**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΘΕΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ»**

**MSc: "Environment and Health. Capacity building for decision making"**

**Επιστημονική Υπεύθυνη και Διευθύντρια ΠΜΣ**

**Αν. Καθ. Πολυξένη Νικολοπούλου-Σταμάτη**

# ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΔΙΟΞΙΝΩΝ (AHR) ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ-ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ & -ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ & ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΞΗΣ

# INTERACTIONS OF DIOXIN RECEPTOR (AHR) WITH SMALL MOLECULES –AGONISTS & -ANTAGONISTS. MECHANISMS OF INDUCED TOXICITY& ENDOCRINE DISRUPTION

**ΑΝΤΩΝΙΑ Γ. ΛΥΡΙΤΣΗ**

**Α.Μ.: 2010657**

**Χημικός**

**Επιβλέπων: Ανδρέας Χ. Λάζαρης, Αν. Καθ. Παθολογικής Ανατομικής**

**ΑΘΗΝΑ 2013**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.**
**ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΘΕΜΑΤΩΝ ΜΕ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ»**
***«Environment and Health. Capacity building for Decision Making»***

***Επιστημονική υπεύθυνη και Διευθύντρια: Αν. Καθ. Π. Νικολοπούλου-Σταμάτη***

# ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΔΙΟΞΙΝΩΝ (AhR) ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ-ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ & -ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ & ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΞΗΣ

# INTERACTIONS OF DIOXIN RECEPTOR (AhR) WITH SMALL MOLECULES –AGONISTS & -ANTAGONISTS. MECHANISMS OF INDUCED TOXICITY& ENDOCRINE DISRUPTION

**Αντωνία Γ. Λυρίτση**
**Α.Μ.: 2010657**
**Χημικός**

**<u>Τριμελής επιτροπή ΜΔΕ</u>**

**Υπογραφή**

**Επιβλέπων**:
Ανδρέας Χ. Λάζαρης, Αν. Καθ. Παθολογικής Ανατομικής

**Πρόεδρος**:
Πολυξένη Νικολοπούλου-Σταμάτη, Αν. Καθ. Παθολογικής Ανατομικής

**Μέλος**:
Ευαγγελία Εμμ. Πρωτόπαπα, Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας

Αθήνα 2013

***Στον Φίλιππο & τη Σιμόνα***

Θα ήθελα κατ'αρχάς να ευχαριστήσω θερμά την επιστημονική υπεύθυνη και διευθύντρια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τομέα Παθολογικής Ανατομικής κ. Πολυξένη Νικολοπούλου-Σταμάτη για την αποδοχή της αιτήσεώς μου στο συγκεκριμένο πρόγραμμα, για τον ιδιαίτερα πετυχημένο συντονισμό του προγράμματος, την εγκάρδιά της συμπεριφορά τόσο απέναντι σε μένα όσο και σε όλους τους συμφοιτητές μου αλλά και για την στήριξή της σε όλους τους τομείς.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Ανδρέα Χ. Λάζαρη, ο οποίος ήταν και ο επιβλέπων της παρούσας εργασίας και ο οποίος ανταποκρινόταν άμεσα σε κάθε εμπόδιο και δυσκολία τόσο με τη συνεχή του εύστοχη καθοδήγηση όσο και με την ενθάρρυνσή του και τη δημιουργία ενός αρίστου κλίματος συνεργασίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια του ΤΕΙ Αθήνας κ. Ευαγγελία Εμμ. Πρωτόπαπα, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής για τη συνεισφορά της στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ κ. Προκόπη Μαγιάτη για τη συνεισφορά του ως προς τη χημική και φαρμακολογική διάσταση του θέματος και ειδικά για την παραχώρηση των υπό δημοσίευση ερευνητικών του αποτελεσμάτων.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή του Πανεπιστημίου του Davis των ΗΠΑ κ. Michael S. Denison, για την ανταπόκρισή του στις ανάγκες τις εργασίας μου όσον αφορά στους προσδέτες του AhR.

Χρωστώ αμέριστη ευγνωμοσύνη στον διδάκτορα Φαρμακευτικής κ. Βασίλειο Γ. Μυριανθόπουλο για την κριτική ματιά και τα εποικοδομητικά σχόλια κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας και τη στήριξή του.

Πάνω απ'όλα θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου Γιώργο και Γεωργία για την αγάπη τους και τη βοήθεια που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στους συμφοιτητές μου για την καλή και συναδελφική ατμόσφαιρα καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών.

Τέλος, είμαι ευγνώμων στις συναδέλφους μου κυρίες Ειρήνη Φ. Βελαώρα και Ανθή Κ. Τσιαμούλη αλλά και στον προϊστάμενό μου κ. Ιωάννη Λ. Ρέντζο για το ενδιαφέρον τους, τη συγκαταβατικότητά τους, την κατανόησή τους και την καλή τους διάθεση στην προσπάθειά μου αυτή.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ


**1.** ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ-ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ AhR **2**

**2.** ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ AhR **3**

**2.1** ΔΟΜΗ ΤΟΥ AhR **3**

**2.2** ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ AhR ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ (ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ Ο AhR) **5**

**3.** ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ-ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟΝ AhR ΚΑΙ ΕΠΗΡΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ (ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ-ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ AhR ΑΠΟ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΑ) **9**

**3.1** ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΕΩΣ **9**

**3.1.1** ΔΙΟΞΙΝΕΣ **10**

**3.1.2** ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ (PAHs), ΠΟΛΥΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΔΙΦΑΙΝΥΛΙΑ (PCBs) ΚΑΙ ΔΙΒΕΝΖΟΦΟΥΡΑΝΙΑ (PCDFs) **13**

**3.1.3** ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΔΙΟΞΙΝΩΝ, PAHs, PCBs. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ **17**

**3.1.4** ΠΛΑΣΤΙΚΟΠΟΙΗΤΕΣ, ΒΑΦΕΣ, ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ **24**

**3.1.5** ΙΝΤΙΡΟΥΜΠΙΝΕΣ **28**

**3.1.6** ΑΛΛΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ **29**

**3.2** ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΕΩΣ-ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ **31**

**3.2.1.** ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ AhR ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΒΟΤΑΝΩΝ, ΦΡΟΥΤΩΝ, ΛΑΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ **32**

**3.3** ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΠΟΨΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΤΟΥ AhR **35**

**4.** ΣΥΝΕΡΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ Ο AhR ΚΑΙ Ο ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ-ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΞΗ **36**

**4.1** ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ AhR ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΟΥ ERα **38**

**4.2** ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ERα ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ Ο AhR **41**

**4.3** ΘΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ AhR **42**

**4.4** Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ AhR **43**

**4.5** Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ **44**

**5.** ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ AhR ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ (ΣΥΜΒΙΩΤΙΚΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *MALASSEZIA* ΚΑΙ ΔΕΡΜΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ) **45**

**6.** ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ **48**

**7.** ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **52**

# Εισαγωγή

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι ο υποδοχέας των διοξινών ή αρυλοϋδρογονοανθρακικός υποδοχέας (AhR). Μεταξύ των διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων που έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία συγκαταλέγονται διάφορες ομάδες χημικών ουσιών οι οποίες αν και παρουσιάζουν μία μεγάλη δομική ποικιλότητα, έχουν ένα κοινό γνώρισμα: όλες προκαλούν διαπιστωμένα τις σοβαρές τους τοξικές αποκρίσεις μέσω της αλληλεπίδρασης με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη του οργανισμού, τον AhR. Η πιο γνωστή από αυτές τις ομάδες είναι η ομάδα των διοξινών. Η μελέτη και η κατανόηση του μηχανισμού τοξικότητας των περιβαλλοντικών ρύπων είναι ιδιαίτερης σημασίας. Αυτό διότι υπάρχει αποδεδειγμένη συσχέτιση της έκθεσης του ανθρώπου σε πολλούς από αυτούς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες με την παθογένεση σοβαρών ασθενειών όπως ο καρκίνος. Η εκτεταμένη έκθεση του ανθρώπου σε τέτοιους παράγοντες ακόμα και σε προοδευμένες κοινωνίες τονίζει περαιτέρω τη σημασία τέτοιου είδους τοξικολογικών μελετών. Πράγματι, παρά τις συντονισμένες προσπάθειες των αρμόδιων κρατικών και διεθνών φορέων για τον περιορισμό και την ορθολογική αντιμετώπιση των ρυπογόνων παραγόντων υψηλής τοξικότητας, οι κίνδυνοι είναι ακόμα υπαρκτοί . Μια ιδιαίτερη διάσταση του θέματος των τοξικών επιδράσεων συγκεκριμένων ρυπαντών στην ανθρώπινη υγεία που σχετίζεται επίσης με τη βιολογία του AhR αφορά την ενδοκρινική διατάραξη. Υπάρχουν λοιπόν ουσίες οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία ενός οργανισμού ή στους απογόνους του, εξαιτίας μεταβολών που προκαλούν στην ανθρώπινη υγεία καθώς μιμούνται τις ορμόνες και παρεμβαίνουν στο ορμονικό σύστημα των ανθρώπων. Από την άλλη, η πρόοδος της επιστημονικής έρευνας σχετικά με τη βιολογία του AhR, αποκάλυψε πιθανή θετική συνεισφορά κάποιων ουσιών οι οποίες αν και αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη μπορούν να προφυλάξουν τον οργανισμό από τις τοξικές επιδράσεις που μπορούν να προκληθούν από την ταυτόχρονη έκθεση του οργανισμού σε ρυπαντές.

## 1. Ιστορική Αναδρομή-Ανακάλυψη του Αρυλοϋδρογονοανθρακικού Υποδοχέα ή υποδοχέα των Διοξινών (Aryl Hydrocarbon Receptor AhR)

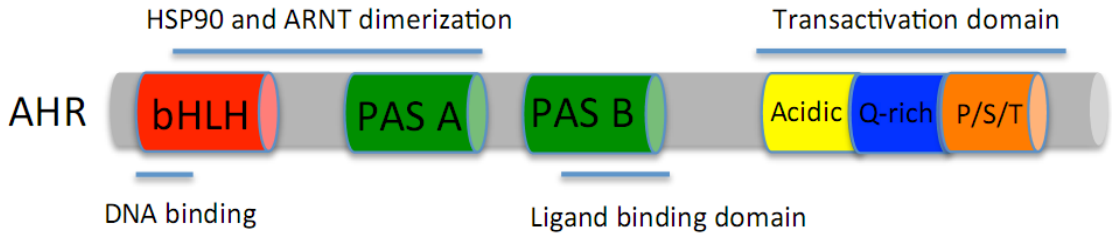
Ο υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων ή αλλιώς υποδοχέας διοξινών (aryl hydrocarbon receptor-AhR) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από μόρια-προσδέτες μικρού μοριακού βάρους (ligands). Καιρό πριν την ανακάλυψή του, οι επιστήμονες γνώριζαν την ύπαρξη μηχανισμών προσαρμογής οι οποίοι ελαχιστοποιούσαν την τοξικότητα περιβαλλοντικών ρυπαντών (Racker, 1954). Με δεδομένη αυτή την παραδοχή σχεδιάστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του ’50 μελέτες σε τρωκτικά (Conney et al., 1956). Σε αυτές τις μελέτες, η χορήγηση του πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα 3-μεθυλχολανθρένιο (3MC), οδήγησε στην επαγωγή ενός αριθμού ηπατικών μικροσωμικών ενζύμων τα οποία ονομάζονται υδρολάσες αρωματικών υδρογονανθράκων (aryl hydrocarbon hydroxylases-AHHs) (Nebert and Bausserman, 1970). Ανακαλύφθηκε ότι η ρύθμιση των AHHs παρουσίαζε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών στελεχών εργαστηριακών ποντικών (Nebert and Bausserman, 1970, 1973). Αυτές οι διαφορές οδήγησαν σε μελέτες διασταύρωσης μεταξύ των στελεχών αυτών. Με βάση την κληρονομικότητα που παρατηρήθηκε φάνηκε ότι το φαινόμενο αυτό της επαγωγής σχετιζόταν με ένα αυτοσωμικό επκρατές χαρακτηριστικό. Ο γονιδιακός τόπος που κωδικοποιούσε το χαρακτηριστικό αυτό ονομάστηκε Ah λόγω της σχέσης του με τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Aryl hydrocarbons-Ah). Πρόκειται για το γονιδιακό τόπο που πλέον αναγνωρίζεται οτι κωδικοποιεί την πρωτεΐνη AhR (Nebert and Bausserman, 1970, Thomas et al., 1972, Nebert, 1989). Η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός του υποδοχέα αυτού πραγματοποιήθηκε με περαιτέρω βιολογικές μελέτες. Οι μελέτες αυτές έλαβαν χώρα για τον χαρακτηρισμό των βιοχημικών μονοπατιών τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση των AHH με τη χρήση αυτή τη φορά της 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-παρα-διοξίνης (2,3,7,8-tetracholorodibenzo-p-dioxin –TCDD), η οποία είχε μεγαλύτερη βιοδραστικότητα από το 3MC (Poland and Glover, 1974). Έτσι, το 1976 ο Poland και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένη διοξίνη παρουσίασαν τα πρώτα πειραματικά δεδομένα που τεκμηρίωναν την ύπαρξη του συγκεκριμένου υποδοχέα ο οποίος έκτοτε ονομάστηκε AhR ως αιτία της επαγωγής των AHH (Poland et al., 1976).

Περιβαλλοντικοί ρυπαντές όπως τα HAHs και τα μη αλογονωμένα PAHs αποτελούν τις πιο αντιπροσωπευτικές και πλέον μελετημένες κατηγορίες προσδετών του AhR (Denison et al. 1998, Denison and Heath-Paglius, 1998, Poland and Knutson, 1982, Safe, 1990), αν και υπάρχουν και προσδέτες που απαντώνται στη φύση. Η έκθεση στην TCDD (διοξίνη), την πιο αντιπροσωπευτική της κατηγορίας των HAHs αλλά και σε ανάλογες ουσίες, επάγει ένα ευρύ φάσμα τοξικών και βιολογικών επιδράσεων, η πλειοψηφία των οποίων εξαρτώνται από τον AhR (Poland and Knutson, 1982, Safe, 1990, Safe, 1995, Devito and Birnbaum, 1994). Στην πραγματικότητα, η εξάλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον AhR, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της απόκρισης του οργανισμού στην TCDD και τις υπόλοιπες ουσίες (Schmidt et al., 1996, Fernandez-Salguero, 1996, Thurmond, 1999). Αν και πολυάριθμα γονίδια ρυθμίζονται από τον AhR (Denison, 1998), τα πλέον μελετημένα είναι αυτά που κωδικοποιούν τα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, όπως το CYP1A1. Η επαγωγή του CYP1A1 είναι μια εξαρτώμενη από τον AhR απόκριση η οποία έχει πολύ συχνά παρατηρηθεί στα περισσότερα είδη και έχει χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπο σύστημα για να καθορίσει τον μηχανισμό βάσει του οποίου ο AhR ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων.

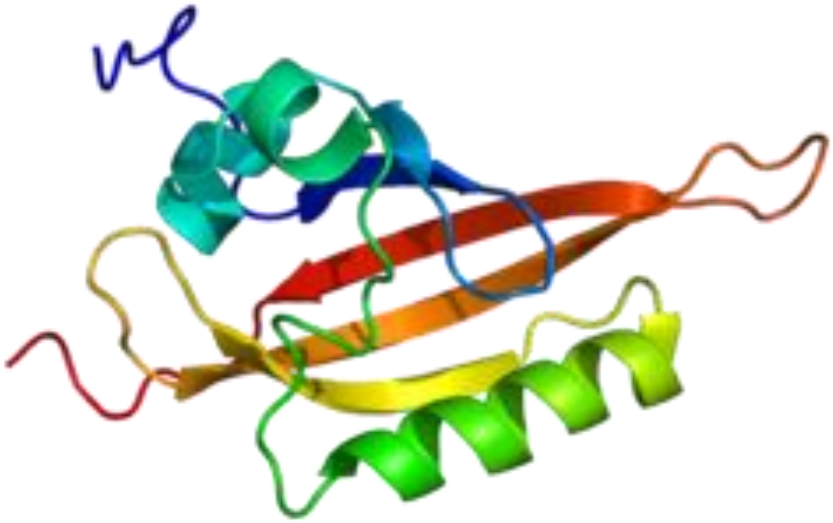
## 2. Δομή και φυσιολογική λειτουργία του AhR

### 2.1. Η Δομή του AhR

Ο AhR είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και με βάση την τριτοταγή του δομή μπορεί να θεωρηθεί μέλος της δομικής οικογένειας bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix-Period-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Single-minded) των μεταγραφικών παραγόντων. Αποτελείται από τουλάχιστον τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές επικράτειες (protein domains) οι οποίες είναι οι bHLH, PAS-A και PAS-B, καθώς και η επικράτεια που σχετίζεται με τη μετενεργοποίηση (transactivation), όπως φαίνεται και στα επόμενα σχήματα (Σχήματα 1 και 2).




**Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση της τοπολογίας των πρωτεϊνικών επικρατειών του υποδοχέα AhR. bHLH (basic Helix-Loop-Helix), PAS (Per (Period) /ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator)/SIM (Single minded), P/S/T/ (Proline, Serine, Theonine).**



**Σχήμα 2. Τρισδιάστατη αναπαράσταση του θεωρητικού μοντέλου της τριτοταγούς δομής της πρωτεϊνικής επικράτειας PAS-B του AhR.**

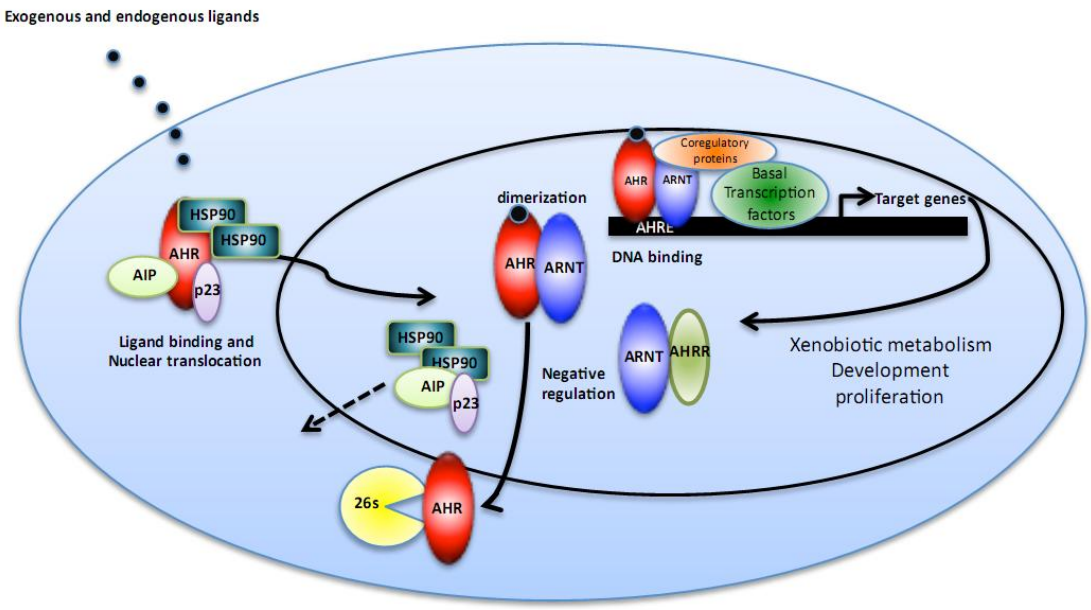
Το τμήμα bHLH του αμινοτελικού άκρου του AhR, είναι μία πολυλειτουργική περιοχή η οποία φαίνεται να είναι σημαντική για τον πυρηνικό εντοπισμό αλλά και την έξοδο του AhR από τον πυρήνα (Ikuta et al., 1998, 2000) καθώς και για την αλληλεπίδρασή του τόσο με την πρωτεΐνη HSP90 (90kDa heat shock protein) (Pongratz et al., 1992) όσο και με την πρωτεΐνη ARNT με την οποία ο AhR σχηματίζει ετεροδιμερές (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) (Fukunaga et al., 1995, Gu et al., 2000). Τέλος, το τμήμα bHLH διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του υποδοχέα με το DNA (Fukunaga et al., 1995, Ikuta et al., 1998). Η περιοχή PAS του AhR, χωρίζεται σε δύο τμήματα που ονομάζονται PAS-A και PAS-B. Παρόμοια με την bHLH, αυτή η περιοχή είναι τόπος αλληλεπίδρασης με τις

πρωτεΐνες HSP90 και ARNT (Antonsson et al., 1995, Fukunaga et al., 1995). Η περιοχή PAS-B περιλαμβάνει επιπλέον τη θέση σύνδεσης του προσδέτη (ligand binding domain- LBD) στην οποία υπάρχουν αμινοξικά κατάλοιπα (residues) τα οποία είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης και του προσδέτη (Goryo et al., 2007). Το καρβοξυτελικό τμήμα του AhR περιέχει την περιοχή μετενεργοποίησης (TAD) η οποία είναι σημαντική για την μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον AhR καθώς και για τις αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με άλλες πρωτεΐνες (Jain et al., 1994, Rowlands et al., 1996, Watt et al., 2005, Moffat et al., 2007). Εντός της TAD περιοχής υπάρχουν τρείς ξεχωριστές υποπεριοχές: η όξινη (acidic), η πλούσια σε γλουταμίνη (Q) περιοχή (glutamine rich) και η πλούσια σε προλίνη-σερίνη-θρεονίνη (P/S/T) περιοχή (proline-serine-threonine rich). Η όξινη περιοχή είναι πλούσια σε αμινοξικά κατάλοιπα ασπαραγινικού (D) και γλουταμινικού (E) οξέος τα οποία είναι απαραίτητα στην μετέπειτα ενεργοποίηση του AhR (Jones and Whitlock, 2001). Η πλούσια σε αμινοξικά κατάλοιπα γλουταμίνης (Q) περιοχή είναι όπως και η όξινη περιοχή σημαντική για την μετέπειτα ενεργοποίηση του AhR αλλά ταυτόχρονα εμπλέκεται και σε αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες-συρρυθμιστές όπως ο πυρηνικός συνενεργοποιητής-1 (nuclear coactivator 1-NCoA1) και η αλληλεπιδρώσα με τον υποδοχέα πρωτεΐνη 140 (RIP140) (Kumar and Perdew, 1999, Kumar et al., 1999, 2001). Η P/S/T περιοχή, αν και είναι η λιγότερο μελετημένη, έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για τη μετενεργοποίηση του υποδοχέα. Παρ'όλα αυτά συμμετέχει στη μετενεργοποίηση λιγότερο απ'ό,τι συμμετέχουν η όξινη και η πλούσια σε γλουταμίνη περιοχή μαζί (Jain et al., 1994, Rowlands et al., 1996).

## 2.2. Φυσιολογική λειτουργία του AhR σε μοριακό επίπεδο (Βιοχημικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο AhR)

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, το 1976 ο Poland και οι συνεργάτες του εντόπισαν για πρώτη φορά τον AhR στο ήπαρ ποντικών (Poland et al, 1976). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν ότι υπάρχει ειδική σύνδεση του συγκεκριμένου υποδοχέα με τη ραδιοσημασμένη 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-παρα-διοξίνη ([$^3$H]-TCDD). Η TCDD είναι ένας υψηλής τοξικότητας περιβαλλοντικός ρύπος, ο οποίος αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανικής διεργασίας και της καύσης οργανικής ύλης και απορριμάτων. Περαιτέρω μελέτες από την ίδια ομάδα έδειξαν ότι ο AhR είναι ένας

υποδοχέας που εκφράζεται ευρέως σε ιστούς θηλαστικών (Poland and Knutson, 1982). Προτάθηκε λοιπόν ότι η δέσμευση της TCDD στον AhR σχετίζεται με το ευρύ φάσμα των βιοχημικών και τοξικών αποκρίσεων που παρατηρούνται στα πειραματόζωα και τα κύτταρα τα οποία εκτίθενται στην TCDD καθώς και σε άλλους αλογονωμένους αρωματικούς ρυπαντές οι οποίοι επίσης προσδένονται στον AhR. Για παράδειγμα, η TCDD προκαλεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επαγωγή των μεταβολικών ενζύμων φάσης I και II και ρυθμίζει την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων. Προκαλεί επίσης ανοσοτοξικότητα, ηπατολογικές αντιδράσεις όπως πορφυρία, αναπτυξιακή και αναπαραγωγική τοξικότητα, διατάραξη του ενδοκρινικού συστήματος, χλωρακμή, δημιουργία όγκων και καρκινογένεση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι τοξικές και γενοτοξικές αντιδράσεις που προκαλούνται από την TCDD, εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο ή το είδος του πειραματόζωου. Για παράδειγμα, η επί δύο έτη έκθεση σε TCDD των επιμύων Sprague-Dawley προκαλεί την ανάπτυξη όγκων στο ήπαρ των θηλυκών αλλά όχι των αρσενικών, κάτι που δείχνει την πιθανή σχέση του AhR με την έκφραση ορμονών (Kociba et al., 1978).




