



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA  
Dipartimento di Biologia  
Corso di laurea Magistrale in Biologia Applicata alla  
Biomedicina

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Possibile ruolo di contaminanti ambientali nella  
patogenesi del diabete mellito: studio degli effetti tossici  
dell'esposizione di isole pancreatiche alla 2,3,7,8-  
*tetraclorodibenzo-p-diossina*

Relatore

Dott.ssa Michela Novelli

Candidata

Chiara Vantaggiato

Anno accademico 2013-2014

<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
<i>Anatomia del pancreas e delle isole pancreatiche</i>	7
<i>Generalità sul diabete</i>	8
<i>Il diabete di tipo 1</i>	9
<i>Il diabete di tipo 2</i>	10
<i>Patogenesi del diabete di tipo 2</i>	12
<i>La Diossina</i>	13
Struttura della diossina e legame al recettore Arilico (AhR)	16
Detossificazione di metaboliti endogeni e xenobiotici	18
Proliferazione e differenziamento	19
Interazione di AhR con il sistema delle protein chinasi	20
Degradazione di AhR	21
Effetti tossici della diossina sull'organismo	22
<i>Relazione tra l'esposizione alla diossina e l'incidenza del diabete di tipo 2: evidenze epidemiologiche</i>	25
<i>Epigallocatechina-3-gallato</i>	28
<i>Scopo della tesi</i>	30
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>32</b>
<i>Animali</i>	32
<i>Isolamento isole e coltura</i>	32
<i>Valutazione funzionale</i>	33
<i>Dosaggio di insulina</i>	34
<i>Valutazione di apoptosi e necrosi</i>	34
<i>Microscopia elettronica</i>	35
<i>Espressione genica</i>	36

Estrazione RNA totale	36
Quantificazione RNA totale	36
Retrotrascrizione RNA	37
PCR Quantitativa (Real Time-PCR qRT-PCR)	37
Housekeeping Gene	39
Controllo PCR	39
Primers utilizzati	39
<i>Dosaggio dei nitriti</i>	39
<i>Reagenti</i>	40
<i>Analisi statistica</i>	40
<b><i>RISULTATI</i></b>	<b>41</b>
<i>Effetti della diossina sulla vitalità cellulare in isole di Langerhans</i>	41
<i>Alterazioni ultrastrutturali indotte dalla diossina in isole isolate</i>	44
<i>Effetti della diossina sulla funzione secretoria in isole di Langerhans</i>	51
<i>Effetti della diossina sull'espressione genica in isole isolate</i>	54
<i>Effetti della diossina sulla produzione di nitriti in isole isolate</i>	57
<i>Effetto protettivo dell'epigallocatechina-3-gallato sulla mortalità indotta da diossina</i>	58
<b><i>DISCUSSIONE</i></b>	<b>61</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b>	<b>70</b>

# RIASSUNTO

La diossina è un noto contaminante ambientale appartenente alla classe dei cosiddetti "*persistent organic pollutants*", che si forma come prodotto secondario in processi industriali quali l'incenerimento dei rifiuti e la produzione di pesticidi. Essa, pertanto, può raggiungere tutti gli individui di una popolazione inducendo effetti tossici diffusi e persistenti. Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una correlazione positiva fra esposizione ambientale alla diossina e insorgenza del diabete, malattia la cui incidenza è in continua crescita. In questo lavoro di tesi, sulla base di risultati in precedenza ottenuti su una linea cellulare stabile di origine  $\beta$ -pancreatica secernente insulina, lo scopo è stato quello di studiare gli effetti tossici della diossina ed il relativo meccanismo di azione in un sistema sperimentale più vicino all'ambito fisiologico: le isole di Langerhans isolate dal pancreas del ratto. Le isole pancreatiche rappresentano, infatti, un vero e proprio organo endocrino in miniatura, al cui interno la funzione delle cellule  $\beta$  è regolata in modo più appropriato dagli stimoli fisiologici rispetto alla linea cellulare in coltura e può anche essere influenzata dal continuo scambio di segnali chimici con gli altri tipi cellulari presenti nelle isole. E' stata inoltre studiata la possibilità di proteggere le isole dagli effetti lesivi della diossina, mediante l'*epigallocatechina-3-gallato* capace di interagire con lo stesso recettore arilico citoplasmatico (AhR) cui si lega la diossina. Le isole pancreatiche di ratto sono state isolate con il metodo della collagenasi, purificate su appropriato gradiente ed esposte per tempi diversi a diverse concentrazioni di *2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD)*. Al termine del periodo di esposizione sono state valutate: la necrosi e l'apoptosi (mediante tecniche ELISA); le alterazioni ultrastrutturali (mediante microscopia elettronica); le alterazioni della funzione secretoria stimolata da glucosio (mediante esperimenti di incubazione statica); le alterazioni dell'espressione di geni funzionali e di geni pro- e anti-apoptotici (mediante tecniche di biologia molecolare). I risultati mostrano che quando le isole vengono incubate per 24 h in presenza di varie concentrazioni di TCDD (1-25 nM), si ha un incremento dose-

dipendente sia dell'apoptosi che della necrosi cellulare, che vengono invece del tutto prevenute se si aggiunge *epigallocatechina-3-gallato* al mezzo di incubazione. Le immagini ultrastrutturali confermano danni precoci e tardivi alle cellule  $\beta$ . L'esposizione delle isole per 1 o 6 h a varie concentrazioni di TCDD determina una diminuzione significativa del rilascio di insulina stimolato da glucosio, mentre non risultano modificati il rilascio basale e il contenuto insulare dell'ormone. La presenza di TCDD non modifica l'espressione di geni funzionali quali quello per l'insulina, mentre determina un aumento dose-dipendente dell'espressione di geni pro-apoptotici quali PUMA, DP5, BIM.

Concludendo, i risultati ottenuti mostrano che basse concentrazioni di diossina, sono capaci di alterare sia la funzione che la sopravvivenza delle cellule presenti nelle isole di Langerhans isolate, e in particolare delle cellule  $\beta$ , fornendo un sostegno sperimentale all'ipotesi, finora fondata solo su dati epidemiologici, che l'esposizione a contaminanti ambientali di tipo diossinico, anche a dosi non elevate, possa costituire un rilevante fattore di rischio nell'insorgenza del diabete di tipo 2.

# ABSTRACT

The dioxin is a well-known environmental contaminant belonging to the class of the so-called "*persistent organic pollutants*". It originates from industrial processes such as waste incineration and pesticide production. Thus, dioxin might be assumed by all individuals in a population and induce widespread and persistent toxic effects. Numerous epidemiological studies show a positive correlation between dioxin exposure and the onset of diabetes, whose incidence has been increasing over the past years. Based on previous results obtained in a well-differentiated and functional pancreatic  $\beta$ -cell line, this thesis aimed at investigating the toxic effects of dioxin and its mechanism of action in a biological system closer to the physiological context, i.e. the islets of Langerhans isolated from the rat pancreas. Actually, the pancreatic islets represent a miniaturized endocrine organ, in which the  $\beta$ -cell function is regulated by physiological stimuli more suitably as compared to the cell line; moreover, this function could be also physiologically influenced by the continuous exchange of chemical signals with the other islet cell types. In addition, we explored the possibility of protecting the islets against the deleterious effects of dioxin by using *epigallocatechin-3-gallate*, able to interact with the same aryl hydrocarbon receptor (AhR) to which dioxin binds. The pancreatic islets were isolated using the collagenase digestion method followed by purification on a suitable gradient. The isolated pancreatic islets were exposed to various concentrations of *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) for various time periods. After exposure to dioxin, several parameters were evaluated in the islets: evidence of necrosis and apoptosis (by ELISA techniques); ultrastructural changes (by electron microscopy); alteration in the secretory function (by static incubation experiments); changes in the expression of functional as well as pro- and anti-apoptotic genes (by molecular biology techniques). The results show that after 24 h incubation of isolated islets in the presence of increasing concentrations of TCDD (1-25 nM), both apoptosis and necrosis were increased in a dose-dependent fashion. Interestingly, both types of cellular death were fully prevented when epigallocatechin-3-gallate was concomitantly added to the incubation

medium. Ultrastructural images confirm that upon islet exposure to TCDD, early and late injury occurred in  $\beta$  cells. When the islets were exposed to various concentrations of TCDD for 1 up to 6 h, the glucose-stimulated insulin release was significantly decreased with respect to control islets, meanwhile basal insulin release and islet insulin content were not modified. Moreover, the expression of functional genes (such as the insulin gene) was not affected by TCDD, whereas the expressions of pro-apoptotic genes such as PUMA, DP5, BIM were up-regulated in a dose-dependent manner.

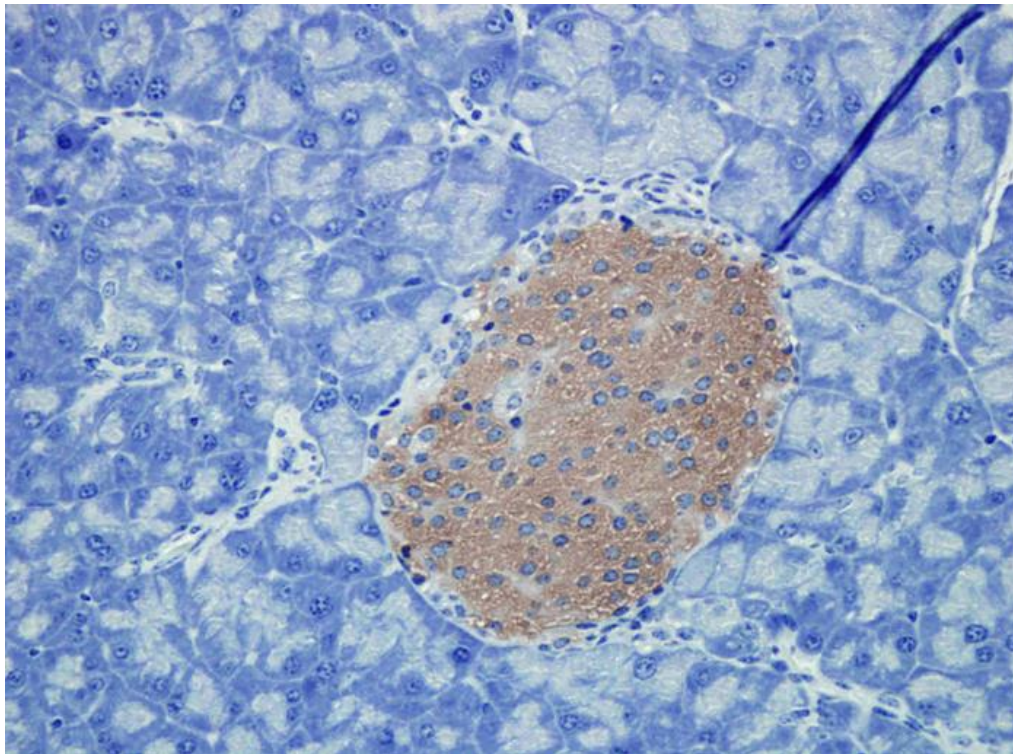
In conclusion, the results obtained in this study show that quite low dioxin concentrations are able to impair both the function and the survival of the cells in the isolated pancreatic islet, and particularly of insulin-producing  $\beta$  cells. Thus, they provide experimental support to the hypothesis, based so far mainly on epidemiological data, that the exposure to environmental contaminants such as the dioxin-like compounds, even at low doses, may represent a significant risk factor for the development of type 2 diabetes.

# INTRODUZIONE

## **Anatomia del pancreas e delle isole pancreatiche**

Il pancreas è un organo ghiandolare situato nella cavità addominale, al di sotto dello stomaco, tra il fegato e la milza. Nell'adulto, il suo peso può variare da 60 a 150 g, e la sua lunghezza oscilla da 10 fino a 20-25 cm. E' diviso in tre porzioni principali: la testa, situata nell'ansa duodenale, il corpo, separato dalla testa da un restringimento chiamato istmo, e la coda, a contatto nella sua parte terminale con la milza. Il pancreas è costituito da tessuto esocrino (o acinare, che rappresenta di gran lunga la maggior parte del parenchima) ed endocrino (isole pancreatiche o di Langerhans, dal nome dello studioso che per primo le descrisse nel 1869), che invece costituisce non più del 1-2% del parenchima. Le isole sono strutture rotondeggianti od ovali e il loro numero varia, in un soggetto di circa 70 kg, da 300000 a 1500000. Le dimensioni delle isole pancreatiche variano da pochi micron a 200-300 micron di diametro, ed è stato calcolato che in un'isola medio-grande siano presenti circa 3000 cellule endocrine. Queste ultime sono di vario tipo, le più numerose sono le cellule  $\beta$  produttrici di insulina (60-80%), seguite dalle cellule  $\alpha$  produttrici di glucagone (20-30%) [1]. Sono inoltre presenti le cellule  $\delta$  (contenenti somatostatina, 5-10 %) e cellule PP contenenti il polipeptide pancreatico (fino al 15-20% nella parte della testa di origine ventrale ed in percentuale inferiore al 5% nel resto dell'organo) [1]. Le  $\beta$ -cellule sono disposte a costituire il core dell'isola, e sono circondate da un mantello di cellule endocrine non- $\beta$  (prevalentemente  $\alpha$ ). Questo modello, ben studiato e caratterizzato nei roditori, è sostanzialmente valido nella maggior parte dei mammiferi, anche se nell'uomo l'organizzazione dell'isola di Langerhans è più complessa. Le isole umane possono essere considerate come un insieme di numerose subunità core-mantello, che sono tra di loro organizzate in strutture più spesso rotondeggianti od ovali.





*Immagine rappresentativa di sezione di pancreas di topo colorata con anticorpo anti-insulina. Ingrandimento 400X.*

## **Generalità sul diabete**

Il diabete mellito è una malattia cronic-degenerativa a carattere dismetabolico, caratterizzata da iperglicemia cronica e da altre disfunzioni del metabolismo glucidico, lipidico e proteico, che possono determinare frequenti e gravi complicanze. Negli anni passati, la classificazione del diabete mellito era essenzialmente basata sulla necessità di utilizzare o meno l'insulina esogena a fini terapeutici, con la distinzione in due tipi principali: diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) o di tipo 1 e diabete mellito non-insulino-dipendente (NIDDM) o di tipo 2 [2]. Nel 1997 l' *American Diabetes Association* (ADA) ha proposto nuovi criteri classificativi e diagnostici [3] che, pur con qualche motivata perplessità, sono stati accettati dalla comunità scientifica internazionale. Dal punto di vista classificativo, gli elementi innovativi sono rappresentati dalla scomparsa dei termini obsoleti relativi all'uso terapeutico dell'insulina, mentre invece, restano le denominazioni di tipo 1 e

tipo 2, per sottolineare i diversi aspetti eziopatogenetici della malattia. E' stato deciso che un valore di 7,0 mM (126 mg/dl) di glicemia a digiuno rappresenta il nuovo limite minimo per la diagnosi di diabete (in precedenza era fissato a 140 mg/dl). Oltre al diabete di tipo 1 e 2, di cui parleremo più estesamente in seguito, vi sono altre forme di diabete quali: il MODY, *Maturity Onset Diabetes of the Young*, ovvero la forma monogenica autosomica dominante di diabete mellito caratterizzato da difetti genetici a carico delle funzioni delle cellule  $\beta$  provocati da mutazioni identificate in sei distinti geni, e il diabete mellito gestazionale, caratterizzato da iperglicemia durante le fasi finali della gravidanza, in cui l'organismo necessita di un'aumentata richiesta di insulina dovuta al fabbisogno metabolico del feto che può indurre un'intolleranza glucidica nella madre che precedentemente non aveva evidenziato la malattia [4].

## **Il diabete di tipo 1**

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) è un disordine dell'omeostasi del glucosio provocato dalla progressiva riduzione e distruzione delle cellule  $\beta$  endocrine delle isole di Langerhans pancreatiche, mediata da un meccanismo autoimmune. Sembra che l'avvio della malattia sia determinato, in individui geneticamente predisposti, da fattori ambientali finora non ben determinati (virus, agenti chimici, citochine liberate da macrofagi attivati nel corso di infiammazioni occasionali) capaci di provocare danni, anche non gravi, alle cellule  $\beta$  in seguito ai quali potrebbe innescarsi la reazione autoimmune. In questo modo, le cellule  $\beta$  non vengono più riconosciute come "self" dal sistema immunitario e sono attaccate e distrutte in un processo che dura solitamente qualche anno e che alla fine comporta la perdita della maggior parte di tali cellule [5]. La presenza di un limitato numero di cellule  $\beta$  funzionalmente attive nelle isole pancreatiche determinano una limitata o assente secrezione di insulina, con conseguente insorgenza di iperglicemia e di tutte le alterazioni metaboliche dipendenti da una grave carenza insulinica. Dopo un periodo di latenza, di solito non inferiore a cinque anni, compaiono le prime complicanze microangiopatiche che colpiscono la retina (retinopatia diabetica) e, mediamente dopo quindici anni, compare nefropatia nel

30-40% dei pazienti. Il coinvolgimento del sistema nervoso neurovegetativo, simpatico e parasimpatico, che si traduce nella neuropatia autonoma testimonia ulteriormente la gravità della malattia.

## **Il diabete di tipo 2**

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM), che comprende oltre il 90% dei casi totali, non insorge di solito prima dei 35-40 anni ed aumenta di frequenza con l'avanzare dell'età. Ha un esordio subdolo, non facilmente diagnosticabile, si accompagna spesso ad obesità, o almeno, a sovrappeso ed è caratterizzato da iperglicemia cui sono collegati sintomi quali poliuria, polidipsia e polifagia. I pazienti con diabete di tipo 2 presentano tipicamente una parziale carenza di secrezione insulinica, associata ad una ridotta sensibilità all'insulina dei tessuti bersaglio (fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo) [6,7]. L'alterata secrezione insulinica può non essere pienamente manifesta in condizioni basali, ed infatti i livelli d'insulina circolanti risultano normali o addirittura aumentati, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia. L'insulina è l'ormone chiave per la regolazione dell'omeostasi glucidica. Il mantenimento di una glicemia normale è garantito dall'equilibrio tra l'azione periferica dell'insulina e la sua secrezione. Le normali cellule  $\beta$  pancreatiche possono adattarsi a variazioni nella sensibilità dei tessuti periferici all'insulina aumentando o diminuendo la sua secrezione. In particolare, in condizioni di insulino-resistenza periferica le cellule  $\beta$  pancreatiche si adattano aumentando la secrezione dell'ormone. Secondo un'interpretazione patogenetica ormai classica [8], una condizione prolungata di insulino-resistenza porterebbe quasi inevitabilmente ad un esaurimento delle riserve funzionali del pancreas endocrino, che si manifesterebbero come un'incapacità delle cellule  $\beta$  di mantenere un'elevata capacità secretoria. Il danno funzionale alle cellule  $\beta$  sarebbe la conseguenza dell'incapacità del soggetto insulino-resistente di garantire un perfetto controllo dei livelli glicemici in risposta a stimoli ambientali (quali ad esempio l'assunzione di cibo) che tendono a farli aumentare. Questa incapacità causerebbe soprattutto un aumento dei livelli e della durata dell'iperglicemia postprandiale. L'esposizione prolungata nel tempo a livelli di glucosio

patologicamente elevati risulterebbe dannosa per le cellule  $\beta$ , sulla base di un meccanismo noto come “glucotossicità” [9]. La combinazione di questi due fattori, insulino-resistenza periferica e danno funzionale secondario delle cellule  $\beta$ , sarebbe infine responsabile del definitivo squilibrio dell’omeostasi glucidica con la conseguente comparsa della malattia diabetica conclamata: l’iperglicemia a digiuno [10].

Anche i diabetici di tipo 2 vanno frequentemente incontro a complicanze gravi. Tra le complicanze acute di questa forma di diabete, c’è una condizione di gravissima disidratazione che può condurre a coma iperosmolare, compromettendo le funzioni cerebrali. Certamente più frequenti sono le complicanze tardive, causa di morbilità e mortalità premature, che possono insorgere anche in pazienti apparentemente controllati in modo adeguato. Tra quelle che derivano da alterazioni a carico dei piccoli vasi vanno ricordate la nefropatia che compare con tappe difficilmente ricostruibili entro un periodo che va da quindici a venticinque anni dalla diagnosi, la retinopatia e la neuropatia, che rendono il diabete mellito la causa più frequente di cecità e disfunzioni neurovegetative nel mondo occidentale [11]. Le macroangiopatie sono in massima parte legate allo sviluppo di aterosclerosi, processo degenerativo della parete delle arterie favorito da alterazioni del metabolismo lipidico come l’ipercolesterolemia e l’ipertrigliceridemia, notevolmente più frequenti nei diabetici che nel resto della popolazione [12]. A questo va aggiunto che processi di ossidazione e di glicazione delle LDL, favoriti dall’iperglicemia cronica, possono accrescere le capacità aterogene di queste lipoproteine trasportanti colesterolo [13]. Inoltre, nei soggetti diabetici le lesioni arteriose comportano spesso ulcerazioni e rottura della placca ateromasica, trombi ed emorragie.

## Diabete di tipo 1 e di tipo 2 a confronto

	<b>Diabete di tipo 1 (T1D)</b>	<b>Diabete di tipo 2 (T2D)</b>
Età di esordio	Al di sotto dei 20 anni	Al di sopra dei 30 anni
Progressione	Rapida (da alcuni mesi a pochi anni)	Lenta (alcuni anni)
Glicemia a digiuno e/o postprandiale	Elevata	Elevata
Insulinemia	Bassa	Elevata/normale/ridotta
Massa $\beta$ cellulare	Ridotta del 90%	Ridotta del 30%
Lesioni insulari (insulite)	Precoci	Assenti

*Tabella: principali differenze tra il diabete di tipo 1 e il diabete di tipo 2*

## Patogenesi del diabete di tipo 2

Il T2DM ha una elevata prevalenza in popolazioni etnicamente omogenee, insorge frequentemente in consanguinei di prima e seconda generazione e mostra una elevata concordanza di sviluppo in gemelli monozigoti [14]. Queste osservazioni suggeriscono che il difetto funzionale delle cellule  $\beta$  non sia solamente la conseguenza di un esaurimento secondario alla prolungata insulino-resistenza, ma che sia presente fin dall'inizio nei pazienti destinati a sviluppare la malattia conclamata [8,15]. Questo difetto primitivo delle capacità secretorie delle cellule  $\beta$ , probabilmente su base genetica, verrebbe poi ulteriormente aggravato da particolari circostanze, quali ad esempio l'obesità o più semplicemente l'invecchiamento, fino al manifestarsi della malattia conclamata [15]. Sulla base delle precedenti considerazioni, si ritiene generalmente che i principali fattori di rischio per il diabete di tipo 2 siano l'obesità, l'età avanzata, la mancanza di esercizio fisico e una dieta ipercalorica [10].

L' Organizzazione Mondiale della Sanità e la Federazione Internazionale del Diabete hanno stimato che la prevalenza del diabete è incrementata da 100 milioni a 135 milioni di adulti

affetti nel mondo nel 1994-1995 ad approssimativamente 400 milioni nel 2014, e prevede un ulteriore aumento di 205 milioni nel 2035 [16]. Questi cambiamenti si sono verificati troppo rapidamente per riflettere soltanto cause genetiche, inoltre i tassi variano molto da un paese ad un altro, ciò induce a pensare che la maggior parte dei nuovi casi di diabete sia causata da cambiamenti nello stile di vita e/o nell'ambiente durante gli ultimi dieci anni. Per questo motivo era stata inizialmente suggerita nel 1972 la possibilità che vi fosse una sovrapposizione tra la distribuzione delle sostanze tossiche e le variazioni geografiche della prevalenza del diabete [17]. A questo proposito, è opportuno notare che negli U.S.A. i tassi di diabete sono aumentati in accordo con la produzione nazionale di sostanze organiche chimiche sintetiche [18]. La diossina ed altri POPs (*Persistent Organic Pollutants*) sono generalmente considerati i più probabili candidati come fattori potenziali di rischio per il diabete di tipo 2 poiché possono agire come interferenti endocrini. La *Environmental Protection Agency* ha definito gli interferenti endocrini chimici come “agenti esogeni che interferiscono con la produzione, rilascio, trasporto, metabolismo, legame e azione, o eliminazione di ormoni naturali nel corpo responsabili del mantenimento dell'omeostasi, della riproduzione, dello sviluppo, e/o del comportamento” [19-22]. Molti di questi inquinanti (sebbene non tutti) sono stati eliminati in molti paesi occidentali tra il 1970 e il 1980, con una conseguente diminuzione dei livelli ambientali. Tuttavia sono ancora rilevabili negli uomini, specialmente in quei sottogruppi della popolazione che hanno un elevato peso corporeo (e quindi una maggiore quantità di tessuto adiposo) a causa delle abitudini alimentari e della esposizione corrente o pregressa [23,24].

## **La Diossina**

Il termine diossina è comunemente usato per riferirsi ad una famiglia di sostanze chimiche tossiche strutturalmente correlate, con un comune meccanismo d'azione ed un comune spettro di risposte [25]. Questo gruppo include le *dibenzo-p-diossine policlorurate* (PCDDs), i *dibenzo-furani policlorurati* (PCDFs) e i *bifenili policlorurati* (PCBs). Fra tutti questi composti è noto da tempo che la sostanza più tossica è certamente la 2,3,7,8-

*tetraclorodibenzo-p-diossina* nota più semplicemente come diossina ed indicata con l'acronimo TCDD [26-28]. Le diossine sono contaminanti ambientali che si formano come prodotti secondari in processi industriali quali l'incenerimento dei rifiuti [29,30], lo sbiancamento della carta e la produzione di pesticidi, erbicidi e fungicidi [30]. Per meglio valutare il rischio associato a questi composti, ad ognuno di essi è stato associato un fattore di equivalenza tossica (TEF) che viene espresso in relazione al potenziale tossico della TCDD assumendo un TEF, per la TCDD, pari 1 [20]. Il metodo del TEF è stato utilizzato per calcolare la quantità di diossine nel corpo umano. La media stimata in una popolazione generica è di circa 58ng di equivalenti di TCDD (TEQ)/kg di lipidi sierici, che corrispondono a 13ng TEQ/kg di peso corporeo. Nelle popolazioni con una più alta esposizione alla TCDD, ad esempio in seguito ad incidenti industriali, si sono stimati valori pari a 96-7000 ng TEQ/kg di peso corporeo [31]. Nel 1998 la *World Health Organization* (WHO) ha stabilito che 1-4 pg TEQ/kg/giorno è l'assunzione giornaliera tollerabile (TDI = *tolerably daily intake = definisce la quantità massima che può essere assunta giornalmente di una sostanza tossica senza provocare lo sviluppo di effetti dannosi per la salute, con un'esposizione continua nell'arco della vita*). Ad oggi, l'assunzione media di tali sostanze nella popolazione di vari Paesi è da considerarsi al di sotto del TDI; in particolare, negli adulti di molti Paesi l'assunzione media va da 0,33 a 3,57 pg TEQ/kg/giorno, inferiore quindi al massimo TDI [31].

