

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Новокузнецкий научно-исследовательский  
химико-фармацевтический институт

# ВИЛИМ

## ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новосибирск  
2008

## ПРОИЗВОДНЫЕ АРИЛГЕТЕРОАЛКАНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ, ОБЛАДАЮЩИЕ ИММУНОАКТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ, КАК ЛИГАНДЫ AhR

При изучении иммуноактивных свойств новых производных арилгетероалканкарбоновых кислот было установлено, что среди соединений, представляющих ряд трис-(2-гидроксиэтил)аммониевых солей производных индолил-3-тиоуксусной кислоты, выявляются вещества с выраженными антипролиферативными свойствами, но при этом соединения малотоксичны, жизнеспособность клеток в культуре *in vitro* сохранялась нормальной. Одно из соединений – ВМ-7-02 (трис-(2-гидроксиэтил)аммониевая соль (1-бензилиндол-3-тио)уксусной кислоты) проявляет антипролиферативные свойства в культуре митоген-стимулированной пролиферации клеток селезенки интактных мышей и лимфоцитов крови человека, опухолевых клеток разных линий, стимулированной тестостероном пролиферации стволовых кроветворных клеток костного мозга мышей. Т-клеточное звено является наиболее чувствительным к антипролиферативному действию соединения ВМ-7-02, т.к. ConA-стимулированная пролиферация подавляется минимальной дозой. Иммунодепрессивные свойства соединения ВМ-7-02 выявляются в экспериментальных моделях Т-зависимой активации В-клеток (модель Th2-опосредованного иммунокомплексного гломерулонефрита и модель IgM-ответа на Т-зависимый антиген у интактных мышей). Не обнаружено какого-либо иммуотропного эффекта соединения ВМ-7-02 на клеточные реакции иммунитета – ГЗТ, РТПХ у интактных мышей.

При сравнении соединения ВМ-7-02 с известным иммунодепрессантом циклофосфаном показано, что наблюдаемая атрофия тимуса у животных связана не с апоптозом, а со снижением пролиферативной активности клеток тимуса («арест» в  $G_0+G_1$ ).

Перечисленные свойства, а также наличие в структуре этих соединений индола, позволяют предполагать участие арил гидрокарбонowego рецептора (AhR) в механизме иммуотропного действия производных арилгетероалканкарбоновых кислот.

AhR – член семейства транскрипционных факторов с основным доменом типа спираль-петля-спираль (Basic-helix-loop-helix, bHLH) и

только он один из всех активируется лигандами. Семейство этих транскрипционных факторов играет роль в восприятии и реагировании на такие стимулы окружающей среды как гипоксия, освещенность, ксенобиотики. Механизм активации AhR аналогичен тем, что описаны для других лиганд-активационных рецепторов и начинается с ранней стадии AhR-обусловленной индукции экспрессии гена CYP1A1 (Swanson, 1993; Wilson et al., 1998). Наиболее изученным и высокоаффинным лигандом AhR, индуцирующим экспрессию гена CYP1A1, является 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Активация гена CYP1A1 происходит в результате взаимодействия транскрипционных факторов с определенными регуляторными элементами в 5'-фланкирующем регионе CYP1A1. После связывания TCDD AhR перемещается в ядро, где гетеродимеризируется с белковым партнером – ядерным переносчиком AhR (Arnt), который связывается со специфическими распознающими последовательностями ДНК, локализованными на 5' конце от транскрипционного стартового сайта гена CYP1A1 и известными как DREs (dioxin-responsive elements) или XREs (xenobiotic-responsive elements). DREs обнаружены также в промоторных областях нескольких генов, ответственных за активацию, пролиферацию и дифференцировку клеток (Lai et al., 1996). В результате этих событий происходит изменение в структуре хроматина, которое облегчает связывание транскрипционных факторов с промотором CYP1A1. Работами последних лет показано, что TCDD индуцирует множество других генов (108 генов), которые ранее не были охарактеризованы (Frueh et al., 2001). Биологические эффекты агонистов AhR, связанные с индукцией других генов, включают клеточную пролиферацию (TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , PAI-2), регуляцию клеточного цикла (p27, jun-B), апоптоз (Bax), синтез ДНК и др. эффекты (Hankinson, 1995; Sogawa, Fujii-Kuriyama, 1997; Hahn, 1998; Kolluri et al., 1999; Mimura et al., 1999; Matikainen et al., 2001). Регуляции экспрессии генов AhR посвящены многочисленные исследования молекулярной токсикологии. AhR определяется во многих тканях и клетках (Carver et al., 1994; FitzGerald et al., 1996), что обуславливает широкий спектр биологических эффектов TCDD, включая туморогенез, тератогенез, атрофию тимуса (McGregor et al., 1998).

