

GLUTATHIONETRANSFERASE ACTIVITY AND PAH-DNA ADDUCTS IN HUMAN PLACENTA AS A RISK FACTOR FOR NEWBORN IN RADIOACTIVELY CONTAMINATED REGIONS

ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И ПАУ-АДДУКТЫ В ПЛАЦЕНТЕ ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР РИСКА ДЛЯ НОВОРОЖДЕННЫХ В РАДИАЦИОННО- ЗАГРЯЗНЕННЫХ РАЙОНАХ

M. Obolenskaya^{1*}, N. Teplyuk¹, L. Sasonova¹, V. Prima¹, M. Malko² E. Bondarenko³,
L. Didenko³, V. Vit⁴, R. Divi⁵, M. Poirier⁵, M. Pasanen⁶

¹Institute of Molecular Biology & Genetics NASci of Ukraine, Zabolotnogo str. 150,
Kiev, 003143, Ukraine Tel.: 380 44 266 11 39; fax: 380 44 266 07 59.

E-mail: Obolenskaya@imbg.org.ua, oberih@ukr.net

²Joint Institute of Power and Nuclear Research, NASci, Minsk, Belarus.

³Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology AMS of Ukraine

⁴Medical Academy, Zaporizhzhia, Ukraine

⁵National Cancer Institute, Bethesda, USA

⁶University of Oulu, Finland

М. Оболенская^{1*}, Н. Теплюк¹, Л. Сазонова¹, В. Прима¹, М. Малько², Е. Бондаренко³,
Л. Диденко³, В. Вит⁴, Р. Диви⁵, М. Пуарье⁵, М. Пасанен⁶

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Заболотного 150, Киев, 03143

²Объединенный институт энергетических и ядерных исследований НАН, Республика Беларусь

³Институт педиатрии, акушерства и гинекологии АМН Украины

⁴Медицинская академия, Запорожье, Украина

⁵Национальный Институт Рака, Бетезда, США

⁶Университет Улу, Финляндия

Abstract

A study of glutathionetransferase (GST) activity and PAH-DNA adducts was undertaken in human placentas collected in radioactively contaminated regions with eventual benzo[a]pyrene (B[a]P) pollution. It was shown that the higher is the contamination of area the more decreased is GST activity and the more abundant are PAH adducts in placental DNA. Depending on predominance in the area of either radionuclides or B[a]P the scenarios of these changes are different. In the case of radionuclides preponderance the accumulation of DNA adducts seems to be a result of decreased cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and GSTP1 activity while in the case of B(a)P chronic exposure it is a result of imbalance between CYP1A1 and GSTP1 elevated expression from one side and suppressed GSTP1 enzymatic activities from another. It was revealed that GST activity correlates with the frequency of some pathological cases in the course of pregnancy and with Apgar's score of newborn. Thus GST activity is an integral biomarker of environmental contamination and maternal detoxification efficiency. It may be used also as a risk factor for newborn.

Key words: glutathionetransferase, PAH-DNA adducts, human placenta, irradiation, benzo (a) pyrene.

INTRODUCTION

The early protection from environmental hazards has become of particular importance in the Ukraine in view of the accident at Chernobyl. Radionuclides have become additional factors at the background of preformed chemical pollution of ambient air particularly by the products of incomplete combustion of organic materials e. g. benzo(a)pyrene (B(a)P).

The human fetus is protected from impact of xenobiotics and radionuclides by detoxification and antioxidant maternal system where liver plays prominent role and by its own defense system. The latter is subdivided into extracorporal one that functions in placenta and intracorporal

ВВЕДЕНИЕ

Своевременная защита детей от неблагоприятного воздействия окружающей среды приобрела в Украине особую актуальность в связи с аварией на ЧАЭС. Радионуклиды стали дополнительным фактором на фоне сформировавшейся ранее химической загрязненности атмосферы, особенно продуктами неполного сгорания углеводородов, например, бензо(а)пиреном (Б(а)П).

Плод человека защищен от воздействия ксенобиотиков и радионуклидов детоксикационной и антиоксидантной системой матери, в которой ведущая роль принадлежит печени, а также своей собственной системой защиты. Последняя подразделяется на экстракорпоральную, функционирующую в

one in which the fetal liver, kidneys and adrenals play an active role. The functional insufficiency of detoxification system causes the accumulation of no excreted xenobiotics both with binding of many of them to cellular macromolecules including DNA in particular. DNA damage in its turn may produce mutagenesis and ultimately results in tumoro- and teratogenesis (Lutz W., 1979; Zeisig M., Moller L., 1995).

The purpose of this investigation was to assess the relative contribution of several factors - including maternal exposure, placental metabolic phenotype, maternal health status - to the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-DNA adducts in placenta and risk for newborns.

Placenta selection as an object of this study was stipulated by several advantageous considerations. Damage to placental DNA can not only document exposure and maternal detoxification efficiency but can serve as a surrogate indicator for DNA damage occurring in other fetal tissues. Placenta is a tissue quantitatively sufficient for routine biochemical investigations. The obtaining of this human embryonic tissue is connected with the least ethical problems. And at last there are expressed nearly one isoform of the enzymes of the I and II phase of detoxification, cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1, EC 1.14.14.1) and glutathionetransferase P1 (GSTP1, EC 2.5.1.18) (Mannervik B., 1985; Pasanen M., 1999). This peculiarity makes placenta a unique in vivo model for investigation of detoxification system, particularly interaction between the enzymes of I and II phases. GSTP1 is a major detoxification enzyme in placenta (Pasanen M., 1999; Knapen M. et al., 1999).

The objectives of this study were: a) to measure GST activity and PAH-DNA adducts content in placental samples; b) to conduct correlation analysis between GST activity, PAH-DNA adducts and maternal exposure level, anthropological indices of mother and newborn health, clinical data; c) to elucidate metabolic processes inducing potential changes of glutathionetransferase activity and PAH-DNA adducts content.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Human term placentas were obtained during different periods from regions contaminated radioactively, radioactively and chemically polluted chemically polluted and those judged as clean. The specimens were subdivided into eight groups depending on when and where they were collected: in 1991-1992 from women who lived till 1986 at the territories nowadays referring to the zones of exclusion and obligatory relocation and from "liquidators" who periodically worked in Chernobyl after the accident (group I); in 1991-1992 and in 1999 from the women who lived in the area of strict radiation monitoring

плаценте, и интракорпоральную, в которой активная роль принадлежит печени, почкам и надпочечникам плода. Функциональная недостаточность системы детоксикации приводит к накоплению не выведенных из организма ксенобиотиков, многие из которых связываются с макромолекулами клетки и, в частности, с ДНК, и нередко определяют канцеро- и тератогенный эффект (Lutz W., 1979; Zeisig M., Moller L., 1995).

Целью настоящего исследования является выяснение относительной роли нескольких факторов - экспозиции матери, фенотипа плаценты, состояния здоровья матери - в накоплении полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в ДНК плаценты и в создании риска для новорожденного.

Выбор плаценты как объекта исследования обусловлен несколькими соображениями. Повреждения ее ДНК могут отражать не только экспозицию матери и эффективность материнской детоксикационной системы, но и служить суррогатным показателем повреждения ДНК в тканях плода. Получение ткани минимально связано с этическими проблемами. Количественно ткани достаточно для проведения биохимических исследований. В плаценте ферменты I и II стадий детоксикации представлены практически единичными изоформами - цитохромом P450 1A1 (CYP1A1, КФ 1.14.14.1) и глутатионтрансферазой P1 (GSTP1, КФ 2.5.1.18) соответственно (Mannervik B., 1985; Pasanen M., 1999). Все это делает плаценту уникальной моделью для исследования системы детоксикации и, в частности, способов взаимодействия ферментов I и II стадий. Глутатионтрансфераза (ГТ-аза) P1 является в плаценте мажорным ферментом системы детоксикации (Pasanen M., 1999; Knapen M. et al., 1999).