**Σχήμα 3. Ο προτεινόμενος μηχανισμός της έκφρασης γονιδίων η οποία καθοδηγείται από τον AhR χρησιμοποιώντας ως μοντέλο την έκφραση του κυτοχρώματος CYP1A1.**

Ο μηχανισμός των βιοχημικών αποκρίσεων που επάγονται από τον AhR αρχικά μελετήθηκε με μοντέλα τα οποία στηρίζονταν στο κυτόχρωμα CYP1A1. Οι μελέτες αυτές έδειξαν οτι υπήρξε επαγωγή του CYP1A1 από τη διοξίνη, αφού όμως είχε προηγηθεί ο ταχύς σχηματισμός ενός πυρηνικού συμπλόκου 180-220 kD στο οποίο συμμετείχε ο AhR. Μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν οτι αυτό το σύμπλοκο ήταν ένα ετεροδιμερές το οποίο αποτελούνταν από τον AhR και την πρωτεΐνη Arnt (AhR nuclear translocator), (Swanson and Bradfield, 1993 και Wilson and Safe, 1998).

Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός της φυσιολογικής λειτουργίας του AhR σε μοριακό επίπεδο φαίνεται στο σχήμα 3 και είναι ο ακόλουθος: η επαγωγός χημική ουσία εισέρχεται στο κύτταρο και συνδέεται με υψηλή χημική συγγένεια με τον AhR, ο οποίος βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο περιλαμβάνει επίσης δύο μόρια από σαπερόνες hsp90 (heat shock protein 90 kDa), την πρωτεΐνη X-associated 2 [XAP2 (Meyer, 1998)] και μια πρωτεΐνη co-chaperone η οποία αναφέρεται ως p23 (Kazlauskas, 1999). Μετά τη δέσμευση του προσδέτη, ο AhR φαίνεται ότι υπόκειται σε μια αλλαγή διαμόρφωσης η οποία οδηγεί στην αποκάλυψη ενός τμήματος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που κωδικοποιεί την μετατόπιση του AhR στον πυρήνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μετακίνηση του συμπλόκου στον πυρήνα (Hord and Perdew, 1994, Pollenz et.al., 1994). Ακολουθεί η απελευθέρωση του συστήματος προσδέτη και AhR από το υπόλοιπο σύμπλοκο και στη συνέχεια ο διμερισμός AhR και προσδέτη με μία δομικά όμοια πυρηνική πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται Arnt (AhR related nuclear translocator). Ο διμερισμός αυτός μετατρέπει τον AhR σε μια μορφή με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για το DNA (Hankinson, 1995, Probst et al., 1993). Ένα τμήμα της αμινοξικής ακολουθίας του AhR συμμετέχει και είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση του υποδοχέα από τον πυρήνα. Με αυτόν τον μηχανισμό απομακρύνονται τα σύμπλοκα του AhR που αποτυγχάνουν να διμεριστούν με τον Arnt ή να προσδεθούν στο DNA, οδηγούνται σε σύνδεση με ουβικουιτίνη και αποικοδόμηση (Roberts and Whitelaw, 1999). Η πρόσδεση του συμπλόκου AhR, προσδέτη και Arnt πραγματοποιείται σε συγκεκριμένο τμήμα της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του DNA. Το σύμπλοκο του AhR με την Arnt μεταναστεύει από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου και αλληλεπιδρά με ειδικές αλληλουχίες του DNA οι οποίες περιέχουν τα στοιχεία απόκρισης στις διοξίνες και τα ξενοβιοτικά (dioxin response elements-DREs και xenobiotic response elements-XREs). Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες περιλαμβάνουν

τον υποκινητή του γονιδίου του CYP1A1 όπως και υποκινητές άλλων γονιδίων τα οποία επάγονται από την παρουσία αρωματικών υδρογονανθράκων. Η επακόλουθη ενεργοποίηση συμπαραγόντων και γενικώς μεταγραφικών παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής.

Η ύπαρξη του AhR έχει επιβεβαιωθεί για ένα ευρύ φάσμα ειδών, ιστών και τύπων κυττάρων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ικανότητά του να λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος εξαρτάται από τον εκάστοτε προσδέτη, υποδεικνύει ότι πολλές βιολογικές και τοξικές επιδράσεις των χημικών προσδετών του AhR, προκύπτουν από τροποποίηση της φυσιολογικής έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα που εκτίθενται σε αυτούς. Επειδή πολλές από τις αρνητικές επιδράσεις των διοξινών και των HAHs παρατηρούνται μέρες ή και εβδομάδες μετά την έκθεση, πιθανώς προκαλούνται από τη συνεχή και μη φυσιολογική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Η υπόθεση αυτή είναι σύμφωνη με το γεγονός ότι τα PAHs και άλλοι σχετικά ασθενείς προσδέτες οι οποίοι προκαλούν μόνο παροδική ενεργοποίηση του AhR δεν προκαλούν τοξικά αποτελέσματα σαν αυτά των διοξινών. Ο ρόλος του AhR στις βιολογικές αλλά και τοξικές αποκρίσεις που προκαλούνται από τους εκάστοτε προσδέτες του είναι καλά τεκμηριωμένος. Παρ’όλα αυτά τα ακριβή βιοχημικά γεγονότα και τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τις επιδράσεις αυτές δεν έχουν ακόμα διασαφηνιστεί πλήρως.

Ο φυσιολογικός ρόλος του AhR παραμένει ένα κρίσιμο ερώτημα. Μέχρι στιγμής δεν έχει εντοπιστεί κανένας ενδογενής προσδέτης υψηλής συγγένειας. Αυτός είναι και ο λόγος που ο AhR έχει χαρακτηρισθεί ως ¨ορφανός υποδοχέας¨. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του AhR με εξωγενείς προσδέτες, έχει κυρίως εστιαστεί στις δομικά ανάλογες οικογένειες των HAHs και PAHs. Παρ’όλα αυτά, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ως προσδέτες και ενεργοποιητές του AhR μπορεί να λειτουργήσουν μόρια μεγάλης δομικής ποικιλότητας. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με τον εκάστοτε προσδέτη χαρακτηρίζεται από χαμηλό βαθμό επιλεκτικότητας. Επιπλέον η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός μιας ποικιλίας προσδετών φυσικής προέλευσης, οδηγεί σε αναθεώρηση των υποθέσεων σχετικά με τη δομική επιλεκτικότητα της διαδικασίας αλληλεπίδρασης AhR και προσδετών.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, οι AhR και Arnt είναι μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων basic helix-loop-helix (b-HLH). Ο AhR είναι

ο μόνος αντιπρόσωπος της οικογένειας ο οποίος ενεργοποιείται από την πρόσδεση μικρών μορίων (ligands). Η πρωτεΐνη Arnt είναι γνωστή με την ονομασία HIF-1β (hypoxia inducible factor-1β) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική απόκριση στην υποξία. Η αλληλεπίδραση του Arnt με τον HIF-1α και η πρόσδεσή τους στα αντίστοιχα στοιχεία απόκρισης της υποξίας (hypoxia response elements) έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση των γονιδίων τα οποία επάγονται από την ύπαρξη υποξίας.

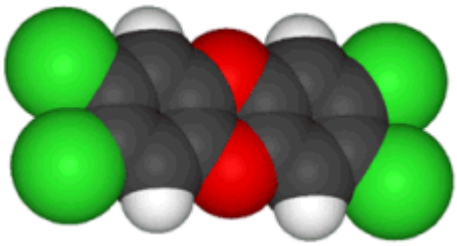
## 3. Οι προσδέτες του AhR-Ουσίες που αλληλεπιδρούν με τον AhR και επηρεάζουν τη λειτουργία του (Ενεργοποίηση-Αναστολή του AhR από ξενοβιοτικά)

### 3.1. Προσδέτες συνθετικής προέλευσης

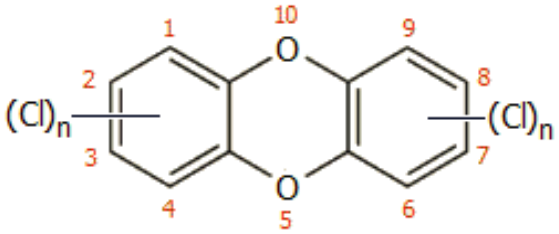
Η πλειονότητα των προσδετών που έχουν υψηλή χημική συγγένεια για τον AhR είναι συνθετικής προέλευσης. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι επίπεδοι υδρόφοβοι αλογονωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες (HAHs) όπως είναι οι διοξίνες, τα διβενζοφουράνια και τα διφαινύλια. Η ομάδα αυτή επίσης περιλαμβάνει τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) όπως το 3-μεθυλοχολανθρένιο (3MC), το βενζο[α]πυρένιο (benzo[a]pyrene-B[a]P) και τις βενζοφλαβόνες. Από αυτές τις δύο κατηγορίες ενώσεων, οι HAHs είναι πιο ισχυροί και σταθεροί προσδέτες του AhR, με σταθερές σύνδεσης ($K_b$) που πλησιάζουν το επίπεδο του $10^{-6}$-$10^{-9}$ $M^{-1}$ (Bandiera et al., 1982, Piskorska-Pliszczynska et al., 1986, Denison and Nagy, 2003). Τα HAHs δεν αποικοδομούνται στο περιβάλλον λόγω του ότι είναι υδρόφοβες και χημικά σταθερές ενώσεις, οι οποίες είναι ανθεκτικές στο μεταβολισμό από μεταβολικά ένζυμα ξενοβιοτικών. Ανιχνεύσιμα επίπεδα αυτών των ρύπων εντοπίζονται σε όλους τους ανθρώπους (Schecter and Olson, 1997). Τα HAHs απελευθερώνονται στο περιβάλλον μέσω της διαδικασίας της καύσης (π.χ. με την αποτέφρωση βιομηχανικών και οικιακών αποβλήτων) αλλά και μέσω της διαδικασίας λεύκανσης του χάρτου (Schecter et al., 2006). Η TCDD αποτελεί τον πλέον χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο της κατηγορίας των συνθετικών προσδετών για τη μελέτη του AhR, μια και είναι ο πιο ισχυρός ενεργοποιητής (αγωνιστής) του (Denison and Heath-Pagliuso, 1998). Τα PAHs κυρίως σχηματίζονται κατά την ατελή καύση υλικών που περιέχουν άνθρακα όπως είναι το κάρβουνο, το ντίζελ, η πίσσα και

φυτικά υλικά (Boström et al., 2002). Εξαιτίας του υψηλού επιπέδου της έκθεσης σε πολλές από αυτές τις χημικές ουσίες στην καθημερινή ζωή, η κατανόηση της ενεργοποίησης του AhR είναι καίριας σημασίας για τον προσδιορισμό των μηχανισμών της τοξικότητάς τους.

### *3.1.1. Διοξίνες*



Οι διοξίνες είναι πολυχλωριωμένες οργανικές ενώσεις, που βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, στα τρόφιμα, στα ιζήματα, αλλά και στον αέρα αστικών και αγροτικών περιοχών σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,1 μέχρι και άνω των 100 pg/Kg ή pg ανά κυβικό μέτρο (1 pg = $10^{-12}$ g ή το 1 εκατομμυριοστό του εκατομμυριοστού του g). Σχηματίζονται κυρίως κατά την ατελή καύση οργανοχλωριούχων ενώσεων, χλωριούχων πολυμερών, όπως το PVC (πολυβινυλοχλωρίδιο), αλλά παραδόξως και κατά την καύση οργανικών υλικών παρουσία χλωριούχων αλάτων σε θερμοκρασίες 600ºC - 1000ºC. Επιπλέον, οι διοξίνες αποτελούν ανεπιθύμητα παραπροϊόντα διαφόρων βιομηχανικών διεργασιών, όπως η λεύκανση χαρτοπολτού, η παραγωγή χλωρίνης, η καύση βενζίνης, πετρελαίου και ξύλου. Μία από τις κυριότερες πηγές διοξινών είναι η ατελής καύση οικιακών απορριμάτων. Η χημική δομή των πολυχλωριωμένων διοξινών είναι η ακόλουθη.




Πολυχλωριωμένες διβενζο-p-διοξίνες (PCDDs)

Αρχικά, οι διοξίνες θεωρήθηκαν ως αποκλειστικώς ανθρωπογενείς ρύποι, επειδή η παρουσία τους σε δείγματα (π.χ. πάγου, λειψάνων) της προβιομηχανικής εποχής είναι μηδενική έως αμελητέα. Πρόσφατα όμως ερευνητικά αποτελέσματα

έδειξαν ότι οι διοξίνες παράγονται, και μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες, κατά τις δασικές πυρκαγιές. Διοξίνες έχουν βρεθεί επίσης σε βαλτότοπους και στην τύρφη.

Ο όρος διοξίνες (στον πληθυντικό) είναι γενικός και καλύπτει μια ομάδα 75 ομοειδών (congeners) πολυχλωριωμένων διβενζο-*p*-διοξινών (polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, PCDD). Ο όρος συνήθως περιλαμβάνει και τα 135 ομοειδή πολυχλωριωμένα διβενζο-φουράνια (polychlorinated dibenzofurans, PCDF), που συχνά αναφέρονται απλά ως φουράνια. Τουλάχιστον 17 από αυτές τις πολυχλωριωμένες ενώσεις έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα τοξικές και καρκινογόνες. Με την ονομασία διοξίνη (στον ενικό) συνήθως εννοείται η 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-*p*-διοξίνη (2,3,7,8-TCDD ή απλά TCDD), η τοξικότερη απ' όλες τις διοξίνες. Η ένωση αυτή έχει χαρακτηρισθεί καρκινογόνος για τον άνθρωπο από τον Διεθνή Οργανισμό Ερευνών του Καρκίνου, του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon, France, World Health Organization) και άλλους αξιόπιστους διεθνείς οργανισμούς υγείας, αν και έχουν διατυπωθεί κάποιες αμφιβολίες ως προς το αν θα πρέπει να χαρακτηρισθεί ως γνωστό καρκινογόνο ή ως πιθανό καρκινογόνο (Cole et al., 2003). Εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις διοξινών υπήρχαν στη φύση και πριν από τη βιομηχανική εποχή, ως αποτέλεσμα φυσικών πυρκαγιών και γεωλογικών διαδικασιών. Σήμερα, ιχνοποσότητες διοξινών και των ανάλογων ενώσεων μπορούν να ανιχνευθούν στους λιπώδεις ιστούς όλων των ανθρώπων, με αυξημένα επίπεδα σε όσους ζουν σε βιομηχανικές χώρες.

Η τοξικότητα των διοξινών θεωρείται επαρκώς τεκμηριωμένη. Για παράδειγμα η TCDD είναι μία αποδεδειγμένα καρκινογόνος ουσία σε ζώα. Όμως, υπάρχουν επιστημονικές απόψεις οι οποίες αποκλίνουν από αυτή την κοινώς αποδεκτή αντίληψη (Tuomisto and Tuomisto, 2012). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ομάδες ατόμων με συγκεκριμένα επαγγέλματα εξαιτίας των οποίων είχαν τη μέγιστη έκθεση σε διοξίνες, κατέδειξαν ότι υπάρχει ένας μικρός κίνδυνος εμφάνισης όλων των ειδών καρκίνου. Παραταύτα, διαφορετικές μελέτες που διεξήχθησαν μετά από μεγάλα ατυχήματα που σχετίζονται με τις διοξίνες δεν επιβεβαίωσαν σαφώς την επικινδυνότητα των διοξινών. Οι κίνδυνοι για τους πληθυσμούς που εκτίθενται στα τρέχοντα επίπεδα διοξίνης φαίνεται να είναι ασήμαντοι. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο AhR είναι ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει βασικές λειτουργίες του οργανισμού. Κατά συνέπεια, η ως κάποιο βαθμό ενεργοποίηση του AhR μπορεί να θεωρηθεί ευεργετική και όχι

επιβλαβής. Αυτό δημιουργεί ερωτηματικά για την ορθότητα της αυστηρότητας στα μέχρι τώρα ισχύοντα επιτρεπόμενα όρια της διοξίνης στα τρόφιμα. Κατά συνέπεια, εξαιτίας αυτής της αντίληψης, πιθανώς να δημιουργηθούν έμμεσοι διατροφικοί κίνδυνοι οι οποίοι ίσως να είναι περισσότερο σοβαροί απ'ό,τι οι χειρότερες προβέψεις για τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου εξαιτίας των διοξινών. Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (Agency for Research on Cancer, IARC), αξιολόγησε την καρκινογόνο δράση των διοξινών το 1997 και το συμπέρασμά τους ήταν ότι η TCDD αποτελεί καρκινογόνο ουσία για τους ανθρώπους. Όμως, σύμφωνα με τους Tuomisto και Tuomisto, αυτό το συμπέρασμα βασίστηκε σε επαρκείς αποδείξεις όσον αφορά στα πειραματόζωα αλλά σε πολύ περιορισμένες ενδείξεις όσον αφορά στους ανθρώπους. Η θεώρηση αυτή ενισχύθηκε και από το γεγονός ότι ο AhR είναι παρών τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα και άρα πιθανώς να έχει τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Κατά συνέπεια τα επίπεδα της TCDD που σχετίζονται με τον καρκίνο στον άνθρωπο είναι παραπλήσια με εκείνα που προκαλούν καρκίνο στους αρουραίους. Άλλες πολυχλωριωμένες διοξίνες (PCDD) και πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDF) δεν έχουν ταξινομηθεί ως προς την καρκινογόνο τους δράση. Πρόσφατα, ο κίνδυνος δημιουργίας καρκίνου από τις διοξίνες, αξιολογήθηκε εκ νέου από την IARC και σύμφωνα με τις πρώτες πληροφορίες η καρκινογένεση της TCDD επιβεβαιώθηκε για όλες τις μορφές καρκίνου (Baan et al., 2009). Υπάρχει έντονη αμφισβήτηση όσον αφορά στην ενοχοποίηση των διοξινών ως αιτίας πρόκλησης καρκίνου στον άνθρωπο. Αν και είναι πιθανό οι διοξίνες να είναι καρκινογόνες για τον άνθρωπο όταν αυτός εκτίθεται σε υψηλές δόσεις, η εγκυρότητα των στοιχείων δεν είναι αποδεκτή από όλους. Ο αντίστοιχος κίνδυνος της έκθεσης σε χαμηλές δόσεις, φαίνεται να είναι ελάχιστος ή ανύπαρκτος. Σύμφωνα πάντα με τους Tuomisto και Tuomisto, από τη στιγμή που λανθασμένες ή επιπόλαιες αποφάσεις μπορεί να έχουν έμμεσες αλλά σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, απαιτείται η δέουσα προσοχή πριν εκδοθούν συμβουλές προφύλαξης. Ένα παράδειγμα είναι η δημοσιοποίηση οδηγιών προς αποφυγή κατανάλωσης ψαριών. Αυτή η κατηγορία τροφίμων αποτελεί σημαντική πηγή Ω-3 λιπαρών οξέων τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη νοητική ανάπτυξη των παιδιών και για την πρόληψη των θανάτων που οφείλονται σε καρδιαγγειακά επεισόδια σε ενήλικες. Ένα άλλο παράδειγμα είναι ο θηλασμός ο οποίος σθεναρά συνιστάται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) εξαιτίας του ότι έχει αδιαμφισβήτητα οφέλη για την υγεία. Ο θηλασμός συνιστάται ακόμα και αν η πρόσληψη διοξινών ανά σωματικό βάρος είναι υψηλότερη

σε βρέφη που έχουν θηλάσει απ’ό,τι η κατά μέσο όρο πρόσληψη από ενήλικα. Έτσι, ενώ είναι λογικό να υπάρχει αυστηρός έλεγχος στις εκπομπές των διοξινών, δεν είναι σωστό να υπάρχει πλήρης αποχή από την κατανάλωση συγκεκριμένων κατηγοριών υγιεινών τροφίμων και θρεπτικών ουσιών εξαιτίας του φόβου των διοξινών.

### *3.1.2. Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) και διβενζοφουράνια (PCDFs)*

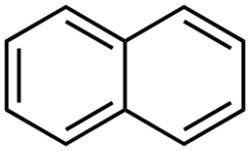
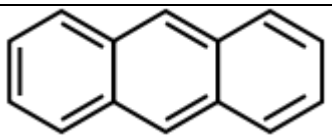
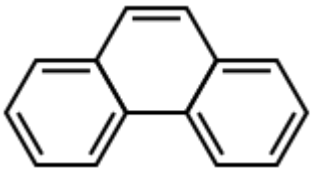
Τα πολυαρένια, γνωστότερα ως πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάθρακες ή PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), είναι οργανικές χημικές ουσίες οι οποίες αποτελούνται από τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, ενωμένων μεταξύ τους, έτσι ώστε ορισμένα άτομα άνθρακα να ανήκουν σε δύο ή τρεις δακτυλίους. Μία τέτοια δομή αναφέρεται επίσης ως σύστημα συγκολλημένων (fused) δακτυλίων. Οι δακτύλιοι μπορεί να είναι τοποθετημένοι σε ευθεία γραμμή ή να σχηματίζουν γωνίες ή να δημιουργούν μια συστάδα (cluster).

Από την ονομασία τους προκύπτει ότι τα PAHs αποτελούνται αποκλειστικά από άνθρακα και υδρογόνο. Το απλούστερο σύστημα δύο συγκολλημένων δακτυλίων είναι το ναφθαλίνιο (το οποίο εξ’ ορισμού δεν θεωρείται ως PAH), ενώ ως το πλέον σύνθετο θα μπορούσε να θεωρηθεί ο γραφίτης. Ανάμεσα σε αυτά τα "άκρα" βρίσκονται τα PAHs. Η διαλυτότητα των PAHs σε οργανικούς διαλύτες μειώνεται, όσο αυξάνει ο αριθμός των δακτυλίων.

Στους αρωματικούς δακτυλίους μπορεί να συγκολληθούν και άλλοι τύποι δακτυλίων όπως πενταμελείς δακτύλιοι, όπως επίσης μπορεί να υπάρξουν PAHs με άλλα άτομα (O, N, S) στη θέση ατόμων άνθρακα. Οι ενώσεις αυτές αναφέρονται ως ετεροαρωματικές ή ετεροκυκλικές ενώσεις και θεωρούνται ως παράγωγα των PAHs όχι όμως ως PAHs. Σήμερα είναι γνωστές εκατοντάδες PAHs και παράγωγά τους.

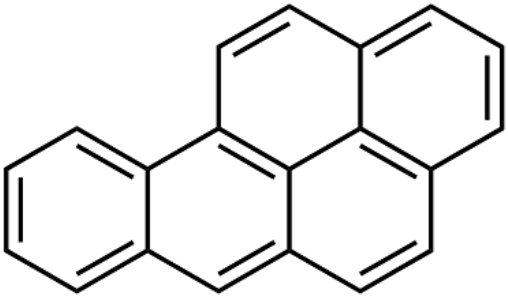
Τα PAHs είναι ενώσεις κυρίως ανθρωπογενούς και δευτερευόντως φυσικής προέλευσης. Τα PAHs και πολλά παράγωγά τους αποτελούν προϊόντα ατελούς καύσης και θέρμανσης πολλών οργανικών ενώσεων (κυρίως υδρογονανθράκων) σε υψηλές θερμοκρασίες και έτσι βρίσκονται σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις στα υπολείμματα απόσταξης του πετρελαίου, στη λιθανθρακόπισσα και στους κλιβάνους

παραγωγής κωκ. PAHs συναντώνται επίσης στις βιομηχανίες παραγωγής αλουμινίου και δημιουργούνται κατά την πυράκτωση κωκ με πίσσα για την παρασκευή των γραφιτικών ηλεκτροδίων (ανόδων) που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτρολυτική παραγωγή του μετάλλου (International Labour Organization). Σχεδόν όλα τα PAHs χαρακτηρίζονται είτε ως ύποπτες καρκινογόνες ουσίες ή ως επικίνδυνες καρκινογόνες ουσίες. Μερικές χαρακτηριστικές δομές PAHs φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 1):

| **Ναφθαλένιο** | **Ανθρακένιο** | **Φαινανθρένιο** |
|---|---|---|
|  |  |  |

**Πίνακας 1. Χαρακτηριστικές δομές PAHs**

Το βενζο[a]πυρένιο είναι ο πλέον μελετημένος καρκινογόνος πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας και ο τύπος του αποτελεί το "σήμα κατατεθέν" αυτής της τάξης των οργανικών ενώσεων.