AhR – как лиганд-активационный рецептор активно изучается как мишень для поиска и создания противоопухолевых лекарственных средств селективного действия (Safe et al., 2002). Основанием для таких исследований послужили данные о том, что TCDD действует как антиэстроген. Впервые в 1978 году было показано, что длительное скармливание TCDD самкам крыс Sprague-Dawley приводило к увеличению количества опухолей в печени, но при этом уменьшались множественные возрастные спонтанные опухоли, включая эстроген-зависимые опухоли матки и молочной

железы (Kociba et al., 1978). Это было первым указанием на то, что TCDD способен блокировать эстроген-индуцированные (E2) митогенные и регуляторные эффекты и последующие *in vitro* и *in vivo* исследования продемонстрировали ингибиторное «crosstalk» взаимодействие между AhR и ER (эстрогеновый рецептор) путями сигналов (Safe et al., 2002). TCDD ингибирует различные E2 – индуцированные ответы *in vitro* в клетках рака молочной железы, включая пролиферацию клеток, синтез ДНК, транскрипцию генов и продвижение клеточного цикла, так же как E2 – индуцированные ответы в матке крыс, включая увеличение веса, пролиферацию клеток, транскрипцию генов, пероксидазную активность и ER связывание. Способность TCDD ингибировать образование опухолей в молочной железе и их рост подтверждено в различных спонтанных и в канцероген-индуцированных моделях опухолей молочной железы, а также у nude мышей с ксенотрансплантатами рака молочной железы. Более того, эпидемиологические данные свидетельствуют, что у женщин, подвергшихся воздействию TCDD в Seveso в 1976 г. (Италия) снижена частота рака молочной железы и рака эндометрия (Bertazzi et al., 1993). В исследованиях, проведенных через 15 лет (Bertazzi et al., 1997), показано, что на фоне увеличения в определенных группах (в соответствии с зоной поражения) смертности от рака желудочно-кишечного тракта, лейкоз, множественных миелом, б-ни Ходжкина, саркомы мягких тканей, не найдено увеличения смертности вообще от онкологической патологии или какой-либо выраженной специфичности (например, рака респираторных органов у мужчин или рака молочной железы у женщин).

При экспозиции самок крыс TCDD в низких дозах *in utero* или в период вскармливания у самок из потомства существенно снижался вес матки, количество дней эструса. (Faqi, Shaheed, 1998). Аналогичные данные получены в культуре клеток рака простаты: TCDD и селективный модулятор AhR – 6-метил-1,3,8-трихлордибензфуран (6-MCDF) тормозят рост этих клеток (Morrow et al., 2004). Изучение серии чередующихся замен алкил полихлорированных дибензфуранов (PCDFs) (типичный представитель – 6-метил-1,3,8-трихлордибензофуран) показало, что эти соединения связывают AhR с изменением аффинности и проявляют как AhR агонистическую, так антагонистическую активность. В модели крыс 6-MCDF блокирует многие токсические эффекты AhR, включая TCDD – индуцированную экспрессию CYP1A1, порфирию, иммуносупрессию и расщелину неба. Однако, 6-MCDF один проявляет антиэстрогенную активность и ингибирует канцероген-индуцированное образование опухолей молочной железы у крыс. Это привело к гипотезе, что т.н. селективные модуляторы AhR (SAhRMs) – являясь лигандами AhR, обладают антиэстрогенными эффектами, но у них отсутствуют транскрипционные эффекты TCDD, свя-

занные с токсичностью. Селективные модуляторы AhR могут применяться как противораковые препараты совместно с другими антиэстрогенными препаратами, такими как тамоксифен. Показано, что нет различий в молекулярных механизмах индукции CYP1A1 между TCDD and 6-MCDF. 6-MCDF проявляет активность агониста AhR в отношении индукции CYP1A1 в клетках линии Hepa-1 (Fretland et al., 2004). TCDD связывает AhR рецептор, но не эстрогеновый рецептор (ER), но тем не менее может вызывать значительные антиэстрогенные эффекты через «crosstalk» механизм. TCDD не конкурирует с эстрогенами за эстрогеновый рецептор (ER), но AhR частично блокирует связывание эстрогенового рецептора с элементами ответа эстрогенов (estrogen response elements) и тем самым блокирует эффекты эстрогенов. (Klinge et al., 1999). Показано, что взаимодействие AhR и ER приводит к down-регуляции некоторых эстроген-индуцированных генов, включая pS2, c-fos, катепсин, PR, белок теплового шока HSP27. Показано, что агонисты AhR индуцируют down-регуляцию ErbB1 белка и/или фосфорилирование во многих тканях/органах. Антиэстрогенные свойства и возможность down-регуляторного эффекта на семейство ErbB рецепторов агонистами AhR гарантирует будущее развитие селективных модуляторов AhR для химиотерапии рака молочной железы, где вещества будут обладать минимальной токсичностью, но сохранять антиэстрогенный эффект (Safe et al., 2002).

Основные биологические эффекты, связанные с TCDD и родственных соединений, хорошо известны – это в первую очередь нарушение эндокринных функций (disruption) и иммуносупрессия. Общий иммунотоксический эффект диоксина у различных экспериментальных животных – это иммунодепрессия и атрофия тимуса.