Задачи данного исследования: а) измерение активности ГТ-азы и содержания ПАУ-аддуктов в ДНК плаценты; б) проведение корреляционного анализа между ГТ-азной активностью, содержанием ПАУ-аддуктов в ДНК и уровнем экспозиции матери, антропологическими и клиническими показателями матери и плода; в) выяснение метаболических процессов, которые вызывают предполагаемые изменения активности ГТ-азы и содержания ПАУ-аддуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая популяция

Образцы зрелой плаценты человека были получены в разные периоды времени в районах, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС, не пострадавших, но химически загрязненных, и условно чистых. Образцы подразделены на группы в зависимости от того, когда и в каком районе они получены: в 1991-1992 г.г. от рожениц, проживавших до 1986 г. в зонах отчуждения и обязательного отселения, а также ликвидаторов последствий аварии (группа I); в 1991-1992 г.г. и в 2000 г. от рожениц, проживавших в зонах усиленного радиационного контроля Киевской и Черниговской областей (Украина) (группа II) и Го-

in Kiev and Chernigiv districts (Ukraine) (group II) and Gomel district (Byelorussia) (group III); in 1991-1993 and in 1995 in Kiev, that has suffered after Chernobyl accident and is chemically polluted e. g. with B(a)P in ambient air (groups IV, V). The specimens included in group V were collected in the department of obstetrical pathology. The group was formed to elucidate the influence of typical pathological cases on placental phenotype because the frequency of pathological cases in other groups was rather high; in 1992 and 2001 in Zaporizhzhia, the industrial town with high B(a)P level in the ambient air (groups VI & VII) and in 1992 and in 2001 in Poltava and Carpatu (group VIII), areas judged as clean (table 1).

мельской области (Белоруссия) (группа III); в 1991-1993 гг. и в 1995 г. - в г. Киеве, химически загрязненном, в частности, Б(а)П, и пострадавшем от аварии на ЧАЭС (группы IV и V). В V группу вошли образцы, полученные в отделе патологии беременности НИИПАГ. Эта группа образцов сформирована для того, чтобы выяснить состояние детоксикационной системы при наиболее типичных осложнениях беременности, частота которых в остальных группах довольно высока; в 1992 и 2001 г. - в г. Запорожье, крупном индустриальном центре с высоким содержанием Б(а)П в атмосферном воздухе (группы VI и VII), и в 1992 г. и 2001 г. - в г. Полтава и в Карпатах, условно чистых в радиационном и химическом отношении (группа VI-II) (таблица 1)

TABLE 1
CONTAMINATION WITH ¹³⁷CS ISOTOPE AND BENZO(A)PYRENE IN SPECIFIED REGIONS

ТАБЛИЦА 1

ЗАГРЯЗНЕННОСТЬ ИЗОТОПОМ ЦЕЗИЯ¹³⁷ И БЕНЗО(А)ПИРЕНОМ РАЙОНОВ, В КОТОРЫХ ПОЛУЧЕНЫ ОБРАЗЦЫ

Groups of samples and regions of their collection		Number of samples	Time (T) of samples collection, years	Soil contamination with Cs in 1986 (kBq/m ²)	SEEAED, mSv *		Concentration of B(a)P in ambient air in period T (ng/m ³)	
					1986	Period T		
I	Radiation zone of exclusion and of obligatory relocation	18	1992-93	~ 600	~ 25	0.3-1.70	4.1**	12.8**
II	Zone of the intensive radiation monitoring	17	1991-93	37-185	1.0 - 5.0	0.09-0.45	~1.0	~1.0
III	Zone of the facultative evacuation and periodic monitoring	26	1999	17-79	0.45-2.10	0.02-0.09	~1.0	~1.0
IV	Radioactively and chemically polluted region (Kiev)	20	1991-93	18 - 37	0.30-0.60	0.02-0.05	4.1	12.8
V	Radioactively and chemically polluted region (Kiev)	21	1995-96	18 - 37	0.30-0.60	0.01-0.02	4.0	12.2
VI	Chemically polluted region (Zaporizhzhia)	21	1992	2 - 4	<0.07	<0.01	12.3	33.3
VII	Chemically polluted region (Zaporizhzhia)	13	2002	2 - 4	<0.07	<0.01	3.0	9.8
VIII	Regions considered as radioactively and chemically clean (Poltava and Carpatu)	10 20	1992-93 2001	4 - 10 2 - 4	<0.16 <0.07	<0.01 <0.01	4.6 ~ 1	6.4 ~ 1

Note: all the data about radioactive contamination and chemical pollution are given for specified settlements and are taken from official documents (see References); * SEEAED - summary effective equivalent annual exposition dose; ** the data are given for the settlements of relocation and without it.

Примечание: данные о загрязненности приведены для определенных населенных пунктов и взяты из официальных документов (см. Список источников); *СЭЭГДЭ - средняя эффективная эквивалентная годовая доза экспозиции; ** данные приведены для населенных пунктов, в которых не было проведено отселение, и для мест отселения.

Immediately after placental delivery coagulated blood was removed from organ surface, the placenta was rinsed with cold 0,9% NaCl solution and gently dried between paper towels. Placental tissue was excised from the central part of the organ through all the layers, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C before experimental processing.

После рождения плаценты кровь, которая коагулировала на поверхности органа, удаляли, плаценту промывали холодным физиологическим раствором и просушивали между двумя слоями фильтровальной бумаги. Образцы ткани брали в центральной части органа через все его слои, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C до проведения анализов.

Each sample was accompanied by a personal questionnaire included social and demographic data of woman recently confined such as location and duration of residence, and those about hazardous habits, lifestyle peculiarities, diet, occupation, medication consumption etc. Clinical data about maternal and newborn health status were taken from respective clinical records.

Каждый образец плаценты сопровождался социально-демографическими данными роженицы, сведениями о вредных привычках, характере питания, приеме лекарств и др., Клинические данные о состоянии здоровья матери, протекании беременности и родов, состоянии здоровья новорожденного были получены из истории беременности и из истории новорожденного.

Biochemical assays

Subcellular fractions were prepared by a standard differential centrifugation technique. Microsomes were isolated in a buffer containing 150 mM KCl and 10 mM EDTA (pH 7,4) and suspended in a buffer containing 100 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA and 20% glycerol (pH 7,4) (Honkakoski P., Lang M., 1989).

The major placental detoxification enzyme glutathionetransferase was determined in the cytosolic fraction, S100, by monitoring the conjugate (GSH-CDNB) formation between glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) (Habig W. et al., 1974). One unit (U) of enzymatic activity was considered the amount of enzyme catalyzing the formation of 1 mmol of product (GSH-CDNB) per minute under the conditions of the assays.

Lipid peroxidation intensity was estimated according to content of compounds in homogenates by reaction with thiobarbituric acid (Gavrilov V. et al., 1987).

PAH-DNA adducts were detected in the Competitive Immunochemiluminescence assay (CIA) (Divi R. et al., 2002) using antibodies elicited against DNA covalently bound with benzopyrenediolepoxide (BPDE) ((±)7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene) that are also specific for DNA samples modified with benz(a)anthracene and chrysene (Poirier M. et al., 1980). Every DNA sample was assayed in triplicate at 10 µg/well and percentage of inhibition in reaction of antibody with modified DNA fixed on the bottom of the well was determined. Adducts content values were expressed as the amount of BPDE-DNA that would cause a similar inhibition of reaction in the assay. The detection limit of the assay was 2.2±0.4 adducts/109 nucleotides. For DNA samples with adducts content below the detection limit a value of half the detection limit was assigned. DNA was isolated by standard procedures of lysis, incubation with proteinase K and DNA deproteinization with phenol-chloroform/isoamyl alcohol (Miller S. et al., 1988).

In some representative samples we detected: 7-ethoxycoumarin-O-deethylase activity (ECOD) of microsomal fraction reflecting activity of CYP1A1 (Pasanen M., 1999) with 0.5 mM 7-ethoxycoumarin as a substrate (Grenlee W.F., Poland A., 1978); glutathionetransferase activity before and after treatment of cytosolic fraction with 0.01M dithiothreitol (DTT) (pH 8.0) 1h at 37°C. The fraction was purified from DTT by chromatography on G-25 Sephadex column balanced with 0.1M Na-phosphate buffer - 1 mM EDTA, pH 8.0.

