



Роль ядерных рецепторов в регуляции биотрансформации ксенобиотиков

С. Н. Ларина, И. В. Игнатъев, Н. В. Чебышев, В. Г. Кукуес

*Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова,
Институт клинической фармакологии ФГУ НЦЭСМП, Москва*

Контактная информация: e-mail: elmed@yandex.ru

Изучение генетической регуляции ферментов, участвующих в метаболизме и выведении лекарств и ксенобиотиков, представляет большой интерес для понимания молекулярных механизмов ответа на лекарства. Гидрофобные лиганды и ряд ядерных рецепторов участвуют в индукции различных ферментов и транспортеров I, II и III фазы метаболизма ксенобиотиков. Ядерные рецепторы являются лиганд-активируемыми транскрипционными факторами. Эти белки модулируют регуляцию целевых генов, взаимодействуя с их промоторными или энхансерными последовательностями в специфических участках. Целевыми генами являются ферменты метаболизма, такие как цитохромы P450 (CYP), транспортеры и ядерные рецепторы. Лиганд-активируемые ядерные рецепторы играют важную роль в процессе восприятия токсических веществ, включая лекарства, вещества, загрязняющие окружающую среду и компоненты питания. Ключевым регулятором экспрессии CYP3A, метаболизирующего более 50 процентов лекарств у млекопитающих, является PXR ядерный рецептор. Сравнение аминокислотных последовательностей лиганд-связывающих доменов PXR различных видов животных выявило необычно широкую дивергенцию у ортологических рецепторов. Эти различия объясняют видовую специфичность в индукции P450 под действием различных лекарств.

Ключевые слова: биотрансформация, цитохром P450, ядерные рецепторы, видовые различия.

Изучение генетической регуляции ферментов метаболизма ксенобиотиков и белков-транспортеров является важной и актуальной проблемой молекулярной фармакологии и токсикологии.

За последние годы накоплена информация о структуре и функции генов, кодирующих белки семейства цитохрома P450 [20]. Геномы млекопитающих содержат по меньшей мере 17 семейств таких генов. Члены этих семейств кодируют от 50 до 80 различных белков у

разных видов [15]. У человека обнаруживают 57 генов P450 и 19 псевдогенов. Четыре генных семейства, а именно CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4¹, кодируют специфические ферменты печени, которые помимо своих основных эндогенных субстратов метаболизируют практически весь спектр ксенобиотиков (лекарства, токсины и пр.), попадающих в челове-

¹ Поскольку гены и кодируемые ими белки носят одни и те же названия, в тех случаях, когда речь идет о гене, название напечатано курсивом.

ческий организм. Данные гены имеют сложные и многоуровневые механизмы регуляции. Им свойственна тканеспецифическая экспрессия, регуляция эндогенными гормонами и цитокинами, индукция различными ксенобиотиками. Многие индукторы способны повышать содержание белков суперсемейства цитохрома P450 за счет изменения уровня транскрипции соответствующих генов. Подобная индукция является основным регулятором CYP P450-зависимого метаболизма [2]. Главную роль в биотрансформации ксенобиотиков и лекарственных средств играют члены подсемейства CYP3A. Ферменты, кодируемые генами данной группы, метаболизируют большинство известных лекарственных средств (ЛС).

Значительный прогресс в понимании механизмов индукции ферментов биотрансформации ксенобиотиков и лекарств был достигнут сравнительно недавно, когда была показана важная роль ядерных рецепторов, особенно прегнан X рецептора (PXR) и конститутивного андростанового рецептора (CAR). Эти рецепторы являются членами суперсемейства лиганд-активируемых ядерных транскрипционных факторов. Ядерные рецепторы распознают специфические последовательности в промоторах или энхансерах генов-мишеней и модулируют экспрессию генов, участвующих в биотрансформации.

Индукция ферментов семейства CYP3A

Более 30 лет назад было установлено, что под воздействием ряда токсических агентов, включая синтетический стероид PCN, происходит активация защитного ответа организма, включающая в себя экспрессию определенных изоформ цитохрома P450 [21]. PCN-индуцируемый

цитохром был выделен из клеток крыс, очищен и изучен. Этот фермент значительно отличался от известных на тот момент изоформ цитохрома P450. Анализ ДНК данного белка, получившего название CYP3A23, показал, что он является представителем нового генного семейства [7]. В настоящее время известно, что экспрессия гена CYP3A23 крысы может быть индуцирована широким спектром веществ, включая стероиды, дексаметазон, бетаметазон, гидрокортизон, α-метилпреднизолон, мифепристон, дегидроэпиандростерон, спиронолактон, триацетилолеандомицин (антибиотик), клотримазол, полихлорбифенилы, хлорорганические пестициды, никардинин (антагонист кальциевых каналов), метирапон (ингибитор 11-В-гидроксилазы), фенobarбитал и пр.