Показано, что перинатальная экспозиция TCDD приводит к атрофии тимуса и подавлению клеточного иммунитета и эти проявления выражены наиболее тяжело и стойко, чем экспозиция взрослого организма, т.е. период созревания иммунной системы особенно чувствителен к TCDD (Fine et al., 1989). Известно, что гемопоэтические прекурсоры, мигрирующие в тимус, являются дубль негативными клетками CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. В тимусе эти дубль негативные клетки-прекурсоры пролиферируют и дифференцируются в дубль позитивные CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клетки, которые далее дифференцируются в CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> или CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> клетки (Boyd et al., 1991). Перинатальная экспозиция TCDD снижает число дубль позитивных клеток и вызывает асимметричную дифференцировку в направлении CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Holladay et al., 1991).

Показано значительное снижение терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT) в лимфоцитах, что свидетельствует о повреждении лимфоцитарной популяции стволовых клеток у плодов и новорожденных

при экспозиции TCDD в дозе 10 µg/kg на 14 день гестации (Fine et al., 1989). Экспозиция TCDD во время гестации подавляет ГЗТ у потомства крыс при очень низких материнских дозах (Gehrs et al., 1997). Подавление ГЗТ у потомства крыс F344, получавших TCDD на 14 день гестации, является стойким во взрослом состоянии и наблюдается в дозе ниже, чем 0,1 µg/kg для самок, и более выражено у самцов, чем самок (Gehrs et al., 1999). Хотя механизм TCDD-индуцированной атрофии тимуса не полностью ясен, вовлечение p27 (Kip1) гена в ингибицию пролиферации тимоцитов обсуждается (Kolluri et al., 1999).

Несмотря на то, что высокие уровни AhR определяются в тимоцитах и клетках стромы тимуса, остается непонятным в каких клетках TCDD вызывает активацию AhR, что приводит к повреждению в тимусе. Некоторые исследователи предполагают, что стромальные элементы, первично эпителиальные клетки в тимусе являются первой мишенью в тимусе для TCDD. Другие авторы считают, что атрофия обусловлена прямым эффектом на тимоциты путем апоптоза или повреждением развития предшественников. На мышцах-химерах с TCDD-чувствительными (AhR<sup>+/+</sup>) стромальными компонентами и TCDD-нечувствительными (AhR<sup>-/-</sup>) гемопоэтическими компонентами (или наоборот) исследовали роль стромальных элементов против гемопоэтических элементов в TCDD-индуцированной атрофии тимуса. Показано, что мишенью для TCDD-индуцированной атрофии тимуса и фенотипического повреждения точно является гемопоэтический компартмент, а TCDD активация в эпителиальных клетках стромы не приводит к повреждению тимуса. Более того, изменения, наблюдаемые в популяции стволовых клеток у этих химер, также зависят от TCDD-обусловленной активации AhR в гемопоэтических элементах (Staples et al., 1998).

Исследование роли AhR в регуляции 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-индуцированного апоптоза Т-клеток тимуса показало, что мыши с нокаутированным AhR (AhRKO) были устойчивы к TCDD-индуцированной атрофии тимуса и апоптозу в сравнении с мышами, имеющими AhR. TCDD запускает несколько апоптотических генов, включая FasL у мышей с наличием AhR, но не у AhRKO мышей. При TCDD-индукции увеличивается FasL только в тимических стромальных, но не Т-клетках тимуса. При смешивании TCDD-обработанных клеток стромы с необработанными Т-клетками тимуса увеличение апоптоза определялось в Т-клетках, которые вовлекались в Fas-FasL взаимодействие. Но апоптоз в Т-клетках не определялся, когда TCDD-обработанные стромальные клетки брали от FasL-дефективных AhRKO мышей при смешивании с обычными Т-клетками (от мышей с AhR), или когда использовали стромальные клетки от мышей с AhR, обработанных TCDD, смешивали с Fas-дефицитными

Т-клетками. TCDD обработка *in vivo* и *in vitro* приводит к транслокации NFκB субъединиц (p50, p65) в ядро стромальных, но не Т-клеток у мышей с AhR. NFκB активация не наблюдалась в стромальных клетках, изолированных от обработанных TCDD AhRKO мышей. Мутации в NFκB-связывающих местах промотора FasL показали, что TCDD регулирует FasL промоторную активность через NFκB. Эти данные свидетельствуют, что AhR регулирует FasL и NFκB в стромальных клетках, которые играют критическую роль в инициации апоптоза в Т-клетках тимуса (Camacho et al., 2005).

Хотя супрессия первичного иммунного ответа лигандами AhR не совсем понятна, тем не менее исследуются эффекты агонистов AhR на иммунологическую память. Исследовали анамнестический ответ на вирус у мышей, обработанных TCDD. Через 2 или 3 месяца после первичной инфекции уровень вирус-специфического IgG был подавлен у мышей, обработанных TCDD, и сохранялся сниженным после реинфекции. Напротив, уровень IgA увеличивался у TCDD-обработанных мышей. Не наблюдали увеличения инфекций или смертности у мышей, обработанных растворителем или TCDD, и мыши в обеих группах освобождались от вируса в течение 3-х дней после реинфекции. С одной стороны, TCDD снижает первичный иммунный ответ, приводя к снижению уровня вирус-специфического IgG и уменьшению пула клеток памяти CD8. Однако вторичный ответ был тем не менее протективным. Эти данные имеют значение для понимания механизмов, по которым лиганды AhR неблагоприятно действуют на функцию лимфоцитов и понимания механизмов, которые контролируют приобретение иммунологической памяти (Lawrence et al., 2004).