Relative content of GSTP1-specific mRNA was detected by Dot-hybridization with the probe kindly provided by Prof. Kano (Japan). The hybridization signals were normalized by hybridization of the sa

Биохимические исследования

Субклеточные фракции получали стандартным методом дифференциального центрифугирования. Микросомы выделяли в буфере, содержащем 150 mM KCl и 10 mM ЭДТА (pH 7,4), помещали в буфер, содержащий 100 mM калий-фосфат, 1 mM ЭДТА и 20% глицерин (pH 7,4) (Honkakoski P., Lang M., 1989).

В качестве основного показателя состояния детоксикационной системы плаценты определяли ГТ-азную активность цитозольной фракции S100 в реакции образования конъюгата (Глут-ХДНБ) между глутатионом (Глут) и искусственным субстратом 1-хлоро,2,4-динитробензолом (ХДНБ) (Habig W. et al., 1974). За единицу ферментативной активности принимали активность, при которой за одну минуту в условиях проведения реакции образуется 1 мкмоль продукта.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Гаврилов В. и соавт., 1987).

ПАУ-аддукты определяли путем конкурентного иммунохемилюминесцентного анализа (Divi R. et al., 2002) с использованием антител к ДНК, ковалентно связанной с бензпирендиолепксидом ((±)7,8,9,10-дигидрокси-с-9,10 эпокси-7,8,9,10-тетрагидробенз(а)-пирен, ДЭБП)). Метод позволяет выявлять также ДНК, модифицированную другими канцерогенами, включая бенз(а)антрацен и хризен (Poirier M. et al., 1980). Каждый образец ДНК исследовали в трех параллельных пробах по 10 мкг и рассчитывали процент ингибирования реакции антител с модифицированной ДНК, нанесенной на дно лунок в плашке. Содержание аддуктов представляли в виде количества ДНК, модифицированной ДЭБП, которое вызывает ингибирование реакции, сходное с исследуемым образцом. Чувствительность метода составляла 2,2±0,4 аддукта/109 нуклеотидов. Для образцов ДНК с количеством аддуктов ниже определяемого чувствительностью метода принимали значения, равные половине значения чувствительности метода. ДНК выделяли стандартным методом с использованием протеиназы К и фенольной депротенизации (Miller S. et al., 1988).

В ряде представительных образцов определяли: 7-этоксикумарин-О-диэтилазную активность (ECOD) микросомальной фракции, отражающую активность CYP1A1 (Pasanen M., 1999), с использованием 0,5 mM 7-этоксикумарина в качестве субстрата (Grenlee W.F., Poland A., 1978); глутатионтрансферазную активность до и после обработки цитозольной фракции 0,01M дитиотрейтолом (ДТТ) в течение 1 часа при 37°C (pH 8,0). Очистку фракции от ДТТ проводили на колонке с сефадексом G-25, уравновешенном 0,1M Na-фосфатным буфером с 1 mM ЭДТА, pH 8,0.

Относительное содержание GSTP1-специфической мРНК определяли Dot-гибридизацией с зондом, любезно предоставленным проф. Кано (Япония). Для нормализации результатов фильтр отмывали и

me RNA samples with the probe corresponding to 18S rRNA kindly provided by Dr. V. Nosikov (Russia). The probes were radioactively labeled with ³²P in reaction with random primers (Sambrook J. et al., 1989). The radioautographs were subjected to densitometry, then values were normalized according to the ratio of optical densities of GSTP1-specific signal to 18S-specific signal and averaged out within three assays.

The protein concentration was detected with the method by Bradford (Bradford M., 1976).

Data analyses

Statistical analysis was held through the Student's coefficient application, correlation and multiple regression analysis in Statistica software, version 6.0 (Lakin G., 1990; Borovikov V., 2001).

RESULTS

Social, economic, demographic and clinical characteristic of the groups

According to the questionnaires the women whose specimens were taken for investigation did not smoke, drink alcohol and use drugs during the pregnancy. They had no professional contact with xenobiotics. They had middle income, similar lifestyle and diet. All the women but those from the group I lived not less than three years in the indicated territories. Women whose placental samples were assayed and who were former inhabitants of zones of exclusion and obligatory relocation had been in their time resettled to Kiev and Kiev district where they lived till delivery.

Mean age of the recently confined women from the whole cohort was 25.7±0.5 years. Significantly higher mean age was at Kiev citizens (28.4-29.2 years, group IV, V) and lower at citizens from rural areas (22.1±0.8 years, group II, 24.4±1.0, group III) and so called "clean" area (24.6±0.9 years, group VIII) compared to the respective value in the whole cohort. The women with complicated obstetric anamnesis, particularly recurrent early pregnancy losses, infertility in anamnesis were the eldest

повторно гибридизовали с зондом к фрагменту 18S рРНК, любезно предоставленным В. Носиковым (Россия). Зонды метили радиоактивным фосфором (³²P) в реакции полимеризации с рассеянной затравкой (Sambrook J. et al., 1989). Радиоавтографы денситометрировали, значения нормализовали по отношению оптической плотности GSTP1-специфического сигнала к 18S- специфическому сигналу и усредняли по трем параллельным измерениям.

Белок определяли по методу Бредфорда (Bredford M., 1976).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку проводили с использованием методов Стьюдента, корреляционного и множественного регрессионного анализов в программе Statistica, версия 6.0 (Лакин Г., 1990; Боровиков В., 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Социально-экономическая, демографическая и клиническая характеристика групп

По данным вопросников женщины, образцы плаценты которых были взяты для исследования, не курили, не употребляли алкоголь и наркотики в течение беременности. Профессионального контакта с ксенобиотиками не имели. У них были средние доходы, сходный стиль жизни и характер питания. Все они, кроме тех, которые отнесены в первую группу, проживали не менее трех лет на указанных территориях. Бывшие жительницы зон отчуждения и обязательной эвакуации, образцы которых исследованы, были переселены и проживали в г. Киеве и Киевской области до момента родов.

Средний возраст рожениц общей выборки составляет 25,7±0,5 года. У киевлянок (группы IV и V) средний возраст (28,4-29,2 года) оказался достоверно выше, а у рожениц из сельских местностей (группа II, 22,1±0,8 года, группа III,) и из "чистой" зоны (группа VIII, 24,6±0.9 года) достоверно ниже среднего значения для всей выборки. Самыми старшими были роженицы, в анамнезе которых зарегистрированы случаи акушерской патологии, в том числе самопроизвольные аборты и бесплодие в анамнезе (группа V, 29,2±1,5 года) (таблица 2).

SOME CHARACTERISTICS OF MOTHERS AND NEWBORNS IN THE GROUPS OF INVESTIGATION

TABLE 2

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОЖЕНИЦ И НОВОРОЖДЕННЫХ В ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

ТАБЛИЦА 2

Groups	Maternal age, years	Length of newborns, cm	Newborn boys/girls, %	Weight of newborns, g	Apgar score
I	25.1±1.2	53.3±0.5	43%/57%	3733±119	7.5±0.2
II	22.1±0.8	50.5±0.4	83%/17%	3197±93	7.7±0.1
III	24.4±1.0	52.2±0.5	46%/54%	3307±83	8.2±0.1
IV	28.4±1.8	51.5±0.6	64%/36%	3223±128	7.4±0.3
V	29.2±1.5	50.8±0.5	50%/50%	3121±108	7.4±0.2
VI	26.3±1.6	52.8±0.7	—	3293±217	8.2±0.2
VII	25.7±1.4	52.8±0.7	42%/58%	3508±121	7.7±0.3
VIII	24.6±0.9	53.6±0.5	56%/44%	3348±29	9.0±0.2

Note: "-" data not available.

Примечание: "-" данные не известны.

The difference between birth weight of newborns in various groups was not significant. Nevertheless the highest bodyweight and length were fixed at newborns from group I. The Apgar higher score were found in radioecologically "clean" area (group VIII). In the group I, IV and V Apgar score were significantly lower than in other ones (table 2).

