорта чая, дрожжи и кунжут). Они содержат различные флавоноиды (даидзеин, генистеин и рутин), небольшое количество микроэлементов и витаминов-антиоксидантов. КФ-тест проводили до и после трехмесячного курса лечения. В течение 6, 9 и 12 мес после лечения, у большинства ликвидаторов уровень КФ не достигал порога чувствительности метода. Пациенты отмечали улучшение общего состояния, повышение работоспособности. Предполагается провести двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффектов обоих препаратов. Применять антиоксиданты можно курсом, что экономически значимо для длительного профилактического лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании изложенных данных КФ можно считать биомаркерами прооксидантного состояния. КФ-тест информативен на промежуточной конечной точке клинических испытаний. Система цитогенетического тестирования более предпочтительна, чем биохимический анализ различных кластогенных и прооксидантных компонентов, так как их синергизм способствует повышению чувствительности теста. Изучение кластогенных эффектов плазмы пациентов на клетках крови здоровых доноров вместо поиска повреждений хромосом в лимфоцитах облученных лиц, имеет преимущество в виде возможности замораживания плазмы и проведения исследования в удобное время. Индукция плазмой хромосомных aberrаций свидетельствует о достижении циркулирующими кластогенными прооксидантами уровня истощения антиоксидантной защиты и системы репарации ДНК организма. Оксидантный стресс является одним из неспецифических последствий облучения, даже в малых дозах. Нашей целью является привлечение внимания к нарушениям здоровья, связанным с оксидантным стрессом у ликвидаторов и облученных детей, поскольку их устранению способствует применение антиоксидантов.

- Emerit I., Cernjavski L., Arutyunyan R., Oganessian N., Pogosian H., Mejlumian H., Sarkisian T., Gulkandanian M., Quastel M., Goldsmith J., Riklis E., Kordysb R., Poliak S., Merklin L. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1994b, 120: 558–561.
- Emerit I., Levy A., Pagano G., Pinto L., Calzone R., Zatterale A. Transferable clastogenic activity in plasma from patients with Fanconi anemia. Hum. Genet. 1995a, 96: 14–20.
- Emerit I., Oganessian N., Sarkisian T., Arutyunyan R., Pogosian A., Asrian K., Levy A., Cernjavski L. Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers. Anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. Radiat. Res., 1995b, 144: 198–205.
- Emerit I., Garban F., Vassy J., Filipe P., Freitas J. Superoxide-mediated clastogenesis and anticlastogenic effects of exogenous superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 12799–12804.

Emerit I, Quastel M, Goldsmith J, Merkin L, Levy A, Cernjavski L, Alaoui-Youssefi A, Pogossian A, Riklis E. Clastogenic factors in the plasma of children exposed at Chernobyl. *Mutat. Res.*, 1997a, 373: 47–54.

Emerit I, Oganessian N, Arutyunyan R, Pogossian A, Sarkisian T, Cernjavski L, Levy A, Feingold J. Oxidative stress-related clastogenic factors in plasma from Chernobyl liquidators: protective effects of antioxidant plant phenols, vitamins and oligoelements. *Mutat. Res.* 1997b, 377: 239–246.

Emerit I, Alaoui-Youssefi A, Cernjavski L, Gentilini M, Nikiforov N, Zybina N, Katashkova G, Tsyb A, Riabchenko N.J., Liasko L.I., Souchkevitch G.N., Kaplan MA, Piatak O.A., Ovsiannikova M., Alekhina S.M., Drobiskaya O.W., Khablyavka I.G., Lysbenko L.A., Antipkine U., Omelchenko L., Arabskaya L., Ossinskaya K., Ivanov K., Pochinok T., Shefel U.V., Lukina E.A., Levina A.A., Khoroshko N.D., Dzerzhitsky V.E., Oganessian N., Pogossian A., Abramian A., Arutyunyan R., Sarkisian T., Esayan A., Asrian K., Neriishi K. Oxidative stress and low dose irradiation. IAEA-TEC-DOC-976 report: Conference on Low doses of ionizing radiation: biological effects and regulatory control, Sevilla, Spain, 17–21 November, 1997c, pp. 1–4.

Faguet G.G., Reichard S.M., Welter D.A. Radiation-induced clastogenic plasma factors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1984, 12: 73–83.

Fuchs J., Emerit I, Levy A, Cernjavski L, Schofer J, Milbradt R. Clastogenic factors in plasma of HIV-infected patients. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 19: 843–848.

Gob K.O., Sumner K. Breaks in normal human chromosomes: are they induced by a transferable substance in the plasma of irradiated persons ex-

posed to total-body irradiation? *Radiat. Res.*, 1968, 6: 51–60.

Hallaban D.E., Spriggs D.R., Beckett M.A., Kufe D., Weichselbaum R.R. Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 10104–10107.

Hollowell H.G., Littlefield L.G. Chromosome damage induced by plasma from irradiated patients. An indirect effect of X-ray. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1968, 129: 240–244.

Kubns D.B., Wright D.G., Nath J., Kaplan S.S., Basford R.E. ATP induces transient elevations of Ca^{2+} in human neutrophils and primes cells for enhanced O_2^- production. *Lab. Invest.*, 1988, 58: 127–130.

Neriishi K. Possible involvement of a free radical mechanism in late effects of A-bomb radiation. *Proc. 5th Int. Congr. on Oxygen radicals: active oxygen, lipid peroxides and antioxidants*, Kyoto, 1991, Abstr.

Oganessian N, Ogandjaria E, Melikian J, Malikojan S, Tirojan G, Asrian K, Abramian A, Batikian Y. Study of the health consequences observed in liquidators of the Chernobyl reactor accident. *Med. Radiol.*, 1991, 10: 33–36 (in Russian).

Osberoff N, Shelton R, Brullag D.L. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258: 9536–9543.

Pant G.S., Kamada N. Chromosome aberrations in normal leukocytes induced by the plasma of exposed individuals. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 1977, 26: 149–155.

Progrebniak H.W., Matthews A, Pass H.I. Reactive oxygen species can amplify macrophage tumor necrosis factor production. *Surg. Forum*, 1990, 16: 101–105.

Wavra E, Zollner H, Schauer R.J., Tillian H.M., Schauenstein E. The inhibitory effect of 4-hydroxynonenal on DNA polymerases alpha and beta from rat liver and rapidly dividing Yoshida ascites hepatoma. *Cell Biochem. Function*, 1986, 4: 31–36.