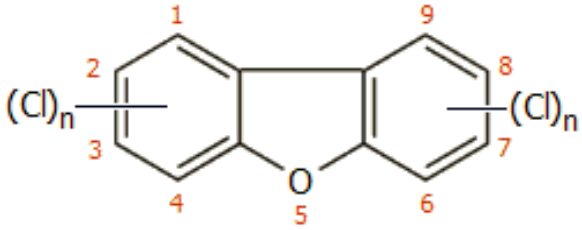


**Βενζο[a]πυρένιο**

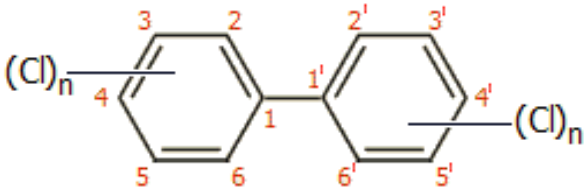
Το μόριο του βενζο[a]πυρενίου ως έχει δεν παρουσιάζει καρκινογονικότητα σε βιολογικά συστήματα. Ωστόσο, χαρακτηρίζεται ως προ-καρκινογόνος ένωση (procarcinogen), γεγονός το οποίο σημαίνει ότι μπορεί με κατάλληλο μεταβολισμό (ενζυμικό) να μετατραπεί σε καρκινογόνο ένωση. 'Οταν το βενζο[a]πυρένιο εισέλθει στον ανθρώπινο οργανισμό, αρχικά οξειδώνεται προς μια εποξειδική ένωση, το (+)βενζο[a]πυρενο-7,8-εποξείδιο, υπό την επίδραση του ενζύμου CYP1A1 γνωστό

και ως οξειδάση αρυλικών υδρογονανθράκων (aryl hydrocarbon hydroxylase, AHH) και του ανάλογου ενζύμου CYP1BA (ένζυμα που ανήκουν στην "υπεροικογένεια" ενζύμων κυτόχρωμα 450 (cytochrome 450), μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων που διευκολύνουν την οξείδωση οργανικών ενώσεων. Στη συνέχεια, ο εποξειδικός (τριμελής) δακτύλιος διανοίγεται παρέχοντας (-)βενζο[a]πυρενο-7,8-διυδροδιόλη. Η τελευταία ένωση υπόκειται ξανά σε οξείδωση υπό την επίδραση των ίδιων οξειδωτικών ενζύμων παρέχοντας την ισχυρά μεταλλαξιογόνο ένωση (+)βενζο[a]πυρενο-7,8-διυδροδιολο-9,10-εποξείδιο (BPDE), μία δραστική ηλεκτρονιόφιλη ένωση. Όπως αναφέρθηκε, τα PAHs είναι μια τάξη ενώσεων κυρίως ανθρωπογενούς και δευτερευόντως φυσικής προέλευσης. Γενικά, αναμένεται η παραγωγή PAHs σε κάθε περίπτωση ατελούς καύσης οργανικής ύλης. Οι κυριότερες φυσικές πηγές εκπομπής PAHs είναι οι δασικές πυρκαγιές, όπως και η ηφαιστειακή δραστηριότητα. Ωστόσο, οι ανθρωπογενείς πηγές PAHs είναι πολύ περισσότερες και σε αυτές περιλαμβάνονται η για κάθε σκοπό, καύση πετρελαίου και των προϊόντων τους, διάφορες βιομηχανικές διαδικασίες (διύλιση πετρελαίου, παραγωγή κωκ, χαλυβουργία, παραγωγή αλουμινίου), όπως και η αποτέφρωση απορριμμάτων. Ακόμη, PAHs αναμένονται να εμφανιστούν εκεί που γίνεται χρήση προϊόντων πίσσας (πεζοδρομίων, χώρων στάθμευσης) και σχετικά πρόσφατα έχει αρχίσει και εξετάζεται το ενδεχόμενο επιβάρυνσης των φυσικών υδάτων, από αυτού του είδους τα προϊόντα (Mahler et al., 2011).

Με τις διοξίνες εξετάζονται και ορισμένα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (plolychlorinated biphenyls, PCBs). Υπάρχουν 209 ομοειδή πολυχλωριωμένα διφαινύλια, από τα οποία 130 έχουν βρεθεί στα βιομηχανικώς παραγόμενα PCBs. 12 από αυτά τα ομοειδή έχουν τα ίδια τοξικολογικά χαρακτηριστικά με τις διοξίνες και χαρακτηρίζονται ως PCBs παρόμοια με διοξίνες (dioxin-like PCBs). Η τοξικότητα όλων αυτών των πολυχλωριωμένων αρωματικών ενώσεων εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των ατόμων χλωρίου στο μόριό τους. Οι γενικοί τύποι των πολυχλωριωμένων διβενζοφουρανίων και διφαινυλίων είναι οι ακόλουθοι:




Πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs)




Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs)

Τα μόρια των PCDD και των PCDF είναι επίπεδα. Αντίθετα, τα μόρια PCBs μπορεί να μην είναι επίπεδα, αφού τα δύο φαινύλια μπορούν να περιστρέφονται το ένα ως προς το άλλο και ως προς τον δεσμό 1-1'. Ωστόσο, η ελεύθερη περιστροφή δεν είναι δυνατή εάν π.χ. υπάρχουν άτομα Cl και στους δύο αρωματικούς δακτυλίους σε ορθο-θέση ως προς τον δεσμό 1-1', λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων (άτομα χλωρίου στις θέσεις 2, 2' και 6, 6' θέσεις). Είναι χαρακτηριστικό ότι τα πιο τοξικά από τα PCBs είναι τα ονομαζόμενα συνεπίπεδα PCBs (coplanar PCBs), εκείνα δηλαδή που μπορούν να αποκτήσουν επίπεδη διαμόρφωση, έχοντας τα άτομα χλωρίου μακριά από τον δεσμό 1-1'.

Οι πολυχλωριωμένες διβενζο-*p*-διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια δεν έχουν καμία απολύτως χρησιμότητα και δεν παρασκευάζονται βιομηχανικά. Αντίθετα, κατά το παρελθόν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια χρησιμοποιήθηκαν σε μεγάλες ποσότητες λόγω της χημικής τους σταθερότητας και του υψηλού σημείου ζέσεως, ως ψυκτικά και διηλεκτρικά υγρά μετασχηματιστών και πυκνωτών και ως υγρά υδραυλικών συστημάτων. Εκτιμάται πως συνολικά (ξεκινώντας από το 1929) παρήχθησαν περίπου 1,5 εκατομμύρια τόννοι πολυχλωριωμένα διφαινύλια. Η διαπίστωση της ιδιαίτερης τοξικότητάς τους σε συνδυασμό με τη δυσκολία της καταστροφής τους, οδήγησε στη σταδιακή απαγόρευση της παραγωγής τους από τις δεκαετίες 1970-80.

### *3.1.3. Προέλευση των διοξινών, PAHs, PCBs. Επιπτώσεις στο περιβάλλον και τον άνθρωπο*

Οι διοξίνες και τα PCBs ανήκουν στην κατηγορία των ανθεκτικών ή έμμονων οργανικών ρύπων (Persistent Organic Pollutants, POPs), οι οποίοι δύσκολα υπόκεινται σε χημική και βιολογική διάσπαση με αποτέλεσμα να παραμένουν στο περιβάλλον και να συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα των ανθρώπων και των ζώων. Διοξίνες και PCBs εντάσσονται στην κακόφημη "βρωμερή δωδεκάδα". Η έκθεση του ανθρώπου στις διοξίνες και τα PCBs πραγματοποιείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% μέσω των τροφίμων. Στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποδίδεται το 80% της συνολικής έκθεσης. Η πρόσληψή τους από τα ζώα πραγματοποιείται μέσω των ζωοτροφών. Οι κύριες ανθρωπογενείς πηγές διοξινών είναι οι ατελείς και πρόχειρες καύσεις οικιακών ή άλλων απορριμμάτων ("καύσεις στις αυλές"), οι καύσεις στους χώρους επεξεργασίας αστικών απορριμμάτων, οι καύσεις νοσοκομειακών αποβλήτων, καύσεις γαιανθράκων, όπως και διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες.

Η σχετική συμβολή κάθε πηγής διοξινών προφανώς εξαρτάται από τη χώρα, τον βαθμό εκβιομηχάνισής της και από την αυστηρότητα τήρησης των σχετικών νόμων, ως προς τις εκπομπές βιομηχανικών ρύπων. Είναι χαρακτηριστική η μείωση της έκλυσης διοξινών από βιομηχανικές δραστηριότητες λόγω των επιβληθέντων μέτρων και κυριότερη πηγή διοξινών παραμένουν οι ανεξέλεγκτες καύσεις οικιακών απορριμμάτων (π.χ. σε μεταλλικά βαρέλια), μία συνηθισμένη πρακτική στις ΗΠΑ, παρά το γεγονός ότι νομοθετικά απαγορεύεται.

Οι διοξίνες έχουν από καιρό χαρακτηριστεί ως επικίνδυνοι καρκινογόνοι παράγοντες. Κατά την εκτέλεση του προγράμματος National Toxicology Program (NTP, 7th Annual Report on Carcinogens, 1994) στις ΗΠΑ, χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός πειραματοζώων (μύες και επίμυες) και τα πειράματα έδειξαν αυξημένο κίνδυνο για διάφορους τύπους καρκίνου, αλλά με μηχανισμούς που παρουσιάζουν ιδιομορφίες. Η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (Environmental protection Agency, EPA) έχει θέσει όρια έκθεσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα λόγω των αμφιβολιών ως προς την καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο δράση των διοξινών και ιδιαίτερα της πλέον επικίνδυνης 2,3,7,8-TCDD. Η Ευρωπαϊκή

'Ενωση και άλλες βιομηχανικές χώρες έχουν θέσει δικά τους όρια για το νερό, τα τρόφιμα, το αίμα και το γάλα θηλασμού.

Η επικινδυνότητα των διοξινών οφείλεται στην ενεργοποίηση πλήθους ενζύμων, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν μία ποικιλία βλαβών. Ακόμη φαίνεται ότι μπορεί να δράσουν συνεργιστικά με διάφορες γνωστές καρκινογόνες ουσίες, αυξάνοντας κατά πολύ την καρκινογόνο δράση τους. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ως δυσκολία για την εξακρίβωση της μακροπρόθεσμης επικινδυνότητας σωρευμένων μικροποσοτήτων διοξινών στον ανθρώπινο οργανισμό η αδυναμία ανεύρεσης ομάδων πληθυσμών, που να μην έχουν εκτεθεί ποτέ σε διοξίνες (Greens.org: ¨The Political History of Dioxin¨, Kogevinas, 1997, Schnorr et al., 1993).

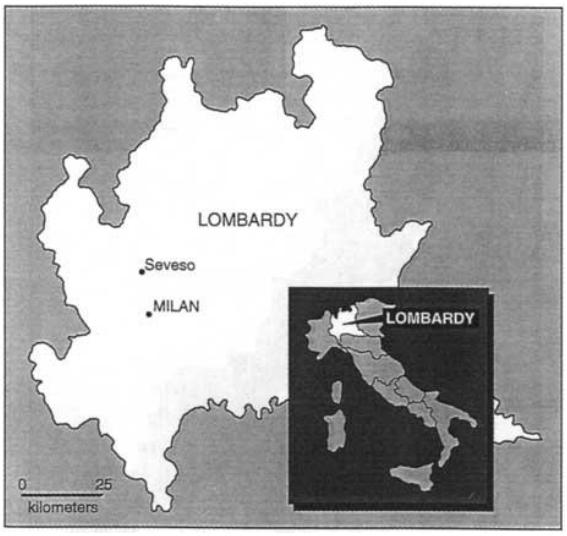
Ο βιοχημικός μηχανισμός που καθιστά την TCDD ισχυρό καρκινογόνο παράγοντα (αλλά και τις άλλες διοξίνες και τα παρόμοια με διοξίνες PCBs) για τον άνθρωπο δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός. Γενικά, θεωρείται ότι το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση της ουσίας με τον AhR. Στη συνέχεια, όπως έχει αναφερθεί αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα, το σύμπλοκο συνδέεται με το DNA στον πυρήνα με αποτέλεσμα την αλλοίωση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων, που με τη σειρά της οδηγεί σε αλλοίωση των επιπέδων συγκέντρωσης ορισμένων ειδικών πρωτεϊνών και ενζύμων στα κύτταρα, γεγονός το οποίο προκαλεί την έναρξη του καρκίνου (National Toxicology Program Fact Sheet, 2006: "Dioxins Mixtures Research).

Βιομηχανικά ατυχήματα που παρατηρήθηκαν με διοξίνες είναι τα ακόλουθα:

- 1949: Ατύχημα σε εργοστάσιο παρασκευής φυτοφαρμάκων της εταιρείας Monsanto στην πόλη Nitro της Δυτικής Βιργινίας των ΗΠΑ. Αναφέρεται ότι δηλητηριάστηκαν 240 άτομα.
- 1963: Διαφυγή διοξίνης σε εργοστάσιο της Philips-Duphar κοντά στο 'Αμστερνταμ. Η ρύπανση του εργοστασίου είχε τέτοια έκταση που χρειάστηκε να διαλυθεί και τα επιμέρους τμήματα να εγκλωβιστούν σε μπλοκ τσιμέντου, τα οποία τελικά πετάχτηκαν στον ωκεανό.
- 1964-68: Στο εργοστάσιο Spolana παρασκευής 2,4,5-τριχλωροφαινόλης και των παραγώγων της φυτοφαρμάκων στην πόλη Neratovice της Τσεχοσλοβακίας. Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του δηλητηριάστηκαν περίπου 80 εργάτες. Το 2002, κατά τη διάρκεια μεγάλων πλημμυρών, επήλθε

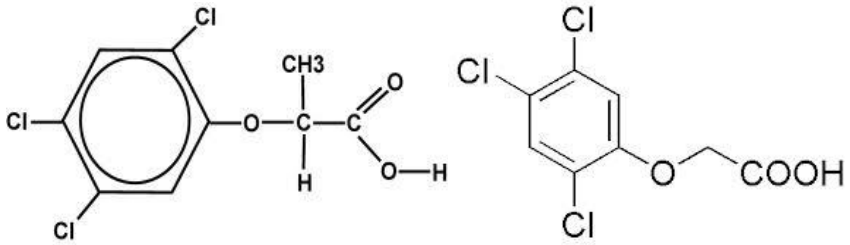
σοβαρή ρύπανση των ποταμών Έλβα και Μούλντε, όταν τα νερά των ποταμών "ξέπλυναν" τα ρυπασμένα κτήρια και εδάφη της περιοχής, γεγονός που οδήγησε στην απαγόρευση της κατανάλωσης ψαριών, αυγών και πουλερικών της περιοχής.

- Το ατύχημα του Seveso. Το ατύχημα συνέβη τον Ιούλιο του 1976, στη Βόρεια Ιταλία (βόρεια του Μιλάνου) σε μία βιομηχανία της πόλης Meda (19.000 κατοίκων το 1976) (Εικόνα 1), αλλά καταγράφηκε ως "καταστροφή του Seveso", επειδή η γειτονική πόλη του Seveso (17.000 κατοίκων το 1976) υπέστη το κύριο πλήγμα από τις συνέπειές του.




**Εικόνα 1. Η πόλη Seveso βόρεια του Μιλάνου**

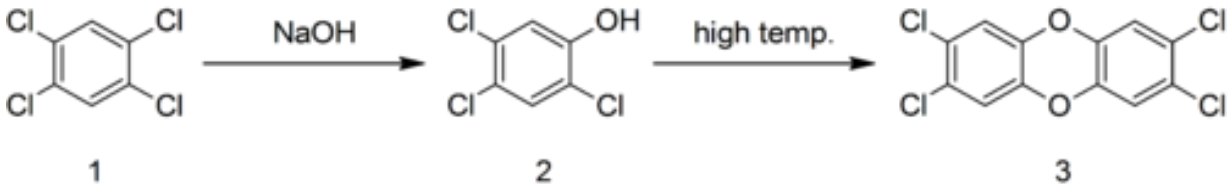
Στη Meda υπήρχε η μικρή βιομηχανία ICMESA (Industrie Chimiche Meda Società Azionaria), που ανήκε στη μεγάλη Ελβετική φαρμακευτική εταιρεία Hoffmann-La Roche. 'Ενα από τα προϊόντα της βιομηχανίας αυτής ήταν η 2,4,5-τριχλωροφαινόλη, πρώτη ύλη για την παραγωγή των ζιζανιοκτόνων 2,4,5-T και Silvex (ή Fenoprop) (Σχήμα 4).




Silvex (ή Fenoprop) 2,4,5-T

**Σχήμα 4 Οι δομές των ζιζανιοκτόνων 2,4,5-T και Silvex**

Λίγες ώρες μετά την έκρηξη παρατηρήθηκαν εγκαύματα στα πρόσωπα παιδιών. Οι αρχές άρχισαν να εξετάζουν προσεκτικότερα την κατάσταση πέντε ημέρες μετά το ατύχημα, όταν ήδη είχαν αρχίσει τα κουνέλια της περιοχής να ψοφούν μαζικά και να έχουν κιτρινίσει τα φύλλα των δέντρων. Μετά από δύο εβδομάδες διαπιστώθηκε ότι η κύρια αιτία δεν ήταν η 2,4,5-τριχλωροφαινόλη, η οποία είναι επίσης τοξική ουσία, αλλά το εξαιρετικά τοξικότερο παραπροϊόν διοξίνη (Σχήμα 5).




**Σχήμα 5. Η αντίδραση μετετροπής της 2,4,5-τριχλωροφαινόλης στο παραπροϊόν της TCDD**

Τρεις εβδομάδες αργότερα απομακρύνθηκαν 736 κάτοικοι που ζούσαν κοντά στο εργοστάσιο. Τον Σεπτέμβριο εμφανίστηκαν συμπτώματα χλωρακμής (το κύριο και εμφανές σύμπτωμα οξείας δηλητηρίασης από διοξίνες) σε 193 εργάτες της εταιρείας. 'Αμεσοι θάνατοι εξαιτίας του ατυχήματος δεν υπήρξαν, αλλά ο τοπικός πληθυσμός (~32.000 άτομα) ετέθη υπό παρακολούθηση για το ενδεχόμενο αύξησης ορισμένων ασθενειών και περιπτώσεων καρκίνου. Αρκετά παιδιά έπαθαν παροδικά χλωρακμή (Εικόνα 2), ενώ πολλά ζώα της περιοχής πέθαναν λόγω της ρύπανσης του εδάφους (το 4% από 80.000 ζώα).

**Εικόνα 2. Εμφάνιση χλωρακμής σε παιδιά**

Όσα ζώα επέζησαν σφαγιάστηκαν και τα σφάγια καταστράφηκαν για να αποφευχθεί η εισαγωγή διοξινών στην τροφική αλυσίδα. Για τα επόμενα 20 χρόνια πραγματοποιήθηκαν κλινικές και επιδημιολογικές έρευνες στον πληθυσμό και ειδικότερα στα πιο ευαίσθητα άτομα (παιδιά, έγκυοι,

ηλικιωμένοι, γυναίκες, κ.λπ.). Οι επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι στη ζώνη υψηλής έκθεσης υπήρξαν αυξήσεις κακοηθών νεοπλασμάτων, διαβήτη, ενδοκρινικών ανωμαλιών και γενικά αύξηση στη θνησιμότητα. Ωστόσο οι αυξήσεις αυτές δεν ήταν υπερβολικές και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Οι επιστήμονες πιστεύουν ότι ο χρόνος έκθεσης του πληθυσμού στην τοξική ουσία ήταν περιορισμένος, αλλά περιορισμένο ήταν και το χρονικό διάστημα μετά τη διαρροή για να εμφανισθούν σοβαρές ενδείξεις ασθενειών.

Η εμφάνιση χλωρακμής, ενός χαρακτηριστικού εξανθήματος που μοιάζει με ακμή, είναι ένα από τα κύρια κλινικά σημεία δηλητηρίασης από TCDD σε ανθρώπους (Panteleyev and Bickers, 2006, Sorgetal., 2009). Το διασημότερο θύμα της διοξίνης ήταν ο Victor Yushchenko, Πρόεδρος της Ουκρανίας (Εικόνα 3).

**Εικόνα 3. Ο Ουκρανός πολιτικός Victor Yushchenko , πριν και μετά τη δηλητηρίασή του με 2,3,7,8-TCDD**

Κατά τον Σεπτέμβριο του 2004 πιθανολογείται ότι πραγματοποιήθηκε δολοφονική απόπειρα κατά του Προέδρου της Ουκρανίας Victor Yushchenko. Αναφέρεται ότι στον Ουκρανό Πρόεδρο χορηγήθηκε μέσω της τροφής ποσότητα διοξινών κατά τη διάρκεια ενός επίσημου γεύματος. Μέσα σε λίγες ημέρες παρουσίασε οξεία παγκρεατίτιδα και στη συνέχεια έντονα συμπτώματα χλωρακμής με έντονη παραμόρφωση των χαρακτηριστικών του προσώπου του. Μεταφέρθηκε σε κλινική της Βιέννης, όπου οι εξετάσεις έδειξαν την παρουσία διοξινών σε συγκέντρωση 108.000 pg/g λίπους αίματος,

επίπεδα κατά 50.000 φορές υψηλότερα από τα μέσα επίπεδα του γενικού πληθυσμού. Από τη σχέση των συγκεντρώσεων των ομοειδών διοξινών που δεν διέφεραν σημαντικά από τα μέσα επίπεδα, εκτιμάται ότι η απόπειρα εναντίον του πραγματοποιήθηκε με σχεδόν καθαρή 2,3,7,8-TCDD σε ποσότητα περίπου 1 mg. Η περίπτωση του Yushchenko αποτέλεσε ευκαιρία για να διαπιστωθεί ο μεταβολισμός και η αποβολή της διοξίνης από τον ανθρώπινο οργανισμό. Για τα τρία επόμενα χρόνια παρακολουθήθηκε η συγκέντρωση της 2,3,7,8-TCDD και των μεταβολιτών της στο αίμα, στους λιπώδεις ιστούς, στα κόπρανα, στο δέρμα και στον ιδρώτα. Διαπιστώθηκε ότι η 2,3,7,8-TCDD αποβλήθηκε από τον οργανισμό κατά 60% αναλλοίωτη και κατά το υπόλοιπο ως μεταβολίτες-υδροξυπαράγωγα (ενώσεις που προκύπτουν με αντικατάσταση ενός ή δύο χλωρίων με υδροξύλια). Μεταβολίτες βρέθηκαν κυρίως στα κόπρανα και μόνο ίχνη τους στο αίμα. Ακόμη διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση των ενζύμων που προκαλούν τον μεταβολισμό της 2,3,7,8-TCDD απαιτεί την παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων της ουσίας. Το γεγονός αυτό ερμηνεύει τους σχετικά μικρούς χρόνους υποδιπλασιασμού της ένωσης (15,4 μήνες), όταν αυτή βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και τους αντίστοιχα μεγάλους χρόνους (6 περίπου έτη) υποδιπλασιασμού όταν η ουσία βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Να σημειωθεί ότι ο Yushchenko δεν ήταν το πρώτο θύμα οξείας δηλητηρίασης από 2,3,7,8-TCDD. Είχε προηγηθεί η περίπτωση δύο Αυστριακών γυναικών ηλικίας 30 και 27 ετών κατά τα έτη 1997-98. Και οι δύο γυναίκες ήταν υπάλληλοι ενός ερευνητικού ινστιτούτου υφασμάτων. Στην πρώτη μετρήθηκαν 144.000 pg/g λίπους αίματος (αντιστοιχούσε σε 25 μg/kg σωματικού βάρους ή πρόσληψη ποσότητας 1,6 mg 2,3,7,8-TCDD) και στη δεύτερη 26.000 pg/g λίπους αίματος (αντιστοιχούσε σε 6 μg/kg σωματικού βάρους ή πρόσληψη ποσότητας 0,4 mg 2,3,7,8-TCDD). Τα γαστρεντερικά συμπτώματα και οι αιματολογικές βλάβες πρακτικά υπεχώρησαν μετά 2-3 έτη θεραπευτικής αγωγής.

- Ένα ακόμα περιστατικό που αξίζει να σημειωθεί είναι αυτό που έλαβε χώρα στα τέλη Ιανουαρίου του 1999 στο Βέλγιο, όταν ένα μίγμα από PCBs και διοξίνες αναμίχθηκε από λάθος με ποσότητα ανακυκλωμένου λίπους που προοριζόταν για παραγωγή ζωοτροφής (Bernard et al., 2002). Αν και τα πρώτα σημάδια δηλητηρίασης εμφανίστηκαν τον Φεβρουάριο του 1999, η

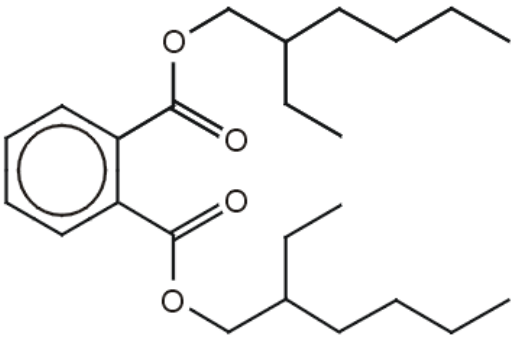
προέλευση και η έκταση της μόλυνσης ανακαλύφθηκαν τον Μάιο του ίδιου έτους. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, ο αριθμός των κτηνοτροφικών μονάδων που είχαν προμηθευτεί τη συγκεκριμένη ζωοτροφή ξεπερνούσε τις 2.500. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα μια πρωτοφανή κρίση στο χώρο των τροφίμων η οποία επεκτάθηκε σε όλη τη χώρα και κατά συνέπεια σε όλη την Ευρώπη. Για τη διαχείριση της κρίσης εφαρμόστηκε ένα μεγάλης έκτασης πρόγραμμα παρακολούθησης των επιπέδων PCBs και διοξινών στα τρόφιμα. Ο χαρακτηρισμός της μόλυνσης από PCBs, βασίστηκε στον προσδιορισμό δεικτών για εφτά PCBs. Επιπλέον προσδιορισμός 17 διοξινών γινόταν μόνο όταν οι συγκεντρώσεις των PCBs ξεπερνούσαν τα επίπεδα ανοχής του 0,1 (γάλα), των 0,2 (πουλερικά, βοδινό και χοιρινό κρέας) ή του 1 (ζωοτροφές) μg/g λίπους. Στο τέλος Δεκεμβρίου του 1999 είχαν πραγματοποιηθεί περισσότεροι από 55.000 έλεγχοι για PCBs και 500 για διοξίνες. Τα επίπεδα των ρυπαντών και το προφίλ των μολυσμένων ζωοτροφών επιβεβαίωσαν ότι το ατύχημα είχε προέλθει από μία και μοναδική περίπτωση μαζικής εισόδου PCBs στην τροφική αλυσίδα τον Ιανουάριο του 1999. Η συνολική ποσότητα των PCBs που αναμίχθηκαν με το ανακυκλωμένο λίπος ήταν 150 κιλά. Αυτό το μίγμα των PCBs περιείχε περίπου 1 γραμμάριο διοξινών.