Glutathionetransferase activity, relative content of GSTP1-specific mRNA and PAH-DNA adducts in placental specimens

The glutathionetransferase activity in the samples from eight groups revealed a bimodal distribution (figure 1). In groups I, IV-VI the enzymatic activity was in the range 150-204 nmol r mg protein-1 r min-1. In the II, III, VII and VIII groups of the samples from less contaminated areas the glutathionetransferase activity was in the range 271-310 nmol r mg protein-1 r min-1 (figure 1). Multiple regression analysis has shown that glutathionetransferase activity correlates with ambient air pollution by B(a)P (linear regression coefficient $b = - 0.44$; $p < 0.001$) and with value of summary effective equivalent annual expositional dose (SEEAED) ($b = - 0.28$; $p = 0.004$). The lower GST activity corresponded to the higher PAH-DNA adduct content in DNA (figure 1). Correlation analysis results indicate high degree of inverse association between mean values of both indices (Pearson's correlation index $r = - 0.86$, $p = 0.006$) (figure 2).

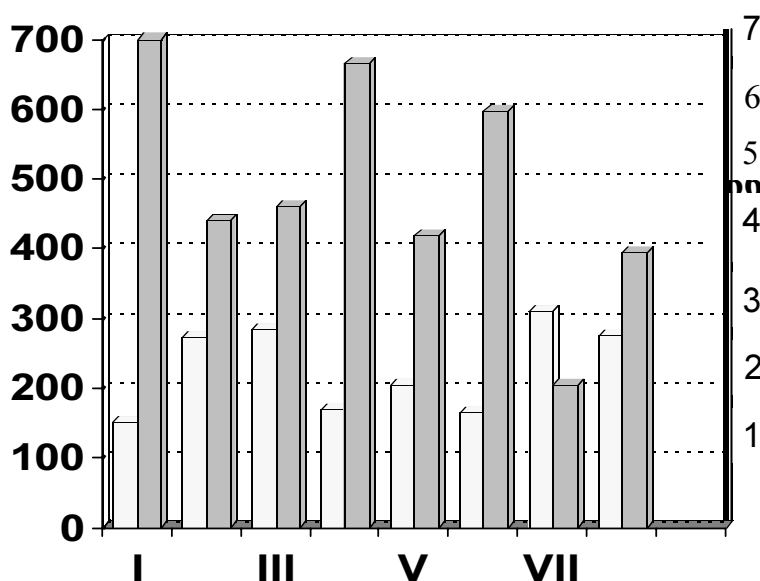
По массе тела новорожденные из разных групп достоверно не отличаются между собой. Однако, самые большие рост и масса обнаружены у новорожденных в группе I. Показатель шкалы Апгар был наиболее высоким в условно чистом регионе (группа VIII). В группах I, IV и V показатели шкалы Апгар были достоверно ниже, чем в других (таблица 2).

Глутатионтрансферазная активность, содержание GSTP1-специфической мРНК и ПАУ-аддукты ДНК в образцах плаценты

Глутатионтрансферазная активность общей выборки имеет бимодальное распределение (рисунок 1). Ее значения находятся в пределах 150-204 нмоль г мг белка-1 г мин-1 в группах I, IV-VI. В группах II, III, VII и VIII ГТ-азная активность колеблется в пределах 271,9-310,0 нмоль г мг белка-1 г мин-1 (рисунок 1). Множественный регрессионный анализ показал, что ГТ-азная активность коррелирует с загрязнением воздуха бензо(а)пиреном (коэффициент линейной регрессии $b = - 0,44$, $p < 0,001$) и с величинами средней эффективной эквивалентной годовой дозой экспозиции (СЭЭГДЭ) ($b = - 0,28$ и $p < 0,004$). Меньшей ГТ-азной активности соответствует большее содержание ПАУ-аддуктов в ДНК (рисунок 1). Результаты корреляционного анализа обнаруживают высокую степень зависимости между среднеарифметическими показателями обеих величин (коэффициент корреляции Пирсона $r = - 0,85$; $p = 0,006$) (рисунок 2).

FIGURE 1. CYTOSOLIC GLUTATHIONETRANSFERASE ACTIVITY AND PAH-DNA ADDUCTS IN PLACENTAL SAMPLES FROM DIFFERENT GROUPS OF INVESTIGATION

РИСУНОК 1. ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИТОЗОЛЯ И СОДЕРЖАНИЕ ПАУ-АДДУКТОВ В ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ ПЛАЦЕНТЫ РАЗНЫХ ГРУПП ИССЛЕДОВАНИЯ

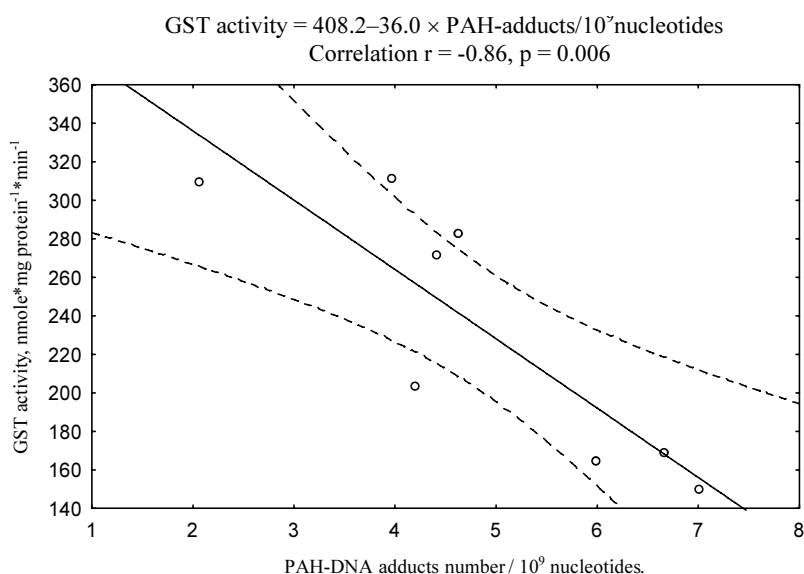


Note. Ordinate: left - cytosolic GST activity, nmol of GSH-CDNB × mg protein⁻¹ × min⁻¹ (rare dots), right: content of PAH-DNA adducts /109 nucleotides (frequent dots); abscissa: number of group

Примечание. По оси ординат: слева - ГТ-азная активность цитозоля, нмоль ГТ-ХДНБ × мг белка⁻¹ × мин⁻¹ (редкие точки), справа - содержание ПАУ-аддуктов в ДНК/109 (частые точки). По оси абсцисс - группы образцов.

FIGURE 2. CORRELATION BETWEEN MEAN VALUES OF CYTOSOLIC GLUTATHIONETRANSFERASE ACTIVITY AND PAH-DNA ADDUCTS CONTENT IN PLACENTAL SAMPLES FROM DIFFERENT GROUPS

РИСУНОК 2. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СРЕДНЕАРИФМЕТИЧЕСКИМИ ЗНАЧЕНИЯМИ ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОЗОЛЯ И СОДЕРЖАНИЕМ ПАУ - АДДУКТОВ В ДНК В ОБРАЗЦАХ ПЛАЦЕНТЫ ИЗ РАЗНЫХ ГРУПП



Note. Ordinate: cytosolic GST activity, nmole of GS-CDNB × mg protein⁻¹ × min⁻¹, abscissa: content of PAH-DNA adducts /10⁹ nucleotides.

Примечание. По оси ординат - ГТ-азная активность цитозоля, нмоль ГТ-ХДНБ × мг белка⁻¹ × мин⁻¹; по оси абсцисс - количество ПАУ-ДНК аддуктов/10⁹ нуклеотидов.

The dithiotreitol (DTT) ability to restore cytosolic glutathionetransferase activity in vitro varied in different groups. After DTTtreatment GSTactivities in the specimens from radioactively contaminated and radioactively and chemically contaminated areas (groups I-V) increased 1.3-1.5 times, while in the specimens from highly chemically polluted area (group VI) it increased 2.5 times. The samples from these groups differed both in relative amount of GSTP1-specific mRNA in nonfractionated total placental RNA. It is approximately 3times lower in the specimens from radioactively highly exposed women (group I) and 6times higher in the specimens from inhabitants of chemically highly contaminated area (group VI) in comparison with "clean" area (group VIII) (figure 3).