У человека гомолог CYP3A23 крысы представлен геном CYP3A4. Его продукт вовлечен в окислительный метаболизм многих веществ, включая большую часть известных ЛС, и в количественном отношении является главным цитохромом, синтезируемым в печени. Индукция данного гена широким спектром ксенобиотиков подтверждена экспериментально. Этот процесс лежит в основе клинически важных лекарственных взаимодействий, а потому привлекает к себе значительное внимание. Хотя первоначально повышение активности CYP3A было выявлено в экспериментах *in vivo*, при воздействии на пациента различных ЛС (дексаметазона, триацетилолеандомицина и рифампицина), большинство индукторов экспрессии гена CYP3A4 выявлено с использованием первичной культуры гепатоцитов человека (*in vitro*) [24]. Одним из наиболее сильных активаторов как *in vivo*, так и *in vitro*, оказался макролидный антибиотик рифампи-

цин [14]. Как и в случае гомологичного гена крысы *CYP3A23*, экспрессия гена *CYP3A4* индуцируется стероидами, включая дексаметазон, спиронолактон и ципротеронацетат [14]. Также индукторами *CYP3A4* являются многие ЛС: клотримазол (фунгицид), фенобарбитал, фенитоин, фенилбутазон, сульфидимидин, омепразол, лансопразол, метирапон и пр. [14].

Принципиально важно, что представители подсемейства *CYP3A* обладают видоспецифичными спектрами индукторов. Например, экспрессия генов *CYP3A4* человека и *CYP3A6* кролика одинаково сильно активируется рифампицином, тогда как ген *CYP3A23* крысы довольно слабо индуцируется этим ЛС [14]. Напротив, PCN является эффективным индуктором гена *CYP3A23* крысы, но довольно слабым – для генов *CYP3A4* человека и *CYP3A6* кролика. Эти данные свидетельствуют о существовании важных видоспецифических различий в работе рецепторов, которые в ответ на воздействие ксенобиотиков индуцируют экспрессию генов подсемейства *CYP3A*.

Несмотря на важность цитохрома P450, система биотрансформации и выведения ксенобиотиков, сформировавшаяся в процессе эволюции, включает в себя и белки-транспортёры (АТФ-зависимые мембранные транспортёры), которые «выбрасывают» молекулы токсических веществ из клеток, и ферменты биотрансформации, осуществляющие модификацию липофильных соединений (II фаза метаболизма), приводящую к повышению их гидрофильности и делающую их доступными для мочевого экскреции. Исследования обеих фаз метаболизма ксенобиотиков, а также их экскреции привели к выявлению сложной сети ядерных и стероидных рецепто-

ров, которые обладают общими индукторами, сходными ДНК-связывающими доменами и взаимодействуют с одними и теми же генами.

Ядерные рецепторы

За последние десять лет была выявлена целая группа белков (так называемые «орфан»-рецепторы), которые являются важными регуляторами процесса биотрансформации. В их числе: PXR-рецептор (регулирует ряд процессов, протекающих при беременности), CAR-рецептор (участвует в процессе андрогенеза), AhR-рецептор (запускает каскад реакций под воздействием ароматических углеводородов), PPAR α -рецептор (триггерный белок-переключатель), GR-рецептор (глюкокортикоидный рецептор), VDR-рецептор (рецептор витамина D) и многие другие. Эти рецепторы синтезируются в различных тканях и органах, участвующих в метаболизме и выведении ксенобиотиков, они обеспечивают молекулярную передачу сигналов непосредственно в клеточное ядро. В ядре такие сигналы (молекулы), взаимодействуя с регуляторными участками соответствующих генов, индуцируют (или модифицируют) их экспрессию.