Le diossine non erano presenti nell'ambiente prima dell'industrializzazione se non in piccole quantità dovute alla naturale combustione e ai processi geologici [32-34]. Oggi questi composti si ritrovano in tutti gli esseri umani, con livelli più alti nelle persone che vivono nei paesi più industrializzati [35], che risultano esposti costantemente a bassi livelli di PCDDs/PCDFs attraverso il cibo, l'acqua, l'atmosfera ed il suolo e non solo a seguito di esposizione accidentale o dovuta al lavoro in siti a rischio. E' stato stimato che il 90% dell'esposizione umana alla TCDD proviene dall'alimentazione: la fonte principale è rappresentata da animali che sono esposti primariamente alla TCDD che si deposita sulla

superficie del suolo, delle piante e dell'acqua. L'uomo assume poi la TCDD attraverso il consumo di carne, latte, pesce e uova. Questo determina un'esposizione continua a bassi livelli di TCDD che, a lungo andare, si accumula nell'organismo determinando effetti dannosi per la salute [36]. Le diossine sono composti biologicamente ed ambientalmente persistenti: basti pensare che l'emivita della più tossica delle diossine, ovvero la TCDD, nei roditori è di circa 2-4 settimane [37,28], ma nell'uomo è stata stimata un'emivita di 7-11 anni, sia pure con notevoli variazioni individuali [38]. Studi di farmacocinetica hanno dimostrato che l'emivita della diossina è dose-dipendente e inoltre varia in base alla composizione del corpo: una maggiore presenza di tessuto adiposo determina infatti un aumento dell'accumulo e quindi una maggiore persistenza [39-41]. Ciò è dovuto alla natura lipofila della TCDD, che ne permette il passaggio senza ostacoli attraverso le membrane cellulari e il deposito in vari organi, in particolare nel tessuto adiposo e nel fegato.

In Europa, nell'ultimo secolo si è verificato un costante aumento dell'esposizione della popolazione a questi prodotti, che ha raggiunto un picco negli anni '50-'60 per poi diminuire. Un secondo picco si è avuto negli anni '80-'90, dovuto all'incremento dell'industria della carta e soprattutto delle emissioni poco controllate provenienti dagli inceneritori dei rifiuti. Per quanto riguarda in particolare l'Italia, la situazione appare piuttosto grave. Infatti secondo i dati contenuti nell'ultimo rapporto della Commissione dell'Unione Europea sul rilascio di diossine e furani al suolo risalente al 1999, l'Italia risulta il maggior produttore di diossina in Europa: ne emette il 38% in più della Spagna, in 33% in più della Gran Bretagna, il 29% in più della Germania e il 75% in più di Danimarca, Finlandia, Norvegia, e Svezia messe insieme. L'Associazione Medici per l'Ambiente, tenendo conto della contaminazione ormai diffusa uniformemente in tutti i paesi industrializzati e della notevole persistenza di questi composti nell'ambiente ha parlato addirittura, riferendosi all'inquinamento da diossina, di "pandemia silenziosa".

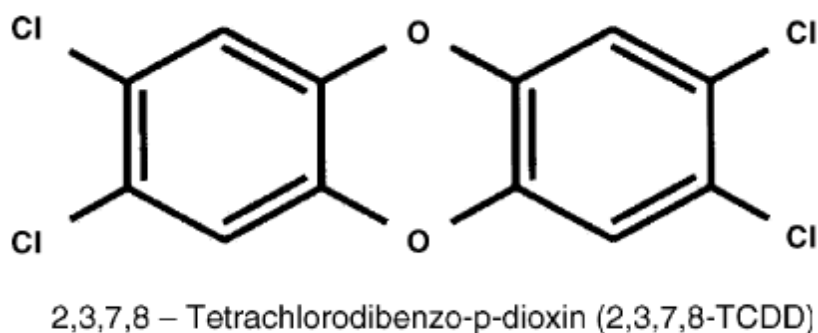
Negli ultimi anni la situazione sembra aver subito un peggioramento, come dimostra il caso ormai tristemente noto dell'emergenza rifiuti in Campania. Per fare un esempio più vicino



alla realtà regionale toscana, anche se di dimensioni assai più ridotte, possiamo citare quello dell'inceneritore di Montale nel pistoiese. La situazione è aggravata dal fatto che nelle zone a rischio si producono alimenti che vengono poi distribuiti a livello nazionale, diffondendo così la possibile contaminazione anche al di là delle zone di emissione della diossina.

### **Struttura della diossina e legame al recettore Arilico (AhR)**

La diossina ed i composti ad essa correlati sono costituiti da due anelli benzenici connessi da 1 o 2 atomi di ossigeno e contenenti da 4 a 8 atomi di cloro, per un totale di più di 75 composti clorurati detti congeneri [42]. Come già detto nel paragrafo precedente, la più tossica tra i composti appartenenti a questo gruppo è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina, mostrata in Figura: su di essa si sono concentrati gli studi clinici ed epidemiologici degli ultimi decenni [43-45].



*Figura: struttura della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina*

E' stato stabilito con certezza che, una volta attraversata la membrana citoplasmatica grazie alla sua alta lipofilità, la diossina si lega ad una particolare proteina citosolica, conosciuta come recettore degli idrocarburi arilici o recettore arilico (AhR) [46,47]. Questo recettore è un membro della famiglia delle proteine bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim), noti regolatori trascrizionali, ed è coinvolto nell'organogenesi, nella detossificazione di endo- e xenobiotici e in diverse risposte organo-specifiche indotte dalla diossina. Tra i più comuni ligandi di questo recettore vi sono: gli idrocarburi arilici (dai quali prende il nome), gli idrocarburi arilici alogenati come la diossina e numerosi costituenti vegetali introdotti con

l'alimentazione. Non è ancora noto con certezza quale sia il ligando fisiologico del recettore arilico: fra le varie ipotesi avanzate a questo proposito si possono ricordare i metaboliti del triptofano [48] e l'AMP ciclico [49]. Il ruolo fisiologico del recettore arilico non è ancora pienamente compreso sebbene l'elevato livello di conservazione in una larga varietà di specie animali suggerisca un suo ruolo fondamentale per la fisiologia cellulare [50]. AhR è presente nel citosol di molte cellule, quando è in forma inattiva si ritrova associato ad altre proteine: Hsp90 (*Heat Shock Protein 90*) [51,52], XAP2 (*Immunophilin-Related Protein*) [53-55] e una piccola proteina p23 [56]. Il legame del ligando, sia esso endogeno o esogeno come la diossina, induce dei cambiamenti conformazionali in AhR che determinano il rilascio delle proteine accessorie e l'attivazione del recettore. Una volta attivato, il recettore può indurre diversi meccanismi di trasduzione del segnale che determineranno le diverse risposte cellulari. Questi meccanismi di trasduzione del segnale possono appartenere a due tipologie diverse: la prima comprende la traslocazione nel nucleo del complesso AhR/TCDD e l'attivazione della trascrizione genica mentre la seconda, invece, comprende un sistema di interazioni proteina-proteina che prescinde dall'attività trascrizionale del recettore. Una volta avvenuto il legame della diossina con AhR, il complesso trasloca nel nucleo [57]. All'interno del nucleo, AhR dimerizza con ARNT (*Ah Receptor Nuclear Translocator*) [58], un'altra proteina bHLH, che normalmente si trova libera nel nucleo [47]. A seguito di questa dimerizzazione si forma un complesso trascrizionalmente attivo che si lega ad un sito specifico, la sequenza 5'-TNGCGTG-3', presente nel promotore di diversi geni bersaglio, noto come elemento di risposta agli xenobiotici (XRE) o, nel caso specifico della diossina, DRE [55]. Viene così attivata la trascrizione di geni che codificano per enzimi coinvolti nelle biotrasformazioni (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, UGT1A6, GSTA2, NQO1, ALDH3A1, Nrf2, AhR repressor) e nella regolazione di sviluppo, proliferazione e differenziamento cellulare (p21CIP1, p27KIP1, c-jun, junD, Hes-1, IL-2, Bax, IGF1BP-1, Filaggrina) [60]. Una modulazione inappropriata dell'espressione genica potrebbe pertanto rappresentare il passo iniziale di una serie di cambiamenti biochimici, cellulari e tissutali che

sarebbero responsabili della tossicità osservata [59].

## **Detossificazione di metaboliti endogeni e xenobiotici**

La principale funzione del recettore arilico consiste nell'indurre una sovraespressione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli idrocarburi arilici quali ad esempio il *benzopirene*. A tal proposito è noto che AhR sia un importante regolatore di tre membri della famiglia CYP1: CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1, tutti appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450. Il gene CYP1A1 codifica per un enzima microsomiale che è coinvolto nell'ossigenazione di vari xenobiotici nel corso del processo di detossificazione [61]. L'importanza di CYP1A1 nei processi di detossificazione degli xenobiotici è sottolineata da esperimenti che hanno dimostrato come la somministrazione orale di *benzopirene* risulta mortale per topi *knock-out* per questo gene ma non per quelli *wild-type* [62]. D'altra parte, l'espressione prolungata di CYP1A1 può causare danni a carico del DNA dovuti ad un incremento della produzione di metaboliti genotossici e specie reattive dell'ossigeno (ROS) [63]. La regolazione cooperativa degli enzimi di Fase I e II facilita il corretto metabolismo degli xenobiotici e di sostanze endogene potenzialmente tossiche [62,64,65]. A questo proposito è stato identificato un altro gruppo di geni indotti dall'attivazione di AhR che codificano per enzimi di Fase II e per altri enzimi coinvolti nelle difese antiossidanti [66]. Il fattore chiave nell'induzione di questi geni antiossidanti è Nrf2 (*NF-E2-Related Factor 2*), un fattore trascrizionale appartenente alla famiglia delle *leucine zipper* che si lega a sequenze ARE (*Antioxidant Response Element*) [67]. Le vie di attivazione collegate al legame di Nrf-2 e AhR alle sequenze ARE e XRE, rispettivamente, possono inoltre interagire fra loro in quanto sequenze XRE sono state identificate all'interno dei promotori di geni controllati da Nrf-2 [68,69]. Questo meccanismo di cross-talk tra i due sistemi per le biotrasformazioni facilita i processi di detossificazione e contemporaneamente aumenta le difese contro lo stress ossidativo [67].

E' stato anche dimostrato che AhR può interagire direttamente con NF-kB, un altro fattore di trascrizione che svolge un ruolo importante nella risposta allo stress ossidativo e nella risposta infiammatoria [70] e con la forma ipofosforilata della proteina Rb [71,72]. E' utile

ricordare che gli enzimi di biotrasformazione sono coinvolti non solo nel metabolismo di sostanze esogene, ma anche nel controllo omeostatico di molecole segnale come ormoni steroidei, neurotrasmettitori, tirosine e retinoidi, anche se i meccanismi con i quali esplicano questa regolazione sono ancora poco chiari [73-75]. La connessione tra il complesso attivato AhR/Arnt e i promotori dei geni bersaglio necessita di un complesso sistema di coattivatori/corepressori [76].

## **Proliferazione e differenziamento**

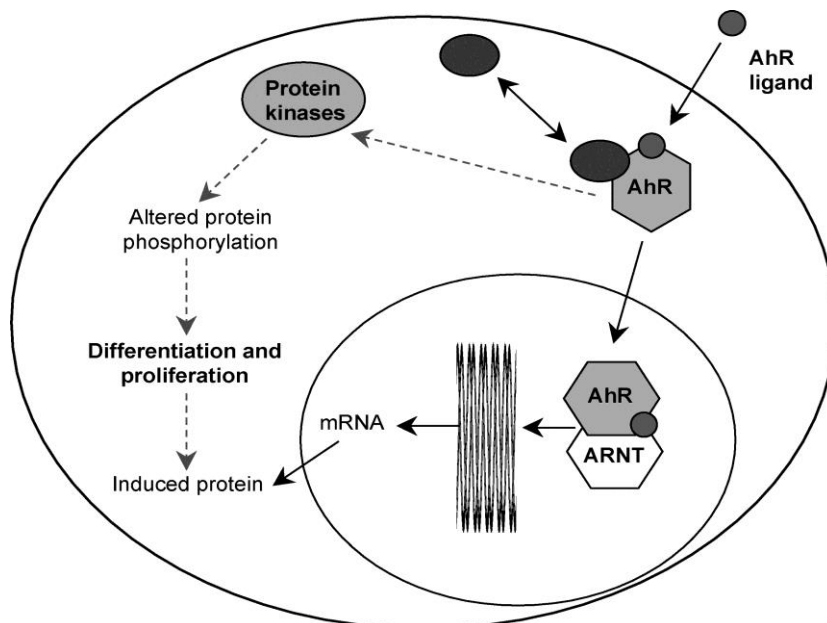
Recentemente sono state ottenute evidenze sperimentali riguardanti il coinvolgimento di un gruppo eterogeneo di proteine modulate da XRE nel controllo del ciclo cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi [77,78]. Il legame di AhR alle sequenze XRE dei geni p21CIP1 e p27KIP1 può causare l'inibizione dell'attività di alcune chinasi ciclina-dipendenti [79,80]. In particolare, l'inibizione della chinasi-2 ciclina E-dipendente può a sua volta impedire la fosforilazione della proteina Rb e di conseguenza causare un arresto del ciclo cellulare [79]. Fra i geni la cui espressione può essere regolata da AhR mediante il legame a sequenze XRE occorre ricordare anche c-Jun [81], IL-2 (citochina che svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi delle cellule T), Bax (con funzioni pro-apoptotiche) [82], IGFBP-1 (*Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1*) [83] e CD39 (una interessante ecto-ATPasi probabilmente coinvolta nei meccanismi di riconoscimento cellulare) [84]. Bisogna inoltre ricordare che la funzione del recettore arilico è essa stessa strettamente controllata da un repressore il quale compete con AhR per Arnt, interferendo con la capacità di AhR di legarsi alle regioni XRE e stimolare la trascrizione [85].

E' infine interessante ricordare che studi condotti su colture cellulari che crescono in sospensione, hanno indicato che la perdita dei contatti tra cellule promuove la traslocazione nel nucleo del recettore arilico indipendentemente dal legame con un ligando [86]. Questo meccanismo di attivazione ligando-indipendente necessita di ulteriori investigazioni poiché le due vie sono difficilmente distinguibili [48]. Tuttavia, si ritiene che esista un sistema di fosforilazione di residui specifici nella sequenza amminoacidica NES (*Nuclear Export*

*Sequence*) di AhR, in particolare a livello di Ser68, che ne determina la traslocazione nel nucleo anche in assenza di attivazione da parte del ligando. L'uso di inibitori specifici di diverse chinasi ha suggerito che questa fosforilazione sia catalizzata dalla p38 MAPK [87].

## **Interazione di AhR con il sistema delle protein chinasi**

Studi su modelli cellulari privi di nucleo hanno mostrato che la stimolazione del recettore arilico con TCDD ha la capacità di attivare anche altre vie di trasduzione del segnale che sono indipendenti dalla traslocazione nucleare. Infatti, la stimolazione con TCDD induce la modificazione dello stato di fosforilazione delle proteine cellulari attraverso l'induzione di tirosin chinasi entro 10 minuti dal trattamento [88]. Sulla base di queste osservazioni il sistema di fosforilazione proteica indotta dalla diossina può essere considerato un percorso separato dal più noto meccanismo di traslocazione nucleare. Uno schema dei due differenti meccanismi di trasduzione del segnale è riportato nella figura sottostante.



*Figura: differenti meccanismi di trasduzione del segnale mediati dal recettore AhR*

L'attivazione di numerose chinasi mediata dalla diossina dipende dalle condizioni cellulari [89]. E' stato dimostrato che il legame fra diossina e AhR può indurre l'espressione di c-Jun attraverso l'attivazione della p38-MAPK. L'incremento della fosforilazione di p38-MAPK in

risposta alla diossina non richiede sintesi proteica per cui è stato proposto che ci sia un cross-talk tra le vie di traduzione del segnale AhR- e MAPK-dipendenti, probabilmente mediato dall'intervento di proteine adattatrici simili a TAK-1. Ulteriori evidenze sperimentali sembrerebbero inoltre indicare che un'altra tirosin chinasi, pSrc, viene rilasciata in forma attiva dal complesso AhR/Hsp90 in seguito al legame con la diossina [88,90]. Numerose osservazioni hanno infine indicato che la fosforilazione dello stesso AhR rappresenta un passo importante nel suo meccanismo di traduzione del segnale. In effetti, siti di fosforilazione sia per Protein-Kinasi A che Protein-Kinasi C sono stati identificati nel recettore umano e in quello murino [91]. Recentemente è stato suggerito che l'attivazione del recettore mediante il legame con il ligando o dovuta alla fosforilazione, mediata da c-AMP, potrebbe stimolare sistemi di segnale divergenti [49].

Ulteriori interazioni di AhR con numerose molecole biologiche sono ancora oggetto di studio in quanto coinvolte nelle diverse risposte da parte di cellule e tessuti. Alcuni risultati sperimentali indicano che la diossina può indurre un aumento dell' uptake del calcio entro 5 minuti dall'attivazione del recettore arilico, escludendo pertanto il coinvolgimento di cambiamenti a livello trascrizionale [92].

## **Degradazione di AhR**

E' stato ipotizzato che l'attivazione del recettore arilico a seguito del legame con il ligando, possa essere regolata mediante l'innescò dei processi di degradazione del recettore stesso [93]. Esperimenti condotti con inibitori specifici hanno dimostrato che la *downregulation* di AhR è mediata dal proteasoma. Infatti, nella frazione nucleare di cellule in coltura, la concentrazione della proteina AhR raggiunge un picco dopo 1-2 h dopo il trattamento delle cellule con diossina per poi scendere rapidamente con il passare del tempo. In presenza di inibitori dell'attività proteasomica, dopo trattamento delle cellule con diossina, i livelli di AhR e Arnt restano elevati anche dopo 8 ore [93,94].

## **Effetti tossici della diossina sull'organismo**

I dati relativi ai possibili rischi dell'esposizione alla diossina per l'uomo derivano principalmente dallo studio degli effetti osservati nei casi di esposizione accidentale [95,96]. Probabilmente l'aspetto più inusuale dell'azione tossica della diossina è quello di produrre una grande varietà di risposte, alcune delle quali si manifestano già a basse dosi e durano per lunghi periodi di tempo. Le ricerche svolte in seguito ad incidenti di forte impatto ambientale si sono occupate principalmente dei possibili danni per la funzione epatica e per i sistemi immunitario, nervoso e riproduttivo ottenendo però risultati non ancora definitivi [97].

Il primo dato chiaro che emerge sia dalle osservazioni epidemiologiche che dalle ricerche sperimentali sugli effetti tossici dei composti clorurati è che tali effetti variano enormemente in funzione di numerosi fattori: tipo di cellule o tessuto, età, sesso, specie, tempo e durata dell'esposizione. Inoltre, anche per uno stesso tipo cellulare, la tossicità può variare a seconda delle condizioni di coltura e dello stadio di crescita. La quantità di informazioni disponibili riguardo alle azioni della diossina è divenuta considerevole, ma nello stesso tempo, frammentaria per cui risulta assai difficile individuare chiaramente un meccanismo d'azione comune che possa spiegare i numerosi effetti tossici nei diversi tipi di tessuto.

Il solo effetto clinico conseguente all'esposizione della diossina stabilito con certezza è una grave forma di acne, più sfigurante della normale acne giovanile; questa perdura anche anni dopo l'esposizione e la prima comparsa è definita cloracne [97]. La cloracne si manifesta con eruzioni cutanee e pustole con possibile localizzazione estesa all'intera superficie corporea e con manifestazioni protratte, nei casi più gravi, per molti anni.

Uno dei più comuni sintomi associati nelle specie animali ad avvelenamento da TCDD è la cosiddetta "*wasting syndrome*" (sindrome da perdita di peso corporeo), che coinvolge soprattutto il tessuto adiposo [81] e quello muscolare. Negli animali trattati con diossina, la *wasting syndrome* si sviluppa lentamente fino a portare alla morte, nel caso di una perdita di peso corporeo superiore al 50% [98]. Questa perdita di peso non può essere attribuita solo ad una riduzione dell'assunzione di cibo, che pure è una conseguenza dell'avvelenamento da

diossina. Infatti, animali trattati con TCDD ed alimentati artificialmente, in modo da garantire un apporto calorico paragonabile a quello dei controlli, manifestano comunque un'alterazione dell'assorbimento intestinale dei nutrienti e del loro trasporto così da non poter mantenere il giusto peso corporeo [98]. Negli animali trattati con diossina sono state osservate numerose alterazioni del metabolismo lipidico: aumento della mobilizzazione dei grassi dal tessuto adiposo [99], della loro ossidazione [100] e della chetogenesi [101], diminuzione della sintesi ex novo dei grassi e aumento dei livelli plasmatici dei trigliceridi [102]. L'esposizione alla diossina causa inoltre un'incapacità del glucosio di indurre sintesi proteica negli adipociti [103,104]. Questo effetto della diossina sembrerebbe riconducibile alla sua capacità di inibire l'uptake del glucosio attraverso una riduzione del numero e/o dell'attività dei trasportatori del glucosio GLUT4 e GLUT2 [103,104]. Recentemente [105] è stato anche dimostrato che nel ratto la somministrazione di diossina è in grado di modificare a livello ipotalamico l'espressione di geni coinvolti nella regolazione dell'assunzione di cibo e del metabolismo.

Gli idrocarburi aromatici clorurati producono lesioni iperplastiche ed ipertrofiche a livello della mucosa gastrointestinale con manifestazioni emorragiche e necrotiche più o meno gravi [106,107]. La TCDD e i composti correlati producono epatomegalia in tutte le specie studiate, anche a basse dosi. Il sistema immunitario è stato per lungo tempo considerato un bersaglio preferenziale della tossicità della diossina [108-111,41]; infatti, in tutte le specie studiate, la TCDD e congeneri hanno prodotto una perdita di tessuto linfoide, specialmente nel timo, ma anche nella milza e nei linfonodi [106] dovuta alla necrosi dei linfociti. Gli effetti immunologici causati dalla diossina si manifestano con una diminuzione della resistenza alle infezioni e delle risposte immunitarie umorali e cellulo-mediate. Essa promuove le risposte infiammatorie come risulta da un aumento della produzione di citochine infiammatorie come l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ )[112]. Inoltre, l'esposizione cronica alla TCDD danneggia la riproduzione; nei maschi causa una diminuzione della spermatogenesi, delle dimensioni dei testicoli e una



degenerazione dei tubuli seminiferi [107]. Nelle donne esposte alla TCDD, lesioni morfologiche sono state osservate nell'utero e nelle ovaie; inoltre, i livelli di progesterone ed estrogeni nel sangue risultano significativamente diminuiti [106,107]. Altre osservazioni suggeriscono che la TCDD possa avere effetti teratogeni. Inoltre, è interessante ricordare, che è stata dimostrata l'esistenza di importanti interazioni (cross-talk) fra le vie di trasduzione del segnale mediate da AhR e quelle degli estrogeni [113,114]. L'esposizione a basse dosi di diossina può essere associata a deficit comportamentali e neurologici, in particolar modo se l'esposizione avviene durante lo sviluppo [115]. La neurotossicità è stata osservata nell'uomo e confermata in parecchie specie da laboratorio [115]. L'esposizione di animali adulti ad una singola dose di PCBs fa diminuire i livelli di diversi neurotrasmettitori nel cervello, mentre esposizioni ripetute a basse dosi di PCBs sembrano compromettere il metabolismo della dopamina cerebrale [115]. Modificazioni analoghe sono state riscontrate anche in lavoratori di industrie chimiche, i quali sono maggiormente esposti a contaminanti chimici come la diossina [116].

Esperimenti su animali trattati con alte dosi di diossina e studi su popolazioni umane altamente esposte, hanno mostrato che i composti diossinici determinano un incremento del rischio di ammalarsi di cancro [117]. Nel ratto, la diossina induce neoplasie nei polmoni, nelle cavità nasali e orali, nella tiroide e nel fegato [118,119]. Per quanto riguarda l'uomo, il *Department of Health and Human Service* degli Stati Uniti ha classificato la diossina fra le sostanze sicuramente cancerogene [120]. A questo proposito può essere interessante ricordare che confrontando le concentrazioni di TCDD nei tessuti di animali trattati che sviluppavano tumori e in quelli di una popolazione altamente esposta si è trovata una certa similarità dei valori ottenuti [121]. Studi epidemiologici hanno suggerito che i lavoratori impiegati nell'agricoltura e nelle industrie di produzione di pesticidi manifestano un elevato rischio di sviluppare sarcoma dei tessuti molli, sindrome di Hodgkin e linfoma non-Hodgkin [122-124]. La mortalità dovuta al cancro, come quelli dell'apparato digerente e del sangue, risulta essere aumentata [125-129]. Infine, numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato

l'esistenza di una correlazione positiva fra esposizione alla diossina e l'insorgenza del diabete di tipo 2 [130-134].

A questo proposito, è anche utile ricordare che le caratteristiche relative all'alta diffusione e all'elevata persistenza della diossina nell'ambiente la fanno ritenere al momento attuale forse l'unico contaminante ambientale capace di causare effetti diffusi sulla popolazione generale [135]. Queste sostanze, grazie alla loro lipofilità e alla loro elevata resistenza alla degradazione, risultano presenti, a basse concentrazioni, nel grasso di molti alimenti [23,136] pertanto, possono raggiungere tutti gli individui di una popolazione. Infine, anche se, associati ad un rischio di indurre diabete molto basso a livello individuale, possono comunque provocare effetti significativi a livello dell'intera popolazione [137].

## **Relazione tra l'esposizione alla diossina e l'incidenza del diabete di tipo 2: evidenze epidemiologiche**

Come già accennato precedentemente, diversi studi epidemiologici hanno contribuito a stabilire una chiara relazione tra l'esposizione alla diossina (così come ai POPs) e l'incidenza del diabete di tipo 2 [138]. Questa associazione è stata prima riportata per la popolazione esposta professionalmente e successivamente indagata nella popolazione generale. Molti veterani della guerra in Vietnam sono stati esposti alla *2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina*, che era un contaminante presente nell'Agent Orange, ampiamente utilizzato con defoliante dall'aviazione degli Stati Uniti dal 1961 al 1971 [139]. Anche dopo molti anni, significativi residui di diossina sono stati trovati nel siero di tali veterani (600 pt rispetto a 1-2 pt nella popolazione non esposta) [130,140], a causa della lunga emivita della diossina e studiando i possibili effetti sulla salute, è stata trovata una associazione significativa con il diabete di tipo 2 [141].

Conclusioni simili sono state tratte da studi epidemiologici condotti sulla popolazione esposta ad alti livelli di diossina a seguito di un incidente industriale avvenuto il 10 luglio 1976, nel reparto di produzione del triclorofenolo di un impianto chimico collocato vicino la

città di Seveso, a 25 km a nord di Milano [97,142,143]. In quella occasione si produssero alcuni chilogrammi di diossina che contaminarono l'ambiente, causando la morte di numerose forme di vita sia della flora che della fauna circostante. Benché un numero consistente di individui, sia adulti che bambini, fossero venuti a contatto con la sostanza chimica, per molti anni non si sono riscontrati effetti gravi sulla salute. Tuttavia è stato poi evidenziato un innalzamento dell'incidenza dei tumori nella popolazione che viveva nelle zone più esposte alla diossina sprigionata con l'esplosione [144] e a 25 anni il *follow-up* della popolazione esposta ha mostrato un significativo incremento della mortalità da diabete mellito tra le donne [129,145].