Ethoxycoumarin O-deethylase activity and TBARS content in placental specimens from different groups

Ethoxycoumarin O-deethylase activity was measured in the specimens from several groups and the values were compared with those obtained in conditionally "clean" regions (9.9 ± 1.9 pmol × mg protein⁻¹ × min⁻¹). In the specimens from radioactively highly exposed women (group I) and from the women with obstetrical pathology (group V) ECODactivity values were nearly 2.5 times higher than those from the "clean" area and consisted 25.5 ± 5.8 and 24.6 ± 6.6 pmol × mg protein⁻¹ × min⁻¹, respectively. In the specimens from highly polluted area (group VI) ECOD activity was 70.3 ± 13.7 pmol × mg protein⁻¹ × min⁻¹ nearly 5 - 7 times higher than from the "clean" area. In the specimens from the area with lower SEEAED and from Kiev with mixed pollution

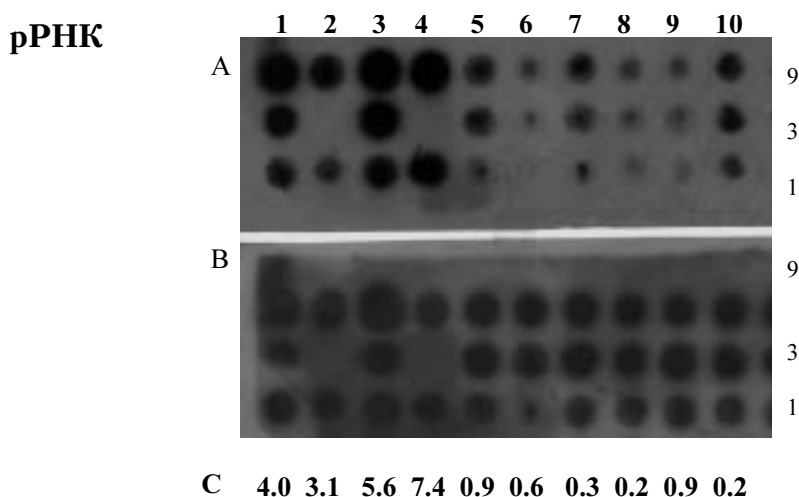
Восстановительное действие дитиотрейтола (ДТТ) на ГТ-азную активность цитозоля по-разному проявляется в образцах из разных групп. Если в результате обработки ДТТ в образцах из радиоактивно загрязненных территорий и территорий со смешанным загрязнением (группы I - V) ГТ-азная активность повышается в 1,3 - 1,5 раза, то в образцах с выраженным химическим загрязнением (группа VI) она повышается в 2,5 раза. Образцы из этих групп отличаются между собой и по относительному содержанию GSTP1-специфической мРНК. Оно снижено примерно в 3 раза в образцах из районов с радиоактивным загрязнением (группа I) и повышено приблизительно в 6 раз в образцах из районов с химическим загрязнением (группа VI) по сравнению с условно чистым районом (группа VIII) (рисунк 3).

Этоксикумарин-О-диэтилазная активность и содержание ТБК-реагирующих соединений в образцах из разных групп

Этоксикумарин-О-диэтилазную активность определяли в образцах из нескольких групп, и полученные величины сравнивали с показателями образцов из условно чистого района, где она составляла 9,9 ± 1,9 пмоль × мг белка⁻¹ × мин⁻¹. В образцах от интенсивно облученных женщин (группа I) и от рожениц с акушерской патологией (группа V) величины ECOD активности выше примерно в 2,5 раза, чем в условно "чистой" зоне, и составляют 25,5 ± 5,8 и 24,6 ± 6,6 пмоль × мг белка⁻¹ × мин⁻¹, соответственно. В образцах из района с выраженным химическим загрязнением (группа VI) величины ECOD активности примерно в 5 - 7 раз выше, чем в "чистой" зоне, и составляют 70,3 ± 13,7 пмоль × мг белка⁻¹ × мин⁻¹. В образцах из районов с низкими дозами СЭЭГДЭ и со смешанным харак-

FIGURE 3. RADIOAUTOGRAPHS OF HYBRIDIZATION SIGNALS OF GSTP1-SPECIFIC mRNA (A) AND 18S rRNA (B) IN TOTAL PLACENTAL RNA

РИСУНОК 3. РАДИОАВТОГРАФ РЕЗУЛЬТАТОВ ГИБРИДИЗАЦИИ НЕФРАКЦИОНИРОВАННОЙ ПЛАЦЕНТАРНОЙ РНК С ЗОНДАМИ, СПЕЦИФИЧЕСКИМИ К GSTP1 мРНК (А) И ¹⁸S рРНК (В)



Note. 1, 3 and 9 micrograms of total RNA were loaded; C - ratio between intensity of GSTP1-specific (A) and 18SrRNA-specific (B) signals; bands designated in upper row correspond to RNA samples from group VI (1-4), group VIII (5-7, 10) and group I (8, 9).

Примечание. Каждая РНК нанесена в виде трех пятен, содержащих 1, 3 и 9 микрограмм; C - отношение интенсивности GSTP1-специфического гибридационного сигнала (А) к интенсивности 18S рРНК-специфического гибридационного сигнала (В); дорожки: 1-4 - РНК из образцов плацент VI группы; 5-7, 10 - РНК из образцов плацент VIII группы; 8, 9 - РНК из образцов плацент I группы.

ECOD activities were at intermediate level, $39.0 \pm 8.3 \text{ pmol} \times \text{mg protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Among all the groups two were distinguished by thiobarbituric reactive substances (TBARS) content: group I in which it consisted $127.1 \pm 16.3 \text{ mmol/g tissue}$, and group V with obstetrical pathology in anamnesis, in which it consisted $26.1 \pm 2.8 \text{ mmol/g tissue}$, and correspondingly were two times higher and lower than values in other groups ($52.6\text{-}58.0 \text{ mmol/g tissue}$).

Correlation between placental glutathionetransferase activity and indices of maternal and newborn health status

The statistical analysis of data has shown that cytosolic glutathionetransferase activity correlates with Apgar's score and with the frequency of obstetrical pathological cases. The higher is glutathionetransferase activity the higher is Apgar's score (Pearson's coefficient $r = 0.34$; $p < 0.001$). More weak but significant inverse correlation is revealed between GST activity and maternal age ($r = - 0.2$; $p = 0.03$). Weak inverse correlation was found also between GST activity and frequency of several pathological cases: menacing abortion ($r = - 0.21$; $p = 0.017$), anemia ($r = - 0.19$; $p = 0.026$), intra- uterine fetal hypoxia ($r = - 0.17$; $p = 0.046$). If to combine anemia and hypoxia as the cases with similar oxygen insufficiency then indicated correlation becomes more pronounced ($r = - 0.24$; $p = 0.006$). Correlation was also found between GST activity and the number of medical abortions in anamnesis ($r = - 0.23$; $p = 0.036$). But none of the following cases, early and late gestosis, oligo-

тером загрязненности значения ECOD активности составляли $39.0 \pm 8.3 \text{ пмоль} \times \text{мг белка}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$.

По содержанию ТБК-реагирующих соединений среди всех образцов резко выделяются образцы из двух групп - из I, где оно составляет $127,1 \pm 16,3 \text{ мкмоль/г ткани}$, и из V группы с акушерской патологией в анамнезе ($26,1 \pm 2,8 \text{ мкмоль/г}$), и соответственно примерно в 2 раза выше и ниже значений в остальных группах, где они колеблются в пределах между 52,6 и 85,0 мкмоль/г ткани.

Корреляция между глутатионтрансферазной активностью в плаценте и клиническими показателями матери и новорожденного

Проведенный анализ показал, что ГТ-азная активность цитозольной фракции коррелирует с показателями шкалы Апгар и частотой случаев акушерской патологии. Чем выше ГТ-азная активность, тем выше показатели шкалы Апгар (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,34$; $p < 0,001$). Более слабая, но негативная корреляция выявлена между ГТ-азной активностью и возрастом матери ($r = - 0,2$; $p < 0,03$). Кроме того, слабая достоверная негативная корреляция обнаружена со следующими нозологическими единицами: угроза прерывания беременности ($r = - 0,21$; $p < 0,017$), анемия беременных ($r = - 0,19$; $p < 0,026$), внутриутробная гипоксия плода ($r = - 0,17$; $p < 0,046$). Если объединить анемию и гипоксию как состояния, для которых характерна кислородная недостаточность, то корреляция становится более выраженной ($r = - 0,24$; $p < 0,006$). Выявлена также достоверная корреляция ГТ-азной активности с количеством медицинских аборт в анамнезе рожениц ($r = - 0,23$; $p < 0,036$) при отсутствии связи с

hydramnion, polyhydramnion, premature release of amniotic fluid, weakness of labor activity, bleeding, spontaneous abortion, revealed a significant correlation with GST activity.