Показано, что активация лейкоцитов продуцирует 6-кратное стойкое увеличение уровня mRNA AhR и конкордантное увеличение экспрессии белка AhR. Более того, активация лейкоцитов вызывает транслокацию AhR, связывание с DREs и транскрипцию CYP1A1 в отсутствие TCDD. Активированные лейкоциты показывают еще большее усиление связывания DREs AhR в присутствии TCDD, чем при его отсутствии. Эти данные подтверждают, что механизм, ответственный за чувствительность иммунокомпетентных клеток к TCDD может быть прямо связан со значительным увеличением экспрессии AhR, который сопровождает активацию лейкоцитов (Crawford et al., 1997).

Сконструированы AhR-дефицитные мыши, у которых проявляется изменение строения и клеточности селезенки с явным увеличением частоты инфекции. Оценивали иммунный ответ у двух линий мышей дефицитных по AhR 8-10-нед. возраста. Мышей иммунизировали двумя видами антигенов – аллогенными клетками мастоцитомы P815 и ЭБ, оценивали

гуморальный и клеточный иммунный ответ. Также изучали у этих AhR-дефицитных животных иммунный ответ после экспозиции иммуносупрессивной дозой TCDD. Показано, что AhR-дефицитные мыши развивают нормальный иммунный ответ на оба вида антигена и ни клеточный, ни гуморальный иммунный ответ не подавлялся при экспозиции TCDD. Иммунный ответ у мышей-гетерозигот AhR(+/-) менее чувствителен к TCDD, чем у мышей-гомозигот AhR(+/+). Полученные результаты подтверждают, что отсутствие AhR не влияет на функционирование иммунной системы, но подтверждают данные предыдущих исследований, указывающих на облигатную роль AhR в TCDD-индуцированной иммуносупрессии (Vogderstrasse et al., 2001).

Экспозиция половозрелых C57Bl/6 мышей TCDD вызывает подавление как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Хотя у мышей с нокаутированным AhR<sup>-/-</sup> *in vivo* показано, что иммунотоксичность TCDD определяется наличием AhR, но конкретные мишени, в которых происходит активация AhR, до недавнего времени не были определены. Связано это отчасти с множеством клеток, участвующих как в инициации, так и в реализации иммунного ответа. Кроме этого, отсутствуют какие-либо выраженные эффекты TCDD на иммунные функции в культуре *in vitro*. Показано, что у интактных животных TCDD подавляет Т-клеточные реакции *in vivo* (замедленную и контактную гиперчувствительность, образование CTL), но в культуре MLC он не влияет на пролиферацию Т-клеток и образование CTL. TCDD не влияет на способность клеток селезенки и клонов Т-клеток пролиферировать и продуцировать цитокины при поликлональной Т-клеточной стимуляции (Prell R.A. et al., 1995). Появление мышей с нокаутированным AhR<sup>-/-</sup> показало, что Т-клетки, несущие AhR – прямые мишени для этого ксенобитика. В полуаллогенной модели острой РТПХ (при переносе клеток родителя C57Bl/6 гибридам (C57Bl/6xDBA/2)F1) показано, что при введении TCDD F1 реципиентам и переносе Т-клеток только от мышей AhR<sup>+/+</sup>, но не от AhR<sup>-/-</sup> мышей, цитотоксический ответ подавляется. Полное подавление CTL ответа в модели острой РТПХ с помощью TCDD требует экспрессии AhR на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках (Kerkvliet et al., 2002). Показано, что активация AhR наблюдается в течение первых трех дней иммунного ответа и CD4<sup>+</sup> Т-клетки являются первичными мишенями. Используя модель острой РТПХ в полуаллогенной модели (перенос В6 клеток одного из родителей В6D2F1 реципиентам) показали, что активация AhR в клетках донора приводит к образованию субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих высокие уровни CD25 вместе с CD62L(low), CTLA-4 и глюкокортикоид-индуцированным TNFR. Эти донорские CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> клетки также проявляют функциональные характеристики регуляторных Т-клеток *in vitro*.



Эти данные подтверждают новую ранее неизвестную роль AhR в индукции регуляторных Т-клеток и обеспечивают новые перспективы в понимании механизмов иммуносупрессии, вызванной экспозицией TCDD. Сохраняется ли это положение для других лигандов – неизвестно (Funatake et al., 2005).