Altri studi epidemiologici, con risultati paragonabili, sono stati eseguiti sui lavoratori d'industria esposti professionalmente [146], su veterani delle guerre in Corea e in Vietnam, che sono stati esposti *all'Agent Orange* [131], e su individui che vivono vicino a inceneritori di rifiuti municipali [147] o vicino a siti di rifiuti pericolosi [148]. Inoltre, correlazioni simili sono state ottenute in 24 anni di studi di *follow up* su 1054 vittime della "malattia dell'olio" che alla fine degli anni '70, furono accidentalmente esposte ad olio di riso contaminato con *policlorinato bifenile* [149]. Altri autori hanno ottenuto risultati contrastanti studiando lavoratori professionalmente esposti [150-154], in particolare, recentemente, è stato rianalizzato lo studio *Ranch Hand* [155] ed è stato ipotizzato che la progressione del diabete sia responsabile dell'aumento dei livelli di diossina piuttosto che esserne causata.

Negli ultimi anni, lo studio dell'associazione tra esposizione alla diossina e incidenza del diabete è stato esteso da singoli individui esposti per motivi professionali o accidentali alla popolazione generale. La caratteristica principale dei POPs è che essi sono per lo più presenti come componenti di miscele chimiche, per cui, quando si valutano gli effetti sulla popolazione generale di un'esposizione di fondo ai POPs, si deve tener presente che i dati ottenuti non possono essere semplicemente attribuiti all'effetto esclusivo di quel composto, ma devono piuttosto essere visti come il risultato di un effetto additivo della miscela [156].

A seguito di uno studio di popolazione in Belgio, per la prima volta, emerse che nel siero dei

pazienti diabetici aumentavano significativamente i livelli di diossina e policlorinati bifenili. Nel 2006, incrociando i dati raccolti dal 1999-2002 dall' *U.S National Health e dall' Examination Survey*, [132,157] alcuni studiosi trovarono una forte correlazione tra la concentrazione di POPs nel siero (specialmente di composti organoclorati) e il diabete.

L'associazione con i livelli sierici di POPs fu in seguito estesa, dallo stesso gruppo, all'insulino resistenza [158], alla prevalenza della sindrome metabolica, e all'obesità addominale [159] tra adulti non diabetici. Questi risultati sono stati ulteriormente supportati da uno studio di Everett [133] che ha mostrato una significativa correlazione positiva tra il diabete e la *policlorinato dibenzo-p-diossina*, il *policlorinato bifenile* e il *DDT* in un gruppo di 1830 soggetti dal 1999 al 2002 (*National Health e Examination Survey*). Altri studi sulla popolazione generale hanno ulteriormente confermato l'associazione tra l'esposizione ai POPs e l'incidenza del diabete [160-167].

I POPs sono generalmente lipofili, resistenti alla degradazione e tendenti al bioaccumulo nella catena alimentare, per questi motivi, benché vi sia un declino generalizzato nei livelli ambientali nelle ultime decadi, vengono soprattutto trovati come contaminanti dei cibi. In considerazione di ciò, alcuni studi recenti sulla relazione tra consumo di cibi, quali pesci e mammiferi marini, e l'incidenza del diabete possono essere particolarmente interessanti. E' stata mostrata una significativa associazione tra i livelli di POP nel plasma e la compromessa funzione delle cellule  $\beta$  tra gli Inuit della Groenlandia [168], altri hanno riportato che i tassi di prevalenza del diabete sono 3-5 volte più alti tra gli aborigeni Canadesi rispetto alla popolazione generale [169], e altri ancora hanno trovato una positiva correlazione tra i livelli sierici di *p,p'-DDE* e alcuni *policlorinati bifenili* congeneri negli aborigeni Canadesi [170]. Infine, Rylander [171] ha riportato una correlazione significativa tra i livelli plasmatici di POP e il diabete di tipo 2 nei pescatori svedesi e nelle loro mogli mentre Turyk [172] ha trovato una simile significativa associazione in un gruppo di sportivi dei Grandi Laghi consumatori di pesce.

Nonostante la letteratura epidemiologica sia ancora lontana dall'essere omogenea e presenti

diverse mancanze e incongruenze, la principale conclusione che si può trarre è che vi sono forti evidenze che i *Persistent Organic Pollutants* (POPs) costituiscano fattori di rischio per il diabete nell'uomo [156].

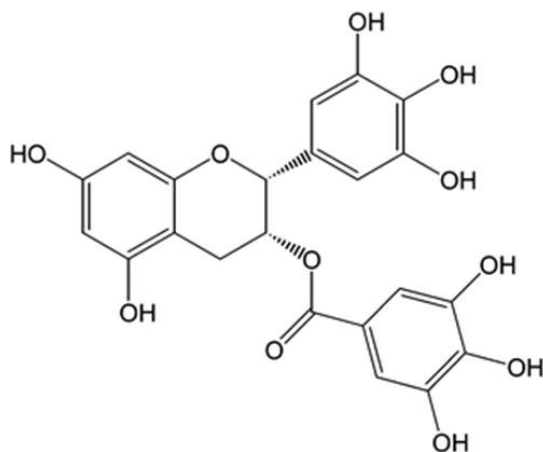
Recentemente sono stati proposti nuovi ed originali modi per studiare l'associazione tra l'esposizione alla diossina e ad altri POP con il diabete. Fujiyoshi [173], al fine di offrire qualche indizio sul meccanismo d'azione diabetogena della diossina nell'uomo, ha eseguito una ricerca epidemiologica molecolare in campioni di tessuto adiposo provenienti da veterani del Vietnam dell'aviazione USA che erano stati esposti o no alla diossina. Gli studi sono stati condotti con l'uso della *quantitative reverse-transcribed PCR* (qRT-PCR) su geni selezionati e hanno rilevato che l'indicatore molecolare più sensibile e affidabile di diabete indotto da diossina era il rapporto mRNA di GLUT4 e NFκB, un marcatore dell'infiammazione. E' interessante notare che questo rapporto mostra significative correlazioni con i livelli sierici di diossina e glicemia a digiuno, non solo tra i veterani esposti, ma anche nel gruppo di controllo, che ha bassi livelli di diossina rispetto alla popolazione generale.

Molte evidenze epidemiologiche supportano l'ipotesi di un'associazione positiva tra l'esposizione a diossina o altri POPs e l'incidenza del diabete. Comunque, tale associazione non implica necessariamente un legame causale poiché altre spiegazioni sono plausibili. Per questo, molto recentemente, un gruppo di esperti si è riunito per valutare l'associazione tra POPs e diabete in studi epidemiologici, indicando la necessità di ulteriori studi su animali ed in vitro per analizzare i meccanismi al fine di chiarire il ruolo dei POPs nello sviluppo delle malattie metaboliche, campo che è stato scarsamente indagato sino ad anni recenti.

### **Epigallocatechina-3-gallato**

E' stato dimostrato che l'epigallocatechina-3-gallato (EGCG) è in grado di agire come inibitore del recettore arilico legandosi alla *Heat Shock Protein 90* (Hsp90), una delle sue proteine accessorie [174,175]. L'EGCG è la catechina più abbondante nel tè verde costituendo più del 40% dei polifenoli totali in esso contenuti [176]. Il tè verde contiene

infatti vari composti polifenolici, quali: EGCG, l'epigallocatechina, l'epicatechina-3-gallato ed l'epicatechina. L'EGCG è inoltre la sola catechina presente nel plasma in forma libera dopo l'assorbimento intestinale ed è quella a più lunga emivita plasmatica nell'uomo. In Figura è mostrata la struttura chimica dell'*epigallocatechina-3-gallato*.



**(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)**

*Figura: struttura chimica dell'EGCG*

Numerosi studi sperimentali ed epidemiologici hanno mostrato che l'EGCG può ridurre il rischio di malattie croniche come quelle cardiovascolari, l'obesità ed il cancro. Inoltre, è stato mostrato che il consumo di estratti di tè verde o di EGCG ha effetti benefici nel controllo della glicemia in soggetti obesi e diabetici ed in modelli animali di diabete.[177]. L'EGCG si è dimostrata in grado di esercitare effetti benefici su alcune malattie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, la sindrome di Sjogren e l'encefalomielite. E' stato inoltre riportato che l'EGCG modula la funzione di linfociti, macrofagi e cellule dendritiche, sopprimendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie [177]. Altri effetti benefici attribuiti all'EGCG includono l'attività antiossidante, anti-angiogenetica e anti- proteolitica. In aggiunta a ciò, in un numero sempre maggiore di studi, viene messa in evidenza l'influenza dell'EGCG sull'apoptosi in molti sistemi biologici [178].

## Scopo della tesi

Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio internato di tesi si dedica ormai da anni allo studio della possibile azione diabetogena della diossina; tale interesse era stato inizialmente motivato dalla relativa scarsità di lavori sperimentali riguardanti gli effetti della diossina sulla funzione endocrina del pancreas che rendeva necessario un approfondimento di questo aspetto, per cercare di individuare una base biologica plausibile a sostegno delle osservazioni epidemiologiche precedentemente ricordate.

Sulla base di queste premesse, i primi studi hanno dimostrato che la diossina, somministrata *in vivo* a basse dosi, è in grado di indurre rapidamente un danno specifico della funzionalità secretoria del pancreas endocrino nel ratto, associata ad una diminuzione della captazione del glucosio da parte delle cellule pancreatiche, ma non riconducibile direttamente ad una diminuzione della quantità dei trasportatori specifici per il glucosio (GLUT2) [218]. Successivamente, la  $\beta$ -tossicità della diossina è stata ulteriormente caratterizzata utilizzando come modello sperimentale la linea cellulare INS-1, derivante da un insulinoma di ratto indotto con raggi X, ben differenziata e capace di secernere insulina in risposta al glucosio. Questi esperimenti hanno permesso di dimostrare che la diossina, anche a dosi molto basse (1,0-12,5 nM) è particolarmente tossica per le cellule INS-1 che pertanto possono essere considerate un bersaglio specifico e assai sensibile dell'azione tossica di tale sostanza [179]. Inoltre, allo scopo di approfondire lo studio dei meccanismi dell'azione tossica della diossina sulle cellule pancreatiche INS-1, sono stati valutati gli effetti di potenziali agenti protettivi scelti in base alla loro capacità di modulare alcuni dei meccanismi biochimici per i quali in letteratura è stato ipotizzato un ruolo patogenetico nel danno indotto dalla diossina. I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare che la preincubazione con acido deidroascorbico (DHA), provocando un aumento dose-dipendente della concentrazione intracellulare di vitamina C, era in grado di proteggere, anche se solo parzialmente, le cellule INS-1 dalla tossicità acuta della diossina, probabilmente preservando la funzione mitocondriale [180]. E' stato inoltre possibile

dimostrare che l'*epigallocatechina-3-gallato* (EGCG), un flavonoide di origine vegetale scelto principalmente in base alla sua capacità di interagire con il recettore arilico (AhR), esercita un notevole effetto protettivo nei confronti dell'azione della diossina nelle cellule INS-1 [181]. Questi esperimenti hanno indicato che il mitocondrio rappresenta uno dei principali bersagli dell'azione tossica acuta della diossina e hanno altresì permesso di chiarire il ruolo rivestito dalla notevole attivazione dei meccanismi autofagici nel processo che conduce alla morte cellulare indotta dalla diossina.

Il progetto sperimentale oggetto della mia tesi si è proposto, sulla base dei suddetti risultati, di studiare gli effetti tossici della diossina sulle isole di Langerhans isolate dal pancreas del ratto, che, nei confronti della linea cellulare INS-1, rappresentano sicuramente un sistema sperimentale più vicino all'ambito fisiologico. Le isole pancreatiche rappresentano infatti un vero e proprio organo endocrino in miniatura, nell'ambito del quale la funzione delle cellule  $\beta$  è regolata in modo più appropriato dagli stimoli fisiologici ed è inoltre influenzata dal continuo scambio di segnali chimici con gli altri tipi cellulari presenti all'interno della stessa isola.

Gli esperimenti a cui ho partecipato e che sono oggetto della mia tesi sono stati volti a:

- a) indagare gli effetti della TCDD sulla mortalità delle isole isolate;
- b) valutare l'effetto di varie dosi di TCDD sulla funzione secretoria in isole di Langerhans isolate di ratto;
- c) cercare di comprendere il meccanismo di azione della TCDD nelle isole, valutando l'espressione di alcuni geni rilevanti per la funzione secretoria o coinvolti nel processo apoptotico;
- d) studiare la possibilità di contrastare gli effetti di TCDD nelle isole usando l'EGCG, sostanza in grado di legarsi al recettore arilico.



# **MATERIALI E METODI**

## **Animali**

Abbiamo utilizzato ratti Sprague-Dawley di 250-300g di peso per l'isolamento delle isole di Langerhans. Gli animali sono stati acquistati dalla ditta Harlan Italy e mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia dell'Università di Pisa fino al momento del sacrificio, sottoposti a cicli controllati di luce-buio di 12 h ed alimentati con una dieta standard Teklad in cubetti compressi (Harlan Italy).

## **Isolamento isole e coltura**

Le isole di Langerhans sono state isolate dal pancreas dei ratti attraverso digestione enzimatica con collagenasi, secondo una modifica del metodo di Lacy e Kostianovsky [182]. L'enzima collagenasi agisce in prevalenza sul tessuto connettivo e sul friabile tessuto esocrino, lasciando pressochè intatte le isole di Langerhans. Gli animali sono stati anestetizzati con 0,1 ml 100 g p.c di Nembutal (5g/100 ml). Prima di iniziare la chirurgia l'addome dei ratti è stato bagnato con alcool per evitare eventuali contaminazioni. Praticata una incisione addominale a V, si è messo allo scoperto il pancreas ed è stato chiuso il dotto pancreatico con una pinza emostatica a livello dell'inserzione nel duodeno [183]. Il dotto epato-pancreatico è stato inciso con forbici a molla e poi introdotta la cannula. Sono stati quindi iniettati lentamente 15 ml di soluzione contenente collagenasi (1 mg/ml di collagenasi P in tampone Hank's). Il pancreas dilatato è stato rimosso in modo da non far defluire la soluzione di collagenasi e posto in un contenitore in un bagnetto a 37°C in agitazione per 15 min. Al termine della digestione, il contenitore è stato tolto dal bagnetto, e il materiale fatto passare più volte attraverso una pipetta Pasteur di plastica per omogeneizzarlo. Poi, è stato aggiunto tampone freddo e lasciato in ghiaccio a sedimentare al fine di far cessare l'azione enzimatica della collagenasi. Dopo aver ripetuto questa procedura per due volte, parte del tampone è stato eliminato e il materiale restante aspirato con una siringa da 10 ml con ago

14-G in modo da eliminare ciò che non attraversava l'ago. Il materiale raccolto è stato filtrato e posto in un Falcon da 50 ml, ad esso è stato aggiunto tampone freddo ed è stato centrifugato per 3 min a 500 g. Il passo successivo è stato l'eliminazione del soprannatante per capovolgimento e la risospensione del pellet in 10 ml di Histopaque 1119. In seguito, lentamente, sono stati stratificati 10 ml di Histopaque 1077 e poi 10 ml di tampone Hank's freddo contenente siero albumina bovina (1mg/mL). Dopo centrifugazione a 1000 g per 20 min a 10°C, le isole si posizionano all'interfaccia tra il secondo ed il terzo strato, da dove sono state raccolte con una pipetta Pasteur in un Falcon e lavate 2 volte con tampone freddo centrifugando a 500 g per 3 min. Le isole separate con questo procedimento, sono state riconosciute con l'ausilio di un microscopio stereoscopico e trasferite con pipetta in una capsula di Petri contenente terreno di coltura (RPMI), lavate più volte in tampone RPMI sterile ed infine incubate in presenza di RPMI, contenente HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 50  $\mu$ M, sodio piruvato 1 mM, penicillina 100 U/ml e streptomicina 100  $\mu$ g/ml e 10% FCS, e mantenute per almeno 24 h a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata di aria e contenente CO<sub>2</sub> al 5%. Quindi, le isole sono state distribuite in piastre da 24 pozzetti con l'ausilio di uno stereomicroscopio: gruppi di 10 isole sono stati utilizzati per le prove funzionali e la valutazione dell'apoptosi e della necrosi; gruppi di 300-350 isole per la valutazione dell'espressione genica.

## **Valutazione funzionale**

Dopo 1 o 6 h di coltura in presenza di varie dosi di TCDD (1, 6 e 12 nM), il mezzo è stato rimosso e le isole lavate con KRB/Hepes contenente glucosio 2,8 mM e preincubate per 30 min nello stesso tampone. Al termine, il mezzo è stato rimosso e le isole incubate per 60 min in presenza di KRB/Hepes contenente glucosio 2,8 o 16,7 mM. Terminata l'incubazione, il mezzo è stato rimosso ed utilizzato per la determinazione dell'insulina rilasciata ed il contenuto residuo di insulina delle isole estratto con 1 ml di etanolo acidificato freddo (150:47:3 v/v etanolo assoluto:H<sub>2</sub>O: HCl concentrato), secondo una modificazione del metodo di Kenny [184]. Questo è un procedimento di estrazione semplificato che richiede la

semplice omogenizzazione in etanolo-acido senza precipitazione, e consente di estrarre insulina ed altri polipeptidi pancreatici quali proinsulina, peptide C, glucagone e somatostatina. L'estratto in etanolo-acido può essere usato direttamente per il dosaggio ormonale, purché convenientemente diluito nel tampone del dosaggio.

Il rilascio di insulina è stato calcolato come percentuale del contenuto iniziale dell'ormone nelle cellule  $\beta$ .

## **Dosaggio di insulina**

L'insulina è stata determinata con l'ausilio di un dosaggio radioimmunologico come descritto da Herbert et al. [185]. Questo dosaggio si basa sulla competitività nell'occupare i siti leganti dell'anticorpo anti-insulina aggiunto durante il dosaggio, tra l'insulina presente nel campione e l'insulina marcata con  $^{125}\text{I}$ , aggiunta successivamente. Dopo due giorni di incubazione a  $4^{\circ}\text{C}$ , periodo ottimale per raggiungere l'equilibrio nel nostro sistema, l'insulina legata all'anticorpo è stata separata da quella libera mediante aggiunta di una sospensione di carbone attivo inerte in tampone glicina a pH 8,8.

Dopo centrifugazione per 10 min a 2500 g ed eliminazione del soprannatante, la radioattività contenuta nel fondello di carbone, attribuibile all'insulina libera, è stata misurata con un contatore gamma. La curva di taratura è stata ottenuta usando insulina umana come standard. La sensibilità ed i coefficienti di variazione del radioimmunosaggio sono stati i seguenti: limite di sensibilità 0,13 ng/ml, variazione intradosaggio 3,1%, variazione interdosaggio 10,2%.

## **Valutazione di apoptosi e necrosi**

Per la valutazione dell'apoptosi e della necrosi è stato adottato un metodo quantitativo basato sul principio del "sandwich-enzyme-immunoassay", che utilizza anticorpi monoclonali di topo diretti, rispettivamente, contro DNA ed istoni. Ciò ha permesso la determinazione specifica di mono- ed oligo-nucleosomi nella frazione citoplasmatica dei lisati cellulari. Gruppi di 10 isole sono stati incubati in 1 ml di RPMI contenente varie dosi di TCDD (1, 5, 10, 25, 50 nM) in presenza o meno di EGCG (200  $\mu\text{M}$ ) per 24 o 6 h. Al termine, il mezzo e

le isole sono stati recuperati, messi in provette Eppendorf e centrifugati per 10 min a 200 g. Il sopranatante è stato recuperato ed utilizzato per la determinazione della necrosi. Dalle provette contenenti il pellet, il mezzo residuo è stato rimosso per capovolgimento, poi sono stati aggiunti 200 µl del tampone di lisi e le provette incubate per 20 min a temperatura ambiente su un pianetto basculante. Al termine dell'incubazione, le provette sono state centrifugate come sopra, e 20 µl di sopranatante sono stati posti in piastre da 96 pozzetti rivestiti con streptavidina. Dopo aver messo nella piastra anche 20 µl di standard, controllo positivo (fornito dal kit) e controllo negativo (RPMI privo di cellule), abbiamo aggiunto, in tutti i pozzetti, 80 µl di miscela contenente anticorpo anti-istone-biotina e anticorpo anti-DNA-perossidasi preparata fresca subito prima dell'uso. La piastra è stata chiusa con una pellicola trasparente, avvolta in carta stagnola e tenuta per 2 h a temperatura ambiente su un pianetto in agitazione. Al termine, il sopranatante è stato rimosso e la piastra lavata per 3 volte, prima dell'aggiunta di 100 µl di una soluzione contenente 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-solfonato), substrato per la ossidasi. Infine, la piastra è stata letta a due lunghezze d'onda (405nm e 490 nm) e i valori della lettura di riferimento (490 nm) sono stati sottratti, quindi è stato sottratto il bianco, ed i risultati espressi come incremento rispetto al controllo posto uguale a 1.

## **Microscopia elettronica**

Le isole di Langerhans di ratto dopo un periodo di incubazione di 24 h in RPMI da solo o contenente TCDD 10 o 50 nM, sono state fissate in gluteraldeide (2,5% in tampone fosfato 0,1 M) per 20 min a temperatura ambiente. Le isole sono state poi lavate in tampone fosfato 0,1 M a pH 7,3, sottoposte a post-fissazione in tetrossido di osmio (0,1% in tampone fosfato 0,1 M) ed infine deidratate nella serie continua degli alcoli. Nella fase finale della deidratazione le cellule sono state raccolte meccanicamente mediante *scraping* e concentrate mediante centrifugazione. I pellet cellulari ottenuti sono stati rapidamente trasferiti in ossido di propilene ed infine inclusi in resina PolyBed 812. Le sezioni ultrasottili, ottenute

utilizzando un ultramicrotomo con lama di diamante, sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo ed osservate con un microscopio elettronico Zeiss 902.

## **Espressione genica**

### **Estrazione RNA totale**

Al termine del periodo di incubazione di 6 h, la sospensione cellulare è stata trasferita in Eppendorf da 1,5 ml sterili, centrifugata a 4500 rcf per 1 min al fine di separare le isole, che sono state utilizzate per l'estrazione di RNA, dal terreno di coltura che invece è stato usato per la determinazione dei nitriti (600 µl). Il pellet è stato lavato 2 volte con PBS e poi portato a secco. Per l'estrazione del RNA totale è stato utilizzato il kit "*RNeasy Mini Kit®*", che prevede l'utilizzo di colonne contenenti una membrana in grado di trattenere l'RNA. Il pellet è stato scongelato lentamente in ghiaccio; successivamente è stato aggiunto "QIAzol Lysis Reagent", necessario per ottenere il lisato cellulare, ed il tutto è stato opportunamente omogeneizzato meccanicamente con siringa per 5 volte e tenuto a temperatura ambiente (15-25°C) per 5 min. Alla soluzione sono stati aggiunti 140 µL di cloroformio e successivamente essa è stata agitata vigorosamente per 15 sec allo scopo di mescolare le due fasi. Le eppendorf sono state centrifugate per 15 min a 12,000 g a 4°C. La fase acquosa è stata poi trasferita in nuove Eppendorf ed è stato aggiunto un volume 1,5 (525 µl) di etanolo 100%. Nel passaggio successivo il lisato è stato trasferito nell'apposita colonna del kit posta all'interno di un tubo da centrifuga e sottoposta a centrifuga di 8000 g per 15 sec. L'RNA trattenuto sulla colonna è stato lavato con il tampone "RW1" e successivamente con il secondo tampone "RPE". Dopo aver trasferito la colonna in un nuova provetta Eppendorf, l'RNA è stato eluito aggiungendo direttamente 25 µl di acqua "RNase free" sulla membrana della colonna che è stata centrifugata a 8000 g per 1 min.

### **Quantificazione RNA totale**

I campioni di RNA totale ottenuti sono stati quantificati con il Nano-Drop al fine di:

- ✓ ricavare la concentrazione di RNA estratto tramite il valore di assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm;
- ✓ valutare indicativamente il grado di purezza della preparazione; un rapporto di assorbimento tra 260 e 280 nm maggiore di 1,7 indica un buon contenuto di acidi nucleici (principalmente RNA) rispetto al contenuto di proteine.

### **Retrotrascrizione RNA**

Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato il “*iScript Reverse Transcription kit®*” che, grazie all’attività della trascrittasi inversa, è in grado di sintetizzare una molecola di cDNA usufruendo di un filamento di RNA come stampo. Per ogni campione, sono stati presi una quantità di  $\mu\text{L}$  tali da contenere 1  $\mu\text{g}$  di RNA, ed aggiunta  $H_2O$  RNase free fino ad un volume finale di 15  $\mu\text{L}$ . Ad ogni campione sono stati aggiunti 4  $\mu\text{L}$  di 5x *iScript reaction mix* e 1  $\mu\text{L}$  di *iScript Reverse Transcriptase Mix*. La reazione avviene mediante una prima incubazione a 25°C per 5 min, una seconda incubazione a 45°C per 30 min seguita, infine, da una fase di inattivazione dell’enzima a 85°C per 5 min. I campioni di cDNA così ottenuti sono stati conservati a -20°C sino all’analisi dell’espressione genica tramite *quantitative-PCR* (Real Time-PCR).

### **PCR Quantitativa (Real Time-PCR qRT-PCR)**

La *Real-Time PCR* è una tecnica che consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA stampo attraverso il monitoraggio, in tempo reale, dell’intensità di fluorescenza che si libera dal prodotto di amplificazione durante la reazione a catena della DNA polimerasi. Questo risulta possibile mediante l’impiego di marcatori fluorescenti (*Syber Green*), il cui accumulo, a livello del prodotto di reazione, segue la stessa cinetica della PCR. Il colorante fluorescente, intercalato nel DNA a doppio filamento ed eccitato da una luce laser, emette energia luminosa ad una specifica lunghezza d’onda. La luce raccolta ed analizzata da uno spettrografo viene poi convogliata in una telecamera CCD, che integra il segnale e lo converte in un dato numerico che viene registrato dal software, gestito da un personal

computer interfacciato al termociclatore (Rotore-Gene Qiagen). Il Rotore Gene possiede un programma che misura i valori dei cicli di amplificazione delle efficienze usando il metodo Pfaffl di quantificazione relativa.

La miscela di reazione che è stata applicata comprende:

- ✓ 5 µl di cDNA, diluito 1:50;
- ✓ 10 µl di *SSo Advanced Universal Sybr® Green Supermix* (contenente Taq polimerasi, dNTPs, buffer, sonda);
- ✓ 1 µl di primer Senso (soluzione 10 µM);
- ✓ 1 µl di primer Antisenso (soluzione 10 µM);
- ✓ H<sub>2</sub>O fino ad arrivare ad un volume di 20 µl.