Ядерные рецепторы обычно характеризуются наличием ДНК-связывающего домена типа «цинковые пальцы» (DBD) и С-концевого лиганд-связывающего домена (LBD). Сравнение аминокислотных последовательностей выявило высокое межвидовое сходство PXR-, CAR- и VDR-рецепторов. В то время как DBD-домены являются высоко консервативными, в структуре LBD-доменов наблюдаются различия, которые, по-видимому, и обеспечивают наблюдаемые видовые особенности метаболизма ксенобиотиков.

Уже изучены основные механизмы индукции экспрессии генов цитохромов P450 ксенобиотиками. Ведущая роль в этих процессах принадлежит трем «орфан»-рецепторам – CAR, PXR и PPAR α (табл. 1), которые участвуют в индукции экспрессии генов, принадлежащих к семействам CYP2, CYP3 и CYP4 [19]. В ответ на воздействие соответствующих сигнальных веществ (фенобарбитал для CAR-рецептора, прегненолон-6 α -карбонитрил и рифампицин для PXR-рецептора и клофибриновая кислота для PPAR α -рецептора) происходит их активация. Все эти рецепторы принадлежат к так называемому семейству ядерных рецепторов 1 (NR1). Они димеризуются с одним и тем же белком – RXR-рецептором. Образующийся комплекс перекрестно взаимодействует с широким спектром прочих внутриклеточных сиг-

нальных систем. Проведенные исследования позволяют предположить, что основной функцией этих рецепторов является регуляция активности цитохромов P450 в печени, в ответ на воздействие ксенобиотиков или эндогенных метаболитов. Поэтому ксенобиотики в ряде случаев могут вызывать нарушения эндогенной регуляции с соответствующими патофизиологическими последствиями.

Структура PXR-рецептора

Все ядерные рецепторы обладают сходными структурными элементами: высоко вариабельным N-концевым доменом, центральным ДНК-связывающим доменом (DBD) и терминальным С-концевым доменом (LBD), отвечающим за взаимодействие с лигандами [6, 16]. Высоко консервативный DBD-домен состоит из примерно 70 аминокислотных остатков,

Таблица 1

Взаимодействие лигандов с ядерными рецепторами и их действие на ферменты биотрансформации лекарств (Фаза I и II) и ABC-транспортёры (Фаза III) [19]

Лиганд	Ядерный рецептор	Распознаваемый ДНК-элемент	Регулируемый ген		
			Фаза 1	Фаза 2	Фаза 3
Ксенобиотики Фенобарбитал	CAR	DR-3, DR-4, DR-5, SR-6, ER-6	CYP2A6(+) CYP2B1(+) CYP2B6(+) CYP2C9(+) CYP2C19(+)	UGT1A1(+)	ABCC2(+) ABCC3(+) ABCC4(+)
Ксенобиотики Стероиды	SXR/PXR	DR-3, DR-4, DR-5, ER-6, ER-8	CYP1A2(+) CYP2B6(+) CYP2C9(+) CYP2C19(+) CYP3A4(+) CYP3A7 CYP7A1(-) CYP3A(+)	SULT2A1(+) UGT1A1(+) UGT1A3(+) UGT1A4(+)	ABCA1(+) ABCB1(+) ABCB11(+) ABCC1(+) ABCC2(+) ABCC3(+) ABCG2(+)
Жирные кислоты Фибраты	PPAR α	DR-1	CYP4A1(+) CYP4A3(+) CYP7A	UGT1A9(+) UGT2B4(+)	ABCA1(+) ABCC2(+) ABCD2(+) ABCD3(+)

формирующих два «цинковых пальца». Каждый «цинковый палец» образован четырьмя остатками цистеина, которые связываются с одним атомом цинка. LBD-домен содержит около 250 аминокислот. Его пространственная структура образует своеобразный гидрофобный «карман», в котором происходит связывание лиганда. Помимо этого, LBD-домен также содержит фрагменты, отвечающие за димеризацию, а также участок, активирующий транскрипцию генов-мишеней, так называемую AF-2-спираль (она располагается на самом конце домена) [6]. Когда происходит связывание лиганда, AF-2-спираль претерпевает конформационное изменение. В результате такой активации рецептор способен связываться с соответствующими белками-коактиваторами и инициировать транскрипцию. N-концевой домен ядерных рецепторов высоко вариабелен как по длине, так и по аминокислотному составу.

Для более полного понимания эволюции и биологической функции ядерных рецепторов подобные структуры изучались у различных видов. Проводился анализ гомологии LBD-доменов. Было показано, что все ядерные рецепторы обладают общностью происхождения от некой исходной структуры с последующей эволюционной дивергенцией [18].