Известны несколько генов, экспрессирующих DREs в их промоторных регионах, которые играют роль в активации и дифференцировке Т-клеток, и могут являться потенциальными мишенями для TCDD в Т-клетках (Frueh et al., 2001). Однако только несколько генов прямо регулируются активацией AhR и эти данные получены на гепатоцитах. Например, многие ферменты I фазы метаболизма индуцируются активацией AhR в гепатоцитах (Okino, Whitlock, 2000), однако, их индукция и роль в функционировании Т-клеток не изучена. С другой стороны, ген ИЛ-2 играет важную роль в функционировании Т-клеток и, по-видимому, будет прямо регулироваться активацией AhR. Jeon и Esser (2000) показали, что промоторный регион гена ИЛ-2 мышей имеет 3 потенциальных DREs области, которые способны связывать лиганд-активированный AhR. Они также сообщают об индукции гена ИЛ-2 в тимоцитах после экспозиции TCDD *in vivo* и в клетках селезенки после стимуляции *in vitro* анти-CD3 антителами.

Хотя DRE-обусловленное нарушение транскрипции в результате активации AhR хорошо известный путь для TCDD иммунотоксичности, предполагается существование и других механизмов. О такой возможности сообщает Lawrence et al. (1996) – они не смогли определить DRE связывание AhR в Т-клетках мышей после воздействия TCDD. Lawrence et al. (1996) исследовали поведение AhR в Т-клетках, используя изолированные Т-лимфоциты селезенки и клоны Т-клеток, полученные от Ah-отвечающих линий мышей. Исследовали наличие AhR в целых клеточных экстрактах в интактных и активированных лимфоцитах селезенки. Увеличение активности 7-этоксирезорифин-о-диэтилазы (EROD) наблюдали в клетках селезенки и клонах Т-клеток; однако уровень EROD, индуцированный TCDD в Т-клетках, был примерно в 100 раз меньше, чем в индуцированных клетках печени. Поведение AhR в Т-клетках мышей исследовали путем TCDD-индуцированной транслокации ядра и связывания ДНК. Внутриклеточное распределение AhR изучали путем субклеточного фракционирования как интактных, так и активированных Т-клеток в присутствии или отсутствии TCDD. AhR определялся во всех исследованных типах клеток, но AhR, перенесенный в ядро, только в активированных, TCDD-обработанных Т-клетках. Хотя AhR, полученный от TCDD-обработанных клеток печени, связывается специфически с DRE, не обнаружено связывания идентичного количества AhR, полученного из активированных Т-клеток. Неспособ-

ность определить связывание ядра Т-клеток с AhR комплексом согласуется с наблюдениями о том, что трудно репродуцировать *in vitro* иммуно-токсические эффекты TCDD *in vivo*. Авторы полагают, что у Т-клеток могут отсутствовать фактор(ы), требуемые для связывания AhR с DRE, или, возможно, имеется супрессорный фактор, который блокирует связывание AhR и ДНК. Основываясь на этих данных, авторы считают, что TCDD, по-видимому, влияет на функцию Т-клеток через не прямые механизмы.

Предполагается, что лиганд-активированный AhR может связываться с другими транскрипционными факторами, такими как RelA компонент NFκB, индуцируя множественные функциональные модуляции экспрессии генов, контролируемые этими транскрипционными факторами (Kim et al., 2000). Известно, что NFκB широко экспрессируется клетками иммунной системы и играет важную роль как в развитии иммунной системы, так и ее функционировании.

Высказывается предположение, что иммуотропные эффекты могут реализовываться в результате взаимодействия между AhR и белком ретинобластомы, контролирующим прохождение клеточного цикла через фазу G1, транскрипционным репрессором COUP-TF, иммуофилин-подобными белками (Ge, Elferink, 1998; Klinge et al., 2000; Carver, Bradfield, 1997). Интересно, что иммунодепрессанты циклоспорин и FK506 реализуют эффекты через образование комплексов с иммуофилинами (Schreiber, 1991).

Природные лиганды AhR. Классические лиганды AhR – это полициклические диоксины, из которых 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) наиболее токсичен и полициклические бифенилы, которые широко представлены в окружающей среде. Недавно стало увеличиваться число исследований, в которых показано, что различные синтетические и структурно различные соединения натурального происхождения также проявляют тканеспецифические агонистическую и антагонистическую активности в отношении AhR. К ним относятся соединения растительного происхождения, которые проявляют множественные химиопротективные и противораковые активности, такие как флавоноиды, каротиноиды, индол-3-карбинол и ресвератрол.

1. Пищевые. Сообщается о большом количестве пищевых компонентов, которые активируют или блокируют сигнальные пути AhR. Такие пищевые растительные соединения, как индол-3-карбинол (Bjeldanes et al., 1991), 7,8-дигидрорутакарпин (Gillner et al., 1989), дибензоилметаны (MacDonald et al., 2001), куркумин (Ciolino et al., 1998), каротиноиды (Gradelet et al., 1996 a) и флавоноиды (Canivenc-Lavier et al., 1996) конкурентно связывают AhR и/или AhR-зависимую экспрессию генов. Более того, пищевые индолы, такие как индол-3-карбинол и триптофан, могут превращаться у млекопитающих в пищеварительном тракте в более аф-