Per l'amplificazione è stato utilizzato il programma riportato nella Tabella sottostante.

	Temperature	Time	Cycle Number
Hot start	95°C	5 min	1
Amplification	95°C	15 sec	Variabile
	°C Primer	30 sec	
	72°C	10 sec	
Melting	95°C	5 sec	1
Curve	65°C	1 min	
Cooling	40°C	10 min	1

*Tabella: Programma di amplificazione Real Time-PCR*

## **Housekeeping Gene**

Per poter quantificare l'espressione genica di un campione è necessario disporre di un riferimento, che non si modifichi durante il trattamento, rappresentato da un gene diverso dal gene di interesse, ed espresso costitutivamente nel campione e nel controllo. Tali geni costitutivi, denominati *housekeeping*, sono caratterizzati dal fatto che la loro espressione segue l'attività trascrizionale della cellula; ne consegue che la quantità di RNA e quindi di cDNA utilizzato quale DNA stampo è ad essa proporzionale. Dunque, prima di valutare la differenza tra i cicli di amplificazione ( $C_T$ ) del gene di interesse nel campione e nel controllo, è stato necessario determinare per ciascuno i valori di  $C_T$  del gene housekeeping, che nel nostro caso è ipoxantinaguanina fosforibosiltransferasi (HPRT). Calcolati tali valori, si può procedere alla determinazione dell'espressione.

## **Controllo PCR**

Per evidenziare eventuali contaminazioni da DNA nei reagenti necessari per l'amplificazione genica, è stato eseguito un controllo negativo per ogni reazione, detto bianco, e contenente  $H_2O$  in cui erano presenti tutti i componenti tranne il cDNA.

## **Primers utilizzati**

I primers di ratto utilizzati per lo studio dei trascritti dei geni funzionali (INS-1, GLUT-2), anti-apoptotici (Bcl2 e Bcl XL) e pro-apoptotici (PUMA, DP5, BIM, BAK, BAX) sono stati acquistati.

## **Dosaggio dei nitriti**

La determinazione dei nitriti è stata eseguita con il metodo spettrofotometrico utilizzando il reattivo di Griess, metodo molto sensibile, capace di rilevare piccole quantità di nitriti. Lo ione  $NO_2^-$  può essere determinato per via fotometrica, poiché reagendo con il reattivo, forma un azocomposto che mostra estese coniugazioni e pertanto assorbe nel visibile, presentando un massimo di assorbimento a 520 nm. A 100  $\mu$ l di mezzo sono stati aggiunti 100  $\mu$ l del reattivo di Griess ottenuto mescolando uguali volumi di soluzione A costituita da 1,3 % di



sulfonilamide in acido acetico al 60 % e soluzione B (0,1 % naftiletilendiamina diidroclore in acqua) preparato non più di dodici ore prima dell' uso. A seguito di una serie di reazioni chimiche che avvengono tra i composti, si origina un colorante azoico rosso che presenta un picco massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 520 nm. La piastra è stata incubata per 10 min a temperatura ambiente su pianetto basculante e l'assorbanza misurata con un lettore di piastre a 540 nm. Le concentrazioni sono state calcolate usando uno standard di  $NaNO_2$  in RPMI.

## **Reagenti**

Histopaque 1119 e 1077 sono stati acquistati da SIGMA. Il terreno di coltura RPMI e il siero bovino fetale sono stati forniti da INVITROGEN. La collagenasi P e il kit *ELISApplus* sono stati acquistati da ROCHE. Naftiletilendiamina diidroclore e sulfonilamide sono stati acquistati da SIGMA. Il kit *RNeasy Mini Kit*® è stato acquistato da QIAGEN. *iScript Reverse Transcription kit*® , *Sso Advanced Universal Sybr*® *Green Supermix* sono stati acquistati da BIO-RAD. I primers: gene BIM è stato acquistato da QIAGEN; geni INS-1, GLUT-2, Bcl2 sono stati acquistati da IDT; geni Puma, Bcl XL, Bax, Bak, DP5 sono stati forniti da SIGMA. Il primer del gene housekeeping HPRT è stato acquistato da IDT.

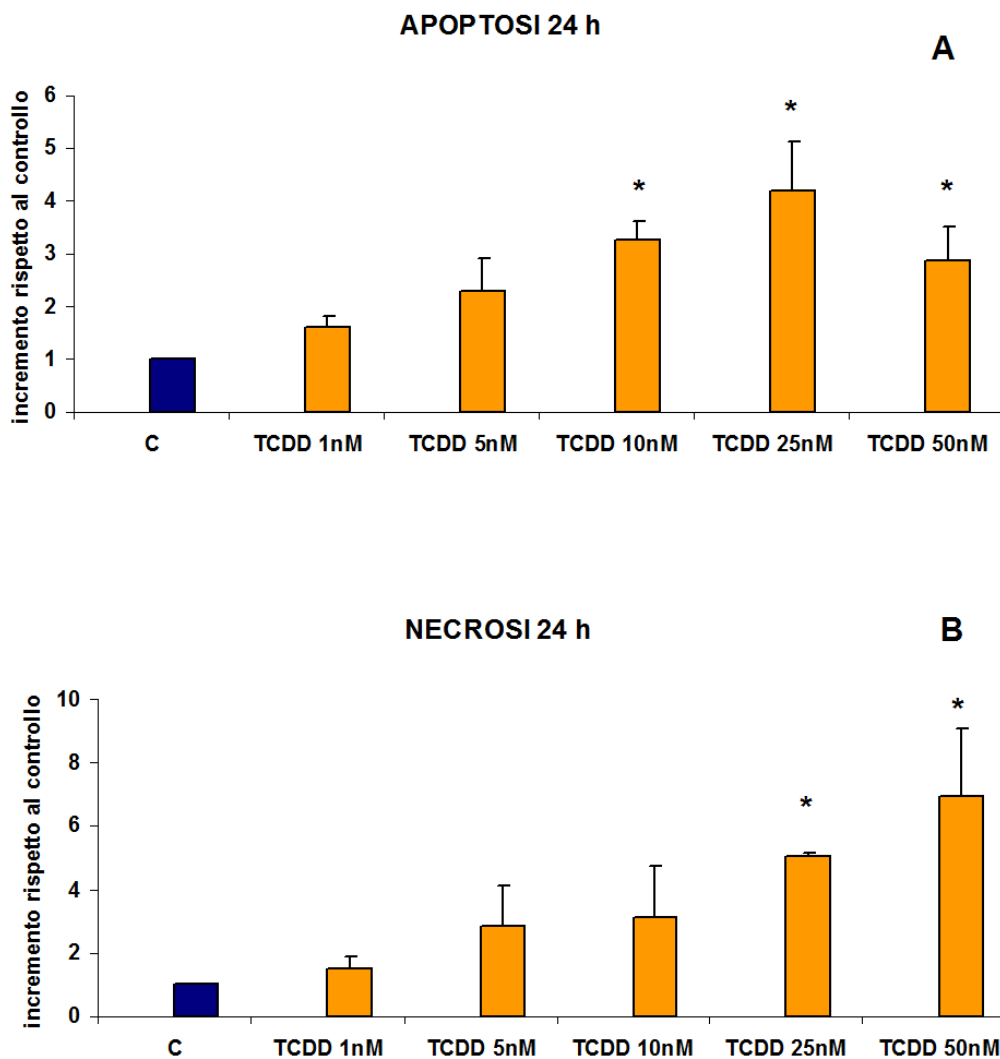
## **Analisi statistica**

I risultati sono espressi come media  $\pm$  ESM. La significatività statistica è stata valutata mediante analisi della varianza (ANOVA), seguita da test di Fisher come metodo di analisi post-hoc per stabilire le differenze tra coppie di dati utilizzando il programma GraphPad Instat. Un valore di  $p < 0,05$  è stato considerato significativo.

# RISULTATI

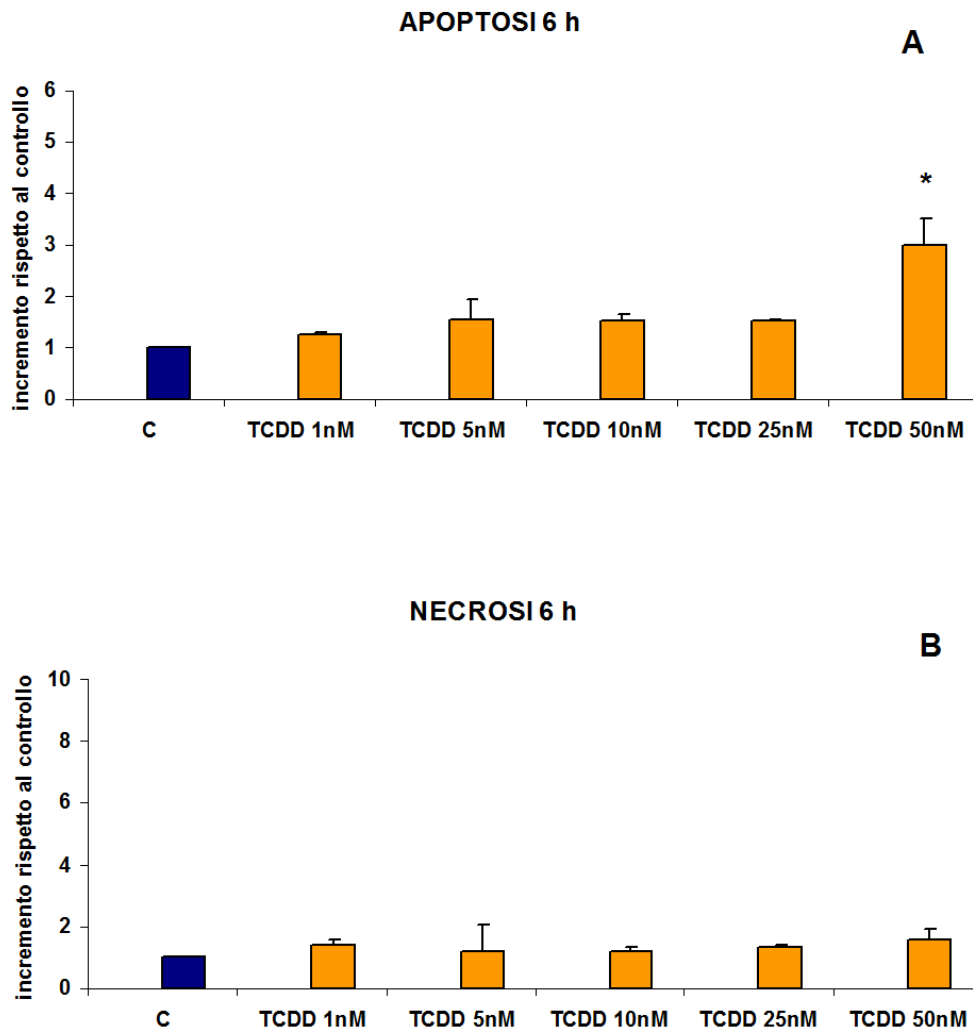
## **Effetti della diossina sulla vitalità cellulare in isole di Langerhans**

Per caratterizzare la tossicità della diossina sulle isole di Langerhans isolate di ratto, abbiamo per prima cosa valutato gli effetti di una incubazione di 24 h con concentrazioni crescenti di TCDD (da 0 a 50 nM) sulla mortalità cellulare. Per far questo abbiamo utilizzato un particolare ELISA, utilizzabile direttamente su aggregati cellulari ed in grado di fornire dati quantitativi sui livelli sia di apoptosi che di necrosi. Con tale metodo abbiamo constatato che i livelli di apoptosi (Fig. 1A) aumentano in maniera dose dipendente, divenendo significativamente più elevati dei controlli alle concentrazioni di TCDD 10 e 25 nM. Poi, per la dose di diossina più alta tra quelle utilizzate (50 nM), i livelli di apoptosi tendono a diminuire pur rimanendo significativamente più alti di quelli delle isole di controllo. La Fig. 1B mostra che la diossina causa anche un aumento dose-dipendente della necrosi, che diventa significativo rispetto ai controlli per le dosi più alte di TCDD utilizzate (25 e 50 nM). Dal momento che un'incubazione per 24 h con TCDD determinava effetti così importanti sulla mortalità delle cellule pancreatiche, abbiamo voluto verificare quali fossero le conseguenze di un'esposizione alle stesse dosi di diossina per un periodo più breve. Abbiamo quindi valutato l'apoptosi e la necrosi nelle isole isolate di ratto esposte per 6 h a varie concentrazioni di TCDD. La Fig. 2A mostra che i livelli di apoptosi aumentano significativamente solo per la dose di TCDD più alta (50 nM), mentre non si verifica alcun incremento nella necrosi (Fig. 2B).



**FIG.1** Effetto di 24 h di esposizione a diossina sull'apoptosi (pannello A) e sulla necrosi (pannello B) in isole isolate di ratto. Le isole isolate di ratto sono state tenute in coltura per 24 h dopo l'isolamento. Dopo gruppi di 10 isole sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti ed incubati per 24 h in presenza di varie dosi di TCDD (1, 5, 10, 25 e 50 nM). Al termine dell'incubazione, la necrosi è stata determinata nel mezzo di coltura e l'apoptosi nel lisato delle isole raccolte utilizzando il kit *Cell death detection ELISA-Plus*. I dati sono espressi come incremento rispetto al controllo posto uguale a 1.

\*  $p < 0,05$  almeno rispetto alle isole di controllo. (C) (test post-hoc di Fisher)



**FIG.2** Effetto di 6 h di esposizione a diossina sull'apoptosi (pannello A) e sulla necrosi (pannello B) in isole isolate di ratto. Le isole isolate di ratto sono state tenute in coltura per 24 h dopo l'isolamento. Dopo gruppi di 10 isole sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti ed incubati per 6 h in presenza di varie dosi di TCDD (1, 5, 10, 25 e 50 nM). Al termine dell'incubazione, la necrosi è stata determinata nel mezzo di coltura e l'apoptosi nel lisato delle isole raccolte utilizzando il kit *Cell death detection ELISA-Plus*. I dati sono espressi come incremento rispetto al controllo posto uguale a 1.

\*  $p < 0,05$  almeno rispetto alle isole di controllo. (test post-hoc di Fisher)

## **Alterazioni ultrastrutturali indotte dalla diossina in isole isolate**

Isole di ratto isolate incubate per 24 h in RPMI da solo o contenente due diverse concentrazioni di TCDD (10 e 50 nM) sono state processate e analizzate per la microscopia elettronica al fine di studiare le alterazioni cellulari a livello ultrastrutturale. Nelle isole di controllo (Fig. 3, 4 e 5 C) vi sono molte cellule  $\beta$  con abbondanti granuli maturi d'insulina caratterizzati dal tipico core denso circondato da un evidente alone bianco. Si notano anche alcuni granuli immaturi con core meno denso ed alone sottile. I nuclei sono rotondi e contengono cromatina non condensata. I mitocondri, l'apparato di Golgi ed il reticolo endoplasmatico rugoso hanno un aspetto normale. Non si vedono cellule morte.

Dopo un'incubazione delle isole per 24 h con TCDD 10 nM (Fig. 3 e 4, TCDD10) nel nucleo la cromatina appare maggiormente addensata, nel citoplasma sono ancora presenti numerosi granuli di insulina che non appaiono diversi da quelli dei controlli. Gli altri organuli citoplasmatici non presentano alterazioni di rilievo, con l'eccezione dei mitocondri, che sono più numerosi e di forma piuttosto irregolare, con cristae evidenti e talvolta dilatate.

Nelle Fig. 5 e 6 (TCDD50) sono illustrate le alterazioni ultrastrutturali delle isole dopo 24 h in presenza di TCDD 50 nM. Le cellule  $\beta$  presentano nuclei con cromatina addensata in zolle alla periferia e nucleoli evidenti. I mitocondri in genere appaiono notevolmente rigonfiati con matrice dispersa e creste frammentate. I granuli non sono sempre presenti. Sono evidenti numerose cellule in apoptosi tardiva e in necrosi. Le cellule in apoptosi tardiva si riconoscono perché appaiono collassate, il nucleo presenta cromatina fortemente addensata e talvolta è frammentato; in prossimità della membrana cellulare si osservano voluminosi vacuoli scarsamente elettron-densi che costituiscono i caratteristici "*blebs*".

Il trattamento con TCDD determina gli effetti descritti nelle cellule  $\beta$ , mentre gli altri tipi cellulari che compongono le isole di Langerhans si mostrano molto più resistenti alla sostanza tossica, non presentando alterazioni di rilievo neppure alla dose più alta utilizzata (dati non mostrati).

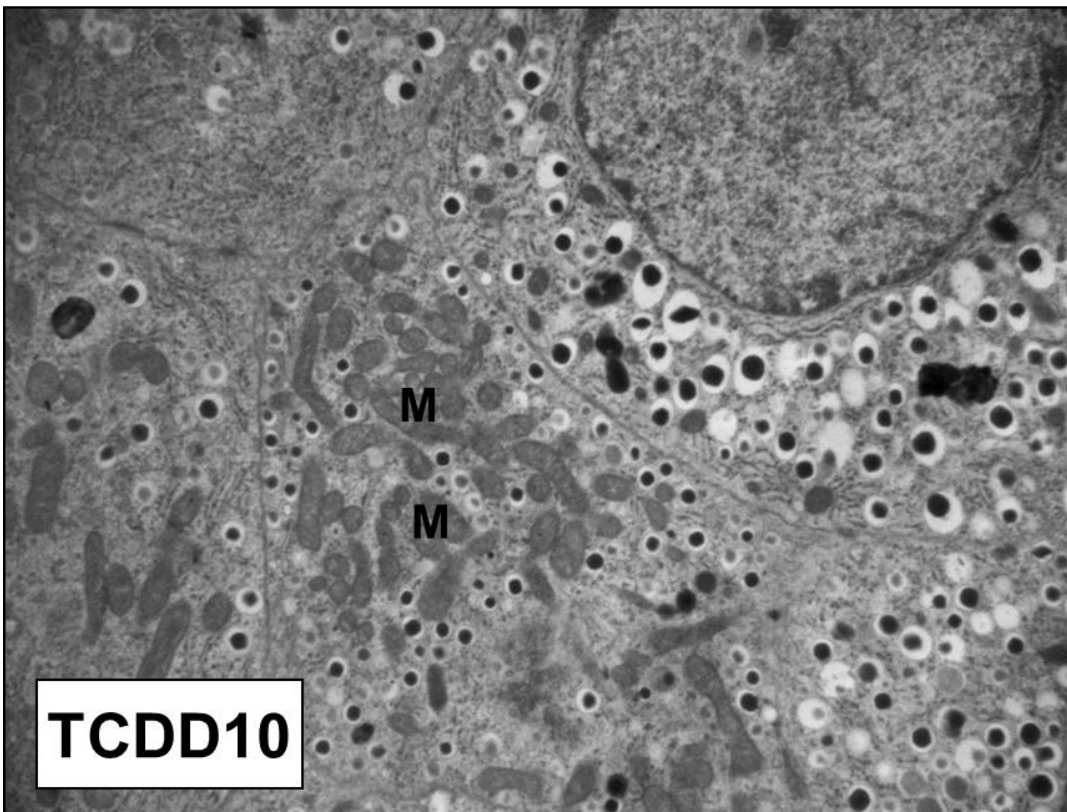
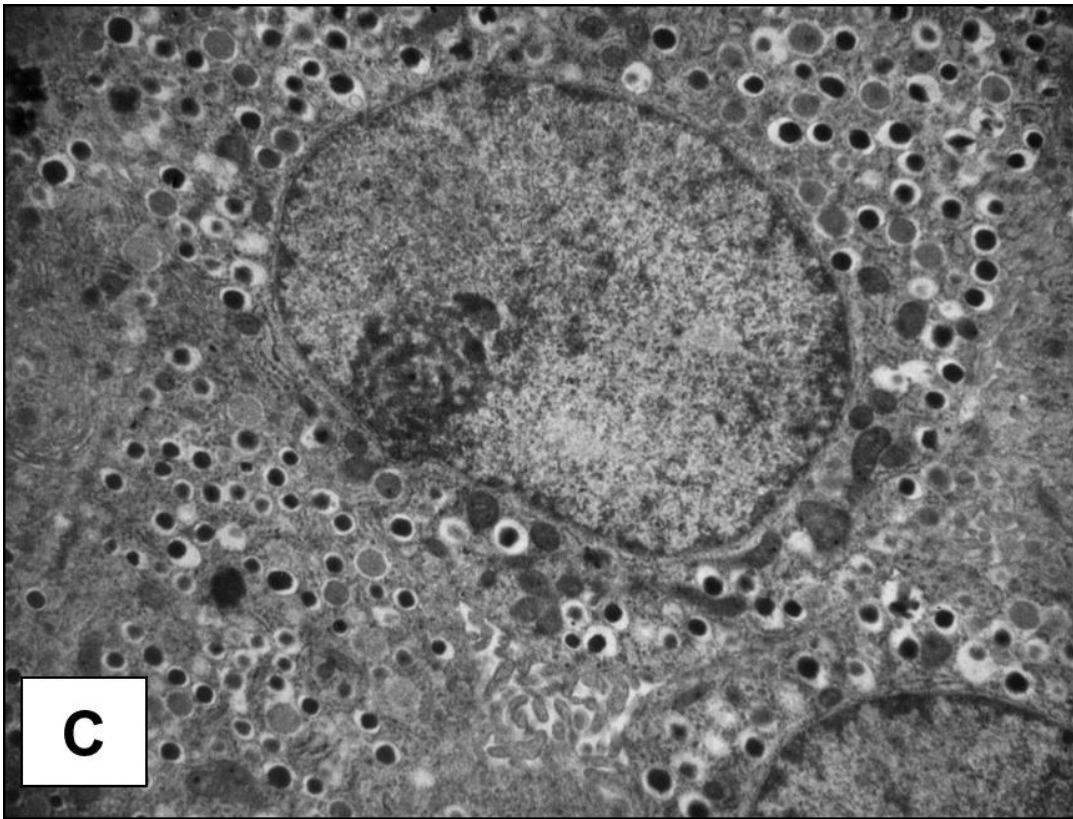
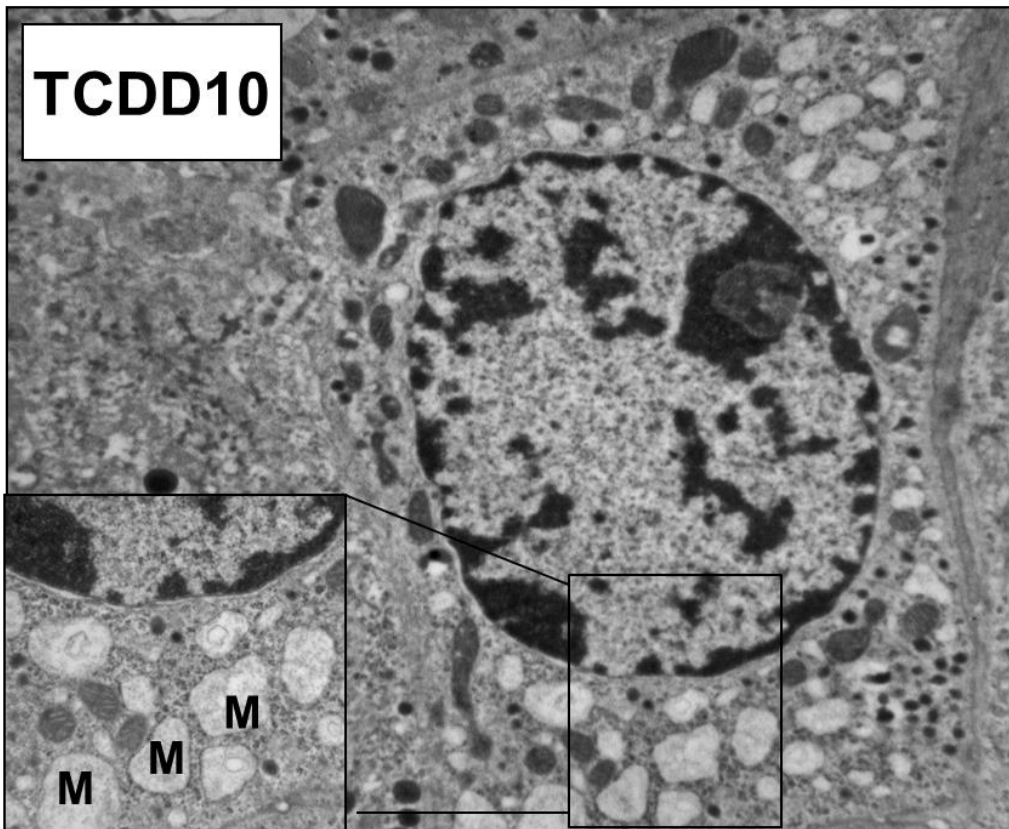
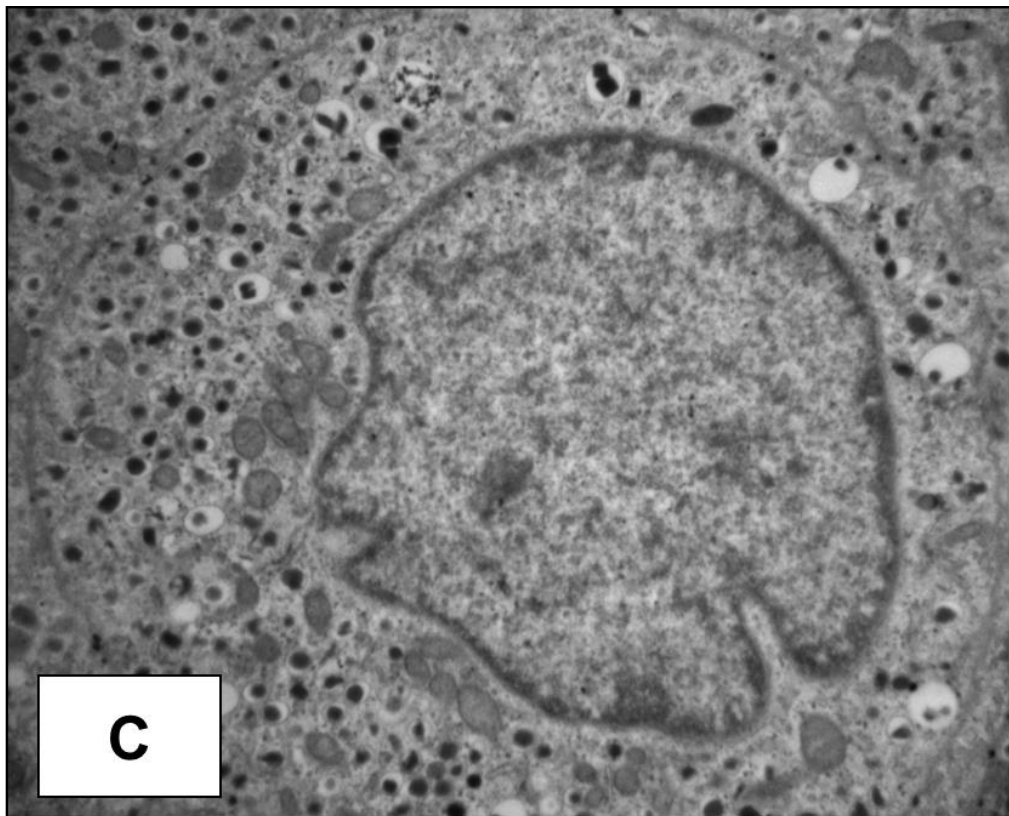


FIG. 3



**FIG. 4**

**FIG.3-4 Effetto della diossina (10 nM) sull'ultrastruttura di isole isolate di ratto.**

Immagini rappresentative ottenute con il microscopio elettronico di cellule  $\beta$  in isole di ratto isolate incubate per 24 h in RPMI da solo (C) o contenente TCDD (10 nM). Al termine del periodo di incubazione le isole sono state fissate con gluteraldeide 2.5% e processate per l'analisi al microscopio elettronico come descritto in dettaglio in materiali e metodi.