Среди млекопитающих идентичность нуклеотидных последовательностей LBD-домена совпадает не более чем на 75%, что является необычно низким значением для ортологических ядерных рецепторов. Нуклеотидные последовательности, кодирующие LBD-домены ядерных рецепторов курицы и рыбы, имеют 49% и 52% гомологии с аналогичной последовательностью гена *PXR* человека и 54% и 44% гомологии с геном *CAR* человека соответственно. Этот уровень гомологии сопоставим с различия-

ми между самими генами *PXR* и *CAR* у млекопитающих. Построение дендрограммы на основании структур LBD-последовательностей показало, что *PXR*-рецепторы обезьяны, свиньи и собаки могут быть выделены в отдельную группу [18]. LBD-домены ядерных рецепторов этих видов показывают наибольшую степень гомологии с LBD-доменом *PXR*-рецептора человека (96%, 87% и 83% соответственно). Это позволяет предположить существование большего сходства в профилях активации *PXR*-рецепторов этих трех видов и человека по сравнению с другими видами животных.

DBD-домены *PXR*-рецепторов млекопитающих высоко консервативны и имеют гомологию аминокислотного состава более 95% [9].

В настоящее время для многих видов показано наличие генетического полиморфизма *PXR*-рецепторов. Различные изоформы возникают при альтернативном сплайсинге либо за счет существования альтернативных промоторов. Например, при сплайсинге внутри рамки считывания, приводящим к делеции 41 аминокислоты с N-конца LBD-домена *PXR*-рецептора мыши образуется изоформа *PXR2*, обладающая более узким диапазоном индукторов [13]. У человека был описан похожий вариант, в котором отсутствуют 37 аминокислот [4]. Второй, относительно редкий вариант *PXR*-рецептора человека, обозначенный *hPAR2*, возникает в результате добавления 39 аминокислот к N-концу *PXR*-рецептора. Пока неизвестно, как такая модификация влияет на его активность.

Недавно была описана структура гена *PXR* человека [8]. Он располагается на 3 хромосоме (локус 3q13-21), состоит из 10 экзонов и 9 интронов и имеет размер около 30 т.п.н. Первые два экзона транс-

крибируются только при синтезе изоформы hPAR2.

Регуляция работы PXR-рецептора

В исследованиях на клеточных моделях было показано, что из всех известных ядерных рецепторов PXR-рецепторы активируются самым широким спектром веществ. PXR-рецепторы человека и макаки резуса имеют сходные профили активации вследствие их высокой гомологии (96%). Профиль активации PXR-рецептора кролика также похож на таковой у приматов, за редким исключением. PXR-рецепторы собаки и свиньи обладают такими же широкими спектрами индукторов, как и PXR-рецепторы других млекопитающих. PXR-рецепторы различных видов животных (за исключением рыб) проявляют высокое сродство не только к ксенобиотикам, но также и к различным стероидам, включая желчные кислоты.

Исследования, проведенные на PXR-рецепторе мыши, показали эффективную активацию как классическим индуктором CYP3A PCN, так и антиглюкокортикоидами [13]. Эти данные позволили предположить, что PXR-рецептор играет важную роль в регуляции активности CYP3A. Между тем, хотя PCN и является эффективным активатором PXR-рецепторов у мышей и крыс, он в значительно меньшей степени способен активировать аналогичные структуры у кролика и человека. Напротив, рифампицин хорошо активирует PXR-рецепторы человека и кролика, но практически не активирует их у мышей и крыс [9]. При этом профили активации PXR-рецепторов пересекаются с профилями индукции CYP3A [9, 14]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что PXR-рецептор служит ключевым регу-

лятором экспрессии генов семейства CYP3A, а также, что именно особенности работы PXR-рецепторов определяют профили индукции CYP3A белков.

Спектр веществ, являющихся активаторами PXR-рецептора, постоянно расширяется, в том числе за счет ЛС (табл. 2) [12]. Среди ксенобиотиков, которые активируют PXR-рецепторы, известны такие индукторы системы CYP3A, как метирапон, клотримазол, фенобарбитал, спиронолактон и транснонахлор. Также активаторами PXR-рецепторов являются: нифедипин (блокатор кальциевых каналов), ритонавир (ингибитор ВИЧ протеазы), таксол (цитостатик), тамоксифен и 4-гидрокситамоксифен, троглитазон, ловастатин, дифенол А, диэтилгексилфталат, нонилфенол и пр. [12].