финные лиганды AhR (Bjeldanes et al., 1991). Кислотно-катализируемая конденсация индол-3-карбинола приводит к образованию индоло-3-карбазола, который среди пищевых соединений имеет наибольшую аффинность для AhR и является потенциальным индуктором AhR-зависимой экспрессии гена. 3,3'-дииндолилметан продукт конденсации индол-3-карбинола является также агонистом AhR (Bjeldanes et al., 1991). Флавоноиды, такие как флавоны, флаванолы, флаваноны и изофлавоны, представляют большую группу пищевых фитохимических лигандов AhR. Большинство флавоноидов проявляют AhR антагонистическую активность, однако идентифицировано и много агонистов (Canivenc-Lavier et al., 1996). Эти соединения найдены во фруктах, овощах, чае и уровень в крови флавоноидов достаточен для индукции или ингибции AhR-зависимой активности (Nakagawa et al., 1997; Paganga, Rice-Evans, 1997).

2. Эндогенные. Хотя многочисленные синтетические и пищевые натуральные лиганды для AhR идентифицированы, но об эндогенных, физиологических лигандах для AhR известно мало. Тем не менее показано, что разрушение AhR (через антисенс или методом iRNA) приводит к уменьшению развития бластоцит мышей и нарушает регуляцию клеточного цикла в культуре клеток (Peters et al., 1995; Abdelrahim et al., 2003). Более того, развитие отклонений в печени и, возможно, в иммунной системе AhRKO мышей подтверждает, что существуют эндогенные лиганды для AhR у мышей (Fernandez-Salguero et al., 1995).

Идентифицировано несколько структурно различных эндогенных соединений, которые связывают AhR и/или активируют AhR-зависимую экспрессию генов. Эндогенные соединения, которые содержат индольные структуры, активируют AhR и большинство из них образуются из триптофана через биологические или физико-химические процессы. Несколько фотооксидантных продуктов триптофана конкурентно связывают AhR и активируют AhR-зависимую экспрессию генов (Wei et al., 1999).

Один из фотооксидантных продуктов идентифицирован как FICS, соединение очень близкое по структуре ICS, который образуется из индол-3-карбинола (Denison et al., 2003). Это подтверждает, что FICS и другие фотооксидантные продукты триптофана могут быть новыми химическими мессенджерами света аналогично другим молекулам триптофанового происхождения, таким как индолкарбоновая кислота (вовлечена в регуляцию роста растений) и сератонин (участвует в циркадном ритме млекопитающих) (Wei et al., 1999). AhR может быть другим членом суперсемейства PAS, которые активируются светом.

Метаболиты триптофана, такие как триптамин, индолкарбоновая кислота, также активируют AhR сигнальный путь. Хотя они имеют слабую активность и в норме в крови их концентрация низка, в условиях ингиби-

ции уровня моноаминоксидазной активности, уровень этих веществ становится достаточным для активации AhR сигнального пути (Heath-Pagliuso et al., 1998). Индиго и индирубин – метаболиты триптофана, которые могут образовываться при *cyp2A6/2C19/2E1*-зависимом метаболизме индолов (Gillam et al., 2000). Они выделены из мочи человека и проявляют AhR активность в дрожжевых клетках. Хотя уровни этих соединений в сыворотке человека не определены, индиго и индирубин в фетальной сыворотке коров были существенны для активации AhR в дрожжевых клетках (Adachi et al., 2001).

Тетрапиролы, такие как билирубин и биливердин – другая группа эндогенных соединений, которые связывают и активируют AhR. Персистентная экспрессия *cyp1A1* у крыс Gunn с врожденной желтухой подтверждает наличие эндогенных AhR лигандов (Kapitulnik, Gonzalez, 1993). Билирубин – первичный продукт гема определяется в высоком уровне в крови крыс Gunn и эффективно индуцирует экспрессию *cyp1A1* и DRE-зависимую активность в культуре в физиологических концентрациях (Kapitulnik, Gonzalez, 1993; Phelan et al., 1998). Биливердин – прекурсор билирубина также активирует DRE-зависимую транскрипцию гена (Denison et al., 2002). Некоторые метаболиты арахидоновой кислоты активируют AhR. Липоксин A4, липоксигеназный продукт AA, связывает AhR и индуцирует *cyp1A1* и DRE-зависимую экспрессию гена в концентрациях, близких к физиологическому уровню (Schaldach et al., 1999). Некоторые ПГ, включая ПGG<sub>2</sub>, также связывают AhR и активирует AhR-зависимую экспрессию гена, хотя в концентрации > 1 μM, которая значительно больше физиологической (Seidel et al., 2001). Эндогенные оккостеролы, 7-кетохолестерол связывают AhR и действуют, как антагонисты AhR. Более того, концентрация 7-кетохолестерола в крови достаточна для ингибции TCDD-индуцированной экспрессии генов в культуре (Savouret et al., 2001).