DISCUSSION

The obtained results evidence that placental glutathionetransferase activity is an integral index. It reflects the rate of environmental contamination with either radionuclides or chemicals or both, because the more hazardous substances are in the environment the more decreased is glutathionetransferase activity. Placental GST activity is associated with maternal health status that is confirmed by statistically significant correlation with the frequency of some pathological cases in the course of pregnancy, with peculiarities of obstetrical anamnesis and even with maternal age. Changes in glutathionetransferase activity are highly inversely correlated with the level of PAH-DNA adducts. Glutathionetransferase activity positively correlates with Apgar's score thus reflecting its indirect association with newborn health status.

In this study the most pronounced effect on GST activity exhibits the chemically polluted environment followed by radioactive contamination (to the less extent). The status of mother health has significant but less pronounced effect than the above mentioned factors. The most pronounced consequence of glutathionetransferase activity down-regulation is the accumulation of PAH-DNA adducts with their potential risk for newborns. High sensitivity of glutathionetransferase activity to different inner and outer factors may be explained by complex regulatory mechanisms of gene expression and enzyme activity (Knapen M. et al., 1999).

The similarity of glutathionetransferase activity down-regulation and increase of PAH-DNA adducts level in the samples from radioactively and chemically highly exposed pregnancies raises the question about specific role of each factor in these changes. It appears that there are some differences between both groups in other indices. The parallel studies with the samples from group I revealed the presence of ^{137}Cs in the range 1.2-1.8 Bq/kg placental weight (Zadorozhna T.D. et al., 1993). It means the presence of exogenous irradiation on top of endogenous sources in the heavily exposed pregnancies. No radionuclides were found in samples from Zaporizhzhia city. Moreover, significantly higher level of TBARS in samples from group I reflects the active process of lipid peroxidation, being a typical hallmark of radioactive irradiation damage (Bacq Z.M., Alexander P., 1963; Vladimirov Yu.A., Archakov A.I., 1971) though its not sole prerogative. Thus, the short-term exposure to high doses of ionizing radiation with following chronic internal one and probably external irradiation seems to be the probable reason of the phenotype changes. It should be noted that our data about the down-regulation of

такими типами патологии как ранние и поздние токсикозы, мало- и многоводие, преждевременное отхождение околоплодных вод, слабость родовой деятельности, кровотечения, спонтанные аборт.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГТ-азная активность плаценты и ПАУ-аддукты являются интегральными показателями. С одной стороны они отражают степень загрязненности окружающей среды, так как чем она (загрязненность) выше, тем в большей степени снижена ГТ-азная активность и большее количество ПАУ-аддуктов накапливается в ДНК плаценты. С другой стороны ГТ-азная активность плаценты коррелирует с состоянием здоровья матери, что подтверждается достоверными коэффициентами корреляции с частотой некоторых патологических отклонений в течение беременности, с акушерской предысторией и даже с возрастом матери. Опосредованная связь между ГТ-азной активностью и состоянием новорожденного подтверждается ее положительной корреляцией со шкалой Апгар.

В нашем исследовании наиболее сильное влияние на ГТ-азную активность оказывают загрязненная химическими соединениями атмосфера, менее сильное - радиоактивное облучение. Влияние здоровья матери менее выражено по сравнению с перечисленными факторами. Наиболее существенным следствием сниженной ГТ-азной активности является накопление ПАУ-аддуктов в ДНК и связанное с ним появление угрозы для новорожденного. Высокую чувствительность ГТ-азной активности к различным внутренним и внешним факторам можно объяснить многообразием способов регуляции экспрессии гена GSTP1 и активности фермента (Knapen M. et al., 1999).

Учитывая то, что в наиболее загрязненных радионуклидами и бензо(а)пиреном районах, ГТ-азная активность и ПАУ-аддукты численно одинаковы, возникает вопрос о специфической роли каждого из факторов в этих изменениях. Между образцами из этих районов выявлен ряд различий по нескольким другим показателям. В параллельных исследованиях в образцах из группы I был обнаружен изотоп ^{137}Cs в количестве от 1,2 до 1,8 Бк/кг веса (Задорожна Т. и соавт., 1993). Это означает, что на фоне внешнего облучения происходит также хроническое внутреннее облучение низкими дозами. В образцах из г. Запорожье радионуклиды обнаружены не были. Значительно более высокое содержание ТБК-реагирующих соединений в образцах I группы отражает активность перекисного окисления липидов, что является характерным следствием облучения (Bacq Z.M., Alexander P., 1963; Vladimirov Yu.A., Archakov A.I., 1971), хотя и его не единственной prerogative. Таким образом, кратковременное облучение высокими дозами с последующим хроническим внутренним и, возможно, внешним облучением являются вероятной причиной изменений фенотипа. Наши данные относительно снижения активности ГТ-азы в ответ на действие ра-

glutathionetransferase activity in response to high radioactive exposure are in line with experiments showing down-regulation of GST activity in response to long-lasting irradiation (Jendryczko A., Drordz M., 1992; Baraboi V. et al., 1994). The shift in redox balance towards acidic state due to intensified lipid peroxidation may explain the observed decrease in ECOD activity. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) that binds to xenobiotic response element in CYP1A1 promoter, and induces the gene transcription is highly sensitive to redox potential. In oxidized form its inducing activity is lower that leads to down-regulation of CYP1A1 expression and respectively the amount of monooxygenized products. This in turn may lead to less intensive induction of GSTP1 gene by metabolites of I phase detoxification (Talalay P., 1988). The decrease of relative amount of GSTP1-specific mRNA in total nonfractionated placental RNA and GSTP1-specific antigen in syncytiotrophoblast (Obolenskaya M.Yu. et al., 1997) coincide with suggested scenario in pregnancies from women exposed to high doses of ionizing radiation.

It is known that GSTP1 activity strongly depends on the redox state of its functional SH-groups (Ricci G. et al., 1991), on content and redox state of intracellular low-molecular weight thiols, mainly glutathione (Nishihara T. et al., 1991). As we reported previously about lower content of reduced low-molecular weight thiols in the specimens from the I group (Obolenskaya M.Yu. et al., 1997), the down-regulation at posttranslational level may be additional cause of decreased enzymatic activity.

Thus it seems plausible that high radioactive exposure of the women from areas later assigned to the zones of exclusion and obligatory relocation with consequent internal and probably external exposure to low doses of ionizing radiation during 5-6 years primarily caused the down-regulation of detoxification enzymes activity. This made the conditions for accumulation of PAH-DNA adducts originating from ubiquitous hydrocarbon incomplete combustion products, including those from indoor air and diet even if their content in ambient air is not too high. Exposition to low doses of ionizing radiation both during the Chernobyl NPP accident and following 7-15 years are not so drastic for GST-activity and content of PAH-DNA adducts.

The scenario for decrease of GST activity and accumulation of PAH-DNA adducts in the chemically polluted area including that by B(a)P in ambient air obviously differs from just mentioned above. The observed increase of ECOD activity that is typically induced by PAH leads to more intensive formation by CYP1A1 of oxidized products that may in its turn activate GSTP1 transcription (Talalay P., 1988). The suggested sequence of events coincides with increase of relative amount of GSTP1 specific mRNA in the samples received in group VI. Significant restoration of glutathionetransferase activity after in vitro treat-

диции совпадают с результатами, полученными в экспериментах на крысах (Jendryczko A., Drordz M., 1992; Барабой В.А. и соавт., 1994). Сдвиг в окислительно-восстановительном равновесии в кислую сторону как результат активного перекисного окисления липидов может определять наблюдаемое снижение ECOD активности. Арилуглеводородный рецептор AhR, который связывается с элементом ответа на ксенобиотики в промоторной области гена CYP1A1 и индуцирует его, высоко чувствителен к редокс-потенциалу. В окисленной форме его индуцирующая способность снижена, что влечет за собой снижение экспрессии гена. Это, в свою очередь, приводит к образованию меньшего количества продуктов монооксигенного окисления и к снижению индукции гена GSTP1 метаболитами I фазы детоксикации (Talalay P., 1988). Уменьшение относительного содержания GSTP1-специфической мРНК в составе нефракционированной РНК плаценты и GSTP1-специфического антигена в синцитиотрофобласте (Obolenskaya M.Yu. et al., 1997) согласуется с предполагаемыми событиями во время беременности в организме облученных женщин.