Недавно сообщалось об открытии первого ингибитора PXR-рецептора. Мощный цитостатик эктеинасидин-743 (ET-743) блокирует его работу (как следствие, прекращается индукция генов CYP3A4 и MDR1) в опытах *in vitro* [22].

Механизм взаимодействия PXR-рецептора с генами-мишенями

Ядерные рецепторы регулируют транскрипцию целевых генов путем связывания со специфическими фрагментами ДНК. Члены подсемейства NR1, которое включает в себя PXR-рецепторы, функционируют в виде гетеродимеров с RXR-рецептором и связываются с участком ДНК, состоящим из двойной последовательности AG(G/T)TCA [15].

Необходимость RXR-рецептора как обязательного партнера димеризации для PXR-рецептора была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* на мышцах, когда выключение гена RXR приводило к прекращению прохождения сигнала через PXR-рецептор [23]. А воздействие

Таблица 2

Действие лекарств на PXR человека [12]

Лекарственное средство	Терапевтическое применение
Клотримазол	Противогрибковое
Ципротерона ацетат	Антиандрогенное
Дексаметазон	Противовоспалительное
Глутетимид	Седативное
4-Гидрокситамоксифен	Противораковое
Ловастатин	Понижающий уровень холестерина
Метирапон	Для диагностики заболевания
Мифепристон (RU486)	Абортивное
Нифедипин	Антиангинальное
Паклитаксел	Противораковое
Фенобарбитал	Противосудорожное, седативное
Рифампицин	Антибиотики
Ритонавир	Ингибитор протеазы ВИЧ
Гиперфорин	Антидепрессанты
Спиринолактон	Антигипертензивное
Тамоксифен	Противораковое
Троглитазон	Противодиабетическое

дексаметазона, повышая уровень экспрессии гена *RXR* человека, приводило к увеличению эффективности работы PXR-рецептора (количество гетеродимеров PXR/RXR возрастало). Таким образом, RXR-рецептор играет центральную роль в регуляции многих метаболических путей. Поэтому его можно рассматривать как еще один важный элемент контроля PXR-опосредованной регуляции гена *CYP3A4*, особенно в ситуации, когда концентрация RXR-рецептора является лимитирующим фактором.

Строение опознаваемой последовательности (взаимная ориентация повторов и расстояние между ними) опреде-

ляет, какие именно гетеродимеры могут с ней связываться. Например, гетеродимеры RXR-рецептора с VDR-рецептором, с рецептором тиреоидного гормона и с PXR-рецептором связываются с последовательностью, состоящей из двух прямых повторов со спейсерным участком в 3–5 п.н. [15]. Гетеродимер PXR/RXR также связывается с последовательностью DR-3, входящей в состав промоторов генов *CYP3A23* и *CYP3A2* [20] и в состав энхансера гена *CYP3A4*, а также с последовательностью ER-6 промотора гена *CYP3A4*.

PXR-рецептор способен взаимодействовать с целым рядом регуляторных последовательностей (ER6, DR3 и DR3 и пр.) в генах суперсемейства цитохромов P450 у разных видов.

Кроме последовательностей DR3, DR4 и ER6, гетеродимер PXR/RXR способен связываться с последовательностью DR-5, входящей в состав промоторных областей ряда генов (различные члены семейства *CYP2B* [25], *MDR1* [5]), а также с последовательностью ER-8, расположенной в 5-концевом участке гена *MRP2* [10]. Таким образом, комплекс PXR/RXR способен связываться с регуляторными элементами различного строения. Интересно, что PXR/RXR-комплекс не формируется без активации веществами, которые связываются с RXR-компонентом гетеродимера.

С другой стороны, у крысы ксенобиотики, индуцирующие *CYP3A*, являются также одновременно индукторами и лигандами PXR-рецептора. Предстоит выяснить, является ли этот механизм частным примером или он носит общий характер. Если подобная

система регуляции существует и у человека, она может вызывать различные лекарственные взаимодействия. Например, при комбинированной терапии ВИЧ-инфицированных пациентов ингибиторами ВИЧ-протеазы (ритонавир, субстрат CYP3A4) и противотуберкулезными ЛС (изониазид, рифампицин).