Τα περισσότερο μολυσμένα προϊόντα τροφίμων προερχόντουσαν από κρέας κοτόπουλου και περιείχαν επίπεδα PCBs και διοξινών τουλάχιστον 100 φορές πάνω από τις μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές. Αν και ο βαθμός της μόλυνσης ήταν σημαντικός, θεωρήθηκε απίθανο το ατύχημα αυτό να είχε σοβαρές επιπτώσεις στη γενική υγεία του πληθυσμού του Βελγίου. Διπλασιασμός του φορτίου PCBs και διοξινών στον ενήλικα πληθυσμό θα απαιτούσε την κατανάλωση 10 έως 20 υψηλής μόλυνσης γευμάτων. Με δεδομένη την πολύ περιορισμένη αναλογία των μολυσμένων πουλερικών την εποχή του ατυχήματος στην τροφική αλυσίδα (περίπου 2%), το σενάριο των σοβαρών επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία μοιάζει μάλλον απίθανο και θα μπορούσε να ισχύει μόνο για τους κτηνοτρόφους οι οποίοι κατανάλωναν μολυσμένα προϊόντα της παραγωγής τους. Ακόμα όμως και σε αυτή την περίπτωση η επιβάρυνση του φορτίου των ρυπαντών στον οργανισμό αυτών των ανθρώπων θα ήταν ίδιο με περιπτώσεις ατόμων που καταναλώνουν συστηματικά μολυσμένα θαλασσινά.

### *3.1.4 Πλαστικοποιητές, βαφές, χρωστικές*

***Πλαστικοποιητές (Φθαλικές ενώσεις)***

Οι πλαστικοποιητές (plasticizers) είναι μικρά οργανικά μόρια τα οποία προστίθενται στα πολυμερή για να μειώσουν τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Οι πλαστικοποιητές προστίθενται σε αναλογίες από 1 έως 50% και καθιστούν τα πολυμερή πιο μαλακά και εύκαμπτα. Χωρίς πλαστικοποιητές τα πολυμερή θα ήταν ουσίες σκληρές, εύθρυπτες και δύσκολα θα μπορούσαν να μορφοποιηθούν και να αποκτήσουν τις επιθυμητές ιδιότητες. Οι πλαστικοποιητές δεν πρέπει να θεωρούνται ως απλά πρόσθετα πλαστικών, αλλά ως ουσίες που καθορίζουν δραστικά τις φυσικές ιδιότητές τους. Ο φθαλικός δι(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (DEHP) αποτελεί το πλέον τυπικό παράδειγμα πλαστικοποιητή και πράγματι είναι ο πλαστικοποιητής που παράγεται και χρησιμοποιείται περισσότερο από κάθε άλλο. Ο DEHP συχνά αναφέρεται ως φθαλικός διοκτυλοεστέρας (di-octyl-phthalate, DOP).



**Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας**
**di-(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP), di-octyl-phthalate (DOP)**

Οι φθαλικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στο PVC, είναι οι DEHP, DINP και DIDP. Οι εστέρες αυτοί αποδείχθηκε σε ξεχωριστά πειράματα ότι έχουν ελαφριά οιστρογόνο δράση (κατά $1x10^6$-$5x10^7$ φορές μικρότερη από την αντίστοιχη δράση της 17-β-οιστραδιόλης). Έτσι, μεγάλες δόσεις DEHP σε έμβρυα ποντικιών έδειξαν ότι δρουν ως αντιανδρογόνα (antiandrogens) παρεμποδίζοντας τη σύνθεση τεστοστερόνης. Το αποτέλεσμα αυτό ήρθε σε μια εποχή κατά την οποία μόλις είχαν εμφανισθεί τα πρώτα αποτελέσματα για ουσίες, που θα μπορούσαν να διαταράξουν την ορμονική ισορροπία σε βιολογικά συστήματα.

Οι πλαστικοποιητές εντοπίζονται στο νερό, στην τροφή, στον αέρα εσωτερικών χώρων και στην οικιακή σκόνη. Κατά συνέπεια οι άνθρωποι εκτίθενται σε αυτά τα χημικά σε καθημερινή βάση. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα είναι αυτό της διφαινόλης Α (BPA) και της 4-n-νονυλφαινόλης (nNP) οι οποίες έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα ανθρωπίνων ούρων. Πρόσφατη μελέτη του 2005 στις Ηνωμένες Πολιτείες έδειξε ότι μεταβολίτες των φθαλικών πλαστικοποιητών όπως οι DBP και BBP υπάρχουν στον οργανισμό τουλάχιστον του 75% του πληθυσμού. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων σε δείγματα ούρων παιδιών ήταν διπλάσιες απ'ό,τι σε αυτά των ενηλίκων. Φθαλικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους όπως ο φθαλικός διισονονυλεστέρας (DINP), ο φθαλικός δι-n-οκτυλεστέρας (DNOP) και ο φθαλικός διιδοδεκυλεστέρας (DIDP) χρησιμοποιούνται στην κατασκευή εύκαμπτου βινυλίου που υπάρχει στα πατώματα, στις ταπετσαρίες, στις συκευασίες τροφίμων, στους σάκκους αποθήκευσης αίματος και στα παιδικά παιχνίδια. Φθαλικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους όπως τα BBP και DBP χρησιμοποιούνται σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας όπως αρώματα, καλλυντικά, λοσιόν και βαφές νυχιών αλλά και σε βερνίκια. Η BPA χρησιμοποιείται σε πολυκαρβονικά πλαστικά τα οποία έχουν χρήση ως υλικά επίστρωσης σε μεταλλικά κουτάκια αναψυκτικών, συσκευασίες τροφίμων, παιδικά μπουκάλια και οδοντικά σφραγίσματα. Αλκυλοφαινόλες όπως η nNP και η 4-tert-οκτυλοφαινόλη (tOP) χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μη ιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών που βρίσκονται σε σαπούνια, καλλυντικά, χρώματα, ζιζανιοκτόνα και παρασιτοκτόνα αλλά και ως πρόσθετα σε πλαστικά. Η 4-χλωρο-3-μεθυλοφαινόλη (CMP) και η ρεζορκινόλη χρησιμοποιούνται ως αντισηπτικά ενώ η 2-φαινυλοφαινόλη (2-PP) είναι μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται στο κέρωμα λεμονιών. Τέλος, ο αδιπικός δις( 2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (DEHA) αντικαθιστά τα φθαλικά σε προϊόντα πολυβινυλοχλωριδίου (PVC). Πρόσφατη μελέτη του 2008 (Kruger et al, 2008) έδειξε ότι πολλά από τα συγκεκριμένα μόρια έχουν μία ασθενή δράση αγωνιστή του AhR η οποία γίνεται πολύ πιο ισχυρή όταν οι συγκεκριμένες ουσίες δρουν σε συνέργεια μέσα σε μείγματα. Οι ίδιες ουσίες εμφάνισαν επίσης δράση ανταγωνιστική έναντι του υποδοχέα ανδρογόνων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν το σημαντικό ρόλο που έχουν οι πλαστικοποιητές ως προσδέτες του AhR και γενικότερα ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs), ουσίες δηλαδή που προέρχονται από το περιβάλλον ή τη διατροφή και παρεμβαίνουν στη βιοσύνθεση των ορμονών, στη φυσιολογική σηματοδότηση ή στον μεταβολισμό. Οι δομές των πλέον διαδεδομένων πλαστικοποιητών παραθέτονται στον Πίνακα 2.

Table 1
Information of the tested compounds

| Phenols | Structure | CAS. no. | Company | Plasticizers | Structure | CAS. no. | Company |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bisphenol A (BPA) | | 80-05-7 | Sigma–Aldrich (UK) | Dibutyl phthalate (DBP) | | 84-74-2 | Aldrich (Germany) |
| 4-*n*Nonyl-phenol (nNP) | | 104-40-5 | Lancaster Synthesis Ltd (UK) | Benzyl butyl phthalate (BBP) | | 85-68-7 | Aldrich (Germany) |
| 4-*n,n*-Octyl phenol (tOP) | | 140-66-9 | Aldrich (Germany) | Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) | | 117-81-7 | Lancaster Synthesis Ltd (UK) |
| 2-Phenyl-phenol (2-PP) | | 90-43-7 | Aldrich (Germany) | Diisodecyl phthalate (DIDP) | | 26761-40-0 | Fluka (Germany) |
| 4-Chloro-3-methyl-phenol (CMP) | | 59-50-7 | Sigma–Aldrich (Germany) | Diisononyl phthalate (DINP) | | 68515-48-0 | Aldrich (Germany) |
| 2,4-Dichloro-phenol (DCP) | | 120-83-2 | Lancaster Synthesis Ltd (UK) | Dioctyl phthalate (DNOP) | | 117-84-0 | Fluka (Germany) |
| Resorcinol | | 108-46-3 | Riedel-de Haën Fine Chemicals (Germany) | Bis (2-ethylhexyl) adipate (DEHA) | | 103-23-1 | Lancaster Synthesis Ltd (UK) |

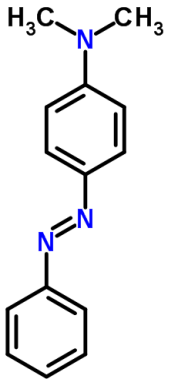
**Πίνακας 2. Οι δομές των πλέον διαδεδομένων πλαστικοποιητών**

## *Βαφές, Χρωστικές*

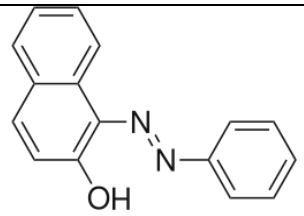
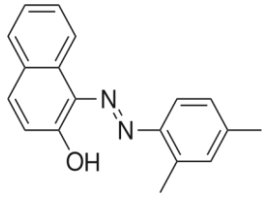
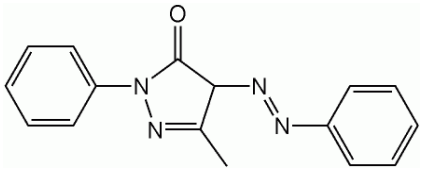
Τα λύματα από τις βιομηχανίες βαφής περιέχουν πολλές επικίνδυνες χημικές ουσίες και έχει δειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν γονοτοξικότητα και μεταλλαξιογένεση (Houk, 1992, Umbuzeiro et al., 2004). Αν και συγκεκριμένες καρκινογόνες βαφές έχουν απαγορευτεί, τοξικολογικά δεδομένα για βαφές ή παράγωγα βαφών είναι ανεπαρκή με τουλάχιστον 14 προϊόντα βαφών που χρησιμοποιούνται σε Ευρωπαϊκές χώρες να αναφέρονται ως μεταλλαξιογόνα το 2004 (Chung and Creniglia, 1992, Hildenbrand et al., 1999, Doi et al., 2005, Schneider et al., 2004). Επιπλέον, ενώ πολλές βαφές δεν βιοαποικοδομούνται αμέσως, η χλωρίωση ή ο οζονισμός έχει επίσης δειχθεί ότι αυξάνουν την τοξικότητα των λυμάτων από τις βιομηχανίες βαφών, γεγονός που αποτελεί ένδειξη σχηματισμού περισσοτέρων τοξικών ενδιάμεσων προϊόντων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επεξεργασίας τους

(Hitchcock et al., 1998, Kunz et al., 2002, Nukaya et al., 1997, Oguri et al., 1998). Έτσι, η διάθεση των μη επεξεργασμένων ή μη καταλλήλως επεξεργασμένων λυμάτων προϊόντων βαφής, μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο τον υδάτινο αποδέκτη.

Ανάμεσα στις τοξικές βαφές που απαγορεύτηκαν, οι βαφές sudan και η διμεθύλιο κίτρινο ή κίτρινο μεθύλιο (methyl yellow), έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των διοξινών (AhR) (Lubet et al., 1983, Kato et al., 2000). Στον Πίνακα 3 φαίνονται οι δομές μερικών χαρακτηριστικών χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ως χρωστικές. Περιβαλλοντικές ουσίες που αποτελούν προσδέτες του AhR, έχουν εντοπιστεί σε βιομηχανικά λύματα όπως αυτά από βιομηχανίες χαρτοποιίας ή λύματα που προέρχονται από υπεράκτια εξόρυξη πετρελαίου και από παραγωγή φυσικού αερίου (Zacharewski et al., 1995, Hurst et al., 2005). Όσον αφορά τις βιομηχανίες με προϊόντα χρωστικών, οι βαφές της διοξαζίνης ή φθαλοκυανίνης, έχει βρεθεί να είναι μολυσμένες με πολυχλωροδιβενζοδιοξίνες (PCDDs) και πολυχλωροδιβενζοφουράνια (PCDFs) εξαιτίας της χρήσης χλωριωμένων αρωματικών διαλυτών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής τους (Heindl and Hutzinger, 1989, Williams et al., 1992). Επιπλέον, διάφορα συνθετικά αζωχρώματα ή βαφές ανθρακινόνης, έχει επίσης αναφερθεί ότι ενεργοποιούν τον AhR (Lubet et al., 1983, Kato et al., 2000, Chou et al., 2006). Από τη στιγμή που είναι πιθανό αυτά τα λύματα των χρωστικών να περιέχουν χημικές ουσίες που είναι ικανές να προσδεθούν στον AhR, είναι απαραίτητη η διερεύνηση της εμφάνισης αυτών των προσδετών για να παρέχει βασικές πληροφορίες για μείωση του κινδύνου. Σε αυτή τη μελέτη, η δειγματοληψία μη επεξεργασμένου νερού, έγινε κοντά σε ένα εργοστάσιο λυμάτων που επεξεργάζεται τα λύματα των βιομηχανιών που χρησιμοποιούν βαφές μαζί με τα οικιακά λύματα.



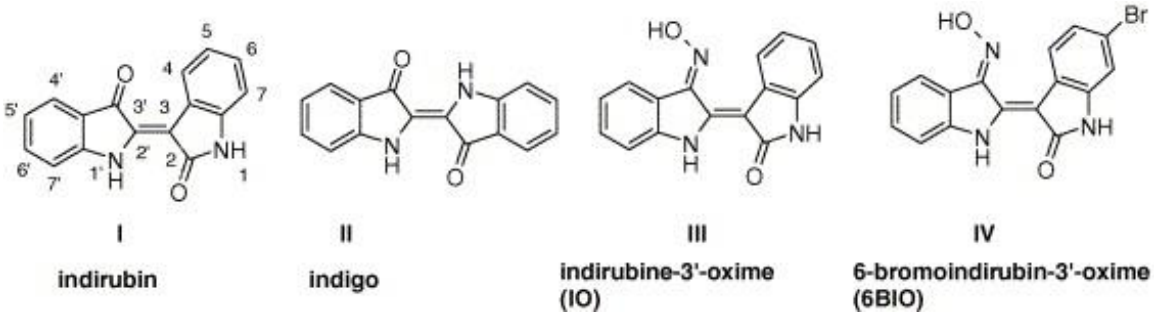

**methyl yellow**

| Sudan I | Sudan II | Sudan Yellow 3G |
|---|---|---|
| 1-phenylazonaphth-2-ol | 1-(2,4-dimethylphenyl) azonapthalen-2-ol | 3-Methyl-1-phenyl-4-(phenyldiazenyl)-1*H*-pyrazol-5(4*H*)-one |
|  |  |  |

**Πίνακας 3. Χημικές δομές χαρακτηριστικών χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως βαφές**

## *3.1.5. Ιντιρουμπίνες*

Τα ιντιγκοειδή είναι μία κατηγορία ενώσεων, που συμπεριλαμβάνει το ίντιγκο και ισομερή με αυτό μόρια. Πρόκειται για διμερή παράγωγα του ινδολίου, τα οποία είτε απομονώνονται από φυσικές πηγές (φυτά, γαστερόποδα μαλάκια, θηλαστικά και βακτήρια), είτε προκύπτουν από χημική σύνθεση. Στην κατηγορία των ιντιγκοειδών ανήκουν και τα παράγωγα ιντιρουμπίνης (2΄-3 σύνδεση των ινδολικών δακτυλίων) (Σχήμα 6), τα οποία αναφέρονται συλλογικά ως ιντιρουμπίνες και τα οποία έχουν επιδείξει ένα πλήθος φαρμακολογικών δράσεων, όπως είναι η αντικαρκινική, η νευροπροστατευτική, η αντιϊκή, η αντιπαρασιτική, η αντιφλεγμονώδης κ.α.




**Σχήμα 6. Δομές ιντιρουμπίνης και παραγώγων αυτής**

Οι ιντιρουμπίνες ανήκουν στην κατηγορία των φαρμοκολογικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Οι κυριότεροι μοριακοί στόχοι τους, οι οποίοι έχουν μελετηθεί εκτεταμένα μέχρι σήμερα, είναι οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3). Η αλληλεπίδραση των ιντιρουμπινών με τις

συγκεκριμένες κινάσες καθιστά τις ιντιρουμπίνες ισχυρούς κυτταροτοξικούς παράγοντες. Εκτός από τους προαναφερθέντες στόχους, έχει ανακαλυφθεί ότι παράγωγα ιντιρουμπινών αποτελούν ισχυρούς προσδέτες του AhR. Οι μοριακοί στόχοι των ιντιρουμπινών συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και σε άλλες βιοχημικές οδούς με αποτέλεσμα να εμπλέκονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπου παρατηρείται απορρύθμιση των οδών αυτών. Το γεγονός αυτό τις καθιστά πολύτιμα μόρια τόσο για τη διερεύνηση των κυτταρικών λειτουργιών όσο και για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

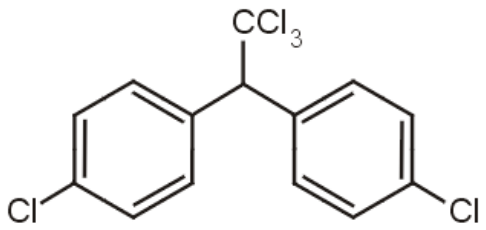
Ως προς τη δυνατότητα των ιντιρουμπινών να αποτελούν προσδέτες του AhR, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η κυτταροτοξικότητά τους δε σχετίζεται με τον συγκεκριμένο υποδοχέα. Αυτό αποδείχτηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα στα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο του AhR και τα οποία βρέθηκαν εξίσου ευαίσθητα στις ιντιρουμπίνες με κύτταρα τα οποία είχαν το γονίδιο του AhR. Αντίθετα, ένα έντονο κυτταροστατικό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση ενός παραγώγου ιντιρουμπίνης, της 1-μεθυλοϊντιρουμπίνης. Το συγκεκριμένο μόριο αν και είναι προσδέτης του AhR είναι αδρανές έναντι των κινασών. Η κυτταροστατική δράση της 1-μεθυλοϊντιρουμπίνης αποδόθηκε στην έκφραση του γονιδίου $p27^{KIP1}$ η οποία εξαρτάται από τον AhR. Η κυτταροστατική δράση της διοξίνης οφείλεται στον ίδιο μηχανισμό. Η συγκεκριμένη περίπτωση αποτελεί ένα παράδειγμα όπου η ίδια ομάδα βιοδραστικών μορίων εμφανίζει κυτταροστατική δράση η οποία οφείλεται στην ενεργοποίηση του AhR και ταυτόχρονα κυτταροτοξική δράση η οποία οφείλεται στην αναστολή πρωτεϊνικών κινασών.

### *3.1.6 Άλλες κατηγορίες προσδετών συνθετικής προέλευσης*

***ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ***

Ως παρασιτοκτόνο μπορεί να χαρακτηρισθεί οποιαδήποτε ουσία η οποία μπορεί να σκοτώσει, να απομακρύνει ή να ελέγξει συγκεκριμένες μορφές ζωής των φυτών ή των ζώων οι οποίες θεωρούνται ότι είναι παράσιτα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα ζιζανιοκτόνα τα οποία προορίζονται για την καταστροφή των ζιζανίων και άλλης ανεπιθύμητης βλάστησης, τα εντομοκτόνα που στοχεύουν στον έλεγχο μιας ευρείας κατηγορίας εντόμων, τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την

πρόληψη ανάπτυξης μούχλας και μυκήτων, τα απολυμαντικά που σχετίζονται με τον περιορισμό της εξάπλωσης των βακτηριδίων αλλά και άλλες ενώσεις. Πολλά παρασιτοκτόνα μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες ανάλογα με την χημική τους δομή. Έτσι, διακρίνονται σε οργανοχλωριούχες ενώσεις, οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά άλατα. Στην κατηγορία των οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων οι οποίοι δρουν προκαλώντας διατάραξη της ισορροπίας καλίου-νατρίου των νευρικών κυττάρων αναγκάζοντας το νεύρο να διαβιβάζει συνεχώς, ανήκει και το DDT.




**DDT**

**p,p'-Δίχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο,**
**p,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethane**

Το DDT έχει εξαιρετικές ιδιότητες για την καταπολέμηση των εντόμων, αλλά ως πολυχλωριωμένη ένωση είναι μη βιοδιασπώμενη και η τοξικότητά της αυξάνει με τις υψηλές συγκεντρώσεις που υπάρχουν στους λιπώδεις ιστούς. Η χρήση του DDT ως χρήσιμου εντομοκτόνου στη γεωργία των αναπτυγμένων χωρών και ιδιαίτερα των ΗΠΑ, αυξήθηκε αλόγιστα και με αλματώδη ρυθμό, ενώ οι επιπτώσεις στη ρύπανση του περιβάλλοντος εμφανίσθηκαν μόνο κατά τις επόμενες δεκαετίες.

Τα πρώτα συμπτώματα των επιδράσεων του DDT εμφανίσθηκαν στις δεκαετίες του 1950-60, όπως νεκρά ψάρια σε ποτάμια ή λίμνες μετά από ραντίσματα, μείωση των χρήσιμων εντόμων και αναπόφευκτα των πουλιών (που τρέφονται με αυτά) στις γεωργικές περιοχές. Ανάλογες παρατηρήσεις έκαναν και ορνιθολόγοι, που διαπίστωσαν μείωση αρπακτικών πουλιών (γεράκια, αετοί) σε διάφορες αγροτικές περιοχές (West and Campbell, 1946). Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά άλατα δρουν μέσω αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, επιτρέποντας έτσι στην ακετυλοχολίνη να μεταφέρει νευρικές ώσεις επ' αόριστον προκαλώντας μία ποικιλία συμπτωμάτων όπως αδυναμία ή παράλυση.