Известно также, что активность GSTP1 сильно зависит от того, в каком состоянии находятся ее функционально активные SH-группы (Ricci G. et al., 1991) и низкомолекулярные тиолы клетки, в частности, глутатион (Nishihara T. et al., 1991). Как мы сообщали ранее, содержание восстановленных низкомолекулярных тиолов в образцах из I группы снижено (Obolenskaya M.Yu. et al., 1997). В связи с этим нарушение фермента на посттрансляционном уровне может быть дополнительной причиной снижения его активности.

Таким образом, представляется вероятным, что высокая доза облучения, которую получили жительницы районов, позднее вошедших в зону отчуждения и обязательной эвакуации, и хроническое внутреннее и, возможно, внешнее облучение низкими дозами в течение последующих 5-6 лет, привело к снижению активности ферментов детоксикационной системы. Это создало условия для накопления в ДНК ПАУ-аддуктов, источником которых могут быть повсеместно распространенные продукты неполного сгорания углеводородов, даже если их содержание в атмосферном воздухе невелико. Облучение меньшими дозами, как во время аварии, так и в течение последующих 7 - 15 лет не приводит к снижению ГТ-азной активности и к накоплению ПАУ-аддуктов в ДНК.

Сценарий, по которому развивается снижение ГТ-азной активности и накопление аддуктов в районе с высоким содержанием Б(а)П в атмосфере, по-видимому, отличается от только что описанного. Наблюдаемое повышение ECOD активности, типично индуцируемое Б(а)П, приводит к образованию большего количества окисленных CYP1A1 продуктов, способных активировать транскрипцию гена GSTP1 (Talalay P., 1988). Эта предполагаемая цепь событий согласуется с увеличением относительного содержания GSTP1-специфической мРНК в образцах из VI группы. Существенное

ment by DTT evidences that enzymatic activity in these samples is partly inhibited. The rather high B(a)P ambient air pollution (see table 1) may be a severe factor resulting in such biochemical changes. Benzo(a)pyrene metabolites interact with highly reactive thiol groups present in glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (Holzer H., Holzer E., 1952) and may be also with those in glutathionetransferase without strongly affecting the relatively high intracellular content of glutathione (Cervello I. et al., 1992). Thus, it is possible that disbalance between enzymatic activities of CYP1A1 and GSTP1 occurs in placentas from area with high B(a)P pollution in ambient air. This effect finally defines PAH-DNA adducts accumulation.

Placental PAH-DNA adducts as biomarkers of environmental pollution are already well known (Manchester D. et al., 1988; Manchester D. et al., 1992; Carlberg et al., 2000). Their association with GST activity however remains till now less evident. There are observations made by M. Pasanen and coauthors (1999) on placentas in Swiss mothers abusing drugs and by R. Whyatt and coauthors (2000) on newborn white blood cells regarding the variability in GSTP1 genotype thus resulting in different enzymatic activity. High correlation degree of GST activity with content of PAH-DNA adducts in our study together with data from mentioned above published papers indicate that at the presence of PAH pollution in indoor or ambient air or in diet the decrease of GST activity because of whatever reason (radionuclide contamination, drugs, PAH, diseases, age, genotype etc.) leads to the accumulation of adducts. Thus we cannot rule out that this association is not attributable to chance or uncontrolled confounding and that GST activity is not a nonspecific indicator of unfavorable factors impact.

As PAH readily cross the human placenta (Manchester D. et al., 1992; Carlberg J. et al., 2000; Whyatt R. et al., 2000) it has been suggested that the presence of DNA adducts in fetal tissues may predispose to developmental infringements and increased morbidity later in postnatal life (Hansen J. et al., 1993). Some authors reported about reverse association between PAH-DNA adducts level in newborns with their birth weight, length and head circumference (Perera F. et al., 1998). Our data confirm the indirect association between placental detoxification efficiency and newborn health status via positive correlation of GST activity with Apgar's score.

Thus GST enzymatic activity may be used not only as an indicator of unfavorable impact on placental metabolism, but also as a biomarker of placental detoxification efficiency and risk factor for newborns.

восстановление активности ГТ-азы *in vitro* под действием ДТТ свидетельствует о частичном подавлении ферментативной активности в этих образцах. Достаточно высокое содержание Б(а)П в атмосфере (см. таблицу 1) может быть серьезным фактором, вызывающим эти изменения. Возможно, что по аналогии с глицеральдегидфосфат дегидрогеназой (Holzer H., Holzer E., 1952) окисленные производные Б(а)П могут связываться с реакционноспособными SH-группами ГТ-азы и ингибировать ее, при этом не влияя на достаточно высокое содержание низкомолекулярных восстановленных тиолов (Cervello I. et al., 1992). Таким образом, при высоком содержании Б(а)П в воздухе возникает дисбаланс между активностью ферментов первой и второй стадий детоксикации, что и определяет накопление в ДНК ПАУ-аддуктов.

ПАУ-аддукты в ДНК плаценты как биомаркеры загрязненности окружающей среды известны уже давно (Manchester D. et al., 1988; Manchester D. et al., 1992; Carlberg et al., 2000). Однако их корреляция с ГТ-азной активностью до сих пор была не столь очевидной. Есть сообщения М. Пасанена и соавт. (1999) о такой корреляции в плацентах женщин, употребляющих наркотики, и Р. Вайатт и соавт. (2000) о зависимости уровня аддуктов в лейкоцитах новорожденных от генотипа GSTP1, определяющего активность фермента. Высокая степень корреляции между ГТ-азной активностью и содержанием ПАУ-аддуктов в ДНК плаценты в нашем исследовании и данные перечисленных сообщений свидетельствуют о том, что при наличии ПАУ в атмосфере окружающей среды, жилых помещений или в диете снижение ГТ-азной активности независимо от причины ее вызывающей (радионуклиды, наркотики, ПАУ, заболевания, возраст, генотип и т.д.) приводит к накоплению аддуктов. В связи с этим ГТ-азную активность плаценты можно рассматривать как неспецифический индикатор влияния неблагоприятных факторов.

Так как ПАУ легко проникают через плаценту (Manchester D. et al., 1992; Carlberg J. et al., 2000; Whyatt R. et al., 2000), было высказано предположение, что наличие ПАУ в тканях плода может инициировать нарушения развития и повышенную заболеваемость в постнатальном периоде (Hansen J. et al., 1993). Имеются сообщения о негативной корреляции между содержанием ПАУ-аддуктов у новорожденных и их весом, ростом и окружностью головы (Perera F. et al., 1998). Наши данные на основании положительной корреляции между ГТ-азной активностью и шкалой Апгар свидетельствуют о связи между эффективностью детоксикации в плаценте и здоровьем новорожденных.

Таким образом, ГТ-азная активность является показателем не только неблагоприятного влияния на метаболизм в плаценте, но и показателем эффективности детоксикации в плаценте и степени риска для новорожденного.

CONCLUSIONS

1. Placental glutathionetransferase activity and level of PAH-DNA adducts content in placental tissue are the integral indices of environmental pollution, efficiency of maternal and placental detoxification and a prognostic factor for newborn.
2. Down-regulation of GST activity and accumulation of placental PAH-DNA adducts can occur according to different scenarios depending on which environmental factor influence is greater i.e. radiation or chemicals (B(a)P).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Galina Demchenko and the body of obstetrical department of the Third Zaporizhzhia Clinic (Ukraine) and Dr. Alexander Perepletchikov M.D. and the body of obstetrical department of Gomel Province Clinic (Belarus) for assistance in placental specimens sampling. Studies were supported by fellowship to M.O. and N.T. from Kasa im. Mianowskiego (Poland) and to M.O. from UICC, ICRETNo.580.