Любопытно также то, что некоторые индукторы CYP3A также являются индукторами гликопротеина Р, кодируемого геном *MDR1*, что объясняют наличием общих регуляторных последовательностей в промоторах данных генов [5].

Генетический полиморфизм PXR-рецептора

Уровень экспрессии CYP3A4 в печени разных людей может различаться в 50 и более раз, что вызывает значительную индивидуальную вариабельность метаболизма ЛС [10]. Немалая часть этих различий является следствием генетического полиморфизма. Для гена CYP3A4 на настоящий момент не описано ни одного полиморфного варианта, который бы встречался с частотой, достаточной для объяснения широкой фенотипической вариабельности. Из этого было сделано предположение, что такая вариабельность может быть объяснена полиморфизмом гена *PXR*. Для данного гена уже описано около 40 однонуклеотидных замен, из которых семь приводят к аминокислотным заменам в последовательности белка. Из этих семи замен четыре (R122Q, V140M, D163G и A370T) были ассоциированы с изменением ответа на рифампицин. Однако частота минорного аллеля каждого из этих полиморфизмов была меньше 2%, что также не позволяет использовать их для объяснения широкой фенотипической вариабельности лекарственного метаболизма [12].

Роль PXR-рецептора в биотрансформации ксенобиотиков и лекарств

Идентификация и характеристика PXR-рецептора была важным событием в изучении системы защиты организма от воздействия ксенобиотиков [13]. Экспрессия гена *PXR* индуцируется большим числом эндогенных и экзогенных веществ, включая стероиды, антибиотики, противогрибковые вещества, желчные кислоты и антидепрессанты. Изучение трехмерной структуры LBD-домена PXR-рецептора показало, что он имеет большую сферическую лиганд-связывающую «полость», которая позволяет взаимодействовать с широким спектром гидрофобных веществ. Таким образом, в отличие от других ядерных рецепторов, которые имеют узкий спектр лигандов, PXR-рецептор выступает как общий сенсор для большого количества различных гидрофобных токсинов. PXR-рецептор в составе гетеродимера с рецептором 9-цисретиновой кислоты (NR2B) взаимодействует с регуляторными районами многих генов, контролирующих метаболизм ксенобиотиков. Опыты на трансгенных мышах подтвердили, что PXR-рецептор является регулятором экспрессии генов семейства CYP3A [26]. Поэтому его активация различными ЛС создает молекулярную основу для лекарственных взаимодействий. Исследования, направленные на изучение работы PXR-рецептора, крайне важны при разработке новых ЛС.

Индукция экспрессии CYP3A4 является основой лекарственного взаимодействия, при котором одно ЛС усиливает метаболизм другого. Большинство ЛС индуцируют CYP3A4 через активацию PXR-рецептора. К примеру, экстракт зве-

робоя вызывает ускорение метаболизма ЛС, являющихся субстратами CYP3A4 и CYP2C9. Предположительно механизм этого процесса включает в себя участие PXR-рецептора. В опытах *in vitro* экстракт зверобоя действительно активировал PXR-рецептор. Анализ различных компонентов экстракта показал, что повышение активности PXR-рецептора обеспечивалось единственным компонентом – гиперфоринном [17].

Тот факт, что PXR-рецептор является причиной лекарственного взаимодействия, имеет важное фармакологическое значение. Изначально выявление индукторов гена CYP3A4 осуществлялось на поздних стадиях разработки ЛС с использованием первичных культур гепатоцитов человека, поскольку имеющиеся животные модели недостаточно релевантны [1]. Такие тесты требуют больших временных и финансовых затрат, кроме того, их результаты плохо воспроизводятся, если материал берется из различных источников. Поскольку модификация экспрессии гена CYP3A4 происходит через PXR-рецептор, то исследования *in vitro* позволяют относительно быстро и недорого выяснять, взаимодействует ли данное ЛС с PXR-рецептором, причем результаты таких тестов хорошо воспроизводятся. Довольно большой список лекарств-кандидатов может быть быстро протестирован на взаимодействие с PXR-рецептором. В зависимости от результатов одни ЛС могут быть заменены другими, со сходным терапевтическим эффектом, но не взаимодействующими с PXR-рецептором. Например, троглитазон (препарат для терапии сахарного диабета) является сильным антагонистом PXR-рецептора [9]. У человека в случае лекарственно-

го взаимодействия он вызывает резкий гепатотоксический эффект. По этой причине данный препарат был снят с продажи. Аналогичные по своим терапевтическим свойствам пиоглитазон и росиглитазон не взаимодействуют с PXR-рецептором и не проявляют этих вредных эффектов. Тест на взаимодействие с PXR-рецептором также быстро и недорого позволяет проверять препараты растительного происхождения и биодобавки на способность изменять экспрессию CYP3A4.