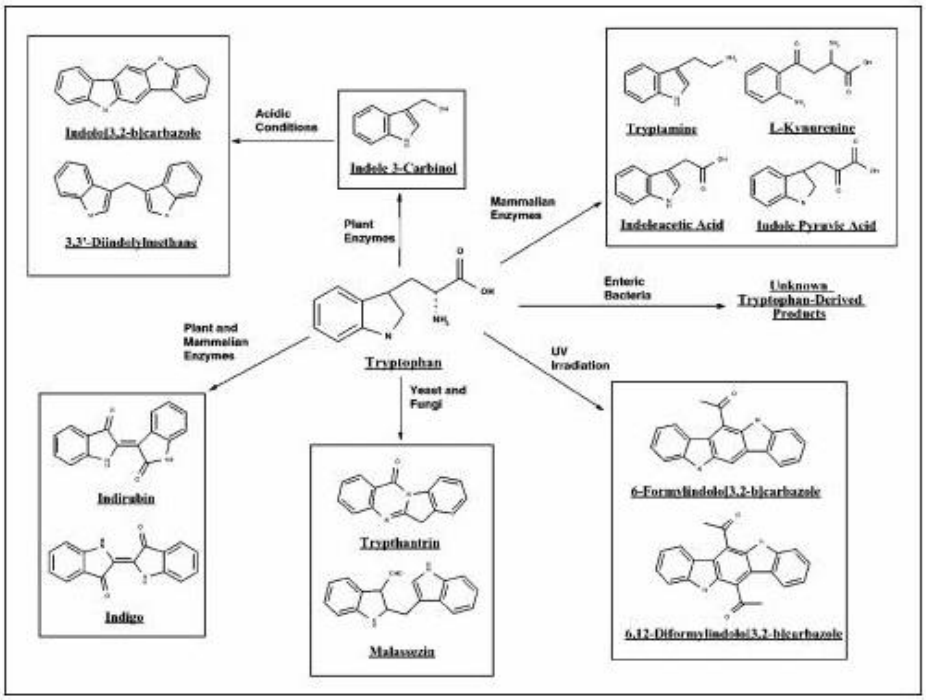
## 3.2 Προσδέτες φυσικής προέλευσης-Φυσικά Προϊόντα

Η σύνδεση του προσδέτη θεωρείται ως ένα κρίσιμο γεγονός για την ενεργοποίηση του AhR (Denison et al., 2002, Denison and Nagy, 2003). Όσον αφορά την επιλεκτικότητα στη σύνδεση του εκάστοτε προσδέτη με τον AhR, οι υπάρχουσες μελέτες έχουν δείξει ότι ο AhR είναι ένας υποδοχέας ο οποίος συνδέεται με μια ευρείας δομικής ποικιλότητας προσδέτες (Hahn, 2002, Denison and Nagy, 2003). Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε ουσίες συνθετικής προέλευσης, για τις οποίες μελετήθηκε ο ρόλος τους στην ενεργοποίηση του AhR. Όμως, πιο πρόσφατα άρχισε να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην κατανόηση του ρόλου των προσδετών φυσικής προέλευσης (φυσικών προϊόντων) στην ενεργοποίηση του AhR (Stevens et al., 2009, Tilg, 2012). Η έκθεση σε προσδέτες-φυσικά προϊόντα σχετίζεται κυρίως με τη διατροφή (Jeuken et al., 2003). Τρόφιμα φυσικής προέλευσης όπως τα λαχανικά ή μεταποιημένα προϊόντα που προέρχονται από αυτά, αποτελούν μία σημαντική πηγή ουσιών που μπορούν να λειτουργήσουν ως προσδέτες του AhR. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται και η ινδολο-3-καρβινόλη (indole-3-carbinol -I3C) η οποία μπορεί να βιομετατραπεί στο προϊόν συμπύκνωσης ινδολο-3,2-β-καρβαζόλη (indolo [3,2-b] carbazole-ICZ) το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερα ισχυρή συγγένεια για τον AhR. Η ουσία I3C επίσης μπορεί να μετατραπεί στον επιμέρους αγωνιστή 3,3-διινδολομεθάνιο (3,3′-diindolylmethane-DIM) (Gillner et al., 1993, Jellinck et al., 1993). Άλλα φυσικά προϊόντα που λειτουργούν ως προσδέτες του υποδοχέα διοξινών είναι η κουρκουμίνη (Ciolino et al., 1998) και τα καροτενοειδή (Gradelet et al., 1996). Τα φλαβονοειδή συμπεριλαμβανομένων των φλαβονών, φλαβονολών, φλαβανονών και ισοφλαβονών είναι επίσης μία άλλη ομάδα φυσικώς απαντώμενων προσδετών του AhR που προέρχονται από τη διατροφή (Denison and Nagy, 2003). Αξίζει να αναφερθεί ότι η πλειονότητα των φλαβονοειδών σύμφωνα με τις υπάρχουσες μελέτες δρούν ως ανταγωνιστές του AhR. Έχει προταθεί ότι ορισμένα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να ασκούν προστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από τις διοξίνες μέσω του ανταγωνισμού τους για τον AhR (Amakura et al., 2002, Tilg, 2012).

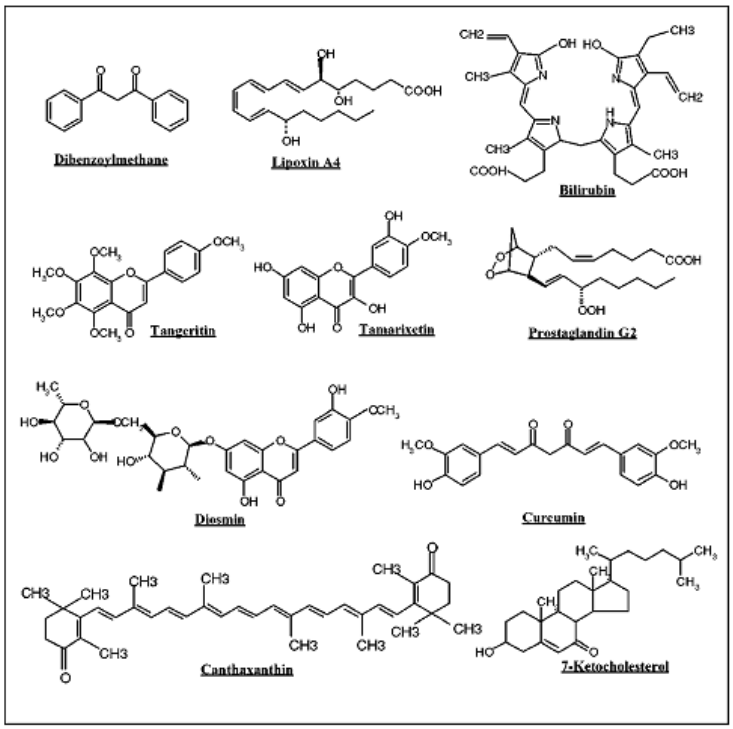
### *3.2.1. Ενεργοποίηση του AhR από εκχυλίσματα βοτάνων, φρούτων και λαχανικών και ουσιών που σχετίζονται με τη διατροφή*

Η πλειοψηφία των προσδετών που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα αντιπροσωπεύουν συνθετικές και ξενοβιοτικές ενώσεις αλλά πολυάριθμοι προσδέτες του AhR οι οποίοι είναι φυσικής προέλευσης (φυσικά προϊόντα) ή ενδογενείς προσδέτες έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και χαρακτηρισθεί (Denison and Nagy 2003, Denison et al., 2002). Ασφαλώς, η σπουδαιότερη πηγή έκθεσης των ανθρώπων αλλά και των ζώων σε αυτούς τους προσδέτες του AhR είναι μέσω της κατανάλωσης τροφίμων τα οποία εμπεριέχουν αυτές τις χημικές ουσίες. Διάφορες μελέτες έχουν περιγράψει μία ποικιλία από ουσίες οι οποίες είναι φυσικής προέλευσης και σχετίζονται με τη διατροφή. Αυτές οι ουσίες μπορούν απευθείας να ενεργοποιήσουν και/ή να αναστείλουν τη σηματοδότηση του βιοχημικού μονοπατιού του AhR (Denison and Nagy 2003, Denison et al., 2002). Η κατανάλωση της ινδολο-3-καρβινόλης (I3C), μία φυσικά απαντώμενη ένωση της οικογένειας των Brassica (π.χ. λαχανάκι Βρυξελλών, μπρόκολο, κουνουπίδι), έχει αποδειχθεί ότι επάγει την έκφραση του εξαρτώμενου από τον AhR γονιδίου (δηλ. CYP1A1) στον άνθρωπο και στα τρωκτικά (1Z7). Στο στομάχι, η I3C υφίσταται όξινη συμπύκνωση και μετατρέπεται σε ινδολο [3,2-b] καρβαζόλη (indolo[3,2-b]carbazole-ICZ), μία ένωση που προσδένεται στον AhR με χημική συγγένεια παρόμοια με αυτή της TCDD και είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής της έκφρασης γονιδίων που εξαρτώνται από τον AhR (1Z7). Σε πιο πρόσφατες μελέτες, μία ποικιλία από άλλα φυσικά προϊόντα όπως οι ινδόλες (θρυπτοφάνη και οι μεταβολίτες της), φλαβονοειδή, πολυφαινόλες και οξειδωμένα καροτενοειδή, έχουν ταυτοποιηθεί ως προσδέτες-αγωνιστές του AhR (Denison and Nagy 2003, Denison et al., 2002, Gradelet et al., 1996, Rannug et al., 1987, Helferich et al., 1991, Heath-Pagliuso et al., 1998, Gillner et al., 1989). Ενώ κάποια συγκεκριμένα φλαβονοειδή (π.χ. διοσμίνη, ταγκεριτίνη και τεμαριξετίνη) είναι αγωνιστές του AhR και ενεργοποιούν τη σηματοδότηση του βιοχημικού μονοπατιού του AhR (Ciolino et al., 1998, Canivenc-Lavier et al., 1996, Ashida et al., 2000, Allen et al., 2001), άλλα ασκούν ανταγωνιστική δράση και καταστέλλουν την έκφραση των εξαρτώμενων από τον AhR γονιδίων (Ashida et al., 2000, Allen et al., 2001, Ashida et al., 2000, Williams et al., 2000). Τα φλαβονοειδή απαντώνται ευρέως στη διατροφή, στα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι (Williams et al., 2000, Berhow et al., 1998, Formica and Regelson, 1995, Hertog et al., 1992) και έχουν βρεθεί στο αίμα σε

χαμηλή μικρομοριακή περιοχή (deVries et al., 1998, Nakagawa et al., 1997, Paganga and Rice-Evans, 1997), μία συγκέντρωση ικανή για πολλούς από αυτούς τους προσδέτες να ενεργοποιήσει ή να αναστείλει τον AhR. Έτσι, οι φυσικές αυτές χημικές ουσίες, φαίνεται να αποτελούν μία σημαντική πηγή ξενοβιοτικών προσδετών του AhR στις οποίες εκτίθενται οι άνθρωποι και τα ζώα. Οι περισσότερες από τις μελέτες που εξετάζουν τη δραστικότητα του AhR εξαιτίας των φυσικών προϊόντων, έχουν επικεντρωθεί κατά κύριο λόγο στην επίδραση των επιμέρους χημικών ουσιών παρά στην εκτίμηση της συνολικής δραστικότητας ενός ακατέργαστου εκχυλίσματος το οποίο θα μπορούσε να περιέχει ένα πολύπλοκο μείγμα από χημικές ουσίες. Ανάλυση μεμονωμένων χημικών ουσιών οι οποίες απομονώθηκαν από προϊόντα διατροφής, παρέχουν πληροφορίες όσον αφορά την ικανότητά τους να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν το βιοχημικό μονοπάτι του AhR αλλά αυτή η ανάλυση δεν μας παρέχει κάποια εικόνα για το κατά πόσο αυτές οι χημικές ουσίες μπορούν να ασκήσουν οποιαδήποτε βιολογική δραστηριότητα σχετιζόμενη με τον AhR όταν βρίσκονται σε εκχύλισμα του προϊόντος ή ακόμα και στο ίδιο το προϊόν. Έτσι, η αξιολόγηση της συνολικής δραστικότητας του AhR ενός ακατέργαστου εκχυλίσματος ενός τροφίμου θα μπορούσε να παρέχει πληροφορίες μεγαλύτερης αξίας όσον αφορά τη βιολογία και τη φυσιολογία του AhR. Παράλληλα ο Amakura και οι συνεργάτες του (Amakura et al., 2002) ανέφεραν την ικανότητα των ακατέργαστων εκχυλισμάτων από διάφορα φρούτα, λαχανικά, είδη τσαγιού και φυτικά προϊόντα, να ανταγωνίζονται τη σηματοδότηση του βιοχημικού μονοπατιού του AhR. Ωστόσο, η δράση αυτών των προϊόντων που υπάρχουν στα εκχυλίσματα ως αγωνιστές του AhR δεν αξιολογήθηκε. Στους Πίνακες 4 και 5 φαίνονται κάποιες χαρακτηριστικές ουσίες που απαντώνται στις τροφές και οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι παίζουν το ρόλο του προσδέτη στον AhR ενεργοποιώντας τον.




**Πίνακας 4. Η τρυπτοφάνη μπορεί να μετατραπεί μέσω πολλαπλών μηχανισμών σε προσδέτες του AhR και επαγωγείς των εξαρτώμενων από τον AhR γονιδίων.**




**Πίνακας 5. Δομές φυσικών προϊόντων που συνιστούν προσδέτες του AhR και επαγωγείς έκφρασηςτων εξαρτώμενων από τον AhR γονιδίων.**

## 3.3. Επιστημονικές απόψεις για το φυσιολογικό υπόστρωμα του AhR

Υπάρχει ένα πλήθος δεδομένων που υποδεικνύει ότι η φυσιολογική ενεργοποίηση του AhR οφείλεται σε ενδογενείς προσδέτες οι οποίοι παράγονται ή *in vivo* ή και σε κυτταροκαλλιέργειες. Παρ'όλα αυτά η ταυτότητα των φυσιολογικών αυτών υποστρωμάτων είναι ακόμα απροσδιόριστη και παραμένει ένα ανοιχτό επιστημονικό ερώτημα ιδιαίτερης σημασίας. Μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη του συμπλόκου AhR-ARNT στον πυρήνα των κυττάρων πειραματόζωων τα οποία δεν είχαν εκτεθεί σε ουσίες που ενεργοποιούν τον AhR. Τα αποτελέσματα αυτά εμμέσως υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός ενδογενούς υποστρώματος. Παρ'όλα αυτά μένει να διαπιστωθεί αν η πυρηνική παρουσία του AhR ήταν μεταγραφικά ενεργή ή λόγω μίας άλλης μη καθορισμένης κυτταρικής διαδικασίας. Τα πιο αξιόπιστα δεδομένα για την ύπαρξη ενός ενδογενούς φυσιολογικού προσδέτη του AhR προέρχονται από μελέτες με πειραματόζωα από τα οποία είχε απαλειφθεί το γονίδιο του AhR. Ένα ευρύ φάσμα ηπατικών βλαβών καθώς και αλλαγές στη λειτουργία του ανοσοποιητικού αλλά και βλάβες σε άλλους ιστούς, δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του AhR είναι απαραίτητη κατά τα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα κατά τα συγκεκριμένα κρίσιμα στάδια προκαλείται από κάποιον ενδογενή προσδέτη που υπάρχει στους συγκεκριμένους ιστούς. Πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες υποστηρίζουν επίσης την ύπαρξη ενός ενδογενούς προσδέτη. Σε αντίθεση με κυτταρικές σειρές όπου ανεξάρτητα από την παρουσία εξωγενών προσδετών παρατηρείται επαγωγή του κυττοχρώματος CYP1A1, στις ίδιες κυτταρικές σειρές όπου έχει απαλειφθεί το γονίδιο του ARNT δεν παρατηρείται επαγωγή των ενζύμων αυτών. Αντίστοιχες μελέτες έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο ενδογενής προσδέτης του AhR πέραν της εμπλοκής του στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών σχετίζεται και με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αλλά και τη διαφοροποίηση. Ένα άλλο επιχείρημα για την ύπαρξη ενδογενούς προσδέτη προέρχεται από το γεγονός ότι η ύπαρξη του γονιδίου του AhR παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης μέσα στα διάφορα είδη ζωής.

Μεταξύ των υποψηφίων ενδογενών προσδετών βρίσκονται παράγωγα τρυπτοφάνης (Oberg et al., 2005, Rannug, 2010), μεταβολίτες αραχιδονικού οξέος (Schaldach et al., 1999), προϊόντα αποικοδόμησης της αίμης (Phelan et al., 1998), παράγωγα χοληστερόλης (Savouret et al., 2001) και χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (McMillan and Bradfield, 2007). Ο πιο ισχυρός και υψηλότερης

χημικής συγγένειας υποψήφιος υποκαταστάτης, είναι το παράγωγο της τρυπτοφάνης FICZ (6-formylindolo [3,2-b] carbazole) (Rannug et al., 1987, Rannug, 2010). Το FICZ παράγεται από την τρυπτοφάνη με ακτινοβόληση ορατής και υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Αυτή η ένωση έχει βρεθεί σε ανθρώπινα δείγματα ούρων και αποδείχθηκε ότι προκαλεί παροδική επαγωγή του CYP1A1 και ανταγωνίζεται την TCDD για τη σύνδεση με τον AhR, αφού εμφανίζει μεγαλύτερη χημική συγγένεια από τη διοξίνη και η οποία φθάνει στο επίπεδο του $10^{-9}$ M (Rannug et al., 1987, Helferich and Denison, 1991). Σε αντίθεση με την TCDD, το FICZ αποτελεί υπόστρωμα για τα μεταβολικά ένζυμα της φάσης I όπως τα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 κατά τέτοιο τρόπο ώστε να συμμετέχει σε μία πορεία αυτορυθμιζόμενης ανατροφοδότησης η οποία διατηρεί τις συγκεντρώσεις του FICZ σε χαμηλά επίπεδα (Wincent et al., 2009).

## 4. Συνεργική δράση των βιοχημικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται ο AhR και ο οιστρογονικός υποδοχέας-Ενδοκρινική Διατάραξη

Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει την ύπαρξη διασταυρούμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βιοχημικών μονοπατιών (crosstalk) στα οποία συμμετέχει ο AhR και ενός αριθμού άλλων σηματοδοτικών οδών. Ανάμεσα σε αυτές, η αλληλεπίδραση με τον οιστρογονικό υποδοχέα-α (Estrogen receptor-alpha, ERa) είναι ίσως η καλύτερα τεκμηριωμένη (Kuil et al., 1998, Kim et al., 2000, Safe and Wormke, 2003, Marlowe and Puga, 2005, Esser et al., 2009). Αν και οι διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοπατιών που εμπλέκονται οι AhR και ERa είναι διαπιστωμένες, οι μηχανισμοί της αλληλεπίδρασης παραμένουν ακόμα ασαφείς και ελάχιστα κατανοητοί. Η ανασταλτική δράση του AhR στον ERa είναι καλά τεκμηριωμένη αλλά ορισμένες ομάδες απέδειξαν ότι ο AhR μπορεί να έχει επίσης οιστρογονική δράση στον ERa και κατά συνέπεια αγωνιστική δράση στα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκεται ο οιστρογονικός υποδοχέας (Abdelrahim et al., 2003, Safe and Wormke, 2003). Αντίστροφα, ο ρόλος του ERa στα μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία συμμετέχει ο AhR μπορεί να σχετίζεται με αναστολή σηματοδότησης, ενεργοποίηση σηματοδότησης ή και καθόλου επίδραση (Hoivik et al., 1997, Beischlag and Perdew, 2005, Matthews et al., 2005, 2007).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι χημικοί ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs) είναι ουσίες οι οποίες προέρχονται από το περιβάλλον ή τη διατροφή και παρεμβαίνουν στη βιοσύνθεση των ορμονών, στη φυσιολογική σηματοδότηση ή στον μεταβολισμό. Πολλοί EDCs εμφανίζουν οιστρογονική δράση και παρεμβαίνουν στη φυσιολογική οιστρογονική σηματοδότηση, η οποία ρυθμίζεται από τις δύο ισομορφές του οιστρογονικού υποδοχέα, τους ERα και ERβ. Οι φυσιολογικοί ρόλοι των υποδοχέων αυτών είναι είτε διακριτοί είτε κοινοί. Μεταξύ των κοινών αυτών ρόλων βρίσκεται και η διάδοση της οιστρογονικής σηματοδότησης. Ο ρόλος αυτός των ERs εξαρτάται από το γενικό κυτταρικό πλαίσιο, τη διαθεσιμότητα άλλων συμπαραγόντων και τους προσδέτες. Οι EDCs οι οποίοι στοχεύουν τα μονοπάτια οιστρογονικής σηματοδότησης μπορούν να τροποποιήσουν τη γονιδιακή και τη μη γονιδιακή δραστηριότητα των ERs μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με τους οιστρογονικούς υποδοχείς ή εμμέσως, μέσω μεταγραφικών παραγόντων όπως ο υποδοχέας των διοξινών AhR. Τέλος, η τροποποίηση της γονιδιακής δραστηριότητας μπορεί να γίνει μέσω διαφοροποίησης των μεταβολικών ενζύμων, τα οποία είναι καίριας σημασίας για τη φυσιολογική σύνθεση οιστρογόνων και το μεταβολισμό τους. Ο φυσιολογικός προσδέτης των υποδοχέων οιστρογόνου είναι το ενδογενές οιστρογόνο, δηλαδή η ορμόνη 17-β-οιστραδιόλη (E2). Αν και οι δύο ισομορφές του υποδοχέα οιστρογόνων παρουσιάζουν ίδια χημική συγγένεια για την 17-β-οιστραδιόλη, υπάρχουν πολλοί εξωγενείς προσδέτες οι οποίοι έχει αποδειχτεί οτι εμφανίζουν εκλεκτικότητα για κάποια από τις δύο. Λόγω του ότι οι περιοχές δέσμευσης των προσδετών στους υποδοχείς οιστρογόνου είναι σχετικά μεγάλων διαστάσεων, αυτοί έχουν μεγάλη τάση να δεσμεύουν εξωγενείς χημικές ουσίες. Παρά την ευρεία εκλεκτικότητα που εμφανίζεται από τους ERs προς διάφορους προσδέτες, σε αμφότερους τους υποτύπους των υποδοχέων εμφανίζονται κοινά δομικά μοτίβα, τα οποία ορίζουν την αλληλεπίδραση με τις ουσίες που έχουν οιστρογονική δράση. Παρά το ότι τα EDCs ασκούν τις βιολογικές τους δράσεις μέσω πολλαπλών μηχανισμών, πολλά από αυτά αλληλεπιδρούν με την οιστρογονική σηματοδότηση μέσω απευθείας πρόσδεσης με τους ERs. Μεταξύ τέτοιων ουσιών που λειτουργούν με τον προαναφερθέντα μηχανισμό βρίσκονται φάρμακα, διφαινύλια, φυτοοιστρογόνα, οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα και άλλα. Συχνά, τα EDCs δρούν μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Κάποιοι από αυτούς είναι η έμμεση δράση μέσω ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, κυρίως του AhR, αλλά και η τροποποίηση του μεταβολισμού των οιστρογόνων.

Οι χημικοί ενδοκρινικοί διαταρράκτες μπορούν να επηρεάσουν την οιστρογονική σηματοδότηση εμμέσως μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον AhR. Οι διοξίνες καθώς και άλλοι προσδέτες του AhR παρουσιάζουν κυρίως αντι-οιστρογονικη δράση (Ohtake et al., 2003, Shipley and Waxman, 2006) αλλά κάποιες φορές μπορεί να εμφανίζουν και ασθενή οιστρογονική δράση (Ohtake et al., 2003, Safe et al., 1991, Astroff et al., 1990, Zacharewski et al., 1994). Ο AhR αλλά και ο οιστρογονικός υποδοχέας είναι υποδοχείς χαμηλού βαθμού επιλεκτικότητας και προσδένουν χημικές ουσίες μεγάλης δομικής ποικιλότητας με βασικό κοινό χαρακτηριστικό τον υδροφοβικό τους χαρακτήρα. Έχει παρατηρηθεί ότι μεταξύ των προσδετών του AhR και του ER υπάρχει κάποια αλληλεπικάλυψη σε δομικό επίπεδο. Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι φάρμακα με αντιοιστρογονική δράση όπως η ταμοξιφαίνη αλλά και πολλοί άλλοι προσδέτες με οιστρογονική δράση, ενεργοποιούν τον AhR και επάγουν την έκφραση του CYP1A1 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού τα οποία δεν εκφράζουν τους οιστρογονικούς υποδοχείς (DuSell et al., 2010). Τα φλαβονοειδή που είναι ουσίες φυσικής προέλευσης που περιέχονται στη διατροφή, είναι γνωστά για την οιστρογονική τους δράση και μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τον AhR. Τέτοια είναι οι ισοφλαβόνες νταιτζεΐνη και γενιστεΐνη (Kuiper et al., 1998, Amakura et al., 2003, Zhang et al., 2003).