M indica i mitocondri. Ingrandimento X 10000.



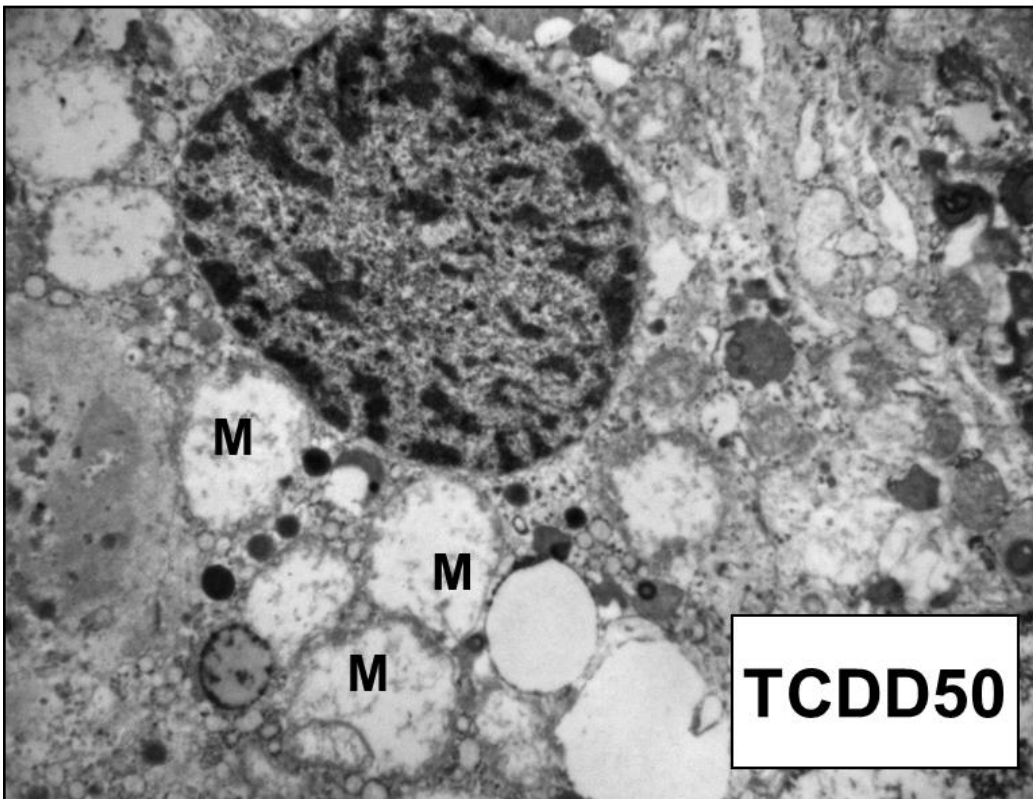
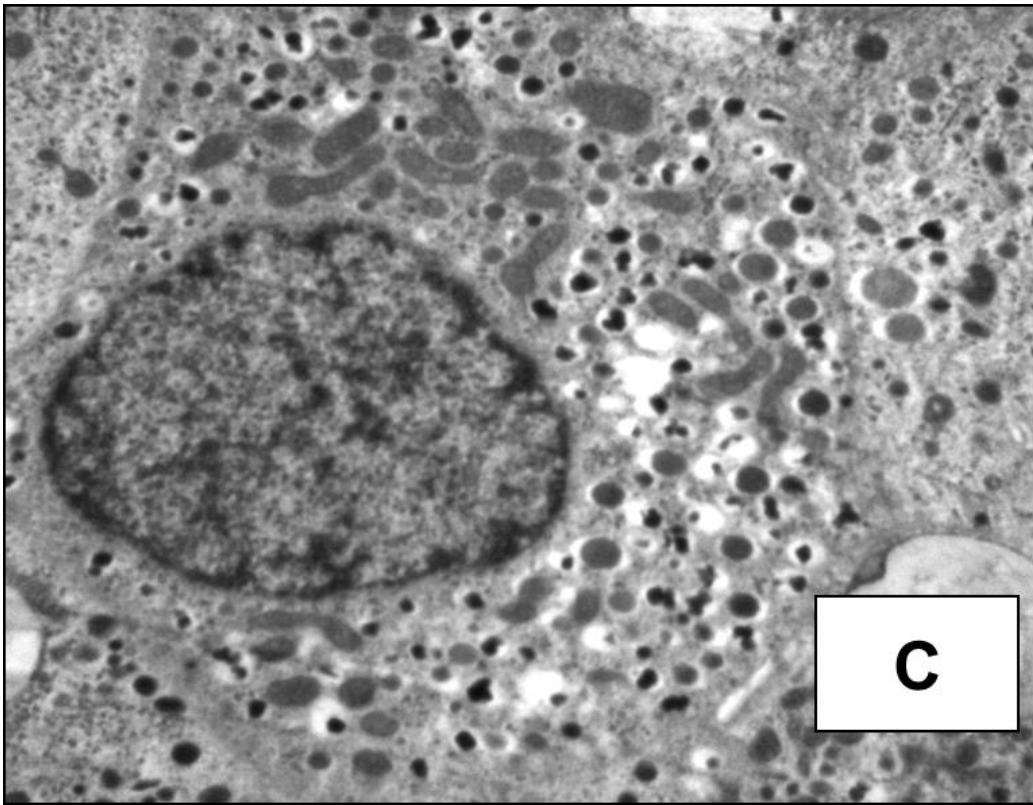
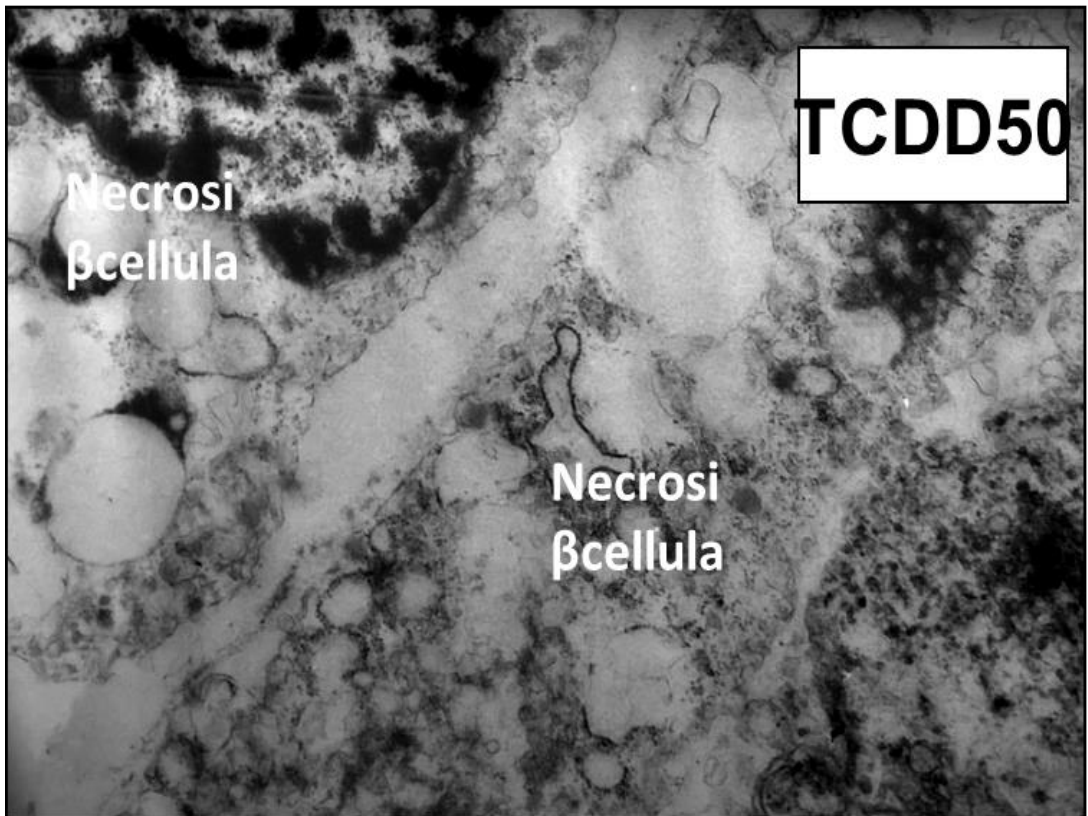
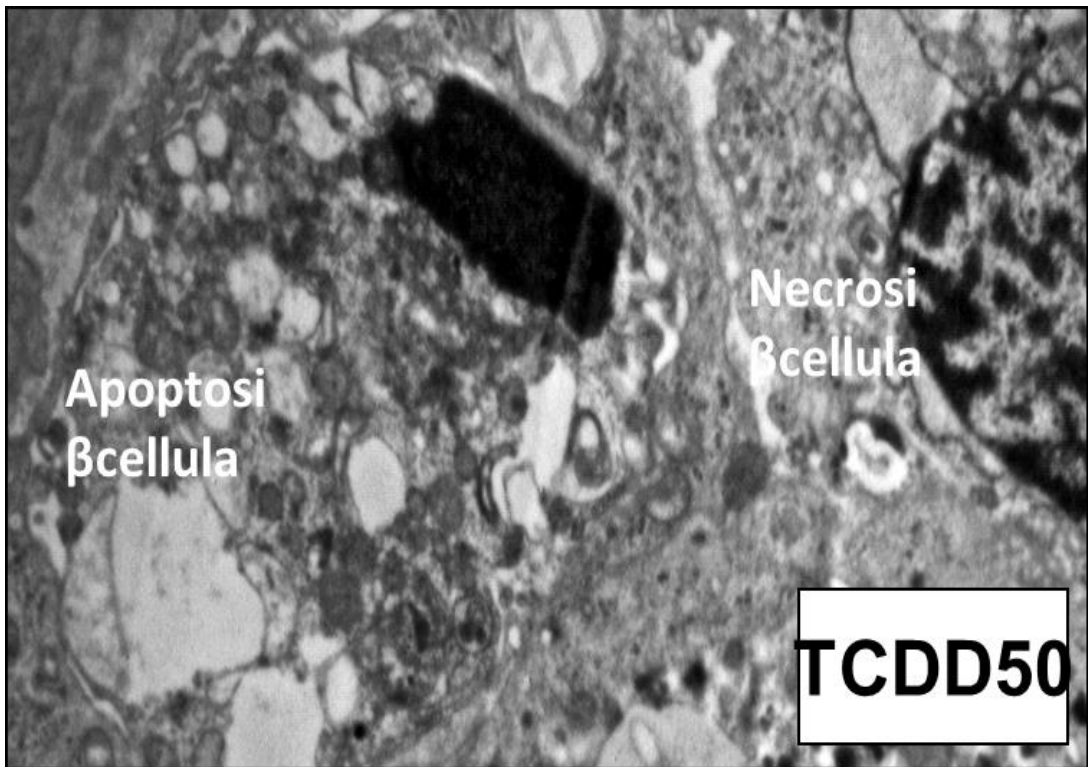


FIG. 5



**FIG. 6**

**FIG.5-6 Effetto della diossina (50 nM) sull'ultrastruttura di isole isolate di ratto.**

Immagini rappresentative ottenute con il microscopio elettronico di cellule  $\beta$  in isole di ratto isolate incubate per 24 h in RPMI da solo (C) o contenente TCDD (50 nM). Al termine del periodo di incubazione le isole sono state fissate con gluteraldeide 2.5% e processate per l'analisi al microscopio elettronico come descritto in dettaglio in materiali e metodi.

M indica i mitocondri. Ingrandimento X 10000.

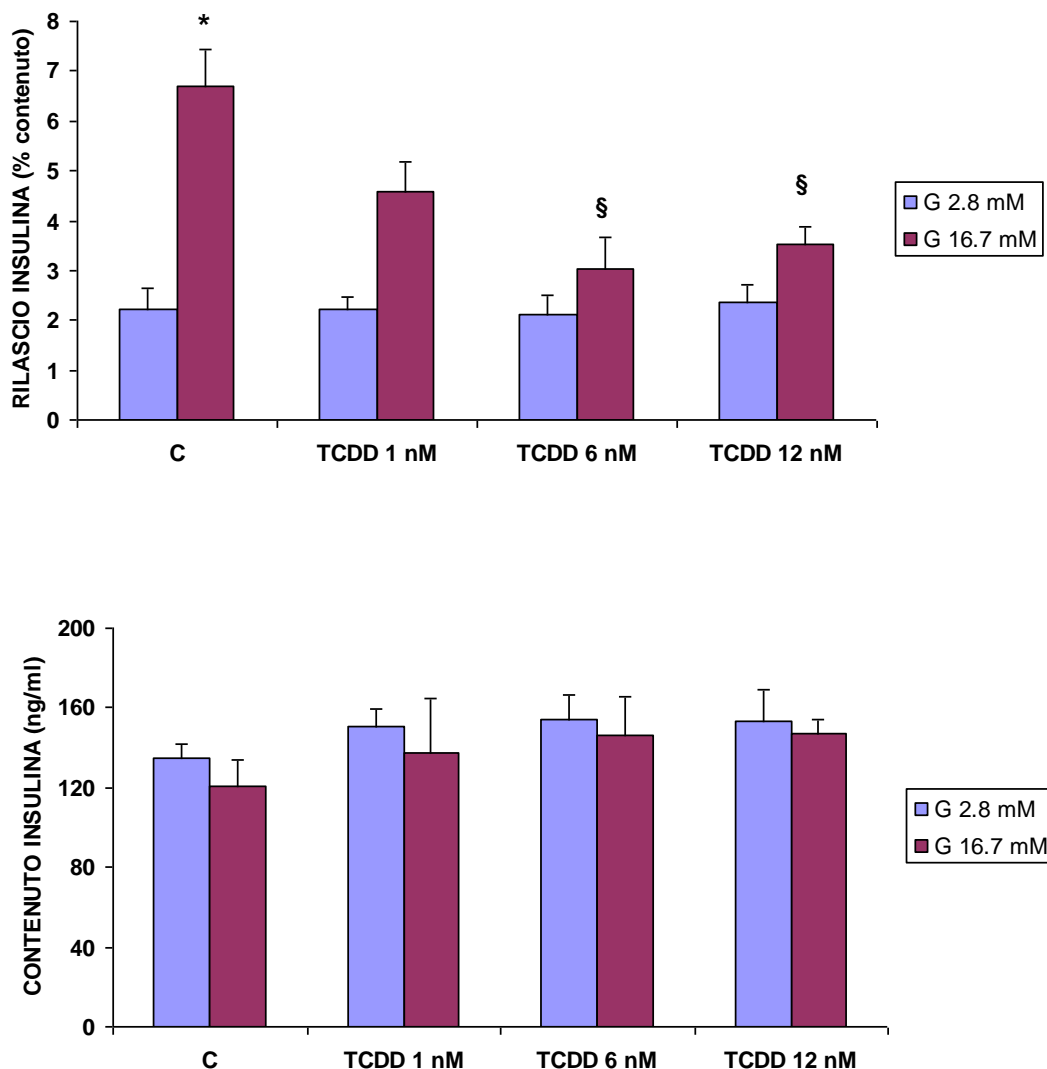
## **Effetti della diossina sulla funzione secretoria in isole di Langerhans**

Le isole di Langerhans isolate da noi utilizzate offrono la possibilità di ottenere in parallelo, oltre alle analisi molecolari, anche una valutazione funzionale, mediante il dosaggio dell'insulina secreta dalle cellule  $\beta$  nel mezzo di incubazione in seguito a stimolazione con glucosio. Per valutare se la diossina sia in grado di indurre alterazioni funzionali delle cellule  $\beta$ , abbiamo misurato la loro secrezione di insulina stimolata dal glucosio dopo che esse erano state esposte a tre diverse concentrazioni di TCDD (1, 6 e 12 nM) che, in base ai risultati illustrati in Figura 2, non risultano citotossiche a breve termine.

I risultati mostrati in Fig. 7A innanzitutto confermano la sensibilità delle cellule  $\beta$  delle isole isolate al glucosio. Infatti, nelle isole di controllo, quando si passa da una concentrazione di glucosio 2,8 mM ad una di 16,7 mM, si ha un aumento del rilascio di insulina di 3 volte. L'esposizione per 1 h delle isole alle tre diverse dosi di diossina non influenza il rilascio dell'ormone in condizioni basali, ma determina una netta diminuzione del rilascio di insulina stimolato da glucosio 16,7 mM, che risulta significativamente più basso rispetto a quello dei controlli. Infatti, se calcoliamo l'incremento del rilascio di ormone quando si passa da concentrazioni di glucosio basali (2,8 mM) a quelle stimolanti (16,7 mM), troviamo valori significativamente più bassi che nei controlli (2, 1,4 e 1,5 volte per TCDD 1, 6 e 12 nM rispettivamente). La Fig. 7B mostra che il contenuto di insulina delle isole isolate di ratto non varia in seguito all'esposizione per 1 h alle tre diverse dosi di diossina.

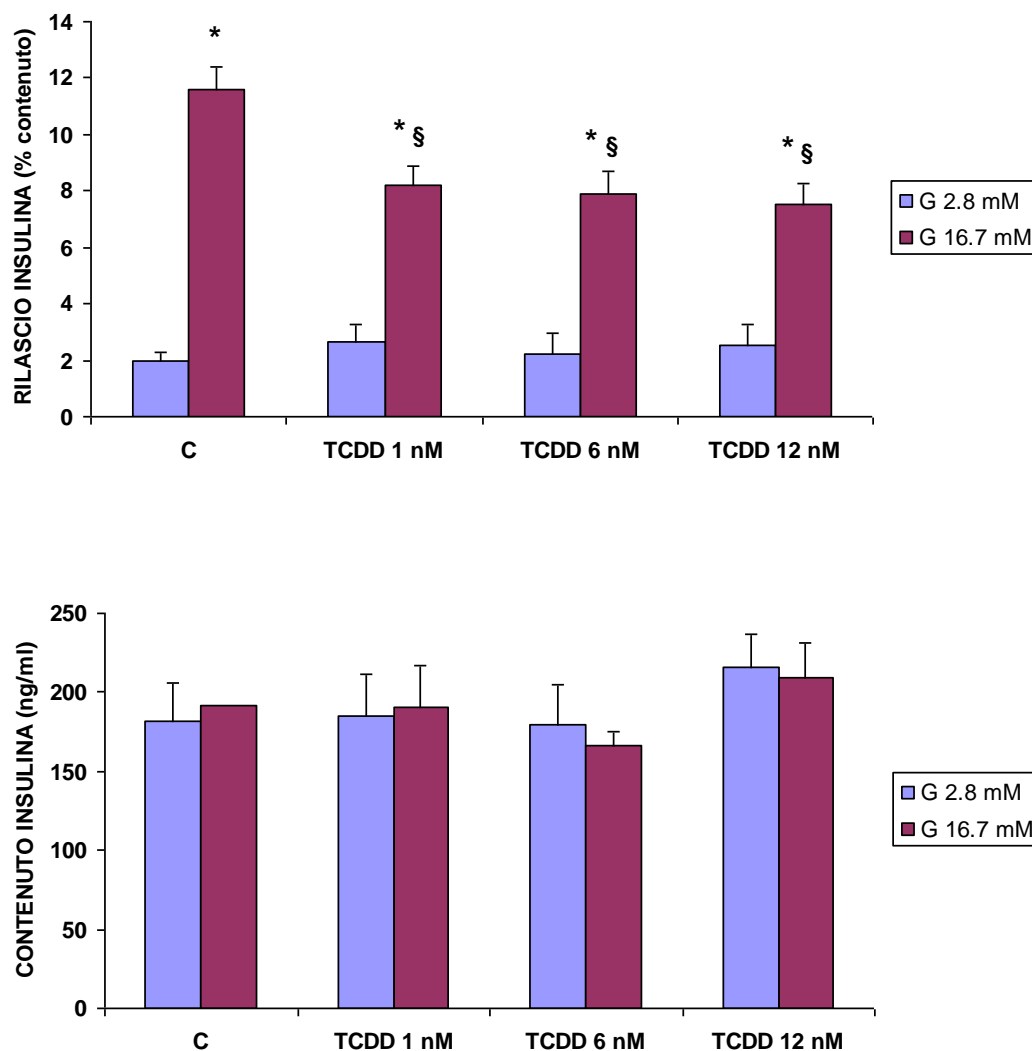
Abbiamo quindi voluto indagare che cosa accadeva quando l'esposizione alla diossina veniva protratta per 6 h prima della stimolazione con glucosio. L'incubazione con TCDD per 6 h, che non causa effetti citotossici alle dosi utilizzate, come stabilito in precedenza, non influenza la secrezione basale di insulina, ma determina una secrezione di ormone significativamente ridotta in presenza di concentrazioni stimolanti di glucosio (Fig. 8A). Tale riduzione della secrezione è simile per le tre dosi di TCDD utilizzate e meno rilevante rispetto a quella trovata dopo un'esposizione di 1 h a diossina. Anche l'esposizione alla

diossina per 6 h non provoca variazioni significative nel contenuto di ormone delle isole isolate (Fig. 8B).



**FIG.7** Effetto dell'esposizione per 1 h a diossina sulla secrezione di insulina stimolata da glucosio in isole di Langherans isolate. Le isole sono state incubate per 1 h in mezzo RPMI contenente varie dosi di TCDD (1, 6 o 12 nM). Poi, dopo la rimozione del mezzo, le isole sono state lavate e incubate per 1 h in tampone KRB/Hepes con glucosio 2,8 o 16,7 mM e la secrezione di insulina è misurata ed espressa come percentuale del contenuto di insulina delle isole. I dati sono riportati come media  $\pm$  ESM di 4-5 osservazioni provenienti da 2 esperimenti separati. \*  $p < 0,05$  almeno rispetto alle isole del rispettivo trattamento a

glucosio 2,8 mM; § p < 0,05 almeno rispetto alle isole esposte a glucosio 16,7 mM di controllo.

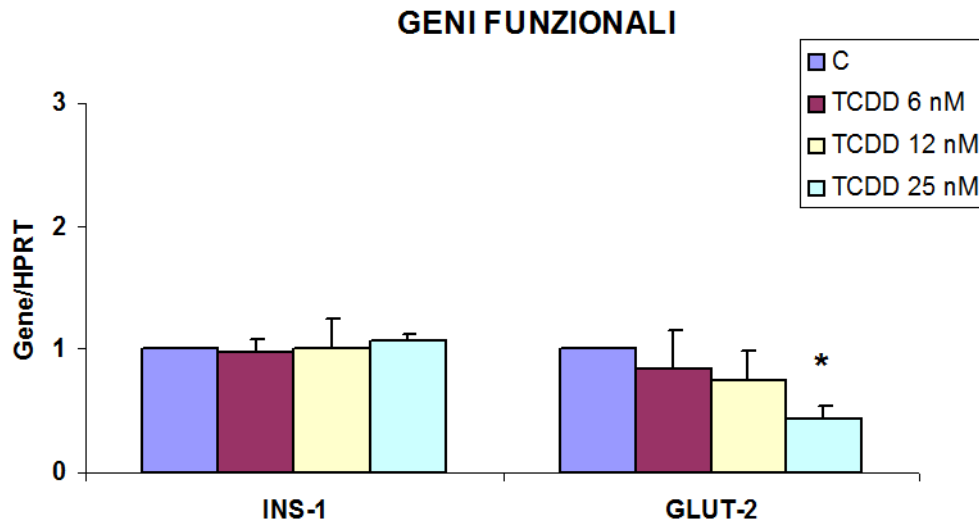


**FIG.8** Effetto dell'esposizione per 6 h a diossina sulla secrezione di insulina stimolata da glucosio in isole di Langherans isolate. Le isole sono state incubate per 6 h in mezzo RPMI contenente varie dosi di TCDD ( 1, 6 o 12 nM). Poi, dopo la rimozione del mezzo, le isole sono state lavate e incubate per 1 h in tampone KRB/Hepes con glucosio 2,8 o 16,7 mM e la secrezione di insulina è misurata ed espressa come percentuale del contenuto di insulina delle isole. I dati sono riportati come media  $\pm$  ESM di 4-5 osservazioni provenienti da 2 esperimenti separati. \* p < 0,05 almeno rispetto alle isole del rispettivo trattamento a 2,8 mM; § p < 0,05 almeno rispetto alle isole esposte a glucosio 16,7 mM di controllo.

## Effetti della diossina sull'espressione genica in isole isolate

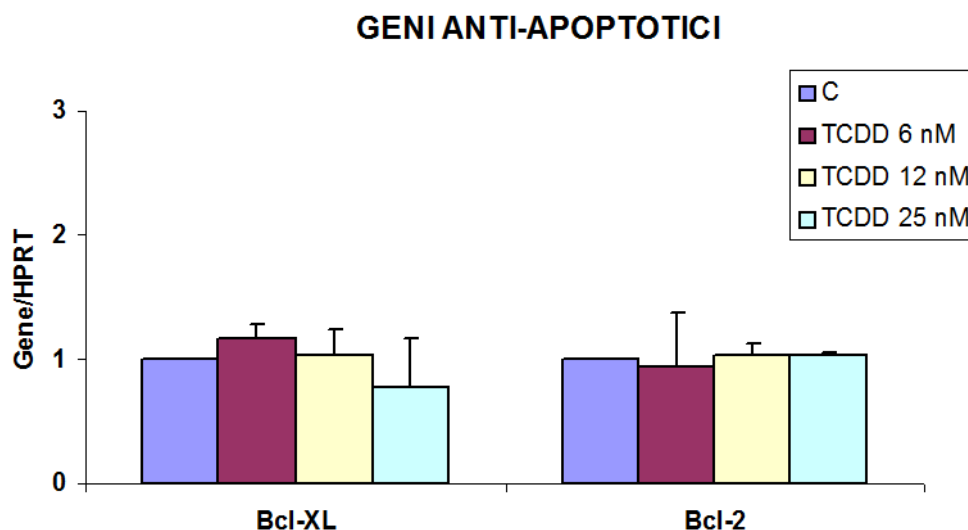
Abbiamo quindi voluto valutare quali fossero gli effetti della diossina sull'espressione di alcuni geni funzionali, nonché di una serie di geni coinvolti nella regolazione dell'apoptosi, in isole pancreatiche isolate.