Связь PXR-рецептора с CAR-рецептором

Наиболее близким к PXR-рецептору является CAR-рецептор. Структуры DBD- и LBD-доменов этих двух рецепторов имеют приблизительно 70% и 50% гомологии соответственно [3]. CAR-рецептор запускает каскад биохимических реакций в ответ на воздействие фенобарбитала.

В неактивном состоянии CAR-рецептор локализуется в цитоплазме [11]. Фенобарбитал активирует CAR-рецептор, способствуя его перемещению в ядро. Интересно, что фенобарбитал не активирует CAR-рецептор путем непосредственного связывания с его LBD-доменом. По-видимому, фенобарбитал воздействует на CAR-рецептор через опосредованный механизм, включающий фосфорилирование, поскольку ингибиторы фосфатазы блокируют его действие [11].

Исходно было показано, что CAR- и PXR-рецепторы контролируют работу генов CYP2B и CYP3A соответственно [13]. Затем было обнаружено, что PXR-рецептор также способен регулировать гены CYP2B [25]. Перекрывание целевых генов для PXR и CAR-рецепторов распространяется не только на семей-

ства CYP2B и CYP3A. Также происходит совместная регуляция генов семейства CYP2C, генов GST-семейства, генов, кодирующих сульфотрансферазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы и гена MRP2 [25]. Все это позволяет предположить наличие своеобразной «функциональной избыточности» сигнальных путей CAR- и PXR-рецепторов.

PXR- и CAR-рецепторы имеют пересекающиеся спектры лигандов, однако у CAR-рецептора этот спектр уже, чем у PXR-рецептора. Это объясняется предположительно, особенностями строения LBD-домена.

Сенсоры ксенобиотиков являются частью сложной сети транскрипционных факторов [21]. Поэтому PXR и CAR-рецепторы способны в определенной степени компенсировать потерю или дефект функции друг друга, что может объяснить отсутствие четкого и однозначного фенотипа у PXR(-) и CAR(-) нокаутных мышей.

Выводы и перспективы

В обзоре рассмотрена роль ядерных рецепторов в защите организма от ксенобиотиков. Наибольшее значение имеет PXR-рецептор. Он регулирует гены подсемейства CYP3A, а также целую группу других генов, экспрессирующихся преимущественно в печени и кишечнике, продукты которых вовлечены в метаболизм и элиминацию потенциально токсичных веществ. Ген PXR активируется большим количеством различных

веществ, включая ксенобиотики и ксеногенные эндогенные метаболиты, как жирные кислоты и стероиды. PXR-рецептор является сенсором широкого спектра веществ. Несмотря на то, что данный белок является в некотором смысле «разборчивым» рецептором, существуют интересные различия в механизмах индукции у различных видов животных. Поскольку основная функция рецептора — защита организма от действия широкого спектра ксенобиотиков, он является причиной осложнения одновременном применении нескольких лекарственных средств. Установлено, что активация PXR-рецептора вызывает целый класс опасных для жизни побочных взаимодействий, при которых одно вещество усиливает метаболизм другого. Дальнейшее изучение лигандов данного рецептора позволит открыть новые ЛС, не вызывающие лекарственных взаимодействий. Детальный анализ пространственной структуры домена PXR-рецептора может позволить в ближайшем будущем описывать свойства того или иного лекарственного средства еще до того, как оно будет синтезировано и испытано. Это приведет к значительному повышению безопасности в процессе начальных стадий химических исследований. Изучение гомологичных рецепторов и профилей активации у различных видов животных позволит выявить наиболее релевантные модели для изучения лекарственных средств *in vivo*.

Список литературы

1. Barwick J. L., Quattrochi L. C., Mills A. S. et al. Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures

of adult rat and rabbit hepatocytes // *Molecular Pharmacology*. 1996. Vol.50. P. 10–16.