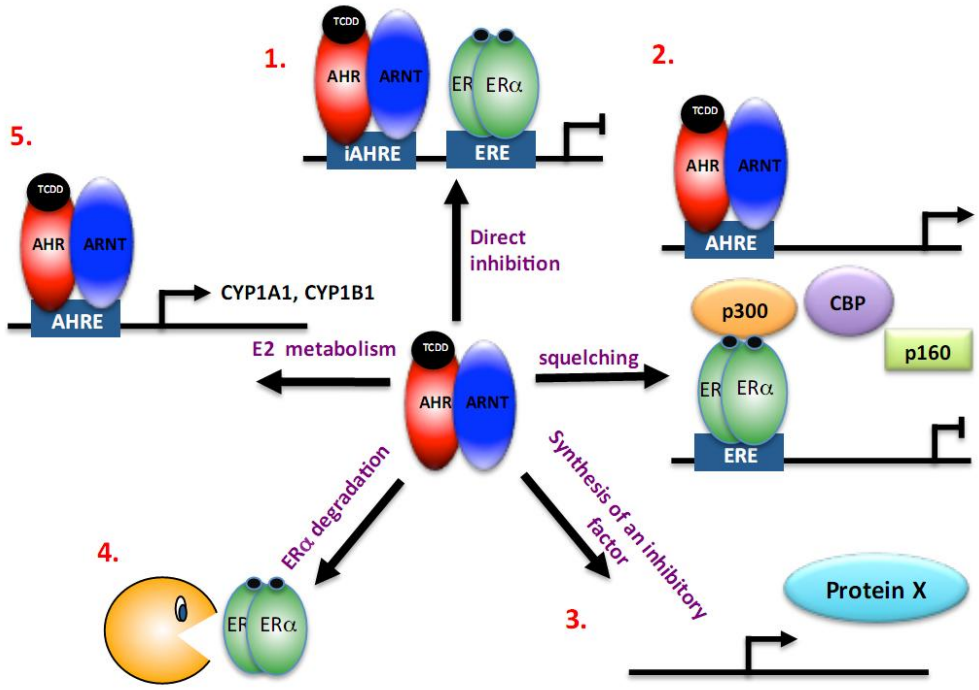
## 4.1. Ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις του AhR στα μονοπάτια του ERa

Οι ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονοπατιών του AhR και ERa προτάθηκαν για πρώτη φορά μετά από πειράματα σε τρωκτικά που πραγματοποιήθηκαν από τους Kociba et al (1978). Στις μελέτες αυτές εξετάστηκαν οι μακροπρόθεμες επιπτώσεις της έκθεσης σε TCDD μέσω της διατροφής. Παρατηρήθηκε ότι μετά από μία διετή διατροφική έκθεση σε διοξίνη, τα εκτιθέμενα τρωκτικά παρουσίασαν χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης όγκων του μαστού και της μήτρας σε σύγκριση με τα μη εκτιθέμενα σε διοξίνη τρωκτικά (Kociba et al., 1978). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην πρόταση ότι η ενεργοποίηση του AhR από τη διοξίνη μπορεί να αναστείλει τον σχηματισμό και την ανάπτυξη ορμονοεξαρτώμενων από την οιστραδιόλη όγκων (Safe and Wormke, 2003). Πρόσθετες μελέτες έδειξαν ότι χορήγηση οιστραδιόλης σε τρωκτικά και ποντίκια στα οποία είχε γίνει αφαίρεση ωοθηκών οδήγησε σε αύξηση του βάρους της μήτρας, της σύνθεσης του DNA και

στην επαγωγή διαφόρων γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τη λειτουργία της μήτρας (Romkes et al., 1987, Romkes and Safe, 1988, Umbreit and Gallo, 1988, Astroff and Safe, 1990, Astroff et al., 1990). Όμως, σε ζώα τα οποία εκτέθηκαν σε οιστραδιόλη μαζί με ταυτόχρονη χορήγηση TCDD, οι εξαρτώμενες από την ορμόνη αποκρίσεις ανεστάλησαν (μειωμένο βάρος μήτρας, σύνθεση του DNA, αναστολή της δέσμευσης του υποδοχέα της προγεστερόνης, δραστικότητα της υπεροξειδάσης, ενεργοποίηση του EGFR και του c-fos (Romkes et al., 1987, Romkes and Safe, 1988, Umbreit and Gallo, 1988, Umbreit et al., 1988, Astroff et al., 1990, 1991). Ο ρόλος του AhR στην εξαρτώμενη από την TCDD αναστολή της δράσης της οιστραδιόλης στις ορμονοεξαρτώμενες μεταβολές της μήτρας επιβεβαιώθηκε από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια στα οποία το γονίδιο του AhR είχε απαλειφθεί (Ahr-null mice, Buchanan et al., 2000, 2002). Σε αυτές τις μελέτες, η TCDD απέτυχε να αναστείλει τις επαγόμενες μεταβολές στη μήτρα από την οιστραδιόλη τεκμηριώνοντας έτσι τον ενεργοποιημένο AhR στη διαμόρφωση των ορμονικών αποτελεσμάτων.

Η χορήγηση της TCDD έχει επίσης αποδειχθεί ότι αναστέλει την ανάπτυξη όγκων του μαστού σε πειράματα χημικής καρκινογένεσης σε τρωκτικά και σε ποντίκια στα οποία είχε αφαιρεθεί ο θύμος αδένας και είχε ενσωματωθεί όγκος καρκίνου του μαστού ανθρώπινης προέλευσης (human breast cancer cell xenografts-Gierthy et al., 1993, Holcomb and Safe, 1994, Tritscher et al., 1995). Οι αγωνιστές του AhR έχει διαπιστωθεί οτι αναστέλλουν την έκφραση διαφόρων ρυθμιζόμενων από την οιστραδιόλη γονιδίων και πρωτεϊνών καθώς και των σχετιζόμενων με αυτά λειτουργιών συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών καθεψίνης D, Hsp27 (27kDa heat shock protein), του υποδοχέα προλακτίνης, του υποδοχέα προγεστερόνης και του CCND1 (Harper et al., 1994, Krishnan et al., 1994, Zacharewski et al., 1994, Krishnan et al., 1995, Lu et al., 1996, Wang et al., 1998, Duan et al., 1999, Porter et al., 2001). Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας καρκινικές κυτταρικές σειρές ορμονοεξαρτώμενου ER-θετικού καρκίνου μαστού, ωοθηκών και ενδομητρίου. Η TCDD και άλλοι προσδέτες του AhR μείωσαν επίσης τα επίπεδα έκφρασης του ERa σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές T-47D, MCF-7 και ZR-75, σχετίζοντας αυτή τη μείωση με την ενεργοποίηση του AhR από τη διοξίνη (Harris et al., 1990, Merchant et al., 1993, Zacharewski et al., 1994, Wormke et al., 2000, Ohtake et al., 2007).

Παρά τις πολυάριθμες *in vivo* αλλά και *in vitro* μελέτες, οι ακριβείς ανασταλτικοί μηχανισμοί της οιστρογονικής σηματοδότησης παραμένουν ασαφείς. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί (Σχήμα 7) συμπεριλαμβανομένων της καταστολής κοινών μεταξύ των δύο μονοπατιών συνενεργοποιητών, της σύνθεσης ανασταλτικών πρωτεϊνών, της αύξησης του μεταβολισμού οιστρογόνων, της σύνδεσης του AhR με τμήματα του DNA σε σημεία που κωδικοποιούν ανασταλτικά στοιχεία απόκρισης σε περιοχές που περιλαμβάνουν τα γονίδια-στόχους του ERa και της αύξησης της αποικοδόμησης του ERa μέσω του πρωτεασώματος (Safe and Wormke, 2003). Ωστόσο, πολλοί από αυτούς τους μηχανισμούς προκαλούν γενικευμένη αναστολή επειδή διαταράσσουν με γενικευμένο τρόπο και αδιακρίτως τα βιοχημικά μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία συμμετέχει ο ERa (π.χ. μειωμένα επίπεδα οιστρογόνου και μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης). Αυτό θα οδηγούσε σε αναστολή της συνολικής σηματοδότησης στην οποία εμπλέκεται ο ERa. Περαιτέρω μελέτες του ανασταλτικού ρόλου του AhR στην έκφραση γονιδίων της μήτρας μέσω της διαμεσολάβησης του ER, έδειξαν οτι η αναστολή δεν είναι τόσο γενικευμένη αλλά περιορίζεται σε μία υποκατηγορία ορμονοεξαρτώμενων γονιδίων (Boverhof et al., 2008). Αυτό υποδηλώνει ότι οι προηγούμενοι μηχανισμοί δεν μπορούν να περιγράψουν πλήρως τον τρόπο με τον οποίο ο AhR προκαλεί τις εκλεκτικές ανταγωνιστικές προς τον ER δράσεις του. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ERa συμμετέχει στην πρόσδεση σε γονίδια-στόχους του AhR από αγωνιστές του τελευταίου αλλά όχι από ανταγωνιστές του (Beischlag and Perdew, 2005, Matthews et al., 2005, Abdelrahim et al., 2006). Η παρουσία του ERa σε αυτά τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα μπορεί να έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στα βιοχημικά μονοπάτια σηματοδότησης του ERa και κατά συνέπεια υποδεικνύει ένα νέο μηχανισμό για την αναστολή της οιστρογονικής δραστηριότητας μέσω της διαμεσολάβησης του AhR. Τρέχοντα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι ο AhR ασκεί μία ειδική εκλεκτική ρύθμιση στη δραστηριότητα του ERa μέσω γονιδιακών μηχανισμών αν και περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν αυτή την υπόθεση.




**Σχήμα 7. Προτεινόμενοι μηχανισμοί αναστολής από τον AhR των μονοπατιών σηματοδότησης στα οποία εμπλέκεται ο οιστρογονικός υποδοχέας ERa.**

**1. Άμεση αναστολή μέσω στοιχείων απόκρισης του DNA σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Aryl Hydrocarbon Response Elements-AHREs)**

**2. Καταστολή κοινών μεταξύ των δύο μονοπατιών συνενεργοποιητών**

**3. Σύνθεση ανασταλτικών πρωτεϊνών**

**4. Αύξηση της αποικοδόμησης του ERa μέσω του πρωτεασώματος**

**5. Τροποποιημένος μεταβολισμός του ER μέσω της αύξησης έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYP1A1 και CYP1B1**

## 4.2. Ανασταλτικές επιδράσεις του ERa στα μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία συμμετέχει ο AhR

Σχετικά με την αλληλεπίδραση των βιοχημικών μονοπατιών των AhR και ERa, υπάρχει ιδιαίτερη αβεβαιότητα ως προς την επίδραση των οιστρογόνων στη μεταγραφή γονιδίων τα οποία ελέγχονται από τον AhR, καθώς διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει είτε ενεργοποίηση, είτε αναστολή ή καθόλου επίδραση (Thomsen et al., 1994, Kharat and Saatcioglu, 1996, Hoivik et al., 1997, Beischlag and Perdew, 2005, Matthews et al., 2005). Ο Ricci και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι μειώθηκε σημαντικά η επαγωγή του CYP1A1 από την TCDD σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 αλλά και στα καρκινικά κύτταρα ECC-1 του ενδομητρίου μετά από την παράλληλη χορήγηση οιστραδιόλης και ανταγωνιστών του ER,

αποκαθιστώντας έτσι την εξαρτώμενη από την TCDD επαγωγή του CYP1A1 (Ricci et al., 1999). Προτάθηκε ότι ο ανασταλτικός αυτός μηχανισμός οφειλόταν στον υπό καταστολή περιοριστικό παράγοντα που εμπλέκεται στη μετενεργοποίηση του CYP1A1 και ονομάζεται πυρηνικός παράγοντας-1 (Ricci et al., 1999). Επιπλέον, σε κύτταρα ποντικού Hepa-1, ο ενεργοποιούμενος από την οιστραδιόλη ERa ανέστειλε την επαγόμενη από την TCDD έκφραση του CYP1A1 μέσω της σύνδεσης του AhR στο DNA και πιο συγκεκριμένα στα στοιχεία απόκρισης του DNA σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες (AHREs-Kharat and Saatcioglu, 1996). Σε μία πιο πρόσφατη δημοσίευση αναφέρθηκε ότι ο ενεργοποιημένος από την οιστραδιόλη ERa λειτουργεί ως καταστολέας μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης του συμπλόκου AHR-ARNT στη ρυθμιστική περιοχή των CYP1A1 και CYP1B1 (Beischlag and Perdew, 2005). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η ελάχιστη αναστολή επιτυγχάνεται μετά την προσθήκη οιστραδιόλης (Hoivik et al., 1997, Wormke et al., 2000, Matthews et al., 2005). Η προσθήκη του οιστρογόνου δεν επηρέασε την έκφραση του CYP1A1 με την διαμεσολάβηση της TCDD τόσο στα MCF-7 κύτταρα αλλά όσο και στα Hepa-1 σε αντίθεση με ό,τι είχε αναφερθεί στο παρελθόν. Σε κύτταρα ενδομητρίου Ishikawa, η οιστραδιόλη δεν οδήγησε σε αναστολή της εξαρτώμενης από την TCDD λειτουργίας του κυτοχρώματος CYP1A1 (Wormke et al., 2000). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να κατανοηθεί καλύτερα η ανασταλτική δράση του ERa στα μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο AhR.

## 4.3. Θετική επίδραση του οιστρογονικού υποδοχέα στην ενεργοποίηση του AhR

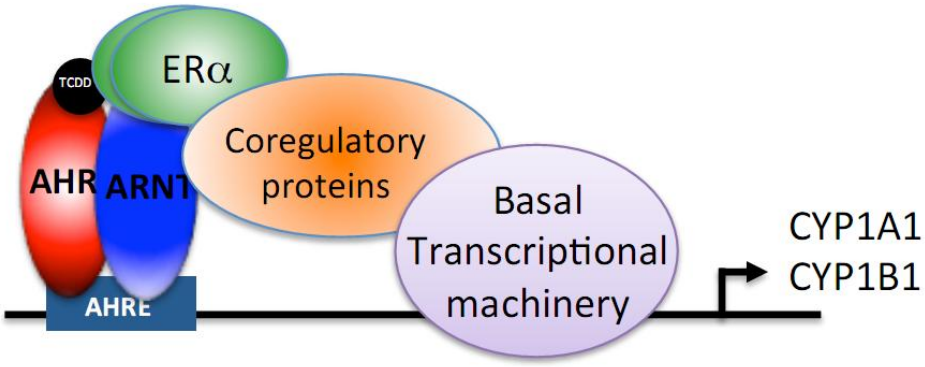
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο ERa έχει θετικό ρυθμιστικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο AhR (Thomsen et al., 1994, Spink et al., 2003, Matthews et al., 2007). Έχει επίσης δειχθεί ότι ο ERa απουσία του προσδέτη επηρεάζει την ενεργοποίηση του AhR. Η εισαγωγή εξωγενούς ERa σε ERa-αρνητικά καρκινικά κύτταρα του μαστού MDA-MB-231, αποκαθιστά την έκφραση των εξαρτώμενων από την TCDD γονιδίων, υποδηλώνοντας έτσι το θετικό ρόλο του ERa στη μετενεργοποίηση του AhR (Thomsen et al., 1994). Περαιτέρω ανάλυση διαφορετικών ανθρωπίνων καρκινικών σειρών, έχουν δείξει μία θετική συσχέτιση

ανάμεσα στην έκφραση του ERa και την ενεργοποίηση του AhR (Vickers et al., 1989, Angus et al., 1999, Sladek, 2003, Spink et al., 2003). Η χρόνια χορήγηση οιστραδιόλης σε θετικά σε ERa καρκινικά κύτταρατ του μαστού MCF-7, ήταν αναγκαία συνθήκη για τη διατήρηση της έκφρασης του AhR σε υψηλά επίπεδα καθώς και την επαγωγή των CYP1A1 και CYP1B1 (Spink et al., 2003). Σε μερικές *in vivo* μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι σε θηλυκούς αρουραίους οι οποίοι ελάμβαναν χρόνια δόση της TCDD, αυξήθηκε η συχνότητα εμφάνισης υπερπλασίας του ήπατος σε σχέση με τους αντίστοιχους αρσενικούς, τονίζοντας έτσι τη συμμετοχή των οιστρογόνων στην αναστολή των επιδράσεων που ρυθμίζονται από τον AhR (Kociba et al., 1978, Lucier et al., 1991). Επιπλέον, η παράλληλη χορήγηση οιστραδιόλης ενίσχυσε την επαγόμενη από την TCDD έκφραση του CYP1A1 σε αρουραίους που υπέστησαν ωοθηκεκτομή, παρέχοντας έτσι μία περαιτέρω απόδειξη ότι ο ERa μπορεί να εμπλέκεται στη σηματοδότηση του βιοχημικού μονοπατιού του AhR (Kociba et al., 1978, Lucier et al., 1991, Sarkar et al., 2000, Wyde et al., 2001). Λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη αυτές τις μελέτες μπορεί να προταθεί ότι ο ERa έχει πιθανώς θετικό ρόλο στη ρύθμιση των σηματοδοτικών βιοχημικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται ο AhR.

## 4.4. Ο ρόλος του οιστρογονικού υποδοχέα ως ρυθμιστή της ενεργοποίησης του AhR

Οι αποκλίσεις στη βιβλιογραφία όσον αφορά το ρόλο του ERa στη διαμόρφωση της σηματοδότησης του βιοχημικού μονοπατιού του AhR, μπορεί να οφείλεται στους πιθανούς του ρόλους ως ένας γενικός ή ένας ειδικός συρρυθμιστής της σηματοδότησης του βιοχημικού μονοπατιού του AhR. Πρόσφατα δείχθηκε ότι η χορήγηση TCDD επάγει την πρόσληψη του ERa στην ρυθμιστική περιοχή των CYP1A1 και CYP1B1, των δύο γονιδίων στόχων του AhR. Αυτή η πρόσληψη του ERa ενισχύθηκε περαιτέρω μετά από παράλλλη χορήγηση οιστραδιόλης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ορμόνη μπορεί να επηρεάσει θετικά τη δραστηριότητα του AhR (Matthews et al., 2005). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η μέσω του RNA εξουδετέρωση του ERa μείωσε την έκφραση του CYP1A1 η οποία επάγεται από την TCDD (Matthews et al., 2005) (Σχήμα 8). Αυτά τα ευρήματα επισημαίνουν τη δυνατότητα επιρροής που μπορεί να έχει στην μετενεργοποίηση του AhR η πρόσληψη του ERa.

Ωστόσο, δεν είναι σαφές κατά πόσο ο ERa είναι ένα γενικό συστατικό του ενεργού συμπλόκου του AhR ή είναι απλά παρών σε επιλεγμένους προαγωγούς.




**Σχήμα 8. Η χορήγηση TCDD επάγει την ενεργοποίηση του ERa και την αλληλεπίδρασή του με τα γονίδια-στόχους του AhR, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα κυτοχρώματα CYP1A1 και CYP1B1. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν έναν πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου ο οιστρογονικός υποδοχέας ασκεί την επίδρασή του στα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται ο AhR.**

## 4.5. Ο ρόλος του οιστρογονικού υποδοχέα στον καρκίνο του μαστού

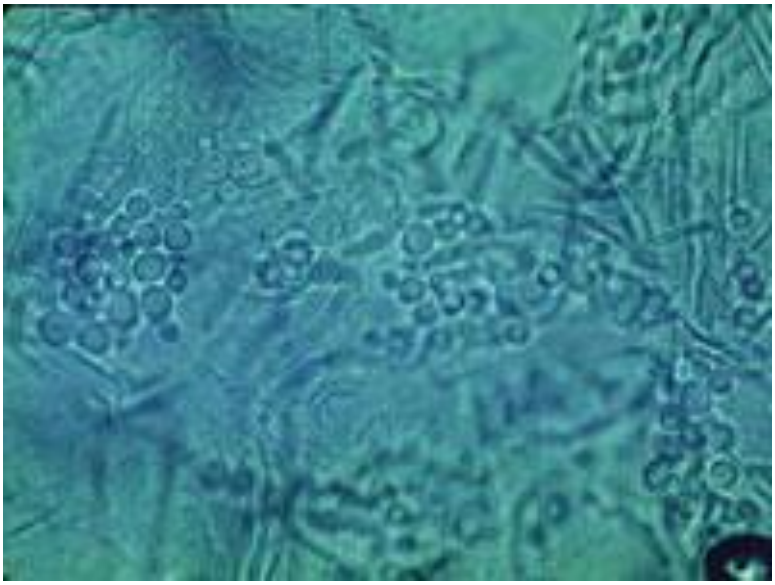
Οι αντιοιστρογονικές επιδράσεις του AhR στον μαστικό αδένα έχουν οδηγήσει στην πραγματοποίηση μελετών που σκοπό είχαν τη διερεύνηση της δυνατότητας του υποδοχέα να αποτελεί στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Οι αγωνιστές του AhR είναι ισχυροί αναστολείς της ανάπτυξης όγκων του μαστού σε ζωικά μοντέλα τρωκτικών, σε αθυμικούς ποντικούς που φέρουν ανθρώπινα μοσχεύματα καρκινικών κυττάρων (xenografts) και στην προκαλούμενη από DMBA χημική καρκινογένεση (Gierthy et al., 1993, Holcomb and Safe, 1994). Οι ανασταλτικές επιδράσεις των αναστολέων του AhR στα καρκινικά κύτταρα του μαστού που είναι θετικά στον ERa (MCF-7, T-47D, ZR-75), παρείχαν μία περαιτέρω επιβεβαίωση για την πιθανή θεραπευτική ωφέλεια έναντι του καρκίνου του μαστού. Αυτό ισχύει δεδομένου ότι η ενεργοποίηση του AhR μπορεί να αναστείλει τα γονίδια που εξαρτώνται από την οιστραδιόλη, να επάγει την αποικοδόμηση του ERa και να αναστείλει τον εξαρτώμενο από την οιστραδιόλη κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Safe and Wormke, 2003, Matthews and Gustafsson, 2006, Ohtake et al., 2007, Hall et al., 2010). Οι φυσικής προέλευσης προσδέτες του AhR όπως η ινδολο-3-καρβαζόλη (I3C) και το DIM έχει αποδειχτεί ότι δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη μαστικών όγκων σε μοντέλα αρουραίων (Safe et al., 1999, 2000). Η αποτελεσματικότητά τους

στη μείωση του σχηματισμού όγκων οδήγησε στην ανάπτυξη εκλεκτικών ρυθμιστών του AhR (Selective AhR Modulators). Δύο κατηγορίες ενώσεων βρίσκονται σήμερα υπό έρευνα για την πιθανή θεραπευτική τους αξία. Μία κατηγορία αποτελείται από ενώσεις που σχετίζονται δομικά με την I3C και η δεύτερη ομάδα των ενώσεων αποτελείται από υποκατεστημένα αλκυλοπολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (alternate-substituted alkyl polychlorinated dibenzofurans-PDCFs, Safe et al., 1999, Safe and McDougal, 2002, Murray et al., 2010). Αυτές οι ενώσεις αναστέλουν τις αποκρίσεις τις επαγόμενες από την E2 *in vivo* αλλά και *in vitro* και μειώνουν την ανάπτυξη του μαστικού όγκου και την αύξηση σε ζωικά μοντέλα ποντικών και αρουραίων (Harris et al., 1990, Astroff and Safe, 1991, Dickerson et al., 1995, McDougal et al., 1997). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο AhR μπορεί να είναι ένας εν δυνάμει θεραπευτικός στόχος για τον μη ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού (Zhang et al., 2009). Προς το παρόν δεν υπάρχει καλή δυνατότητα έγκαιρης πρόγνωσης για το συγκεκριμένο καρκίνο, ενω οι υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες. Ο AhR εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού τα οποία στερούνται τον ERa (μη ορμονοεξαρτώμενος καρκίνος) αλλά ο ρόλος του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη δεν έχει μελετηθεί εντατικά (Wang et al., 1997). Χρησιμοποιώντας την τριπλή αρνητική κυτταρική γραμμή MDA-MB-468, αποδείχθηκε ότι η TCDD αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της επαγωγής του παράγοντα TGFα, ο οποίος έχει προσδιοριστεί ως παρεμποδιστικός της αναπτυξιακής λειτουργίας της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (Wang et al., 1997). Οι προσδέτες του AhR επίσης προκάλεσαν διαφοροποίηση στα κύτταρα καρκίνου του μαστού τα οποία στερούνται ERa και ανέστειλαν την εισβολή τους (Hall et al., 2010). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν την πιθανή αξία των προσδετών του AhR για τη θεραπεία του μη ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού.

## 5. Νεότερα δεδομένα για την εμπλοκή του AhR στην παθολογία διαφόρων ασθενειών (συμβιωτικοί μύκητες του γένους *Malassezia* και δερματοπάθειες)

Οι μύκητες του γένους *Malassezia* είναι συμβιωτικοί με τον άνθρωπο μικροοργανισμοί όπου κάτω από ελλιπώς κατανοητές συνθήκες μπορούν να γίνουν παθογόνοι (Ashbee, 2007, Gaitanis et al., 2012). Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι

συγκεκριμένα στελέχη του μύκητα απομονωμένα από δείγματα ασθενών (με δερματικές μυκητιάσεις), μπορούν να παράγουν μεταβολίτες που δρουν ως αγωνιστές του AhR. Το δέρμα υγιών ανθρώπων φιλοξενεί σημαντικό φορτίο συμβιωτικών μυκήτων του γένους *Malassezia.* Οι μύκητες αυτοί εμπλέκονται στην παθογένεση ποικίλων δερματικών ασθενειών. Οι μύκητες *Malassezia* μπορούν να προκαλέσουν μία ασθένεια η οποία καλείται ποικιλόχρους πιτυρίαση (pytiriasis versicolor PV). Η δερματοπάθεια αυτή είναι μία φλεγμονώδης κατάσταση η οποία είναι ελαφράς μορφής παρά το μεγάλο μυκητιακό φορτίο του δέρματος. Στην ασθένεια αυτή μεταβάλλεται η λειτουργία των μελανοκυττάρων όπως φαίνεται και από το σχηματισμό υπερ- ή υποχρωματισμένων δερματικών πλακών (Thoma et al., 2005). Επίσης, οι μύκητες του γένους *Malassezia* σχετίζονται με τις εξάρσεις συγκεκριμένων φλεγμονωδών δερματοπαθειών όπως η ατοπική και η σμηγματορροϊκή δερματίτιδα (SD, Gupta et al., 2004). Οι συγκεκριμένες παθήσεις είναι ευρέως διαδεδομένες και μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Το γένος *Malassezia* αποτελείται από 17 είδη (Gaitanis et al., 2012) με πιο κοινά στον άνθρωπο τα *M.globosa, M.restricta, M.sympodialis, and M.furfur* (εικόνα 4), με τα δύο πρώτα να υπάρχουν στο δέρμα σχεδόν όλων των ανθρώπων (Tajima et al., 2008).