REFERENCES

- Бак З.М., Александр П. Основы радиобиологии (ред. Варшавский Я.). Иностран. Лит., М., 1963, 500 стр.
- [Bacq Z.M., Alexander P. Fundamentals of Radiobiology. (Varshavsky Ya. Ed.). Inostr. Lit., M., 1963, 500 pp]
- Барабой В.А., Олійник С.А., Хмелевський Ю.В. Стан антиоксидантної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності. Укр. біохім. журн. 1994; 66: 3-18.
- [Baraboi V.A., Oliynik S.A., Khmelevsky Yu. V. The state of physiological antioxidant system at low doses and low intensity of ionizing radiation doses. Ukr. Biochem. J. 1994; 66: 3-18]
- Боровиков В. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. Питер, СПб. 2001, 656 стр.
- [Borovikov V. STATISTICA: the scale of analysis the data on computer. For professionals. Piter, SPb., 2001: 656 pp]
- Владимиров Ю.А., Арчаков И.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Наука, М. 1972, 252 с.
- [Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation in biological membranes. Nauka, M., 1971, 252 pp]
- Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. Вопросы мед. химии. 1987; 33: 118-122.
- [Gavrilov V.B., Gavrilova A.P., Mazhul L.M. Comparative analysis of tests for lipid peroxidation products in serum with the help of thiobarbituric

ВЫВОДЫ

1. ГТ-азная активность и ПАУ-аддукты в ДНК плаценты являются интегральными показателями загрязненности окружающей среды, эффективности детоксикации организмом матери и плацентой, а также прогностическим фактором для новорожденного.
2. Снижение ГТ-азной активности и накопление ПАУ-аддуктов в ДНК плаценты происходит по разным сценариям в зависимости от того какой из неблагоприятных факторов окружающей среды является преобладающим - радиационный или химический Б(А)П.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы выражаем благодарность д-ру Галине Демченко и коллективу акушерского отделения третьей больницы г. Запорожье (Украина) и к.м.н. Александру Переплетчикову и коллективу акушерского отделения Гомельской областной больницы (Белоруссия) за помощь при взятии материала. Исследования поддержаны стипендиями Кассы Миановского (Польша) для М.О. и Н.Т. и стипендией UICC, ICRETNo.580 для М.О.

- acid. Voprosy Med. Chimii, 1987; 33: 118-122]
- Задорожна Т.Д., Лукьянова О.М., Ченшов Д., Антипкин Ю.Г., Диденко Л.В., Естщенко О., Яковлев О.О., Бомко О.И., Журавель А.О. Морфологічні зміни в плаценті та у здоров'ї дітей під впливом низьких доз випромінення. Педіатрія, акушерство і гінекологія, 1993; 2: 8-11.
- [Zadorozhna T.D., Lukianova O.M., Chenshow D., Antipkin Y.G., Didenko L.V., Yestschenko O., Yakovlev O.O., Bomko O.I., Zhuravel A.O. Morphological changes in placenta and the children's health under the influence of low dose irradiation. Pediatrics, Obstet Gynecol., 1993; 2: 8-11.]
- Лакин Г.Ф. Биометрия. Высшая школа, М. 1990, 352 стр.
- [Lakin G.F. Biometrics. High School, M., 1990, 352 pp]
- Официальные источники:**
[Official sources:]
- а). Atlas of caesium deposition on Europe after the Chernobyl accident. Luxembourg, Office for Official Publication of the European Communities. 1998, Ukraine, Plate 19;
- б). Дозиметрическая паспортизация населенных пунктов Украины, подвергнувшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии в Чернобыле. Министерство Здравоохранения Украины, 1993, 178 стр.
- [Dosimetric passportisation of the settlements of Ukraine exposed to radioactive contamination in result of Chernobyl accident. Ministry of Health of Ukraine. 1993. 178p.]
- с) Список населенных пунктов и объектов на радиационно загрязненных территориях. Совет Министров Республики Беларусь. Минск. 2003.

[The list of settlements and the objects in the radioactively contaminated territories. Council of Ministers of Belarus Republic, Minsk, 2003.]

d) Данные Гидрометеослужбы

[Data from Hydrometeoservice]

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976; 72: 248-254.

Carlberg C.E., Moller L., Paakki P., Kantola M., Stockmann H., Purkunen R., Wagner P., Lauper U., Kana M., Elovaara E., Kirkinen P., Pasanen M. DNA adducts in human placenta as biomarkers for environmental pollution, analysed by the 32P-HPLC method. *Biomarkers*, 2000; 5: 182-191.

Cervello I., Lafuente A., Giralt M., Mallol J. Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. *Placenta*, 1992; 13: 273-280.

Divi R.L., Beland F.A., Fu P.P., Von Tungeln L.S., Schoket B., Camara J.E., Ghei M., Rothman N., Sinha R., Poirier M.C. Highly sensitive chemiluminescence immunoassay for benzo[a]pyrene-DNA adducts: validation by comparison with other methods, and use in human biomonitoring. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 2043-2049.

Greenlee W.F., Poland A. An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1978; 205: 596-605.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974; 249: 7130-7139.

Hansen C., Asmussen I., Autrup H. Detection of carcinogen-DNA adducts in human fetal tissue by the 32P-postlabeling procedure. *Env. Health Perspect.*, 1993; 99: 229-231.

Holzer H., Holzer E. Zum Reaktionsmechanismus der Triosephosphat-dehydrierung. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1952; 291: 67-70.

Honkakoski P., Lang M.A. Mouse liver phenobarbital-inducible P450 system: purification, characterization and differential inducibility of four cytochrome P450 isozymes from D2 mouse. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1989; 273: 42-57.

Jendryczko A., Drordz M. Effect of low dose ionizing irradiation on rat metabolism. *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health*, 1992; 5: 251-256.

Knäpen M.F.C.M., Zusterzeel P.L.M., Peters W.H.M., Steegers E.A.P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *Europ. J. Obstetrics & Gynecology and Reprod. Biol.*, 1999; 82: 171-184.

Lutz W.K. In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutat Res.*, 1979; 65: 289-356.

Manchester D.K., Weston A., Choi J.-S., Trivers

G.E., Fennesey P.V., Quintana E., Farmer P.B., Mann D.L., Harris C.C. Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 9243-9247.

Manchester D.K., Bowman E.D., Parker N.B., Caporaso N.E., Weston A. Determinants of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta. *Cancer Res.*, 1992; 52: 1499-1503.

Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.*, 1985; 57: 357-417.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988; 16: 1215.

Nishihara T., Maeda H., Okamoto K., Oshida N., Mizoguchi Y., Terada T. Inactivation of human placenta glutathione-S-transferase by SH/SS exchange reaction with biological disulfides. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1991; 174: 580-585.

Obolenskaya M.Yu., Tschaiikovskaya T.L., Lebedeva L.M., Macewicz L.L., Didenko L.V., Decker K. Glutathione status of placentae from differently polluted regions of Ukraine. *Eur. J. Obstetrics & Gynecol. Reprod. Biol.*, 1997; 71: 23-30.

Pasanen M. The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999; 38: 81-97.

Perera F.P., Whyatt R.M., Jedrychowski W., Rauh V., Manchester D., Santella R.M., Ottman R. Recent developments in molecular epidemiology: A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. *Am. J. Epidemiol.*, 1998; 147: 309-314.

Poirier M.C., Santella R., Weinstein I.B., Grunberg D., Yuspa Sh. Quantitation of benzo(a)pyrene-deoxyguanosine adducts by radioimmunoassay. *Cancer Res.*, 1980; 40: 412-416.

Ricci G., Del Boccio G., Pennelli A., Lo Bello M., Petruzzelli R., Caccuri A.M., Barra D., Federici G. Redox forms of human placenta glutathione transferase. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 21409-21415.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2-nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, V1, 3.

Talalay P., De Long M.J., Prochaska H.J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 8261-8165.

Whyatt R.M., Perera F.P., Jedrychowski W., Santella R.M., Garte S., Bell D.A. Association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct levels in maternal and newborn white blood cells and glutathione S-transferase P1 and CYP1A1 polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2000; 9: 207-212.

Zeisig M., Moller L. 32P-HPLC suitable for characterization of DNA adducts formed in vitro by polycyclic aromatic hydrocarbons and derivatives. *Carcinogenesis*, 1995; 16: 1-9.