Представленные данные свидетельствуют об активном поиске как природных, так и синтетических соединений, модулирующих активность AhR, для лечения гормонзависимых опухолей молочной железы, матки, простаты; более того, ведется активный поиск селективных модуляторов этой активности. Проводятся исследования по изучению молекулярных механизмов эндогенных модуляторов активности AhR (билирубин, триптофан и др.), что может иметь значение для понимания регуляции функций иммунной системы и поиска новых молекулярных мишеней. Работа Funatake S.J. et al. (2005) является одной из первых, где сообщается о наличии активации AhR в течение первых трех дней иммунного ответа, о том, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки являются первичными мишенями. Более того, показана ранее неизвестная роль AhR в индукции регуляторных Т-клеток,

способных вызывать иммунодепрессию. В работе Kerkvliet N. et al. (2002) показано, что активация AhR в Т-клетках существенно нарушает способность клеток отвечать на антигенный стимул, а возможность «отменить» развитие острой РТПХ с помощью TCDD, дает основание для поиска других агонистов AhR. Данные о возможности лиганд-активированного AhR взаимодействовать не только с DREs, но и с другими транскрипционными факторами, белком ретинобластомы, иммунофилин-подобными белками, позволяет предполагать наличие других форм иммунодепрессии, изучение механизма действия которых открывает новые пути базисной иммунорегуляции и новые возможности иммунокорректирующей терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

- Abdelrahim M., Smith R., Safe S. 2003. Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells. *Mol Pharmacol* 63, 1373-81.
- Adachi J., Mori Y., Matsui S. et al. 2001. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276, 31475-8.
- Bertazzi A., Pesatori A.C., Consonni D. et al. 1993. Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin. *Epidemiology*. Sep; 4(5), 398-406.
- Bertazzi P.A., Zocchetti C., Guercilena S. et al. 1997. Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the "Seveso accident". *Epidemiology*. Nov; 8(6), 646-52.
- Bjeldanes L.F., Kim J.Y., Grose K.R. et al. 1991. Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9543-7.
- Boyd R., Hugo P. 1991. Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol Today* 12, 71-9.
- Camacho I.A., Singh N., Hegde V.L. et al. 2005. Treatment of mice with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin leads to aryl hydrocarbon receptor-dependent nuclear translocation of NF-kappaB and expression of Fas ligand in thymic stromal cells and consequent apoptosis in T cells. *J Immunol*. Jul 1; 175(1), 90-103.
- Canivenc-Lavier M.C., Vernevault M.F., Totis M. et al. 1996. Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology* 114, 19-27.
- Carver L.A., Hogenesch J.B., Bradfield C.A. 1994. Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 22, 3038-3044.
- Carver L.A., Bradfield C.A. 1997. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 11452-11456.
- Ciolino H.P., Daschner P.J., Wang T.T. and Yeh G.C. 1998. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 56, 197-206.

Crawford R.B., Holsapple M.P., Kaminski N.E. 1997. Leukocyte activation induces aryl hydrocarbon receptor up-regulation, DNA binding, and increased Cyp1A1 expression in the absence of exogenous ligand. *Mol Pharmacol*. Dec; 52 (6), 921-7.

Denison M.S., Pandini A., Nagy S.R. et al. 2002. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* 141, 3-24.

Denison M.S. and Nagy S.R. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-34.

MacDonald C.J., Ciolino H.P. and Yeh G.C., 2001. Dibenzoylmethane modulates aryl hydrocarbon receptor function and expression of cytochromes P50 1A1, 1A2 and 1B1. *Cancer Res* 61, 3919-24.

Faqi A.S., Chahoud I. 1998. Antiestrogenic Effects of Low Doses of 2,3,7,8-TCDD in Offspring of Female Rats Exposed Throughout Pregnancy and Lactation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61(4), 462-469.

Fernandez-Salguero P., Pineau T., Hilbert D.M. et al. 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722-6.

Fine J.S., Gasiewicz T.A., Silverstone A.E. 1989. Lymphocyte stem cell alterations following perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol* 35, 18-25.

FitzGerald C.T., Fernandez-Salguero P., Gonzalez F.J. et al. 1996. Differential regulation of mouse Ah receptor gene expression in cell lines of different tissue origins. *Arch Biochem Biophys*. Sep 1; 333(1), 170-178.

Fretland A.J., Safe S., Hankinson O. 2004. Lack of antagonism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin's (TCDDs) induction of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) by the putative selective aryl hydrocarbon receptor modulator 6-alkyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran (6-MCDF) in the mouse hepatoma cell line Hepa-1c1c7. *Chem Biol Interact*. Nov 20, 150(2), 161-70.

Frueh F.W., Hayashibara K.C., Brown P.O. et al. 2001. Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicol Lett* 122, 189-203.

Funatake C.J., Marshall N.B., Stepan L.B. et al. 2005. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol*. Oct 1; 175(7), 4184-8.

Ge N.L., Elferink C.G. 1998. A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein: linking dioxin signaling to the cell cycle. *J. Biol. Chem*. 273, 22708-22713.

Gehrs B.C., Riddle M.M., Williams W.C. et al. 1997. Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: II. Effects on the pup and the adult. *Toxicology*, 123, 229-40.

Gehrs B.C., Smialowicz R.J. 1999. Persistent suppression of delayed-type hypersensitivity in adult F344 rats after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology*, 134, 79-88.