In primo luogo abbiamo studiato l'espressione genica di due importanti geni funzionali: l'insulina e il trasportatore di glucosio maggiormente presente sulla membrana plasmatica delle cellule  $\beta$ , il GLUT-2. La Fig. 9 mostra come l'esposizione per 6 h alle 3 diverse dosi di TCDD (6, 12 e 25 nM) non determina variazioni nell'espressione del gene funzionale INS-1, mentre riduce l'espressione di GLUT-2 in maniera dose-dipendente, fino al raggiungimento della significatività per la dose di TCDD più alta utilizzata.



**FIG.9 Effetti della diossina sull'espressione di geni funzionali in isole di Langherans isolate.** Le isole sono state incubate per 24 h dopo l'isolamento in RPMI. Dopo gruppi di 300 isole sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti ed incubati per 6 h in presenza di varie dosi di TCDD (6, 12 e 25 nM). L'RNA totale delle cellule è stato estratto, analizzato mediante Real Time-PCR (RT-qPCR) e normalizzato per il gene housekeeping HPRT. I dati sono riportati come media  $\pm$  ESM di 3-4 osservazioni. \*  $p < 0,05$  almeno rispetto al controllo.

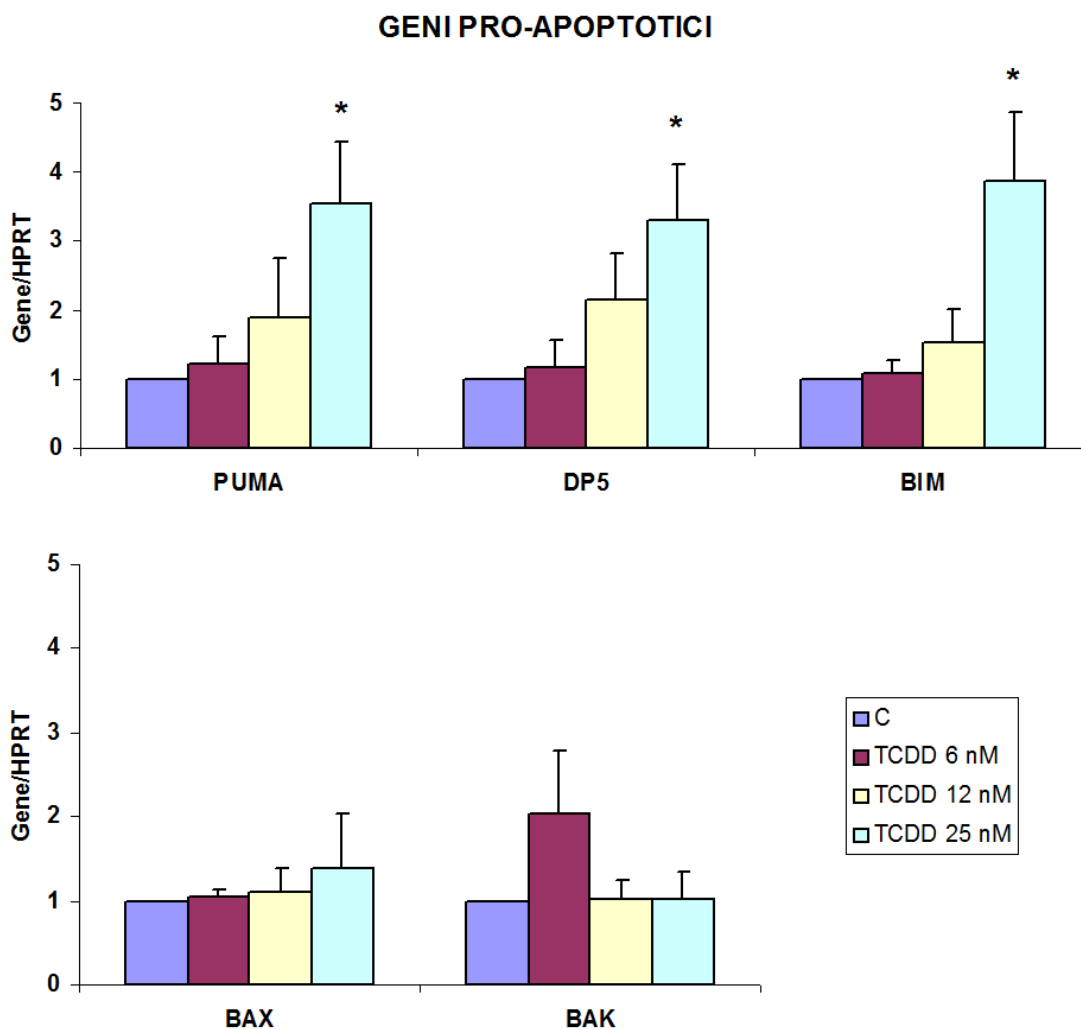
In secondo luogo abbiamo studiato l'espressione genica di proteine anti-apoptotiche: la Fig. 10 mostra che Bcl-XL e Bcl-2 non modificano significativamente la loro espressione per effetto di varie dosi di diossina.



**FIG.10 Effetti della diossina sull'espressione di geni anti-apoptotici in isole di Langherans isolate.** Le isole sono state incubate per 24 h dopo l'isolamento in RPMI. Dopo gruppi di 300 isole sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti ed incubati per 6 h in presenza di varie dosi di TCDD (6, 12 e 25 nM). L'RNA totale delle cellule è stato estratto, analizzato mediante Real Time-PCR (RT-qPCR) e normalizzato per il gene housekeeping HPRT. I dati sono riportati come media  $\pm$  ESM di 3-4 osservazioni.

Infine, abbiamo preso in esame le proteine pro-apoptotiche, ed abbiamo studiato proteine che intervengono nelle fasi precoci del processo (PUMA, DP5, BIM) ed altre che intervengono nelle fasi tardive (BAX e BAK). I geni PUMA, DP5 e BIM mostrano un andamento simile, la loro espressione aumenta all'aumentare della dose di TCDD e l'incremento raggiunge la significatività statistica per la dose più alta. L'espressione di BAX e BAK, invece, non viene influenzata significativamente dal trattamento con le varie dosi di diossina.

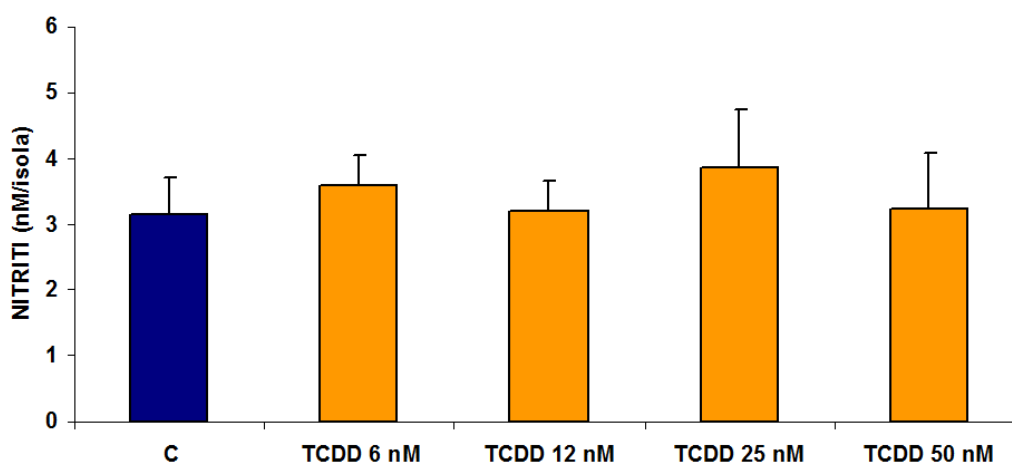




**FIG.11 Effetti della diossina sull'espressione di geni pro-apoptotici in isole di Langherans isolate.** Le isole sono state incubate per 24 h dopo l'isolamento in RPMI. Dopo gruppi di 300 isole sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti ed incubati per 6 h in presenza di varie dosi di TCDD (6, 12 e 25 nM). L'RNA totale delle cellule è stato estratto, analizzato mediante Real Time-PCR (RT-qPCR) e normalizzato per il gene housekeeping HPRT. I dati sono riportati come media  $\pm$  ESM di 3-4 osservazioni. \*  $p < 0,05$  almeno rispetto al controllo (C).

## Effetti della diossina sulla produzione di nitriti in isole isolate

Il monossido d'azoto prodotto durante la reazione catalizzata dalla NO sintetasi inducibile (iNOS) è estremamente reattivo e tende a formare immediatamente nitriti, il cui dosaggio viene pertanto utilizzato come misura indiretta della produzione di NO. Così abbiamo determinato i livelli di nitriti presenti nel mezzo d'incubazione dopo 6 h di esposizione di isole isolate a varie dosi di TCDD, constatando che la loro concentrazione non si modifica rispetto a quella delle isole di controllo.

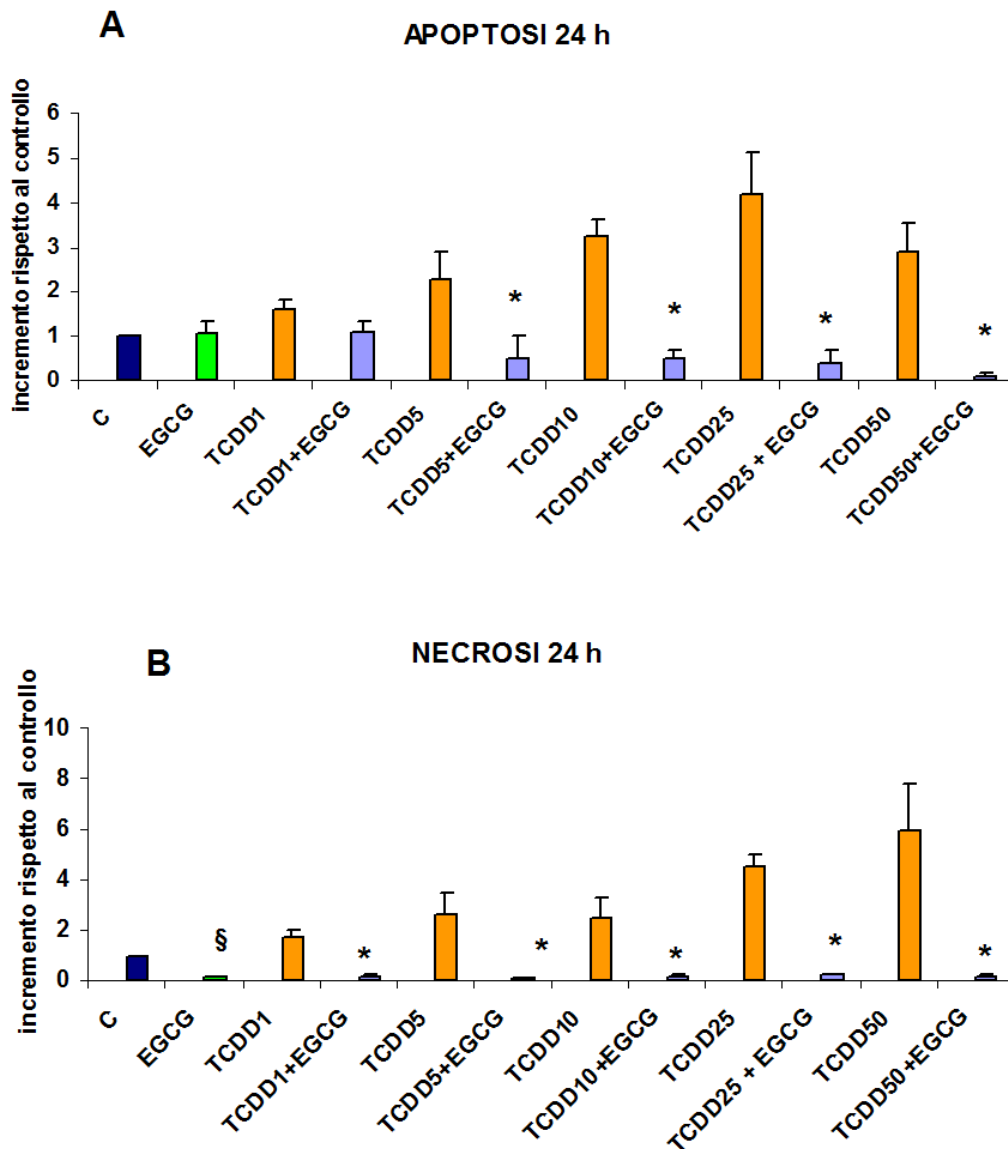


**FIG.12** Effetto dell'esposizione per 6 h a diossina sulla produzione di nitriti in isole di **Langherans isolate**. Le isole sono state incubate per 6 h in mezzo RPMI contenente varie dosi di TCDD (6 , 12, 25 e 50 nM). Al termine il mezzo è stato rimosso ed utilizzato per il dosaggio dei nitriti. I dati sono espressi come media  $\pm$  ESM di 4-5 esperimenti separati.

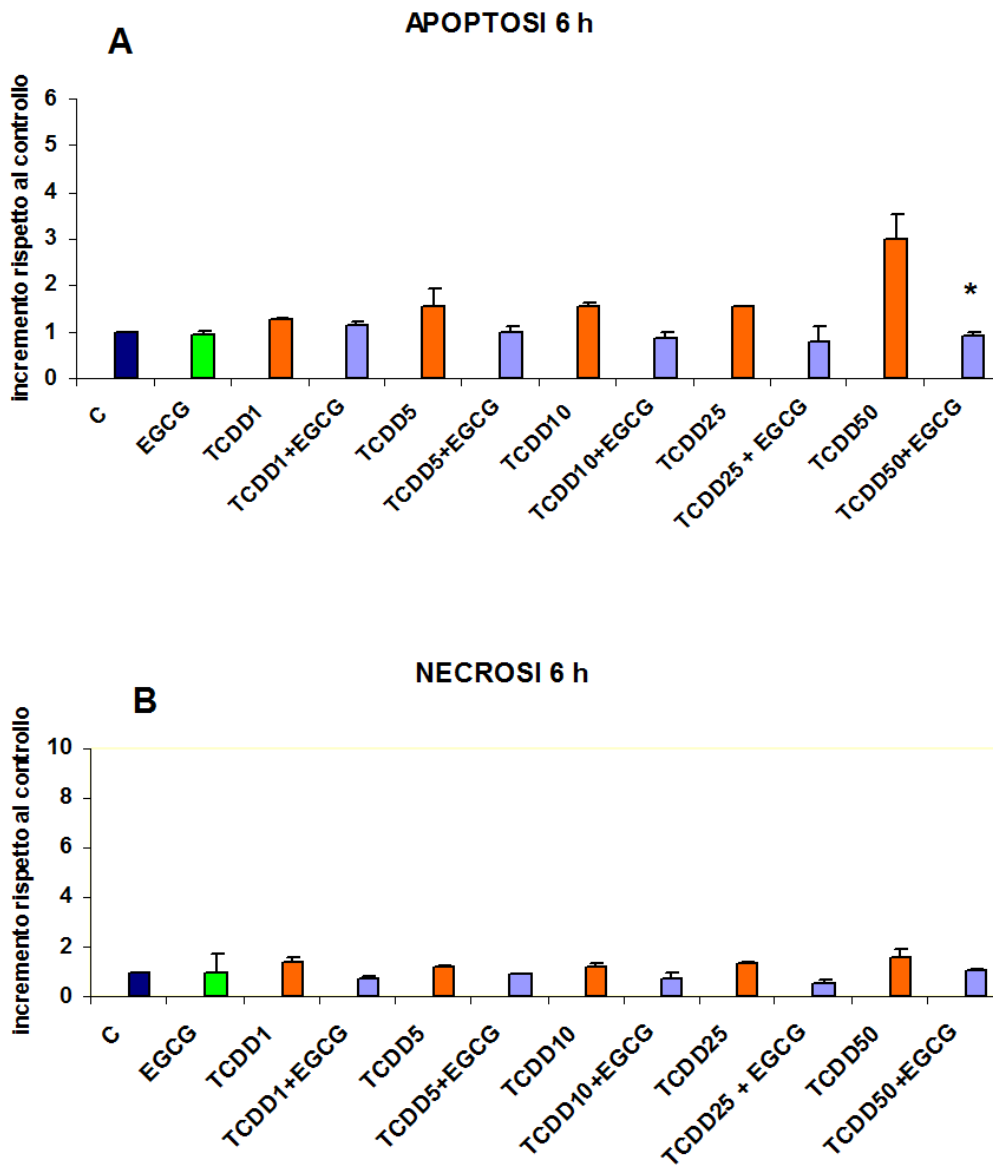
## **Effetto protettivo dell'epigallocatechina-3-gallato sulla mortalità indotta da diossina**

Abbiamo quindi voluto studiare se l'epigallocatechina-3-gallato fosse in grado di influenzare la morte cellulare indotta dal trattamento con diossina. La Fig. 13A mostra che quando EGCG è presente nel mezzo di coltura durante le 24 h di incubazione, previene significativamente l'incremento dell'apoptosi che si verifica all'aumentare della dose di diossina utilizzata ed i valori si riportano ai livelli delle isole di controllo. L'EGCG da sola non modifica l'apoptosi rispetto ai controlli. In Fig. 13B, in cui sono riportati i risultati relativi alla necrosi, si può constatare che quando EGCG è presente nel mezzo di coltura, i livelli di necrosi rimangono sempre molto bassi, inferiori a quelli del controllo, per tutte le dosi di TCDD utilizzate. Anche quando le isole sono incubate in presenza di EGCG da sola, senza diossina, la necrosi è inferiore a quella dei controlli.

L'EGCG si mostra anche in grado di prevenire l'incremento significativo dei livelli di apoptosi che si evidenzia al termine di un'incubazione per 6 h con la dose più alta di diossina (Fig. 14A).



**FIG.13** Effetto protettivo di EGCG sull'apoptosi (pannello A) e sulla necrosi (pannello B) indotte da un'incubazione di 24h con diossina in isole isolate di ratto. Le isole isolate di ratto sono state tenute in coltura per 24 h dopo l'isolamento. Dopo gruppi di 10 isole sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti ed incubati per 24 h con di varie dosi di TCDD (1, 5, 10, 25 e 50 nM) in presenza o meno di EGCG 200  $\mu$ M. Al termine dell'incubazione, la necrosi è stata determinata nel mezzo di coltura e l'apoptosi nel lisato delle isole raccolte utilizzando il kit *Cell death detection ELISA-Plus*. I dati sono espressi come incremento rispetto al controllo posto uguale a 1. §  $p < 0,05$  rispetto alle isole di controllo (C). \*  $p < 0,05$  almeno rispetto al trattamento corrispondente con TCDD.



**Fig.14** Effetto protettivo di EGCG sull'apoptosi (pannello A) e sulla necrosi (pannello B) indotte da un'incubazione di 6h con diossina in isole isolate di ratto. Le isole isolate di ratto sono state tenute in coltura per 24 h dopo l'isolamento. Dopo gruppi di 10 isole sono stati trasferiti in piastre da 24 pozzetti ed incubati per 6 h con varie dosi di TCDD (1, 5, 10, 25 e 50 nM) in presenza o meno di EGCG 200  $\mu$ M. Al termine dell'incubazione, la necrosi è stata determinata nel mezzo di coltura e l'apoptosi nel lisato delle isole raccolte utilizzando il kit *Cell death detection ELISA-Plus*. I dati sono espressi come incremento rispetto al controllo posto uguale a 1. \*  $p < 0,05$  almeno rispetto al trattamento corrispondente con TCDD.

# DISCUSSIONE

Il diabete, nelle sue diverse forme, colpisce quasi 400 milioni di persone nel mondo (più di 3 milioni in Italia), e la sua incidenza risulta in costante aumento: si prevede, infatti, che entro il 2035 il numero di malati si accrescerà di ulteriori 200 milioni [16]. La malattia è associata ad elevata morbilità, dovuta soprattutto a complicanze vascolari croniche, che possono sfociare in insufficienza funzionale di vari organi; ciò, a sua volta, contribuisce ad significativo aumento di mortalità che accompagna il diabete (nel 2014 ci sono stati 4,9 milioni di decessi, nel mondo, correlati alla malattia). La spesa sanitaria correlata al diabete nei paesi occidentali è impressionante, dato che viene stimata aggirarsi intorno al 10% del totale [16].

La forma di gran lunga più frequente di diabete, che colpisce circa il 90% degli individui malati, è il cosiddetto diabete mellito di tipo 2. Secondo un'interpretazione patogenetica del diabete di tipo 2 ormai classica [8], una condizione prolungata di insulino-resistenza potrebbe portare ad un esaurimento delle riserve funzionali del pancreas endocrino, che si manifesterebbe come un'incapacità delle cellule  $\beta$  di mantenere un'elevata capacità secretoria. Infatti, negli stati di insulino resistenza, le isole pancreatiche rispondono aumentando la secrezione di insulina per mantenere la normoglicemia, un processo chiamato compensazione delle cellule  $\beta$ . I meccanismi coinvolti non sono pienamente compresi, ma sembra da studi su roditori, che siano coinvolte sia l'espansione della massa  $\beta$  cellulare sia un aumento della funzione delle cellule  $\beta$  (aumenta il metabolismo del glucosio, la sensibilità alle incretine, l'attività del sistema nervoso parasimpatico). In letteratura vi è un ampio dibattito riguardo a quale sia la sorgente delle cellule dell'isola nell'individuo adulto. Tra le possibilità si includono: la proliferazione delle cellule  $\beta$  esistenti (comprese le cellule in stretta vicinanza dei dotti) e/o la neogenesi da cellule duttali pancreatiche. Il diabete di tipo 2 insorgerebbe negli individui in cui la compensazione fallisce poiché hanno cellule  $\beta$  "fragili" invece che "robuste" nelle loro isole pancreatiche. Queste cellule  $\beta$  fragili su base genetica

avrebbero una ridotta capacità di adattare la loro funzione ad espandere la loro massa di fronte ad eventi tossici e lesivi, tra cui potrebbero esserci anche gli inquinanti ambientali [186].

Il progressivo e impressionante aumento dell'incidenza della malattia, unitamente ad alcune particolarità della sua distribuzione geografica, hanno tuttavia spinto alcuni Autori ad avanzare l'ipotesi che alcuni fattori ambientali tossici per le cellule  $\beta$ , ancora non noti, potrebbero essere coinvolti nella patogenesi del diabete di tipo 2 [187]. Alla luce di questa nuova ipotesi, gli studi epidemiologici che hanno dimostrato una correlazione positiva fra esposizione alla diossina e insorgenza del diabete di tipo 2 [188-190] ci sono sembrati particolarmente interessanti. A questo proposito è utile ricordare che le caratteristiche relative all'alta diffusione e all'elevata persistenza della diossina nell'ambiente la fanno ritenere al momento attuale forse l'unico contaminante ambientale capace di causare effetti diffusi sulla popolazione generale [187]. Nonostante l'interesse teorico suscitato dal possibile rapporto fra esposizione alla diossina e sviluppo di diabete, le informazioni sperimentali relative alle basi biologiche di tale rapporto sono ancora relativamente scarse [191].

Nel laboratorio in cui ho svolto il lavoro sperimentale per questa tesi è da diversi anni in corso una ricerca sugli effetti lesivi della *2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina* (TCDD) nei confronti delle cellule  $\beta$  pancreatiche, che ha confermato che tale composto può determinare danni funzionali e morte in linee cellulari stabili derivanti da cellule  $\beta$  (cellule INS-1) [179,180]. Sulla base di tali risultati, è stato ritenuto essenziale valutare la tossicità della *2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina* (TCDD) nei confronti delle cellule  $\beta$  pancreatiche nel modello sperimentale costituito dalle isole di Langerhans isolate dal pancreas di ratto, cioè in un sistema più vicino all'ambito fisiologico. Ciò ha costituito l'argomento della mia tesi.

Negli esperimenti oggetto di questa tesi, le isole isolate sono state incubate con concentrazioni più elevate di TCDD rispetto a quelle usate in precedenza per le cellule INS-1 (es. 0,05, 0,5, 1 nM) [179-180]. Le isole pancreatiche sono infatti costituite da un

agglomerato di cellule all'interno del quale le sostanze penetrano con maggiore difficoltà. Abbiamo anche utilizzato tempi di incubazione più lunghi con TCDD, perché ci aspettavamo che le isole isolate fossero più resistenti all'effetto della diossina rispetto alla linea cellulare. I risultati che abbiamo ottenuto mostrano l'elevata tossicità della TCDD nei confronti delle cellule  $\beta$  anche quando sono le isole pancreatiche isolate ad essere esposte al composto clorurato. Infatti, dopo 24 ore di incubazione delle isole in presenza di diossina, si ha un aumento della morte cellulare non solo per apoptosi, ma anche per necrosi. La tecnica ELISA che abbiamo utilizzato non ci consente di valutare la mortalità di uno specifico tipo cellulare tra quelli principalmente presenti ( $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ), ma possiamo considerare che i valori di apoptosi e necrosi che misuriamo sono in massima parte riferibili all'effetto della diossina sulle cellule  $\beta$ , non solo perché queste sono molto più numerose rispetto alle altre, ma anche perché sono molto più sensibili ad insulti quali le citochine e anche la diossina, come risulta dalle nostre osservazioni al microscopio elettronico. Infatti, l'elevata tossicità della TCDD per le cellule  $\beta$  è confermata dalle osservazioni ultrastrutturali che dimostrano la presenza di diffuse alterazioni della loro morfologia nelle isole pancreatiche trattate. Le nostre osservazioni sembrerebbero indicare che la morte delle cellule  $\beta$  causata dalla TCDD ha solo in parte le caratteristiche morfologiche tipiche dell'apoptosi, poiché svariate cellule presentano invece segni di necrosi. Le osservazioni ultrastrutturali evidenziano un altro aspetto interessante costituito dal precoce e diffuso coinvolgimento dei mitocondri nel danno cellulare indotto dalla diossina.

Comunque, nell'ambito della caratterizzazione dell'azione tossica della diossina, tenendo presenti i presupposti da cui ha preso origine il nostro studio, un risultato particolarmente interessante è rappresentato dall'alterazione della secrezione di insulina stimolata dal glucosio che viene indotta dalla esposizione a concentrazioni molto basse e sicuramente non citotossiche di TCDD (1 nM), ed è già evidente dopo 1 h di incubazione in presenza di diossina. La dimostrazione di un danno funzionale delle cellule  $\beta$  pancreatiche in presenza



di concentrazioni di TCDD compatibili con un'esposizione ambientale non particolarmente intensa potrebbe rappresentare un elemento importante del legame fra diossina e diabete.

L'alterazione della secrezione di insulina a dosi basse di TCDD è significativa anche per esposizioni prolungate alla diossina (6 h), pur mostrando un effetto minore. Possiamo ipotizzare che basse dosi di diossina non inducono danni permanenti e che, dopo lo stress iniziale, possano essere messi in atto meccanismi di compenso, forse mediante sovra-espressione di geni funzionali oppure ripristino parziale dell'attività metabolica.