**Εικόνα 4. Η *Malassezia furfur* όπως φαίνεται κάτω από το μικροσκόπιο**

Μεγάλη σημασία για την κατανόηση του ρόλου των μυκήτων στις δερματοπάθειες είναι η περιγραφή των παθολογικών ειδών ή στελεχών και η κατανόηση των μηχανισμών τοξικότητας ή παθογένειας. Την τελευταία δεκαετία έχει αναγνωρισθεί

ένα εύρος από μεταβολίτες που έχουν βάση το ινδόλιο σε καλλιέργειες *in vitro* στελεχών *Malassezia furfur*. Αυτοί οι μεταβολίτες έχουν συσχετισθεί με το παθογόνο δυναμικό του είδους (Mayser and Gaitainis, 2010). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι μύκητες του είδους που απομονώθηκαν από ασθενείς που έπασχαν από σμηγματορροϊκή δερματίτιδα, συνέθεταν ουσίες όπως η μαλασσεζίνη, η ινδολο[3,2-b]καρβαζόλη (ICZ) και η πιτυριακιτρίνη (Gaitanis et al., 2008). Αξιοσημείωτο ήταν ότι η συγκέντρωση των ουσιών ήταν πολύ υψηλότερη στις συγκεκριμένες *in vitro* καλλιέργειες σε σχέση με αντίστοιχες μετρήσεις που είχαν πραγματοποιηθεί απευθείας σε υγιές δέρμα. Η μαλασσεζίνη προκαλεί απόπτωση στα ανθρώπινα μελανοκύτταρα μέσω της ενεργοποίησης του AhR, ενώ η ICZ είναι ένας επίσης ισχυρός προσδέτης του υποδοχέα. Η παρουσία μαλασσεζίνης στο ανθρώπινο δέρμα έχει θεωρηθεί ως πιθανός τρόπος ανίχνευσης της *M. furfur* δεδομένου ότι η συγκεκριμένη ουσία παράγεται μόνο από αυτό το είδος. Μέχρι πριν από λίγο καιρό, η παραγωγή αυτών των βιοδραστικών παραγώγων ινδολίου, έχει αποδειχθεί μόνο σε επίπεδο *in vitro* και μόνο για το είδος *M. furfur*. Το γεγονός αυτό προκαλούσε ισχυρούς ενδοιασμούς ως προς την κλινική σημασία των μεταβολιτών αυτών. Όπως έχει αναφερθεί ο AhR είναι ένας ορφανός υποδοχέας με πολλές και διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Μεταξύ των άλλων έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην ομοιόσταση του δέρματος (Bock and Kohle, 2009), την επιτάχυνση της επούλωσης τραυμάτων (Barouti et al., 2009) και της μερικής άμυνας του οργανισμού έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας μέσω της ενδοκυττάριας φωτοχημικής παραγωγής ενός ισχυρού προσδέτη, της 6-φορμυλοϊνδολοκαρβαζόλης (FICZ) (FICZ, Fritsche et al., 2007). Ως προς την παθοφυσιολογία του δέρματος είναι γνωστό ότι η διοξίνη (TCDD) προκαλεί τα καταστροφικά της αποτελέσματα μέσω της συνεχούς και επίμονης ενεργοποίησης του AhR και της βιοχημικής σηματοδότησης που αυτή συνεπάγεται.

Πλέον, η ενεργοποίηση του AhR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμεσολάβηση των βιολογικών και τοξικολογικών αποτελεσμάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα ενός αριθμού περιβαλλοντικών ξενοβιοτικών, μετξύ αυτών της ιντιρουμπίνης και της ICZ (Esser et al., 2009, Vlachos et al., 2012). Τα δύο τελευταία προϊόντα αποτελούν επίσης μεταβολίτες της *Malassezia*. Μετά τη μελέτη των μεταβολιτών της *M. furfur* σε επίπεδο *in vitro*, μία πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες που συνιστούν και ισχυρούς προσδέτες του AhR,

συντίθενται επίσης από το συγκεκριμένο μύκητα *in vivo,* στο δέρμα ασθενών που πάσχουν από σμηγματορροϊκή και ατοπική δερματίτιδα. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μίας εξαιρετικά ευαίσθητης τεχνολογίας η οποία μετράει τη δυνατότητα μίας χημικής ένωσης να ενεργοποιεί τον AhR και κατά συνέπεια την εξαρτώμενη από αυτόν έκφραση γονιδίων (βιοδοκιμασία CALUX) (Denison et al., 2004). Μέσω της μεθόδου αυτής, η ανάλυση εκχυλισμάτων δειγμάτων δέρματος ασθενών, έδειξαν σημαντικά αυξημένη ενεργοποίηση του AhR σε σχέση με δείγματα ελέγχου. Η παραγωγή ινδολικών παραγώγων από συγκεκριμένα στελέχη του μύκητα αυτού σε συνδυασμό με την παρουσία αυτών των ουσιών στο δέρμα ασθενών, συνηγορεί στην υπόθεση ότι οι αγωνιστές αυτοί του AhR αποτελούν ορισμένους από τους πλέον τοξικούς παράγοντες του μύκητα αυτού. Αν και η σημασία της παρουσίας των μυκήτων του γένους αυτού στο ανθρώπινο δέρμα συχνά αγνοείται ή υποεκτιμάται, με βάση τα νέα αυτά πειραματικά δεδομένα της ισχυρής ενεργοποίησης του AhR σε κερατινοκύτταρα HaCaT από εκχυλίσματα της *Malassezia,* μπορεί να προταθεί το εξής: η παρουσία ενός μικροοργανισμού με τη δυνατότητα να συνθέτει συνεχώς ισχυρούς ενεργοποιητές του AhR επάνω στο ανθρώπινο δέρμα πιθανώς έχει ένα κρίσιμο ρόλο αφ’ενός στην ομοιόσταση του δέρματος και αφ’ετέρου στην ανάπτυξη δερματοπαθειών όπως η σμηγματορροϊκή δερματίτιδα και η ατοπική δερματίτιδα.

## 6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετάται η σημασία της πρωτεΐνης AhR στην εμφάνιση μίας πληθώρας βιολογικών και τοξικολογικών αποκρίσεων του ανθρώπινου οργανισμού προς ένα πλήθος ξενοβιοτικών παραγόντων τοξικών για τον άνθρωπο. Ο AhR είναι ένας ορφανός υποδοχέας και η απουσία βεβαιότητας για το φυσιολογικό υπόστρωμά του κάνει ακόμη πιο περίπλοκη την προσπάθεια κατανόησης του ρόλου της πρωτεΐνης στον υγιή οργανισμό. Η ανακάλυψη του AhR στηρίχτηκε στην τοξικότητα που παρουσίαζαν οι διοξίνες για τον οργανισμό του ανθρώπου και από την ανακάλυψή του κι έπειτα, οι περισσότερες μελέτες εστίασαν στην ανίχνευση των μηχανισμών μέσω των οποίων ο AhR επάγει ή καθοδηγεί την τοξικότητα αυτή. Μόνο πρόσφατα έγιναν ορισμένες προσπάθειες να διατυπωθούν υποθέσεις για το φυσιολογικό του ρόλο στον οργανισμό, οι οποίες υπέδειξαν ότι η παρουσία του μοιάζει να είναι απαραίτητη για τη σωστή και ομαλή ανάπτυξη των ανώτερων

οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη διαπίστωση ότι το γονίδιο του AhR υπάρχει σε όλους τους ανώτερους οργανισμούς υποδεικνύει τη σπουδαιότητα της πρωτεΐνης σε μηχανισμούς και λειτουργίες των αντίστοιχων οργανισμών οι οποίοι δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί. Αν και οι μελέτες που έχουν σαν αντικείμενο τη φυσιολογική λειτουργία του AhR δεν έχουν καταλήξει ακόμη σε ασφαλή συμπεράσματα, οι σημαντικά περισσότερες μελέτες που αφορούν στην εμπλοκή του στην εμφάνιση τοξικότητας εξαιτίας της παρουσίας συγκεκριμένων ξενοβιοτικών έχουν αποδώσει ένα πλήθος επιβεβαιωμένων αποτελεσμάτων που κάνουν εξαιρετικά κατανοητό το ρόλο της πρωτεΐνης στους αντίστοιχους μηχανισμούς.

Η βασική διάσταση της γνώσης που υπάρχει κατά συνέπεια σχετικά με τη βιολογία του AhR αφορά στον τρόπο με τον οποίο ο υποδοχέας αυτός εμπλέκεται στην εμφάνιση τοξικών αποκρίσεων και στα μονοπάτια που συμμετέχουν στις αποκρίσεις αυτές σε βιοχημικό επίπεδο. Η όχι πρόσφατη διαπίστωση ότι οι διοξίνες έχουν καρκινογόνο δράση, σχετίζεται άμεσα με τον AhR και αποτελεί την πιο μελετημένη πλευρά της τοξικολογίας του υποδοχέα. Ο AhR αποτελεί το στόχο των διοξινών στον οργανισμό. Οι διοξίνες εισέρχονται στον οργανισμό από το περιβάλλον και συνδέονται με τον AhR προκαλώντας την έναρξη μίας σειράς γεγονότων, αποτέλεσμα των οποίων είναι η μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα του κυττάρου ως ετεροδιμερούς μαζί με την πρωτεΐνη Arnt, η αλληλεπίδρασή του με το DNA και η επαγωγή της μεταγραφής ενός πλήθους γονιδίων που κωδικοποιούν μεταβολικά ένζυμα. Μεταξύ των ενζύμων αυτών είναι και τα κυτοχρώματα τα οποία στη συνέχεια προσδένουν τα μόρια των διοξινών και τα μετατρέπουν σε οξειδωμένα παράγωγα. Τα συγκεκριμένα μόρια όμως αποτελούν επίσης προσδέτες του AhR οι οποίοι με τη σειρά τους προκαλούν εκ νέου τη μεταγραφή μεταβολικών ενζύμων, εγκαθιστώντας με τον τρόπο αυτό έναν φαύλο κύκλο που καταλήγει στη διαρκή και επίμονη ενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών που συμμετέχουν σε αυτόν. Το γεγονός της διαρκούς ενεργοποίησης βιοχημικών μονοπατιών τα οποία σχετίζονται με μεταγραφή γονιδίων αποτελεί μία επικίνδυνη κατάσταση που μπορεί εύκολα να εκτραπεί προς την εμφάνιση νεοπλασίας. Με παρόμοιο αλλά λιγότερο κατανοητό τρόπο λαμβάνουν χώρα οι τοξικές αποκρίσεις άλλων ξενοβιοτικών τα οποία αποτελούν επίσης προσδέτες του AhR. Η πρόσδεση των μορίων αυτών που οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων τα οποία εξαρτώνται από τον AhR, περιγράφεται σαν

ενεργοποίηση του υποδοχέα και τα αντίστοιχα μόρια ονομάζονται αγωνιστές του AhR. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν εκτός από τις διοξίνες και άλλα μόρια όπως οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, τα διβενζοφουράνια καθώς και ουσίες που βρίσκονται σε βαφές, διάφορες χρωστικές και ορισμένοι πλαστικοποιητές. Οι μηχανισμοί τοξικότητας των ουσιών αυτών δεν εξαρτώνται μόνο απο τον AhR αλλά συμμετέχουν σε αυτούς και άλλοι βιοχημικοί μηχανισμοί όπως χημικές τροποποιήσεις στο DNA.

Την αντίθετη αν και λιγότερο μελετημένη δράση έχουν ουσίες που ονομάζονται ανταγωνιστές και έχουν κυρίως φυσική προέλευση και προσλαμβάνονται από τον οργανισμό μέσω της τροφής. Οι ουσίες αυτές συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα αλλά η αλληλεπίδρασή τους αυτή δεν οδηγεί στα βιοχημικά γεγονότα που περιγράφηκαν στην περίπτωση των διοξινών. Η πρόσδεση των ανταγωνιστών στην πρωτεΐνη οδηγεί αντίθετα στην απενεργοποίηση του υποδοχέα. Κατά συνέπεια, η ευεργετική επίδραση που φαίνεται να έχει η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν ουσίες με δράση ανταγωνιστή του υποδοχέα, σχετίζεται με την μερική αναστολή των τοξικών επιπτώσεων των αγωνιστών λόγω του ανταγωνισμού συγκεκριμένων μορίων για την πρόσδεση στην ίδια πρωτεΐνη.

Ιδαίτερο ενδιαφέρον για τη βιολογία του AhR παρουσιάζει η αλληλεπίδρασή του με έναν άλλο σημαντικό υποδοχέα, τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Όπως και στην περίπτωση της προσπάθειας κατανόησης του φυσιολογικού ρόλου του AhR, έτσι κι εδώ τα δεδομένα που υπάρχουν δεν προσφέρουν μία πλήρως κατανοητή εικόνα για την αλληλεπίδραση αυτή. Έτσι, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις ο AhR μοιάζει να έχει ρόλο αρνητικού ρυθμιστή της φυσιολογικής λειτουργίας του ER και της αντίστοιχης οιστρογονικής σηματοδότησης, υπάρχουν συστήματα στα οποία παρατηρείται η αντίθετη επίδραση. Με αντίστοιχο τρόπο η λειτουργία του ER ως ρυθμιστή των βιοχημικών μονοπατιών στα οποία λαμβάνει μέρος ο AhR είναι πολυσήμαντη. Ίσως το κυριότερο συμπέρασμα που έχει προκύψει από τις μελέτες αυτές είναι ότι η φυσιολογική λειτουργία του AhR δεν εξαντλείται στη δημιουργία απόκρισης των οργανισμών προς ορισμένα ξενοβιοτικά αλλά σχετίζεται με ουσιαστικό τρόπο με τη διαδικασία της σωστής ανάπτυξης. Η επικοινωνία μεταξύ αυτών των δύο υποδοχέων αποκτά ιδιαίτερη σημασία όταν λάβει κανείς υπόψιν το γεγονός οτι πολλές από τις ουσίες που είναι γνωστές ως αγωνιστές του AhR έχουν ενοχοποιηθεί ταυτόχρονα και ως ενδοκρινικοί διαταράκτες. Η μελέτη της

αλληλεπίδρασης αυτής μεταξύ AhR και ER προσφέρει μεγάλα περιθώρια επιστημονικών ανακαλύψεων δεδομένης της ελλιπούς κατανόησης των ιδιαίτερα περίπλοκων μηχανισμών μέσω των οποίων διαμεσολαβείται αυτή η αλληλεπίδραση. Παραταύτα, ενθαρρυντικό θεωρείται το γεγονός οτι πολλές από τις ερευνητικές ομάδες που εξειδικεύονται στον AhR θεωρούν τον υποδοχέα αυτό ως πιθανό στόχο φαρμακοθεραπείας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων όπως αυτών του μαστού ή του ενδομητρίου.

Ο AhR αποτελεί έναν από τους λιγότερο καλά μελετημένους υποδοχείς του ανθρώπου κι αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη σημαντική επίδραση που μοιάζει να έχει η λειτουργία του στην ανθρώπινη υγεία. Το γεγονός ότι οι βιοχημικές αποκρίσεις του AhR και οι συνέπειές τους στην υγεία σχετίζονται άμεσα με φαινόμενα περιβαλλοντικά όπως η ρύπανση, η διαχείριση των τοξικών αποβλήτων αλλά και η διατροφή, υποδεικνύουν την ανάγκη για την περαιτέρω μελέτη και έρευνα για το ρόλο του AhR στη δημόσια υγεία. Σε αυτή την προσπάθεια κεντρικό ρόλο οφείλει να διαδραματίσει εκτός από την ακαδημαϊκή και ερευνητική κοινότητα και η πολιτεία.

## 7. Βιβλιογραφία


Abdelrahim M., Ariazi E., Kim K., Khan S., Barhoumi R., Burghardt R., Liu S., Hill D., Finnell R., Wlodarczyk B. et al.. 3-Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha. *Cancer Research.* 2006, **66**, 2459–2467.

Abdelrahim M., Smith, R.3. and Safe S.. Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. *Molecular Pharmacology*, 2003, **63**, 1373–1381.

Allen S.W., Mueller L., Williams S.N., Quattrochi L.C., Raucy J. The use of a high-volume screening procedure to assess the effects of dietary flavonoids on human CYP1A1 expression. *DrugMetab.Dispos*. 2001, **29**, 1074-1079.

Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Kitagawa H, Fujino J, Sasaki K, Toyoda M, Yoshida T, Maitani T. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay. *Biol Pharm Bull.* 2003, **26**, 532–539.

Amakura Y., Tsutsumi T., Nakamura M., Kitagawa H., Fujino J., Sasaki K., Yoshida T., Toyoda M. Preliminary screening of the inhibitory effect of food extracts on activation of the aryl hydrocarbon receptor induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin. *Biol.Pharm.Bull.* 2002, **25**, 272-274.

Angus W.G., Larsen M.C. and Jefcoate C.R.. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis.* 1999, **20**, 947–955.

Anoek Jeuken, Bart J.G.Keser, Elaine Khan, Abraham Brouewer, Jan Koeman and Michael S. Denison. Activation of the Ah Receptor by Extracts of Dietary Herbal Supplements, Vegetables and Fruits. J.*Agric.FoodChem.* 2003, **51**, 5478−5487.

Antonsson C., Whitelaw M.L., McGuire J., Gustafsson J.A. and Poellinger L.. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Molecular and Cellular Biology.* 1995, **15**, 756–765.

Ashbee H.R. Update on the genus Malassezia. Med. Mycol., 2007, 45, 287–303.

Ashida H. Suppressive effects of flavonoids on dioxin toxicity. *Biofactors* 2000, **12**, 201-206.

Ashida H., Fukuda I., Yamashita T., Kanazawa K. Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBSLett.* 2000, **476**, 213-217.

Astroff B, Rowlands C, Dickerson R, Safe S. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibition of 17 beta-estradiol-induced increases in rat uterine epidermal growth factor receptor binding activity and gene expression. *Mol Cell Endocrinol*. 1990, **72**, 247–252.

Astroff B. and Safe S.. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin as an antiestrogen: effect on rat uterine peroxidase activity. *Biochemical Pharmacology.* 1990, **39**, 485–488.

Astroff B., Eldridge B. and Safe S.. Inhibition of the 17 beta-estradiol-induced and constitutive expression of the cellular protooncogene c-fos by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the female rat uterus. *Toxicological Letters*. 1991, **56**, 305–315.

Astroff B., Rowlands C., Dickerson R. and Safe S.. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibition of 17 beta-estradiol-induced increases in rat uterine epidermal growth factor receptor binding activity and gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1990, **72**, 247–252.

Bandiera S., Safe S. and Okey A.B.. Binding of polychlorinated biphenyls classified as either phenobarbitone-, 3-methylcholanthrene- or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions.* 1982, **39**, 259–277.

Barouti N., Fontao L., Pardo B. et al.. AhR pathway as a novel pharmacological target for wound healing. *J. Invest. Dermatol.*, 2009,**129**, S80, (Abstr).

Beischlag T.V. and Perdew G.H.. ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**, 21607–21611.

Berhow M., Tisserat B., Kanes K., Vandercook C. Survey of Phenolic Compounds Produced in Citrus, Technical Bulletin. 1856, U.S. *Department of Agriculture*, U.S. GPO: Washington, DC, 1998.

Bernard A., Broeckaert F., De Poorter G., De Cock A., Hermans C., Saegerman C., Houins G. The Belgian PCB/dioxin incident: analysis of the food chain contamination and health risk evaluation. *Envinonmental research*, 2002, **88**, 1-18.

Bock K.W., Kohle C.. The mammalian aryl hydrocarbon (Ah) receptor: from mediator of dioxin toxicity toward physiological functions in skin and liver. *Biol. Chem*., 2009, **390**, 1225–35.

Boström C.-E., Gerde P., Hanberg A., Jernström B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Törnqvist M., Victorin K. and Westerholm R.. Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives*. 2002, **110** Suppl 3, 451–488.

Boverhof D.R., Burgoon L.D., Williams K.J. and Zacharewski T.R.. Inhibition of estrogen-mediated uterine gene expression responses by dioxin. *Molecular Pharmacology.* 2008, **73**, 82–93.

Buchanan D.L., Ohsako S., Tohyama C., Cooke P.S. and Iguchi T.. Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor-beta expression. *Toxicological Sciences.* 2002, **66**, 62–68.

Buchanan D.L., Sato T., Peterson R.E. and Cooke P.S.. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse uterus: critical role of the aryl hydrocarbon receptor in stromal tissue. *Toxicological Sciences*. 2000, **57**, 302–311.

Canivenc-Lavier M.-C., Vernevaut M.-F., Totis M., Siess M.-H., Magdalou J., Suschetet M. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes. *Toxicology* 1996, **114**,19-27.

Chou P.-H., Matsui S., Matsuda T. Detection and identification of dyes showing AhR binding affinity in treated sewage effluents. *Water Sci.Technol.* 2006, **53** (11), 35-42.

Chung K.T., Creniglia C.E. Mutagenicity of azodyes: structure-activity relationships. *Mutat.Res*. 1992, **277**, 201-220.

Ciolino H.P., Daschner P.J., Wang T.T. and Yeh G.C.. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P4501A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 1998, **56**, 197–206.

Cole P, Trichopoulos D, Pastides H, Star T, Mandel JS: "Dioxin and cancer: a critical review", *Regul Toxicol Pharmacol.* 2003, **38**, (3), 378-388.

Conney A.H., Miller E.C. and Miller J.A.. The metabolism of methylated aminoazo dyes.V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Research.* 1956, **16**, 450–459.

Denison M.S. and Heath-Pagliuso S.. The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1998, **61**, 557–568.

Denison M.S., Elferink C.F., Phelan D. The Ah receptor signal transduction pathway. In Toxicant-Receptor Interactions in the Modulation of Signal Transduction and Gene Expression, ed. M. S. Denison, W. G. Helferich. 1998, pp. 3–33.

Denison M.S., Heath-Pagliuso S.. The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull.Environ.Contam. Toxicol*..1998, **61**, 557–68.

Denison M.S., Pandini A., Nagy S.R., Baldwin E.P. and Bonati L.. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 2002, **141**, 3–24.

Denison M.S., Seidel S.D., Rogers W.J., Ziccardi M., Winter G.M., Heath-Pagliuso S.. Natural and synthetic ligands for the Ah receptor. In Molecular Biology Approaches to Toxicology. 1998, ed. A Puga, K.B. Wallace, pp.393–410.

Denison M.S., Zhao B., Baston D.S. et al.. Recombinant cell bioassay systems for the detection and relative quantitation of halogenated dioxins and related cemicals. Talanta, 2004, **63**, 1123–33.

Denison, M.S. and Nagy S.R.. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003, **43**, 309–334.

Devito M.J., Birnbaum L.S.. Toxicology of dioxins and related chemicals. In Dioxins and Health. 1994, ed. A. Schecter, pp.139–62.

deVries J.H., Hollman P.C., Meyboom S., Buysman M.N., Zock P.L., van Staveren W.A., Katan M.B. Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am. J.Clin.Nutr*. 1998, **68**, 60-65.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009, **30**, 293–342.

Dickerson R., Keller L.H. and Safe S.. Alkyl polychlorinated dibenzofurans and related compounds as antiestrogens in the female rat uterus: structure-activity studies. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1995, **135**, 287–298.

Doi A.M., Irwin R.D., Bucher J.R. Influence of functional group substitutions on the carcinogenicity of anthraquinone in rats and mice: analysis of long-term bioassays by the national cancer institute and the national toxicology program. *J.Toxicol.Environ.Health* PartB. 2005, **8**, 109-126.

Duan R., Porter W., Samudio I., Vyhlidal C., Kladde M. and Safe S.. Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17-beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Molecular Endocrinology.* 1999, **13**, 1511–1521.

DuSell CD, Nelson ER, Wittmann BM, Fretz JA, Kazmin D, Thomas RS, Pike JW, McDonnell DP. Regulation of aryl hydrocarbon receptor function by selective estrogen receptor modulators. *Mol Endocrinol.* 2010, **24**, 33–46.

Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor β-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, **82**, 4258–4265.

Esser C., Rannug A. and Stockinger B.. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends in Immunology*, 2009, **30**, 447–454.

Fernandez-Salguero P.M., Hilbert D.M., Rudikoff S., Ward J.M., Gonzalez F.J. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*. 1996, **140**, 173–79.

Formica J.V., Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *FoodChem.Toxicol.* 1995, **33**, 1061-1080.

Fritsche E., Schafer C., Calles C. et al.. Lightening up the UV response by identification of the aryl hydrocarbon receptor as a cytoplasmic target fro ultra violiet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 2007, **104**, 8851–6.

Fukunaga B.N., Probst M.R., Reisz-Porszasz S. and Hankinson O.. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, **270**, 29270–29278.

Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M et al.. The Malassezia genus in skin and systemic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2012, **25**,106–41.

Gaitanis G, Magiatis P, Stathopoulou K. et al.. AhR ligands, malassezin, andindolo[3,2-b]carbazole are selectively produced by Malassezia furfur strains isolated froms eborrheic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 2008, **128**, 1620–5.

Gierthy J.F., Bennett J.A., Bradley L.M. and Cutler D.S.. Correlation of in vitro and in vivo growth suppression of MCF-7 human breast cancer by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Research.* 1993, **53**, 3149–3153.

Gillner M., Bergman J., Cambillau C., Alexandersson M., Fernström B. and Gustafsson J.A.. Interactions of indolo[3,2-b]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Molecular Pharmacology.* 1993, **44**, 336–345.

Gillner M., Bergman J., Cambillau C., Gustafsson J.-A. Interactions of rutaecarpine alkaloids with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinin rat liver. *Carcinogenesis* 1989, **10**, 651-654.

Goryo K., Suzuki A., Del Carpio C.A., Siizaki K., Kuriyama E., Mikami Y., Kinoshita K., Yasumoto K.-I., Rannug A., Miyamoto A. et al.. Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, **354**, 396–402.

Gradelet S., Astorg P., Leclerc J. Chevalier J., Vernevaut M.-F., Siess M.-H. Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Xenobiotica.* 1996, **6**, 49-63.

Gradelet S., Leclerc J., Siess M.H. and Astorg P.O.. beta-Apo-8'-carotenal, but not beta-carotene, is a strong inducer of liver cytochromes P4501A1 and 1A2 in rat. *Xenobiotica*. 1996, **26**, 909–919.

Gu Y.Z., Hogenesch J.B. and Bradfield C.A.. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual Review in Pharmacology and Toxicology*. 2000, **40**, 519–561.

Gupta A.K., Batra R., Bluhm R. et al.. Skin diseases associated with Malassezia species. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2004, **51**, 785–98.

Hahn, M.E.. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions*. 2002, **141**, 131–160.

Hall J.M., Barhoover M.A., Kazmin D., McDonnell D.P., Greenlee W.F. and Thomas, R.S.. Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation. *Molecular Endocrinology*. 2010, **24**, 359–369.

Hankinson O..Thearylhydrocarbon receptor complex. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1995, **35**, 307–40.

Harper N., Wang X., Liu H. and Safe S.. Inhibition of estrogen-induced progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells by aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists. *Mol. Molecular and Cellular Endocrinology*. 1994, **104**, 47–55.

Harris HA. Estrogen receptor-beta: Recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol.* 2007, **21**, 1–13.

Harris M., Zacharewski T. and Safe S.. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds on the occupied nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research.* 1990, **50**, 3579–3584.

Heath-Pagliuso S., Rogers W.J., Tullis K., Seidel S.D., Cenijn P.H., Brouwer A., Denison M.S. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 1998, **37**, 11508-11515.

Heindl A., Hutzinger O. Search for industrial sources of PCDD/PCDFs: IV. phthalocyanine dyes. *Chemosphere* 1989, **18**, 1207-1211.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007, **87**, 905–931.

Helferich W.G. and Denison M.S.. Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. *Molecular Pharmacology*, 1991, **40**, 674–678.

Hertog M.G. Hollman P.C.H., Katan M.B.Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J.Agric.Food Chem.* 1992, **40**, 2379 -2383.

Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol*. 2005, **67**, 285–308.

Hildenbrand S., Schrnal F.W., Wodarz R., Kimmel R., Dartsch P.C. Azodyes and carcinogenic aromatic amines in cell culture. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.* 1999, **72** (Suppl3), M52-M56.

Hitchcock D.R., Law S.E., Wu J., Williams P.L. Determining toxicity trends in the ozonation of synthetic dye wastewaters using the nematode Caenorhabditis elefans. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.* 1998, **34**, 259-264.

Hoivik D., Willett K., Wilson C. and Safe S.. Estrogen does not inhibit 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated effects in MCF-7 and Hepa 1c1c7 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 30270–30274.

Holcomb M. and Safe S.. Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Letters.* 1994, **82**, 43–47.

Hord N.G., Perdew G.H. Physiochemical and immunochemical analysis of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: characterization of two monoclonal antibodies to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Molec.Pharmacol*.. 1994, **46**, 618–24.

Houk V.S. The genotoxicity of industrial waste and effluents. *A review.Mutat.Res.* 1992, **277**, 91-138.

Hurst M.R., Chan-Man Y.L., Balaam J., Thain J.E., Thomas K.V. The stable aryl hydrocarbon receptor agonist potency of United Kingdom Continental Shelf (UKCS) offshore produced water effluents. *Mar.Pollut.Bull.* 2005, **50**, 1694-1698.

Ikuta T., Eguchi H., Tachibana T., Yoneda Y. and Kawajiri K.. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, **273**, 2895–2904.

Ikuta T., Tachibana T., Watanabe J., Yoshida M., Yoneda Y. and Kawajiri K.. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biochemistry*. 2000, **127**, 503–509.

Jain S., Dolwick K.M., Schmidt J.V. and Bradfield C.A.. Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, **269**, 31518–31524.

Jellinck P.H., Forkert P.G., Riddick D.S., Okey A.B., Michnovicz J.J., and Bradlow H.L.. Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation. *Biochemical Pharmacology.* 1993, **45**, 1129–1136.

Jeuken A., Keser B.J.G., Khan E., Brouwer A., Koeman J. and Denison M.S.. Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, **51**, 5478–5487.

Jones L.C. and Whitlock J.P.. Dioxin-inducible transactivation in a chromosomal setting. Analysis of the acidic domain of the Ah receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**, 25037–25042.

Kato T., Matsuda T., Matsui S., Mizutani T., Saeki K. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by methyl yellow and related congeners: structure-activity relationship in halogenated derivatives. *Biol.Pharm.Bull.* 2000, **25**, 466-471.

Kazlauskas A., Poellinger L., Pongratz I. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Arylhydrocarbon) receptor. *J.Biol.Chem*.. 1999, **274**, 13519–24.

Kharat I. and Saatcioglu F.. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *The Journal of Biological Chemistry.* 1996, **271**, 10533–10537.

Kim D.W., Gazourian L., Quadri S.A., Romieu-Mourez R., Sherr D.H. and Sonenshein G.E.. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*, 2000, **19**, 5498–5506.

Kociba R.J., Keyes D.G., Beyer J.E., Carreon R.M., Wade C.E., Dittenber D.A., Kalnins R.P., Frauson L.E., Park C.N., Barnard S.D. et al.. Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1978, **46**, 279–303.

Kogevinas M, Becher H, Benn T, Bertazzi PA, Boffetta P, Bueno-de-Mesqurta HB, Coggon D, Colin D, Flesch-Janys D, Fingerhut M, Green L, Kauppinen T, Littorin M, Lynge E, Mathews JD, Neuberger M, Pearce N, Saracci R: "Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins". *Am J Epidemiol.* 1997, **145**, 1061-1075.

Krishnan V., Porter W., Santostefano M., Wang X. and Safe S.. Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1995, **15**, 6710–6719.

Krishnan V., Wang X. and Safe S.. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 1994, **269**, 15912–15917.

Kuil C.W., Brouwer A., van der Saag P.T. and van der Burg B.. Interference between progesterone and dioxin signal transduction pathways. Different mechanisms are involved in repression by the progesterone receptor A and B isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**, 8829–8834.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997, **138**, 863–870.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 1996, **93**, 5925–5930.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β, *Endocrinology.* 1998, **139**, 4252–4263.

Kumar M.B. and Perdew G.H.. Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expression*. 1999, **8**, 273–286.

Kumar M.B., Ramadoss P., Reen R.K., Vanden Heuvel J.P. and Perdew G.H.. The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**, 42302–42310.

Kumar M.B., Tarpey R.W. and Perdew G.H.. Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, **274**, 22155–22164.

Kunz A, Mansilla H., Duran N. A degradation and toxicity study of three textile reactive dyes by ozone. *Environ.Technol.* 2002, **23**, 911-918.

Lu Y.F., Sun G., Wang X. and Safe S.. Inhibition of prolactin receptor gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 human breast cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1996, **332**, 35–40.

Lubet R.A., Connolly G., Kouri R.E., Nebert D.W., Bigelow S.W. Biological effects of the sudan dyes. Role of the Ah cytosolic receptor. *Biochem.Pharmcol.* 1983, **32**, 3053-3058.

Lucier G.W., Tritscher A., Goldsworthy T., Foley J., Clark G., Goldstein J. and Maronpot R.. Ovarian hormones enhance 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated increases in cell proliferation and preneoplastic foci in a two-stage model for rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Research.* 1991, **51**, 1391–1397.

Ma Q. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation and expanding biological roles. *Curr. DrugMetabol*. 2001, **2**, 149–64.

Magiatis P. et al.. Malassezia Yeasts Produce a Collection of Exceptionally Potent Activators of the Ah (Dioxin) Receptor Detected in Diseased Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology advance on line publication*, 2013.

Mahler BJ, Van Metre PC: "Coal-Tar-Based Pavement Sealcoat, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), and Environmental Health", U. S. *Geological Survey* (USGS). 2011, 3010.

Marlowe J.L. and Puga A.. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, **96**, 1174–1184.

Matthews J. and Gustafsson J.-A.. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signalling*. 2006, **4**, e016.

Matthews J., Wihlen B., Heldring N., MacPherson L., Helguero L., Treuter E., Haldosen L.A. and Gustafsson J.A.. Co-planar 3,3',4,4',5-pentachlorinated biphenyl and non-co-planar 2,2“,4,6,6-”pentachlorinated biphenyl differentially induce recruitment of oestrogen receptor alpha to aryl hydrocarbon receptor target genes. *The Biochemical Journal*, 2007, **406**, 343–353.

Matthews J., Wihlen B., Thomsen J. and Gustafsson J.A.. Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, **25**, 5317–5328.

Mayser P., Gaitanis G.. Physiology and biochemistry in Malassezia and the kin. In Boekhout T., Gueho E., Mayser P., Velegraki A. (eds), 2010. *Science and Clinical Practice*. *Springer*, Berlin.

McDougal A., Wilson C. and Safe S.. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumor growth by aryl hydrocarbon receptor agonists. *Cancer Letters.* 1997, **120**, 53–63.

McMillan B.J. and Bradfield C.A.. The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Molecular Pharmacology*, 2007, **72**, 487–498.

Merchant M., Krishnan V. and Safe S..Mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1993, **120**, 179–185.

Meyer B.K., Pray-Grant M.G., Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H.. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Molec.Cell.Biol.*. 1998, **18**, 978–88.

Moffat I.D., Roblin S., Harper P.A., Okey A.B. and Pohjanvirta R.. Aryl hydrocarbon receptor splice variants in the dioxin-resistant rat: tissue expression and transactivational activity. *Molecular Pharmacology.* 2007, **72**, 956–966.

Murphy LC, Peng B, Lewis A, Davie JR, Leygue E, Kemp A, Ung K, Vendetti M, Shiu R. Inducible upregulation of oestrogen receptor-β1 affects oestrogen and tamoxifen responsiveness in MCF7 human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol*. 2005, **34**, 553–566.

Murray I.A., Krishnegowda G., DiNatale B.C., Flaveny C., Chiaro C., Lin J.M., Sharma A.K., Amin S. and Perdew G.H.. Development of a selective modulator of aryl hydrocarbon (Ah) receptor activity that exhibits anti-inflammatory properties. *Chemical Research in Toxicology*. 2010, **23**, 955–966.

Nakagawa K., Okuda S., Miyazawa T. Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci., Biotechnol., Biochem*. 1997, **61**, 1981-1985.

National Toxicology Program Fact Sheet (NIH, 2006): "Dioxins Mixtures Research".West TF, Campbell GA.: "DDT: the synthetic Insecticide", Chapman & Hall, London, 1946.

Nebert D.W. and Bausserman L.L.. Genetic differences in the extent of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mouse fetal cell cultures. *The Journal of Biological Chemistry.* 1970, **245**, 6373–6382.

Nebert D.W.. The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. *Critical Review in Toxicology.* 1989, **20**, 153–174.

Nukaya H., Yamashita J., Tsuji K., Terao Y., Ohe T., Sawanishi H., Katsuhara T., Kiyokawa K., Tezuka M., Oguri A., Sugimura T., Wakabayashi K. Isolation and chemical-structural determination of a novel aromatic amine mutagen in water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem.Res.Toxicol.* 1997, **10**, 1061-1066.

Oberg M., Bergander L., Håkansson H., Rannug U. and Rannug A. Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicological Sciences*, 2005, **85**, 935–943.

Oguri A., Shiozawa T., Terao Y., Nukaya H., Yamashita J., Ohe T., Sawanishi, H., Katsuhara T., Sugimura T., Wakabayashi K. Identification of a 2-phenylbenzotriazole

(PBTA) –type mutagen, PBTA-2, in water from the Nishitakase River in Kyoto. *Chem.Res.Toxicol*. 1998, **11**, 1195-1200.

Ohtake F, Takeyama K-i, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. Nature. 2003, 423-545.

Ohtake F., Baba A., Takada I., Okada M., Iwasaki K., Miki H., Takahashi S., Kouzmenko A., Nohara K., Chiba T. et al. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*. 2007, **446**, 562–566.

Paganga G., Rice-Evans C.A. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.* 1997, **401**, 78-82.

Panteleyev A.A., Bickers D.R.. Dioxin-induced chloracne-reconstructing the cellular and molecular mechanisms of a classic environmental disease. *Exp. Dermatol.*, 2006, **15**, 705–30.

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor β inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*. 2004, **64**, 423–428.

Pei-Hsin Chou, Saburo Matsui, Kentaro Misaki and Tomonari Matsuda, Isolation and Identification of Xenobiotic Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Dyeing Wastewater. *Environ.Sci.Technol*.. 2007, **41**, 652-657.

Phelan D., Winter G.M., Rogers W.J., Lam J.C. and Denison M.S.. Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, **357**, 155–163.

Piskorska-Pliszczynska J., Keys B., Safe S. and Newman M.S.. The cytosolic receptor binding affinities and AHH induction potencies of 29 polynuclear aromatic hydrocarbons. *Toxicology Letters*. 1986, **34**, 67–74.

Poland A. and Glover E.. Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a potent inducer of aryl hydrocarbon hydroxylase, with 3-methylcholanthrene. *Molecular Pharmacology*. 1974, **10**, 349–359.

Poland A., Glover E. and Kende A.S.. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*. 1976, **251**, 4936-4946.

Poland A., Knutson J.C., 1982. 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons. Examinations of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **22**, 517-554.

Pollenz R.S., Sattler C.A., Poland A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins how distincts ubcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunfluorescence microscopy. *Molec.Pharmacol*.. 1994, **45**, 428–38.

Pongratz I., Mason G.G. and Poellinger L.. Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992, **267**, 13728–13734.

Porter W., Wang F., Duan R., Qin C., Castro-Rivera E., Kim K. and Safe S.. Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2001, **26**, 31–42.

Probst M.R., Reisz-Porszasz S., Agbunag R.V., Ong M.S., Hankinson O. Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action . *Molec.Pharma-col*..1993, **44**, 511–18.

Racker E.. Cellular metabolism and infections. 1954.

Rannug A., Rannug U., Rosenkratz H.S., Winqvist L., Westerholm R., Agurell E., Grafstrom A.-K. Certain photo-oxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity

to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J.Biol.Chem.* 1987, **262**, 15422-15427.

Rannug A.. The tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole helps genes jump. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, **107**, 18239–18240.

Ricci M.S., Toscano D.G., Mattingly C.J. and Toscano W.A.. Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, **274**, 3430–3438.

Roberts B.J., Whitelaw M.L.. Degradation of the basic helix-loop-helix/ Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J.Biol.Chem*.. 1999, **274**, 36351–56.

Romkes M. and Safe S.. Comparative activities of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and progesterone as antiestrogens in the female rat uterus. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1988, **92**, 368–380.

Romkes M., Piskorska-Pliszczynska J. and Safe S.. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic and uterine estrogen receptor levels in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1987, **87**, 306–314.

Rowlands J.C., McEwan I.J. and Gustafsson J.A.. Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors. *Molecular Pharmacology*. 1996, **50**, 538–548.

Safe S, Astroff B, Harris M, Zacharewski T, Dickerson R, Romkes M, Biegel L. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds as antioestrogens: Characterization and mechanism of action. *Pharmacol Toxicol.* 1991, **69**, 400–409.

Safe S. and McDougal A.. Mechanism of action and development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of hormone-dependent cancers. *International Journal of Oncology*. 2002, **20**, 1123–1128.

Safe S. and Wormke M.. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, **16**, 807–816.

Safe S. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol.Therap.*. 1995, **67**, 247–81.

Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds environmental and mechanistic consideration swhich support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit.Rev.Toxicol.* 1990, **21**, 51–88.

Safe S., Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicology Letters*. 2001, **120**, 1-7.

Safe S., Qin C. and McDougal A.. Development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 1999, **8**, 1385–1396.

Safe S., Wormke M. and Samudio I.. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. Journal of Mammary Gland *Biology and Neoplasia*. 2000, **5**, 295–306.

Sarkar S., Jana N.R., Yonemoto J., Tohyama C. and Sone H.. Estrogen enhances induction of cytochrome P-4501A1 by 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in liver of female Long-Evans rats. *International Journal of Oncology*. 2000, **16**, 141–147.

Savouret J.F., Antenos M., Quesne M., Xu J., Milgrom E. and Casper R.F. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 3054–3059.

Schaldach C.M., Riby J. and Bjeldanes L.F..Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*, 1999, **38**, 7594–7600.

Schecter A. and Olson J.R.. Cancer risk assessment using blood dioxin levels and daily dietary TEQ intake in general populations of industrial and non-industrial countries. *Chemosphere*. 1997, **34**, 1569–1577.

Schecter A., Birnbaum L., Ryan J.J. and Constable J.D.. Dioxins: an overview. *Environmental Research*. 2006, **101**, 419–428.

Schmidt J.V., Su G.H., Reddy J.K., Simon M.C., Bradfield C.A.. Characterization of amurine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc.Natl.Acad.Sci.*. 1996, USA **93**, 6731–36.

Schmidt JV., Bradfield C.A. Ah receptor signalling pathways. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 1996, **12**, 55–89.

Schneider K., Hafner C., Jager I. Mutagenicity of textile dye products. *J.Appl.Toxicol.* 2004, **24**, 83-91.

Schnorr TM, Lawson CC, Whelan EA, Dankovic DA, Deddens JA, Piacitelli LA, Reefhuis J, Sweeney MH, Connally LB, Fingerhut MA: "Spontaneous Abortion, Sex Ratio, and Paternal Occupational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin", *Br J Ind Med.* 1993, **50**, 699-703.

Shanle E. K and Xu W., Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol*. 2011, **1**, 6–19.

Shanle EK, Xu W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. Advanced Drug Delivery Reviews. In Press.

Shipley JM, Waxman DJ. Aryl hydrocarbon receptor-independent activation of estrogen receptor-dependent transcription by 3-methycholanthrene. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006, 213-87.

Sladek F.M.. Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas. In Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2003, pp. 679–684.

Sorg O., Zennegg M., Schmid P. et al.. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in VictorYushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites. *Lancet*, 2009, **374**, 1179–85.

Sotoca AM, van den Berg H, Vervoort J, van der Saag P, Strom A, Gustafsson JA, Rietjens I, Murk AJ. Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ER alpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicol Sci.* 2008, **105**, 303–311.

Spink D.C., Katz B.H., Hussain M.M., Pentecost B.T., Cao Z. and Spink, B.C.. Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2003, **24**, 1941–1950.

Stevens E.A., Mezrich J.D. and Bradfield C.A.. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology.* 2009, **127**, 299-311.

Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. Estrogen receptor β inhibits 17β-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, **101**, 1566–1571.

Swanson H.I., Bradfield C.A., 1993. The Ah-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* **3**, 213-223.

Tajima M., Sugita T., Nishikawa A. et al.. Molecular analysis of Malassezia microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J. Invest. Dermatol*., 2008, **128**, 345–51.

Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol.* 2000, **24**, 145–155.

Thoma W., Kramer H.J., Mayser P.. Pityriasis versicolor alba. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2005, **19**, 147–52.

Thomas P.E., Kouri R.E. and Hutton J.J.. The genetics of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mice: a single gene difference between C57BL-6J and DBA-2J. *Biochemical Genetics*. 1972, **6**, 157–168.

Thomsen J.S., Wang X., Hines R.N. and Safe S.. Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor. *Carcinogenesis.* 1994, **15**, 933–937.

Thurmond T.S., Silverstone A.E., Baggs R.B., Quimby F.W., Staples J.E., Gasiewicz T.A. A chimeric aryl hydrocarbon receptor knockout mouse model indicates that aryl hydrocarbon receptor activation in hematopoietic cells contributes to the hepatic lesions induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*. 1999, **158**, 33–40.

Tilg, H.. Diet and intestinal immunity. *New England Journal of Medicine*. 2012, **366**, 181–183.

Tritscher A.M., Clark G.C., Sewall C., Sills R.C., Maronpot R. and Lucier G.W.. Persistence of TCDD-induced hepatic cell proliferation and growth of enzyme altered foci after chronic exposure followed by cessation of treatment in DEN initiated female rats. *Carcinogenesis*. 1995, **16**, 2807–2811.

Umbreit T.H. and Gallo M.A.. Physiological implications of estrogen receptor modulation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology Letters*. 1988, **42**, 5-14.

Umbreit T.H., Hesse E.J., Macdonald G.J. and Gallo M.A.. Effects of TCDD-estradiol interactions in three strains of mice. *Toxicology Letters.* 1988, **40**, 1–9.

Umbuzeiro G.A., Roubicek D.A., Rech C.M. Sato M.I.Z., Claxton L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures.*Chemosphere.* 2004, **54**, 1589-1597.

Vickers P.J., Dufresne M.J. and Cowan K.H.. Relation between cytochrome P450IA1 expression and estrogen receptor content of human breast cancer cells. *Molecular Endocrinology.* 1989, **3**, 157–164.

Vlachos C., Schulte B.M., Magiatis P. et al.. Malassezia-derived indoles activate the aryl hydrocarbon receptor and inhibit Toll-like receptor-induced maturation inmonocyte-derived dendritic cells. *Br. J. Dermatol.,* 2012, **167**, 496–505.

Wang W., Smith R.3. and Safe S.. Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenicity in MCF-7 cells: modulation of hormone-induced cell cycle enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1998, **356**, 239–248.

Wang W.L., Porter W., Burghardt R. and Safe S.H.. Mechanism of inhibition of MDA-MB-468 breast cancer cell growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Carcinogenesis.* 1997, **18**, 925–933.

Watt K., Jess T.J., Kelly S.M., Price N.C. and McEwan I.J.. Induced alpha-helix structure in the aryl hydrocarbon receptor transactivation domain modulates protein-protein interactions. *Biochemistry.* 2005, **44**, 734–743.

Whitlock J.P., Jr.. Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.*1993, **6**, 754-763.

Whitlock J.P., Okino S.T., Dong L., Ko H.P., Clarke-Katzenberg R., Ma Q., Li H.. Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription.1996, *FASEB J.* **10**, 809-818.

Whitlock JP Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu.Rev.Pharma-col.Toxicol*. 1999, **39**, 103–25.

Williams D.T., Lebel G.L., Benoit F.M. Polychlorodibenzodioxins and polychlorodibenzofurans in dioxazine dyes and pigments. *Chemosphere* 1992, **24**, 169-180.

Williams S.N., Shih S., Guenette D.K., Brackney W., Denison M.S., Pickwell G.V., Quattrochi L.C. Green tea flavonoids inhibit TCDD-induced CYP1A1 and CYP1A2 gene expression in human livers cells. *Chem. Biol.Interact.* 2000, **28**, 211-219.

Wincent E., Amini N., Luecke S., Glatt H., Bergman J., Crescenzi C., Rannug A. and Rannug U.. The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *The Journal of Biological Chemistry,* 2009, **284**, 2690–2696.

Wormke M., Castro-Rivera E., Chen I. and Safe S.. Estrogen and aryl hydrocarbon receptor expression and crosstalk in human Ishikawa endometrial cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2000, **72**, 197–207.

Wyde M.E., Eldridge S.R., Lucier G.W. and Walker N.J.. Regulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced tumor promotion by 17 beta-estradiol in female Sprague--Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2001, **173**, 7–17.

Zacharewski T.R., Berhane K., Gillesby B.E. Detection of estrogen-and dioxin like activity in pulp and paper mill black liquor and effluent using in vitro recombinant receptor/reporter gene assays. *Environ.Sci.Technol.* 1995, **29**, 2140-2146.

Zacharewski T.R., Bondy K.L., McDonell P. and Wu Z.F.. Antiestrogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on 17 beta-estradiol-induced pS2 expression. *Cancer Research*. 1994, **54**, 2707–2713.

Zhang S, Qin C, Safe S. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists. Effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect.* 2003, **111**, 1877–1882.

Zhang S., Lei P., Liu X., Li X., Walker K., Kotha L., Rowlands C. and Safe S.. The aryl hydrocarbon receptor as a target for estrogen receptor-negative breast cancer chemotherapy. *Endocrine-Related Cancer*. 2009, **16**, 835–844.