- Gillam E.M., Notley L.M., Cai H. et al. 2000. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. *Biochemistry* 39, 13817-24.
- Gillner M., Bergman J., Cambillau C. et al. 1989. Interactions of rutaecarpine alkaloids with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis* 10, 651-4.
- Gradelet S., Astorg P., Leclerc J. et al. 1996 a. Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Xenobiotica* 26, 49-63.
- McGregor D.B., Partensky C., Wilbourn J. et al. 1998. An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* Apr; 106 (Suppl 2). 755-760.
- Hahn M.E., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121, 23-53.
- Hankinson O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 307-340.
- Heath-Pagliuso S., Rogers W.J., Tullis K. et al. 1998. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37, 11508-15.
- Holladay S., Lindstrom P., Blaylock B. et al. 1991. Perinatal thymocyte antigen expression and postnatal immune development altered by gestational exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Teratology* 44, 385-93.
- Jeon M-S., Esser C. 2000. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J. Immunol.*, 165, 6975-6983.
- Kapitulnik J. and Gonzalez F.J. 1993. Marked endogenous activation of the CYP1A1 and CYP1A2 genes in the congenitally jaundiced Gunn rat. *Mol Pharmacol* 43, 722-5.
- Kerkvliet N.I., Shepherd D.M., Baecher-Steppan L. 2002. T lymphocytes are direct, aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): AhR expression in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells is necessary for full suppression of cytotoxic T lymphocyte response by TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 185, 146-152.
- Kim D.W., Gazourian L., Quadri S.A., et al. 2000. The RelA NFkappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*.19, 5498-5506.
- Klinge C.M., Bowers J.L., Kulakosky P.C. et al. 1999. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR/AHR nuclear translocator (ARNT) Heterodimer Interacts with Naturally Occurring Estrogen Response Element. *Molecular and Cellular Endocrinology* 157(1-2), 105-19.
- Klinge C.M., Kaur K., Swanson H.I. 2000. The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptors COUP-TFI and ERRalpha. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 163-174.
- Kociba R.J., Keyes D.G., Beyer J.E. et al. 1978. Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 46, 279-303.
- Kolluri S.K., Weiss C., Koff A. et al. 1999. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev* 13, 1742-53.

Lai Z.V., Pineau T., Esser C. 1996. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' region of putative dioxin-inducible genes. *Chem.-Biol. Interact.* 100, 97-112.

Lawrence B.P., Leid M., Kerkvliet N.I. 1996. Distribution and behavior of the Ah receptor in murine T lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* Jun; 138(2), 275-84.

Lawrence B.P., Vorderstrasse B.A. 2004. Activation of the aryl hydrocarbon receptor diminishes the memory response to homotypic influenza virus infection but does not impair host resistance. *Toxicol Sci.* Jun; 79(2): 304-14. Epub 2004 Feb 19.

Mimura J., Ema M., Sogawa K. et al. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13, 20-5.

Morrow D., Qin C., Smith R. et al. 2004. Aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition of LNCaP prostate cancer cell growth and hormone-induced transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jan, 88(1), 27-36.

Nakagawa K., Okuda S. and Miyazawa T. 1997. Dose-dependent incorporation of tea catechins, (–)-epigallocatechin-3-gallate and (–)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 1981-5.

Okino S.T., Whitlock J.P. 2000. The aromatic hydrocarbon receptor, transcription, and endocrine aspects of dioxin action. *Vitam. Horm.* 59, 241-264.

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

Peters J.M., Wiley L.M., 1995. Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 134, 214-21.

Phelan D., Winter G.M., Rogers W.J. et al. 1998. Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys* 357, 155-63.

Prell R.A., Oughton J.A., Kerkvliet N.I. 1995. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on anti-CD3 induced change in T-cell subsets and cytokine production. *Int. J. Immunopharmacol.* 17, 951-961.

Safe S., McDougal A. 2002. Mechanism of action and development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of hormonedependent cancers (Review). *Int J Oncol* 20, 1123-8.

Savouret J.F., Antenos M., Quesne M. et al. 2001. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 276, 3054-9. Epub 2000 Oct 20.

Seidel S.D., Winters G.M., Rogers W.J. et al. 2001. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol* 15, 187-96.

Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y. 1997. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem (Tokyo)* 122, 1075-9.

Schaldach C.M., Riby J. and Bjeldanes L.F., 1999. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38, 7594-600.

Schreiber S.L. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science.* 251, 283-287.

Staples J.E., Murante F.G., Fiore N.C. et al. 1998. Thymic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells. *J Immunol.* Apr 15; 160(8), 3844-54.



Swanson H.I., Bradfield C.A. 1993. The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* 3, 213-30.

Vorderstrasse B.A., Steppan L. B., Silverstone A.E., Kerkvliet N. I. 2001. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice generate normal immune responses to model antigens and are resistant to TCDD-induced immune suppression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 171(3), 157-64.

Wei Y.D., Rannug U. and Rannug A. 1999. UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem Biol Interact* 118, 127-40.

Wilson C.L., Safe S. 1998. Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol. Pathol.* 26, 657-71.