Le cellule  $\beta$  pancreatiche funzionano essenzialmente come sensori del glucosio in quanto la loro principale funzione consiste nell'adeguare perfettamente la secrezione di insulina ai livelli della glicemia. Nell'ambito di questo accoppiamento stimolo-secrezione, i mitocondri svolgono un ruolo fondamentale [192]. Nel modello ormai generalmente accettato della secrezione di insulina stimolata dal glucosio, il metabolismo mitocondriale del piruvato, derivato dal glucosio attraverso la via glicolitica, genera ATP, che promuove la chiusura dei canali al  $K^+$  ATP-dipendenti e di conseguenza induce la depolarizzazione della membrana cellulare. L'ingresso del  $Ca^{2+}$  attraverso i canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio dipendenti e l'aumento della concentrazione del  $Ca^{2+}$  citosolico scatenano l'esocitosi dell'insulina [193,194].

Nostri studi precedenti avevano dimostrato che la diossina determina nelle cellule INS-1 un aumento non fisiologico dei livelli intracellulari di  $Ca^{2+}$  probabilmente responsabile degli effetti tossici a livello mitocondriale. Anche nelle isole pancreatiche i mitocondri appaiono essere un bersaglio degli effetti tossici della diossina e le alterazioni a livello mitocondriale potrebbero essere responsabili della ridotta capacità di secernere insulina in risposta a concentrazioni stimolanti di glucosio. I risultati ottenuti mostrano inoltre che il trattamento con diossina non determina variazione sia nell'espressione genica di INS-1 che nel contenuto dell'ormone nelle isole di Langerhans, mentre determina una ridotta espressione del gene che codifica per il trasportatore del glucosio GLUT-2.

Nelle isole pancreatiche esposte per 6 h a varie dosi di TCDD abbiamo valutato anche l'espressione dei tre maggiori fattori (BH3-only) pro-apoptotici (PUMA, DP5 e BIM), che è noto essere regolati a livello trascrizionale [195-196], di proteine pro-apoptotiche multi-dominio quali Bak e Bax così come di membri della famiglia Bcl-2 anti-apoptotici quali Bcl-2 e Bcl-XL, probabilmente modulati da modificazioni post-trascrizionali [197]. L'apoptosi può essere indotta attraverso due meccanismi principali: il pathway estrinseco, caratterizzato dall'attivazione di recettori di morte e caspasi; il pathway intrinseco, in cui i mitocondri giocano un ruolo chiave di controllo [196]. Diversi stimoli pro-apoptotici, incluso un severo stress del reticolo endoplasmatico (ER), convergono nell'attivazione delle proteine della famiglia Bcl-2 (BH3-only) pro-apoptotiche (tra cui DP5, Bax, Bak, Bim, PUMA) [197]. I membri di questa sottofamiglia di Bcl-2 interagiscono con le proteine anti-apoptotiche Bcl-2 (tra cui Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) attraverso il dominio BH3 [197]. Se l'equilibrio e l'interazione tra i componenti della grande famiglia Bcl-2 favoriscono la decisione della morte cellulare, le proteine multicanale pro-apoptotiche Bax e Bak vengono attivate e vanno a formare pori nella membrana mitocondriale, determinando il rilascio di ulteriori proteine pro-apoptotiche come il citocromo c e SMAC/DIABLO [197].

Nelle cellule  $\beta$ , a differenza di altri tipi cellulari, l'attivazione di NF- $\kappa$ B ha un'azione prevalentemente pro-apoptotica, inducendo stress del reticolo endoplasmatico ed il sistema di risposta a proteine mal ripiegate (UPR) probabilmente attraverso l'attivazione di iNOS nelle cellule [198]. Il meccanismo attraverso il quale il ER contribuisce alla morte delle  $\beta$  cellule non è ancora completamente chiaro, ma, probabilmente, l'induzione delle proteine pro-apoptotiche C/EBP proteina omologa (CHOP), della proteina di morte 5 (DP5) e la ridotta espressione della proteina anti-apoptotica mieloide (Mcl-1) giocano un ruolo chiave in questo processo. La proteina DP5, che è sovra-espressa soprattutto a seguito dell'attivazione di STAT-1, favorisce la degradazione e la repressione delle molecole anti-apoptotiche quali Mcl-1 e Bcl-XL favorendo la via apoptotica attraverso PUMA, i cui livelli di espressione vengono ulteriormente incrementati da NF- $\kappa$ B [197].

I nostri risultati mostrano che il trattamento con TCDD a varie dosi per 6 h determina nelle isole pancreatiche isolate un incremento dell'espressione genica delle proteine pro-apoptotiche PUMA, DP5 e BIM all'aumentare della dose di diossina. Invece, le proteine pro-apoptotiche multi-dominio Bax e Bak, così come le proteine anti-apoptotiche studiate non mostrano variazioni nella loro espressione genica quando esposte a diossina. Dal momento che le osservazioni al microscopio elettronico e risultati ottenuti con il dosaggio ELISA dimostrano che le isole pancreatiche esposte a TCDD ad alte dosi subiscono l'apoptosi, dovremo valutare la concentrazione delle proteine pro e anti apoptotiche che vengono regolate a livello post-trascrizionale.

Vari studi dimostrano che la TCDD può indurre la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [199] e può anche scatenare la produzione di altre molecole bioattive quali il ossido di azoto (NO) [200-201]. L'NO gioca ruoli vitali in vari processi fisiologici e patologici in molti organi. La sua produzione nei tessuti è catalizzata dall'enzima NO sintetasi (NOS), di cui esistono tre differenti isoforme [202-203]. La NO sintetasi presente nell'endotelio dei vasi sanguigni (eNOS) e nei neuroni cerebrali (nNOS) sono costitutivamente attive e  $Ca^{2+}$ /calmodulina dipendenti. La terza isoforma è la NO sintetasi inducibile (iNOS),  $Ca^{2+}$ /calmodulina indipendente, normalmente assente nelle cellule a riposo [203]. Nelle isole pancreatiche sono presenti le tre isoforme di NOS. Molti meccanismi sono stati proposti per spiegare apoptosi mediata da NO nelle cellule  $\beta$ . NO potrebbe formare agenti pro-ossidanti che danneggerebbero il DNA con conseguente attivazione di p53 ed espressione di proteine pro-apoptotiche quali BAX, NOXA, PUMA. In alternativa, l'ossido di azoto potrebbe agire determinando stress del reticolo [204-205] oppure attivando la via mitocondriale dell'apoptosi [206-207].

Abbiamo quindi voluto valutare se l'apoptosi evidenziata nelle isole pancreatiche isolate esposte a diossina fosse determinata da un aumento della produzione di NO. A tal fine abbiamo determinato i livelli di nitriti nel mezzo di incubazione delle isole esposte a varie concentrazioni, ma non abbiamo trovato alcun aumento, cosa che ci fa concludere che la

produzione di NO non gioca un ruolo importante nel determinismo del danno cellulare da diossina.

Nell'introduzione abbiamo ampiamente ricordato che l'azione tossica della diossina viene generalmente considerata dipendente dalla sua interazione con il recettore arilico (AhR) e conseguente modificazione dell'espressione di geni bersaglio, le cui sequenze regolatrici contengono elementi XRE [208]. Di conseguenza, la trasformazione di AhR è ritenuta la prima tappa del meccanismo implicato nella tossicità della diossina. La soppressione di tale trasformazione potrebbe proteggere dalla tossicità mostrata da questo contaminante ambientale.

Da tempo è noto che molti flavonoidi sono ligandi naturali del recettore arilico [209-211]. Tuttavia, le attività biologiche evocate dal legame con AhR sono concentrazione-dipendenti. Al limite inferiore del range di concentrazioni alle quali i flavonoidi legano AhR, molti agiscono come antagonisti [197-199]. In tale ruolo, legano il recettore e possono competere con TCDD per il legame, ma non trasformano AhR in un fattore di trascrizione attivo. Ad alte concentrazioni, gli stessi flavonoidi funzionano come AhR-agonisti e riproducono molte delle azioni negative di TCDD [210-212].

Nei nostri esperimenti abbiamo valutato il potenziale effetto protettivo del flavonoide *epigallocatechina 3-gallato* (EGCG) nei confronti della tossicità della diossina, in quanto è stato dimostrato che questa sostanza è in grado di agire come inibitore di AhR legandosi alla Heat Shock Protein 90 (Hsp90), una delle sue proteine [174,175]. La forma non attiva del recettore arilico è presente nel compartimento citoplasmatico legata a proteine accessorie, in particolare molecole dello chaperone molecolare Hsp90 [52,213,214], la proteina immunofilina-simile XAP2 [52;54,55] e la proteina p23 [214]. La proteina Hsp90 si è dimostrata un componente essenziale della via di segnalazione di AhR. E' stato dimostrato che la sua presenza è necessaria per il corretto folding e per il mantenimento della stabilità del complesso del recettore arilico [215,216]. Due degli antagonisti del recettore arilico più potenti e meglio caratterizzati, il flavonoide sintetico *3'-metossi-4'-nitroflavone* (3M4NF) e

il derivato indolico *3,3'-diindolilmetano* (DIM), agiscono mediante una diretta competizione nel sito di legame con il ligando di AhR. È stato dimostrato che EGCG agisce come un inibitore della Hsp90, legandosi all'interno o in prossimità del sito di legame dell'ATP del dominio C-terminale della proteina, perturbando il legame dell'ATP, inducendo un inappropriato cambiamento conformazionale, impedendo la dimerizzazione e inibendo la funzione di chaperone molecolare [217].

Il legame di EGCG alla Hsp90 stabilizza un complesso AhR che include Hsp90 e XAP2, ed eventualmente p23, bloccando la dissociazione delle proteine accessorie dal recettore indotta da TCDD. L'EGCG inoltre non inibisce la localizzazione nucleare di AhR determinata da TCDD, ma impedisce l'associazione AhR-Arnt e il riconoscimento degli elementi di risposta alla diossina (DRE) e blocca quindi l'attività trascrizionale AhR-mediata da TCDD.

Quindi l'EGCG agisce in modo singolare, totalmente diverso rispetto agli altri inibitori della Hsp90 e ci è sembrato interessante studiare l'eventuale effetto protettivo dell'EGCG nei confronti della tossicità da diossina nelle isole isolate. A tal fine abbiamo utilizzato EGCG alla dose di 200  $\mu$ M che corrisponde alla dose che si è rivelata capace di indurre la massima inibizione dell'azione del recettore arilico [174]. I nostri risultati dimostrano che l'EGCG è in grado di proteggere in maniera altamente significativa le cellule delle isole pancreatiche isolate dalla morte indotta dalla diossina. L'EGCG mostra infatti un effetto inibitorio nei confronti dell'apoptosi indotta dalla TCDD dopo un'esposizione di 24 h alla dose di 5, 10, 25 e 50 nM, oppure dopo un'esposizione di 6 h alla dose più elevata di 50 nM.

L'EGCG protegge le cellule pancreatiche anche dalla necrosi determinata da TCDD dopo 24 h di esposizione e inoltre, abbastanza sorprendentemente, previene anche i bassi livelli di necrosi che si verificano nelle cellule pancreatiche di controllo, probabilmente dovuti alla distruzione delle normali relazioni tra cellule e matrice durante l'isolamento delle isole [178]. Concludendo, i risultati ottenuti mostrano che la diossina altera sia la funzione che la sopravvivenza delle isole di Langerhans isolate, fornendo un sostegno decisivo all'ipotesi, finora fondata solo su dati epidemiologici, che l'esposizione a contaminanti ambientali di

tipo diossinico, anche a dosi molto basse, possa costituire un rilevante fattore di rischio nell'insorgenza del diabete di tipo 2.

# BIBLIOGRAFIA

- [1] Bonner-Weir S, Weir GC. *New sources of pancreatic beta-cells*. Nat. Biotech. 2005; 23:857-861.
- [2] Brillante C, Laffi GC. *Profilo storico sintetico della malattia diabetica*. Minerva medica 1982; 73: 1087-1102.
- [3] American Diabetes Association (ADA). *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care 1997; 20: 1183. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care 2009; 32: S62-S67. *Diabetes Care in the School and Day Care Setting*. Diabetes Care 2009; 32: S68-S72.
- [4] Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. *Principi di Medicina Interna*. Casa Editrice Ambrosiana, HARRISON'STM 2012, 18th edition. Parte 16 "Endocrinologia e Metabolismo", Sezione 1 "Endocrinologia", 344 "Diabete Mellito" a cura di Powers AC.
- [5] Weir GC, Leahy JL, and Bonner-Weir S. *Experimental reduction of  $\beta$ -cell mass: implications for the pathogenesis of diabetes*. Diabetes/Metabolism Reviews 1986; 2: 125-161.
- [6] Shaw JTE, Purdie DM, Neil HAW, Levy JC, Turner RC. *The relative risks of hyperglycaemia, obesity and dyslipidaemia in the relatives of patients with type II diabetes mellitus*. Diabetologia 1999; 42: 24-27.
- [7] DeFronzo RA. *Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes*. Diabetes Rev. 1997; 5:177-269.
- [8] Bonadonna R.C., Stumvoll M., Fritsche A., Muggeo M., Häring H., Bonora E., van Haeften T.W. *Altered homeostatic adaptation of first- and second-phase beta-cell secretion in the offspring of patients with type 2 diabetes: studies with a minimal model to assess beta-cell function*. Diabetes 2003; 52: 470-480.
- [9] Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., Tanaka Y., Takahashi H. *Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection*. Diabetes 2003; 52: 581-587.

- [10] Stumvoll M., Goldstein B.J., van Haeften T.W. *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet 2005; 365: 1333-1346.
- [11] Ganda OP, Soeldner SS. *Genetic, acquired and related factors in the aetiology of diabetes mellitus*. Arch. Intern. Med 1987. 137: 461-469.
- [12] Turner RC, Hattersley AT, Shaw JTE, Levy JC. *Type II Diabetes. Clinical aspects of molecular biological studies*. Diabetes 1995; 44: 1-10.
- [13] Roger H, Unger and Foster DW. *Diabetes mellitus*. In: Williams Textbook of Endocrinology, 9<sup>th</sup> edition, WB Saunders Company 1998; 973.
- [14] Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferrare R, Foley JE, Ravussin E, Bogardus C. *Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursor of NIDDM*. N. Engl. J. Med. 1993; 329: 1988-1992.
- [15] Gerich J.E. *The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity*. Endocr Rev. 1998; 19: 491-503.
- [16] Da: <http://www.idf.org>, International Diabetes Federation consultato il 5 marzo 2015.
- [17] Longnecker, M.P.; Daniels, J.L. *Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes*. Environ. Health Perspect. 2001; 109, 871–876.
- [18] Neel, B.A.; Sargis, R.M. *The paradox of progress: Environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic*. Diabetes 2011; 60, 1838–1848.
- [19] Environmental Protection Agency. *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*. U.S Environmental Protection Agency: Washington, DC,USA, 1997.
- [20] Müllerová, D.; Kopecký, J. *White adipose tissue: Storage and effector site for environmental pollutants*. Physiol. Res. 2007; 56, 375–381.
- [21] Schug, T.T.; Janesick, A.; Blumberg, B.; Heindel, J.J. *Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2011; 127, 204–215.
- [22] Alonso-Magdalena, P.; Quesada, I.; Nadal, A. *Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus*. Nat. Rev. Endocrinol. 2011; 7, 346–353.



- [23] Schafer, K.S.; Kegley, S.E. *Persistent toxic chemicals in the US food supply*. J. Epidemiol. Commun. Health 2002; 56, 813–817.
- [24] Lee, D.-H.; Jacobs, D.R.; Porta, M. Editorial: *Could low-level background exposure to persistent organic pollutants contribute to the social burden of type 2 diabetes?* J. Epidemiol. Commun. Health 2008; 60, 1006–1008.
- [25] Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., van Leeuwen F.X., Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewski T. *Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs for humans and wildlife*. Environ Health Perspect 1998;103:775-792.
- [26] Whitlock J.P.Jr. *Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin action*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1990; 30:251-277.
- [27] Matsumura F. *Mechanism of action of dioxin-type chemicals, pesticides, and other xenobiotics affecting nutritional indexes*. Am. J. Clin. Nutr.1995;61(Suppl.):695S-710S.
- [28] Olie K. *Chlorodibenzo-p-dioxins and chlorodibenzofurans are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in Netherlands*. Chemosphere 1980; 9:501-522.
- [29] Environmental Protection Agency (EPA)(2004). *Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds: National Academy of Sciences (NAS) review draft*. Retrieved February 11, 2005.
- [30] Gilpin R.K., Wagel D.J., et al. *Production, distribution, and fate of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and related organohalogenes in the environment*. In: Schecter A., Gasiewicz T.A. (Eds.), *Dioxins and Health*. Wiley, Hoboken N.J. 2003;pp. 89-136.
- [31] Arisawa K., Takeda H., Mikasa H. *Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs and its potential health effects: a review of epidemiologic studies*. J Med Invest.2005; 52: 10-21.

- [32] Czuczwa J.M., McVeety B.D., Hites R.A. *Polychlorinated dibenzo-p- dioxins and dibenzofurans in sediments from Siskiwit Lake, Isle Royale*. *Chemosphere* 1985; 14: 623-626.
- [33] Schechter A., Dekin A., Weerasinghe N. C. A., Arghestani S., Gross M. L. *Sources of dioxin in the environment: a study of PCDDs and PCDFs in ancient, frozen Eskimo tissue*. *Chemosphere* 1988;17:627-631.
- [34] Ferrario J. and Byrne C. *2,3,7,8-Dibenzo-p-dioxins in mined clay products from the United States: evidence for possible natural origin*. *Environ.Sci.Technol.*2000; 34:4524-4532.
- [35] Schechter A., Gasiewicz T.A. (Eds.) *Dioxins and Health*. Wiley, Hoboken N.J. 2003, pp.885-892.
- [36] Svensson B., Nilsson A, Hansson M, Rappe C, Akesson B, Skerfving S. *Exposure to dioxins and dibenzofurans through the consumption of fish*. *New Engl. J. Med.*1991;324:8-12.
- [37] Rose J.Q., Ramsey J.C. et al. *The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin following single and repeated oral doses to the rat*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*1976;36,209-226.
- [38] Pirkle J.L., Wolfe W.H., Patterson D.G., Needham L.L., Michalek J.E., Miner J.C., Peterson M.R., Phillips D.L. *Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam veterans of Operation Ranch Hand*. *J. Toxicol. Environ. Health* 1989; 27:165-171.
- [39] Emond C., Michalek J.E., Birnbaum L.S., DeVito M.J. *Comparison of the use of a physiologically based pharmacokinetic model and a classical pharmacokinetic model for dioxin exposure assessments*. *Environ. Health Perspect.* 2005;113:1666-1674.
- [40] Aylward L.L., Brunet R.C., Carrier G., Hays S.M., Cushing C.A., Needham L.L., Patterson D.G. Jr, Gerthoux P.M., Brambilla P., Mocarelli P. *Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in human: toxicokinetic modelling for the moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort*. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*2005; 15 :51-65.

- [41] Schechter A., Birnbaum L., Ryan J.J., Constable J.D. *Dioxins: an overview*. Environ Res. 2006; 101: 419-428.
- [42] Schechter A., Pacpke O., Tung KC, Joseph J, Harris TR, Dahlgren J. *Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in the US population : current levels, temporal trends and comparison with dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls*. J. Occup. Environ. Med.2005;47:199-211.
- [43] U.S. Department of Health and Human Services, Public Health service, National Toxicology Program 2000 9th report on Carcinogens.
- [44] Paustenbach D.J. *The U.S. Epa Science Advisory Board Evaluation (2001) of the EPA dioxin reassessment*. Regul. Toxicol. Pharmacol 2002;36:211-219.
- [45] Cole P., Trichopoulos D., Pastides H., Starr T., Mandel J. *Dioxin and cancer: a critical review*. Regul. Toxicol. Pharmacol.2003;38:378-388.
- [46] Bradfield C.A., Glover E., Poland A. *Purification and N-terminal amino acid sequence of the Ah receptor from C57BL/6J mouse*. Mol. Pharmacol.1991; 39:13-19.
- [47] Mandal P.K. *Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology*. J. Comp. Physiol.2005;B, 175: 221-230.
- [48] Denison M.S., Nagy S.R. *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2003;43:309-334.
- [49] Oesch-Bartlomowicz B., Huelster A., Wiss O., Antoniou-Lipfert P., Dietrich C., Arand M., Weiss C., Bockamp E., Oesch F. *Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005;102:9218-9223.
- [50] Poellinger L. *Mechanistic aspects of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor*. Food Addit. Contam.2000;17:261-266.
- [51] Denis M., Cuthill S., Wikstrom A.C., Poellinger L., Gustafsson J.A. *Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988;155:801-807.

- [52] Perdew G.H. *Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein.* J Biol Chem.1988; 263: 13802-13805.
- [53] Carver L.A., Bradfield C.A. *Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo.* J. Biol.Chem.1997; 272:11452-11456.
- [54] Ma Q. & Whitlock J.P. Jr. *A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin.* Journal of Biological Chemistry 1997; 272:8878–8884.
- [55] 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.* Mol. Cell. Biol.1998;18:978–988.
- [56] Petrusis J.R., Kusnadi A., Ramadoss P., Hollingshead B., Perdew G.H. *The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity.* J. Biol. Chem.2003;278:2677-85.
- [57] Pollenz R.S., Sattler C.A., Poland A. *The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy.* Mol Pharmacol.1994; 45: 428-438.
- [58] Reyes H., Reisz-Porszasz S., Hankinson O. *Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor.* Science,1992;256:1193–1195.
- [59] Denison M.S., Fisher J.M., Whitlock J.P. *The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex: nucleotide sequence and functional analysis.* J. Biol. Chem 1988; 263:17221-17224.
- [60] Nebert D.W., Petersen D.D., Fornace A.J. *Cellular responses to oxidative stress: the (Ah) gene battery as a paradigm.* Environ Health Perspect, 1990;88:13-25.

- [61] Conney A.H. *Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: GHA Clowes memorial lecture.* *Cancer Res.*1982;42:4875-4917.
- [62] Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B., Gonzalez F.J. *Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer.* *J. Biol. Chem.*2004;279:23847-23850.
- [63] Rivera S.P., Saarikoshi O., Hankinson O. *Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450.* *Mol. Pharmacol.* 2002;61:255-259.
- [64] Bittinger M.A., Nguyen L.P., Bradfield C.A. *Aspartate aminotransferase generates proagonists of the aryl hydrocarbon receptor.* *Mol. Pharmacol.* 2003;64:550-556.
- [65] Bock K.W., Köhle C. *Coordinate regulation of drug metabolism by xenobiotic nuclear receptors: UGTs acting together with CYPs and glucuronide transporter.* *Drug Metab. Rev.*2004;36:593-613.
- [66] Prohaska H.J., Talalay P. *Regulatory mechanisms of the monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver.* *Cancer Res.* 1988;48:4776-4782.
- [67] Ramos-Gomez M., Kwak M.K., Dolan P.M., Itoh K., Yamamoto M., Talalay O., Kensler T.W. *Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*2001;98:3410-3415.
- [68] Ma Q., Kinneer K., Bi Y., Chan J.Y., Kann Y.W. *Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires CNC (cap'n'collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction.* *Biochem. J.*2004;377:205-213.
- [69] Miao W., Hu L., Scrivens P.J., Batist G. *Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2).* *J. Biol. Chem.*2005;280:20340-20348.
- [70] Tian Y., Ke S., Denison M.S., Rabson A.B., Gallo M.A. *Ah receptor and NF-kB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity.* *J. Biol. Chem.*1999;274:510-515.

- [71] Marlowe J.L., Knutsen E.S., Schwemberger S., Puga A. *The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression.* J.Biol. Chem.2004; 279:29013-22.
- [72] Huang G., Elferink C.J. *Multiple mechanism are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest.* Mol. Pharmacol.2005;67:88-96.
- [73] Nebert D.W. *Proposed role of drug metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of ligands that effect growth, homeostasis, differentiation and neuroendocrine functions.* Mol. Endocrinol.1991;5:1203-1213.
- [74] Andreola F., Fernandez-Salguero P.M., Chiantore M.V., Petkovich M.P., Gonzalez F.J., DeLuca L.M. *Aryl hydrocarbon receptor Knockout mice exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism.* Cancer Res.1997;57:2835-2838.
- [75] Nishimura N., Yonemoto J., Miyabara Y., Fujii-Kuriyama Y., Tohyama C. *Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice.* Arch. Toxicol.2005;79:260-267.
- [76] Hankinson O. *Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor.* Arch. Biochem. Biophys,2005;433:379-386.
- [77] Zaher H., Fernandez-Salguero P.M., Letterio J., Sheikh M.S., Fornace A.J. Jr, Roberts A.B., Gonzalez F.J. *The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis.* Mol. Pharmacol.1998;54:313-321.
- [78] Reiners J.J. Jr, Clift R.E. *Aryl hydrocarbon receptor regulation of ceramide-induced apoptosis in murine hepatoma 1c1c7 cells. A function independent of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator.* J. Biol. Chem.1999;274:2502-2510.
- [79] Barnes-Ellerbe S., Knutsen K.E., Puga A. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation.* Mol. Pharmacol.2004;66 :502-511.
- [80] Kolluri S.K., Weiss K., Koff A., Gottlicher M. *p27 kip1 induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells.* Genes Dev.1999;13:1742-1753.

- [81] Hoffer A., Chang C.Y., Puga A. *Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways.* Toxicol Appl Pharmacol. 1996;141:238-247.
- [82] Matikainen T., Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, Sakai T, Korsmeyer SJ, Casper RF, Sherr DH, Tilly JL. *Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals.* Nat. Genet.2001;28:355-360.
- [83] Marchand A., Tomkiewicz C., Marchandeu J.P., Boitier E., Barouki R., Garlatti M. *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression and counteracts the negative effect of insulin.* Mol Pharmacol.2005; 67: 444-452.
- [84] Gao L., Dong L., Whitlock J.P. Jr *A novel response to dioxin. Induction of ecto-ATPase gene expression.* J. Biol. Chem.1998;273:15358-15365.
- [85] Rushmore T., Pickett C.B. *Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene.* J. Biol. Chem.1990;265:14648-14653.
- [86] Cho Y.C., Zheng W., Jefcoate C.R. *Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts.* Toxicol. Appl. Pharmacol,2004;199:220-238.
- [87] Ikuta T., Kobayashi Y., Kawaijri K. *Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor.* J. Biol. Chem.2004;279:19209-19216.
- [88] Blankenship A., Matsumura F. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system.*Mol. Pharmacol.1997;52:667-675.
- [89] Puga A., Xia Y., Elferink C. *Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation.* Chem. Biol. Interact, 2002; 141:117-130.
- [90] Mazina O., Park S., Sano H., Wong P., Matsumura F. *Studies on the mechanism of rapid activation of protein Tyrosine phosphorylation activities, particularly c-Src kinase, by TCDD in MCF10A.* J. Biochem Mol. Toxicol.2004;18:313-321.
- [91] Dolwick K.M., Schmidt J.V., Carver L.A., Swanson H.I., Bradfield C.A. *Cloning and expression of human Ah receptor cDNA.* Mol. Pharmacol.1993;44:911-917.

- [92] Puga A., Nebert D.W., Carrier F. *Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1*. DNA and Cell Biology, 1992;11:269–281.
- [93] Pollenz R.S. *The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation*. Chem Biol Interact.2002; 141: 41-61.
- [94] Davarinos N.A., Pollenz R.S. *Aryl Hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export*. J. Biol. Chem.1999;274:28708-28715.
- [95] Schechter A., Ryan J.J. *Persistent brominated and chlorinated dioxin blood levels in a chemist 35 years after dioxin exposure*. J. Occup. Environ. Med. 1992;34:702-707.
- [96] Oliver R.M. *Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory workers*. Br. J. Ind. Med. 1975;32:49-53.
- [97] Bertazzi, P.A.; Bernucci, I.; Brambilla, G.; Consonni, D.; Pesatori, A.C. *The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: A review*. Environ. Health Perspect. 1998; 106,625–633.
- [98] Gasiewicz T.A., Holscher M.A., Neal R.A. *The effect of total parenteral nutrition on the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat*. Toxicol. Appl. Pharmacol.1980;54:469-488.
- [99] Pohianvirta R., Sankari S., Kulju T., Naukkarinen A., Ylinen M., Tuomisto J. *Studies on the role of lipid peroxidation in the acute toxicity of TCDD in rats*. Pharmacol. Toxicol.1990;66:399-408.
- [100] Muzi G., Gorski J.R., Rozman K. *Mode of the metabolism is altered in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) –treated rats*. Toxicol. Lett.1989;47:77-86.
- [101] Lakshman M.R., Ghosh P., Chirtel S.J. *Mechanism of action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on intermediary metabolism in the rat*. J. Pharmacol. Exp. Ther.1991;258:317-319.



- [102] Lakshman M.R., Campbell B.S., Chirtel S.J., Ekarohita N. *Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on de novo fatty acid and cholesterol synthesis in the rat.* Lipids,1989;23:904-906.
- [103] Enan E., Liu P.C., Matsumura F. *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes reduction of glucose transporting activities in the plasma membranes of adipose tissue and pancreas from the guinea pig.* J. Biol. Chem.1992a;267:19785-19791.
- [104] Enan E., Liu P.C., Matsumura F. J. *TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin) causes reduction in glucose uptake through glucose transporters on the plasma membrane of the guinea pig adipocyte.* J. Environ. Sci Health,1992b;B27:495-510.
- [105] Lindén J., Korkalainen M., Lensu S., Tuomisto J., Pohjanvirta R. *Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and leptin on hypothalamic mRNA expression of factors participating in food intake regulation in a TCDD-sensitive and a TCDD-resistant rat strain.* J Biochem Mol Toxicol.2005; 19: 139-148.
- [106] McConnell E.E., Moore J.A., Gupta B.N., Rakes A.H., Luster M.I. Goldstein J.A., Haseman J.K., Parker C.E. *The chronic toxicity of technical and analytical pentachlorophenol in cattle. I. Clinicopathology. Toxicol. Appl. Pharmacol.*1980;52:486-490.
- [107] Kociba R.J., Keeler P.A., Park C.N., Gehrich P.J. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): results of a 13-week oral toxicity study in rats.* Toxicol. Appl. Pharmacol.1976;35:553-574.
- [108] Boverhof D.R., Tam E., Harney A.S., Crawford R.B., Kaminski N.E., Zacharewski T.R. *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces suppressor of cytokine signaling 2 in murine B cells.* Mol. Pharmacol.2004;66:1662-1670.
- [109] Lawrence B.P., Vorderstrasse B.A. *Activation of the aryl hydrocarbon receptor diminishes the memory response to homotypic influenza virus infection but does not impair host resistance.* Toxicol. Sci.2004;79:304-14.
- [110] Nohara K., Pan X., Tsukumo S., Hida A., Ito T., Nagai H., Inouye K., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Tohyama C. *Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes.* J. Immunol.2005;174:2770-2777.

- [111] Fisher M.T., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances negative selection of T cells in the thymus but allows autoreactive T cells to escape deletion and migrate to the periphery.* Mol Pharmacol.2005;67:327-35.
- [112] Kerkvliet N.I. *Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins.* Environ. Health Perspect.1995;103 Suppl 9:47-53.
- [113] Brunnberg S., Pettersson K., Rydin E., Matthews J., Hanberg A., Pongratz I. *The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A.2003; 100: 6517-6522.
- [114] Ohtake F., Baba A., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. *Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings.* Biochem Biophys Res Commun.2008; 370: 541-546.
- [115] Tilson H.A., Kodavanti P.R. *Neurochemical effects of polychlorinated biphenyls: an overview and identification of research needs.* Neurotoxicology,1997;18:727-743.
- [116] Cheng W.N., Coenraads P.J., Hao Z.H., Liu G.F. *A health survey of workers in the pentachlorophenol section of a chemical manufacturing plant.* Am. J. Med.1993;24:8192.
- [117] World Health Organization (WHO) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans.* 1997; International Agency for Research on Cancer, WHO, Geneva.
- [118] Huff J.E., Salmon A.G., Hooper N.K., Zeise L. *Long-term carcinogenesis studies on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxins.* Cell Biol. Toxicol.1991;7:67-94.
- [119] Devereux T.R., Anna C.H., Foley J.F., White C.M., Sills R.C., Barrett J.C. *Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis.* Oncogene,1999;18(33):4726-4733.
- [120] National Toxicology Program (NTP) *National Carcinogenic Program Report on Carcinogens, Report on Carcinogen Profiles,* 11 th ed., US Department of Health and Human Service, Agency for Toxic Substance and Disease Registry,2004.

- [121] McGregor D.B., Partensky C., Wilbourn J., Rice J.M. *An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis*. Environ. Health Perspect.1998;106(Suppl.2):755-760.
- [122] Hoar S.K., Blair A., Holmes F.F., Boysen C.D., Robel R.J., Hoover R., Fraumeni J.F. Jr. *Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma*. J. Am. Med. Assoc.1986;256:1141-1147.
- [123] Bailar J.C. *How dangerous is dioxin?* New Engl. J. Med.1991;324:260-262.
- [124] Fingerhut M.A., Halperin W.E., Marlow D.A., Piacitelli L.A., Honchar P.A., Sweeney M.H., Greife A.L., Dill P.A., Steenland K., Suruda A.J. *Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. New Engl J. Med.1991;324:212-218.
- [125] Bertazzi P.A., Zocchetti C., Guercilena S., Consonni D., Tironi A., Landi M.T., Pesatori A.C. *Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the Seveso accident*. Epidemiology,1997;8:646-652.
- [126] Pesatori A.C., Consonni D., Tironi A., Zocchetti C., Fini A., Bertazzi P.A. *Cancer in young population in a dioxin-contaminated area*. Int. J. Epidemiol. 1993;22:1010-1013.
- [127] Landi M.T., Consonni D., Patterson D.G. Jr, Needham L.L., Lucier G., Brambilla P.,Cazzaniga M.A., Mocarelli P., Pesatori A.C., Bertazzi P.A., Caporaso N.E. *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin plasma levels in Seveso 20 years after the accident*. Environ. Health Perspect,1998;106:273-277.
- [128] Bertazzi P.A., Pesatori A.C., Bernucci I., Landi M.T., Consonni D. *Dioxin exposure and human leukemias and lymphomas. Lessons from the Seveso accident and studies on industrial workers*. Leukemia,1999; 13 (Suppl 1): S72-S74.
- [129] Consonni, D.; Pesatori, A.C.; Zocchetti, C.; Sindaco, R.; D'Oro, L.C.; Rubagotti, M.; Bertazzi, P.A. *Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976: 25 years of follow-up*. Am. J. Epidemiol. 2008; 167, 847–858.

- [130] Longnecker, M.P.; Michalek, J.E. *Serum dioxin level in relation to diabetes mellitus among Air Force veterans with background levels of exposure.* *Epidemiology* 2000; 11, 44–48.
- [131] Kim, J.S.; Lim, H.S.; Cho, S.I.; Cheong, H.K.; Lim, M.K. *Impact of Agent Orange exposure among Korean Vietnam veterans.* *Ind. Health* 2003; 41, 149–157.
- [132] Lee, D.H.; Lee, I.K.; Song, K.; Steffes, M.; Toscano, W.; Baker, B.A.; Jacobs, D.R., Jr. *A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: Results from the National Health and Examination Survey 1999–2002.* *Diabetes Care* 2006; 29, 1638–1644.
- [133] Everett, C.J.; Frithsen, I.L.; Diaz, V.A.; Koopman, R.J.; Simpson, W.M., Jr.; Mainous, A.G., 3rd. *Association of a polychlorinated dibenzo-p-dioxin, a polychlorinated biphenyl, and DDT with diabetes in the 1999–2002 National Health and Nutrition Examination Survey.* *Environ. Res.* 2007; 103, 413–418.
- [134] Rignell-Hydbom A., Rylander L., Hagmar L. *Exposure to persistent organochlorine pollutants and type 2 diabetes mellitus.* *Hum Exp Toxicol.* 2007; 26: 447-452.
- [135] Longnecker M.P., Daniels J.L. *Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes.* *Environ Health Perspect.* 2001; 109(Suppl 6): 871-876.
- [136] Müllerová D., Kopecký J. *White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants.* *Physiol Res.* 2007; 56: 375-381.
- [137] Porta M., Zumeta E. *Implementing the Stockholm Treaty on Persistent Organic Pollutants.* *Occup Environ Med.* 2002; 59: 651-652.
- [138] Magliano, D.J.; Loh, V.H.; Harding, J.L.; Botton, J.; Shaw, J.E. *Persistent organic pollutants and diabetes: A review of the epidemiological evidence.* *Diabetes Metab.* 2014; 40, 1–14.
- [139] Booker, S.M. *Dioxin in Vietnam: Fighting a legacy of war.* *Environ. Health Perspect.* 2001; 109, A116–A117.
- [140] Pavuk, M.; Patterson, D.G., Jr.; Turner, W.E.; Needham, L.L.; Ketchum, N.S. *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans*

(PCDFs), and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in the serum of US Air Force veterans in 2002. *Chemosphere* 2007; 68, 62–68.

- [141] Michalek, J.E.; Ketchum, N.S.; Tripathi, R.C. *Diabetes mellitus and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin elimination in veterans of Operation Ranch Hand*. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2003;66, 211–221.
- [142] Bertazzi, P.A.; di Domenico, A. *Health consequences of the Seveso, Italy, accident*. In *Dioxin and Health*, 2nd ed.; Schecter, A., Gasiewicz, T.A., Eds.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2003;pp. 827–853.
- [143] Pesatori, A.C. *Dioxin contamination in Seveso: The social tragedy and the scientific challenge*. *Med. Lav* 1995; 86, 111–124.
- [144] Bertazzi P.A., Bernucci I., Brambilla G., Consonni D., Pesatori A.C. *The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review*. *Environ. Health Perspect.*1998;106(Suppl.2):625-633.
- [145] Warner, M.; Mocarelli, P.; Brambilla, P.; Wesselink, A.; Samuels, S.; Signorini, S.; Eskenazi, B. *Diabetes, metabolic syndrome, and obesity in relation to serum dioxin concentrations: The Seveso women's health study*. *Environ. Health Perspect.* 2013; 121, 906–911.
- [146] Vena, J.; Boffetta, P.; Becher, H.; Benn, T.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Coggon, D.; Colin, D.;Flesch-Janys, D.; Green, L.; Kauppinen, T.; et al. *Exposure to dioxin and non neoplastic mortality in the expanded IARC international cohort study of phenoxy herbicide and chlorophenol production workers and sprayers*. *Environ. Health Perspect.* 199; 106, 645–653.
- [147] Chen, H.L.; Su, H.J.; Guo, Y.L.; Liao, P.C.; Hung, C.F.; Lee, C.C. *Biochemistry examinations and health disorder evaluation of Taiwanese living near incinerators and with low serum PCDD/Fs levels*. *Sci. Total Environ.* 2006; 366, 538–548.
- [148] Kouznetsova, M.; Huang, X.; Ma, J.; Lessner, L.; Carpenter, D.O. *Increased rate of hospitalization for diabetes and residential proximity of hazardous waste sites*. *Environ. Health Perspect.* 2007;115, 75–79.
- [149] Wang, S.L.; Tsai, P.C.; Yang, C.Y.; Leon Guo, Y. *Increased risk of diabetes and polychlorinated biphenyls and dioxins: A 24-year follow-up study of the Yucheng cohort*. *Diabetes Care* 2008;31, 1574–1579.

- [150] Steenland, K.; Piacitelli, L.; Deddens, J.; Fingerhut, M.; Chang, L.I. *Cancer, heart disease, and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. J. Natl. Cancer Inst. 1999;91, 779–786.
- [151] Steenland, K.; Calvert, G.; Ketchum, N.; Michalek, J. *Dioxin and diabetes mellitus: An analysis of the combined NIOSH and Ranch Hand data*. Occup. Environ. Med. 2001; 58, 641–648.
- [152] Karouna-Renier, N.K.; Rao, K.R.; Lanza, J.J.; Davis, D.A.; Wilson, P.A. *Serum profiles of PCDDs and PCDFs, in individuals near the Escambia Wood Treating Company Superfund site in Pensacola, FL*. Chemosphere 2007; 69, 1312–1319.
- [153] Collins, J.J.; Bodner, K.; Aylward, L.L.; Wilken, M.; Bodnar, C.M. *Mortality rates among trichlorophenol workers with exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Am. J. Epidemiol. 2009; 170, 501–506.
- [154] Collins, J.J.; Bodner, K.; Aylward, L.L.; Wilken, M.; Swaen, G.; Budinsky, R.; Rowlands, C.; Bodnar, C.M. *Mortality rates among workers exposed to dioxins in the manufacture of pentachlorophenol*. J. Occup. Environ. Med. 2009; 51, 1212–1219.
- [155] Kerger, B.D.; Scott, P.K.; Pavuk, M.; Gough, M.; Paustenbach, D.J. *Re-analysis of Ranch Hand study supports reverse causation hypothesis between dioxin and diabetes*. Crit. Rev. Toxicol. 2012; 42, 669–687.
- [156] Lee, D.H.; Porta, M.; Jacobs, D.R., Jr.; Vandenberg, L.N. *Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes*. Endocr. Rev. 2014.
- [157] Lee, D.H.; Lee, I.K.; Steffes, M.; Jacobs, D.R., Jr. *Extended analyses of the association between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes*. Diabetes Care 2007; 30, 1596–1598.
- [158] Lee, D.H.; Lee, I.K.; Jin, S.H.; Steffes, M.; Jacobs, D.R., Jr. *Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and insulin resistance among nondiabetic adults: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002*. Diabetes Care 2007; 30, 622–628.
- [159] Lee, D.H.; Lind, L.; Jacobs, D.R., Jr.; Salihovic, S.; van Bavel, B.; Lind, P.M. *Associations of persistent organic pollutants with abdominal obesity in the elderly*:

*The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study.*  
Environ. Int. 2012; 40, 170–178.

- [160] Rignell-Hydbom, A.; Rylander, L.; Hagmar, L. *Exposure to persistent organochlorine pollutants and type 2 diabetes mellitus.* Hum. Exp. Toxicol. 2007; 26, 447–452.
- [161] Uemura, H.; Arisawa, K.; Hiyoshi, M.; Satoh, H.; Sumiyoshi, Y.; Morinaga, K.; Kodama, K.; Suzuki, T.; Nagai, M.; Suzuki, T. *Associations of environmental exposure to dioxins with prevalent diabetes among general inhabitants in Japan.* Environ. Res. 2008; 108, 63–68.
- [162] Rignell-Hydbom, A.; Lidfeldt, J.; Kiviranta, H.; Rantakokko, P.; Samsioe, G.; Agardh, C.D.; Rylander, L. *Exposure to p,p'-DDE: A risk factor for type 2 diabetes.* PLoS One 2009; 4, e7503.
- [163] Lee, D.H.; Steffes, M.W.; Sjödin, A.; Jones, R.S.; Needham, L.L.; Jacobs, D.R., Jr. *Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: A nested case-control study.* Environ. Health Perspect. 2010; 118, 1235–1242.
- [164] Tanaka, T.; Morita, A.; Kato, M.; Hirai, T.; Mizoue, T.; Terauchi, Y.; Watanabe, S.; Noda, M. SCOP Study Group. *Congener-specific polychlorinated biphenyls and the prevalence of diabetes in the Saku Control Obesity Program (SCOP).* Endocr. J. 2011; 58, 589–596.
- [165] Lee, D.H.; Lind, P.M.; Jacobs, D.R., Jr.; Salihovic, S.; van Bavel, B.; Lind, L. *Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plasma predict development of type 2 diabetes in the elderly: The prospective investigation of the vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study.* Diabetes Care 2011; 34, 1778–1784.
- [166] Everett, C.J.; Thompson, O.M. *Associations of dioxins, furans and dioxin-like PCBs with diabetes and pre-diabetes: Is the toxic equivalency approach useful?* Environ. Res. 2012; 118, 107–111.
- [167] Nakamoto, M.; Arisawa, K.; Uemura, H.; Katsuura, S.; Takami, H.; Sawachika, F.; Yamaguchi, M.; Juta, T.; Sakai, T.; Toda, E.; et al. *Association between blood levels of PCDDs/PCDFs/dioxin-like PCBs and history of allergic and other diseases in the Japanese population.* Int. Arch. Occup. Environ. Health 2013; 86, 849–859.

- [168] Jørgensen, M.E.; Borch-Johnsen, K.; Bjerregaard, P. *A cross-sectional study of the association between persistent organic pollutants and glucose intolerance among Greenland Inuit*. *Diabetologia* 2008; 51, 1416–1422.
- [169] Sharp, D. *Environmental toxins, a potential risk factor for diabetes among Canadian Aboriginals*. *Int. J. Circumpolar Health* 2009; 68, 316–326.
- [170] Philibert, A.; Schwartz, H.; Mergler, D. *An exploratory study of diabetes in a First Nation community with respect to serum concentrations of p,p'-DDE and PCBs and fish consumption*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6, 3179–3189.
- [171] Rylander, L.; Rignell-Hydbom, A.; Hagmar, L. *A cross-sectional study of the association between persistent organochlorine pollutants and diabetes*. *Environ. Health* 2005; 4, 1–6.
- [172] Turyk, M.; Anderson, H.A.; Knobeloch, L.; Imm, P.; Persky, V.W. *Prevalence of diabetes and body burdens of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and p,p'-diphenyldichloroethene in Great Lakes sport fish consumers*. *Chemosphere* 2009; 75, 674–679.
- [173] Fujiyoshi, P.T.; Michalek, J.E.; Matsumura, F. *Molecular epidemiologic evidence for diabetogenic effects of dioxin exposure in U.S. Air force veterans of the Vietnam war*. *Environ. Health Perspect.* 2006; 114, 1677–1683.
- [174] Palermo C.M., Westlake C.A., Gasiewicz T.A. *Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein*. *Biochemistry.* 2005; 44: 5041-5052.
- [175] Yin Z., Henry E.C., Gasiewicz T.A. *(-)-Epigallocatechin-3-gallate is a novel Hsp90 inhibitor*. *Biochemistry.*; 2009 48: 336-345.
- [176] Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. *Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995;322: 339-46.
- [177] Zhuo Fu, Wei Zhen, Julia Yuskavage and Dongmin Liu *Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice*. *British Journal of Nutrition* 2011;105, 1218–1225385.



- [178] Yuko Hara, Masayuki Fujino, Masao Takeuchi, Xiao-Kang Li. *Green-tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate provides resistance to apoptosis in isolated islets*. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, September, 2007.
- [179] Piaggi S., Novelli M., Martino L., Masini M., Raggi C., Orciuolo E., Masiello P., Casini A., De Tata V. *Cell death and impairment of glucose-stimulated insulin secretion induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the beta-cell line INS-1E*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2007;220: 333-34.
- [180] Martino L., Novelli M., Masini M., Chimenti D., Piaggi S., Masiello P., De Tata V. *Dehydroascorbate protection against dioxin-induced toxicity in the  $\beta$ -cell line INS-1E*. Toxicol. Lett 2009; 189: 27-34.
- [181] Martino, L.; Masini, M.; Novelli, M.; Giacomelli, D.; Befly, P.; Masiello, P.; de Tata, V. *The aryl receptor inhibitor epigallocatechin-3-gallate protects INS-1E beta-cell line against acute dioxin toxicity*. Chemosphere 2013; 93, 1447–1455.
- [182] Lacy PE, Kostianovsky M. *Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas*. Diabetes 1967;16: 35-39.
- [183] Sutton et al. *Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase*. Transplantation 1986;42: 689-91.
- [184] Kenny J, J. Clin. Endocr. 1965;25: 1375-84.
- [185] Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ. *Coated charcoal immunoassay of insulin*. J.Clin. Endocrinol. 1965;25: 1375-1384.
- [186] Prentki, M.; Nolan, C.J. *Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes*. J. Clin. Investig. 2006; 116,1802–1812.
- [187] Longnecker M.P., Daniels J.L. *Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes*. Environ Health Perspect.; 2001;109 (Suppl 6): 871-876.
- [188] Henriksen G.L., Ketchum N.S., Michalek J.E., Swaby J.A. *Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand*. Epidemiology, 1997;8:252-258.
- [189] Pesatori A.C., Zocchetti C., Guercilena S., Consonni D., Turrini D., Bertazzi P.A. *Dioxin exposure and non-malignant health effects: a mortality study*. Occup Environ Med. 1998;55: 126-131.

- [190] Longnecker M.P., Michalek J.E. *Serum dioxin level in relation to diabetes mellitus among Air Force veterans with background levels of exposure.* Epidemiology 2000; 11:44-48.
- [191] Remillard R.B., Bunce N.J. *Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biologic plausibility.* Environ. Health Perspect 2002;110:853-858.
- [192] Kennedy E.D., Wollheim C.B. *Role of mitochondria calcium in metabolism-secretion coupling in nutrient-stimulated insulin release.* Diab. Metab.1998; 24: 15-24.
- [193] Maechler P *Mitochondria as the conductor of metabolic signals for insulin exocytosis in pancreatic  $\beta$ -cells.* Cell. Mol. Life Sci.2002; 59:1803-1818.
- [194] Maechler P., Carobbio S., Rubi B. *In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion.* Int. J. Biochem. Cell Biol.2006; 38: 696-709.
- [195] Scorrano L., Korsmeyer SJ. *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members.* Biochem. Biophys. Res Commun. 2003 May; 9;304(3): 437-44. Review
- [196] Barthson J, Germano CM, Moore F, Maida A, Drucker DJ, Marchetti P, Gysemans C, Mathieu C, Nunez G, Jurisicova A, Eizirik DL, Gurzov EN. *Cytokines Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  Induce Pancreatic  $\beta$ -cell Apoptosis through STAT1-mediated Bim Protein Activation.* J. Biol. Chem. 2011; 286: 39632-39643.
- [197] Gurzov EN, Eizirik DL. *Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of  $\beta$ -cell death and dysfunction.* Trends in Cell Biology 2011; 21: 424-431.
- [198] Vanzela EC, Cardozo AK. *Is ARE/poly(U)-binding factor 1 (AUF1) a new player in cytokine-mediated beta cell apoptosis?* Diabetologia 2012; 55: 1572-1576.
- [199] Mates, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Marquez, J.. *Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms.* Free Radic. Biol.Med 2010; 49,1328-1341.

- [200] Know, M.J. Jeong, K.S., Choi, E.J., Lee, B.H. *Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)- induced activation of mitogen- activated protein kinase signaling pathway in Jurkat T cells*. Pharmacol. Toxicol. 2003;93,186-190.
- [201] Yuanye Li, Gang Chen, Jianya Zhao, Xiaoke Nie, Chunhua Wan, Jiao Liu, Zhiqing Duan, Guangfei Xu. *2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces microglial nitric oxide production and subsequent rat primary cortical neuron apoptosis through p38/JNK MAPK pathway*. Toxicology 2013; 312 132-141.
- [202] Schrader E, Meier B, Brattsrom A. *Hypericum treatment of mild-moderate depression in a placebo-controlled study. A prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter study*. Hum. Psychopharmacol 1998; 13: 163-169.
- [203] Kalb R, Trautmann-Sponsel RD, Kieser M. *Efficacy and tollerability of Hypericum extract WS 5572 versus placebo in midly to moderately depressed patients. A randomized double-blind multicenter clinical trials*. Pharmacopsychiatry 2001;34: 96-103.
- [204] A. K. Cardozo, F. Ortis, J. Storling et al., *Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump  $Ca^{2+}$ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ , leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$ -cells*. Diabetes 2005; vol. 54, no. 2, pp. 452–461.
- [205] D. L. Eizirik, A. K. Cardozo, and M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocrine Reviews 2008; vol. 29, no. 1, pp. 42–61.
- [206] C. Holohan, E. Szegezdi, T. Ritter, T. O'Brien, and A. Samali, *Cytokine-induced  $\beta$ -cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL: apoptosis*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2008; vol. 12, no. 2, pp. 591–606.
- [207] Mehmeti, E. Gurgul-Convey, S. Lenzen, and S. Lortz, *Induction of the intrinsic apoptosis pathway in insulin-secreting cells is dependent on oxidative damage of mitochondria but independent of caspase-12 activation*. Biochimica et Biophysica Acta 2011; vol. 1813, no. 10, pp. 1827–1835.

- [208] Mandal P.K. *Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology*. J. Comp. Physiol. B, 2005;175: 221-230.
- [209] Lu Y.F., Santostefano M., Cunningham B.D., Threadgill M.D., Safe S. *Identification of 3'-methoxy-4'-nitroflavone as a pure aryl hydrocarbon (Ah) receptor antagonist and evidence for more than one form of the nuclear Ah receptor in MCF-7 human breast cancer cells*. Arch Biochem Biophys 1995; 316: 470-477.
- [210] Lu Y.F., Santostefano M., Cunningham B.D., Threadgill M.D., Safe S. *Substituted flavones as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists*. Biochem Pharmacol. 1996; 51: 1077-1087.
- [211] Gasiewicz T.A., Kende A.S., Rucci G., Whitney B., Willey J.J. *Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds*. Biochem Pharmacol. 1996; 52: 1787-1803.
- [212] Wilhelmsson A., Whitelaw M.L., Gustafsson J.A., Poellinger L. *Agonistic and antagonistic effects of alpha-naphthoflavone on dioxin receptor function*. J Biol Chem. 1994; 269: 19028-19033.
- [213] Wilhelmsson A., Cuthill S., Denis M., Wikström A.C., Gustafsson J.A., Poellinger L. *The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein*. EMBO J. 1990; 9: 69-76.
- [214] Kazlauskas A., Poellinger L., Pongratz I. *Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor*. J Biol Chem 1999; 274: 13519-13524.
- [215] Carver L.A., Jackiw V., Bradfield C.A. *The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system*. J Biol Chem 1994; 269: 30109-30112.
- [216] Whitelaw M.L., McGuire J., Picard D., Gustafsson J.A., Poellinger L. *Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92: 4437-4441.
- [217] Prodromou C. *Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery*. Annu Rev Biochem. 2006; 75: 271-294.

- [218] Novelli M., Piaggi S., De Tata V. *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreatic islets.* Toxicol Lett.; 156: 307-314, 2005.