2. Conney A. H. // *Cancer Res*. 1987. P. 4875–4917.

3. Dotzlaw H., Leygue E., Watson P. L. The human orphan receptor PXR RNA is expressed in both nor-

neoplastic breast tissue // Clin. Cancer Res. 1999. Vol.5. P. 2103–2107.

4. **Elshourbagy N. A., Guzelian P. S.** Separation, purification, and characterization of novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone-16 α -carbonitrile // J. Biol. Chem. 1980. Vol.255. P. 1279–1285.

5. **Geick A., Eichelbaum M., Burk O.** Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin // J. Biol. Chem. 2001. Vol.276. P. 14581–14587.

6. **Giguere V.** Orphan nuclear receptors: from gene to function // Endocr. Rev. 1999. Vol.20. P. 689–725.

7. **Hardwick J. P., Gonzalez F. J., Kasper C. B.** Cloning of DNA complementary to cytochrome P-450 induced by pregnenolone-16 α -carbonitrile. Characterization of its mRNA, gene, and induction response // J. Biol. Chem. 1983. Vol.258. P. 10182–10186.

8. **Hustert E., Zibat A., Presecan-Siedel E. et al.** Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYR3A4 // Drug Metab. Dispos. 2001. Vol.29. P. 1454–1459.

9. **Jones S. A., Moore L. B., Shenk J. L. et al.** The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution // Mol. Endocrinol. 2000. Vol.14. P. 27–39.

10. **Kast H. R., Goodwin B., Tarr P. T. et al.** Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor // J. Biol. Chem. 2002. Vol.277. P. 2908–2915.

11. **Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I. et al.** Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYR2B gene // Mol. Cell Biol. 1999. Vol.19. P. 6318–6322.

12. **Kliwer et al.** // Endocrine Reviews. 2002. Vol.23(5). P. 687–702.

13. **Kliwer S. A., Moore J. T., Wade T. M. et al.** An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway // Cell. 1998. Vol.92. P. 73–82.

14. **Kocarek T. A., Schuetz E. G., Storm S. C. et al.** Comparative analysis of cytochrome

P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes // Drug Metab. Dispos. 1995. Vol.23. P. 415–421.

15. **Mangelsdorf D. J., Evans R. M.** The RXR heterodimers and orphan receptors // Cell. 1995. Vol.83. P. 841–850.

16. **Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M. et al.** The nuclear receptor superfamily: the second decade // Cell. 1995. Vol.83. P. 835–839.

17. **Moore L. B., Parks D. J., Jones S. A. et al.** Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands // J. Biol. Chem. 2000. Vol.275. P. 15122–15127.

18. **Moore L.** Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) and Beuroate Receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of Nuclear Receptor // Mol. Endocrinol. 2002. Vol.16, №5. P. 977–986.

19. **Nakata K., Tanaka Y., Nakano T. et al.** Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II and III xenobiotic metabolizing systems // Drug Metab. Pharmacokinet. 2006. Vol.21, №6. P. 437–457.

20. **Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T. et al.** // Pharmacogenetics 1996. Vol.6. P. 1–42.

21. **Pascussi J., Jounaidi Y., Drocourt L. et al.** Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999. Vol.260. P. 377–381.

22. **Synold T. W., Dussault I., Forman B. M.** The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux // Nat. Med. 2001. Vol.7. P. 584–590.

23. **Wan Y. U. Y., An D., Cai Y. et al.** Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver // Molecular and Cellular Biology. 2000. Vol.20. P. 4436–4444.

24. **Watkins P. B., Wrighton S. A., Maurel P. et al.** Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol.82. P. 6310–6314.

25. **Xie W., Barwick J. L., Simon C.M. et al.**

Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR // *Genes Dev.* 2000. Vol.14. P. 3014–3023.

26. Xie W., Barwick J. L., Downes M. et al. Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR // *Nature.* 2000. Vol.406. P. 435–439.

Nuclear receptors in regulation of xenobiotic biotransformation

S. N. Larina, I. V. Ignatiev, N. V. Tchebyshev, V. G. Kukes

Studies of genetic regulation processes involved in xenobiotic metabolizing enzymes and drug transporters are of great interest to understand molecular mechanism of drug response. Hydrophobic ligands and several nuclear receptors are involved in the induction of various enzymes and transporters involved in Phase I, II and III xenobiotic metabolizing systems. Nuclear receptors form a family of ligand-activated transcription factors. These proteins modulate the regulation of target genes interacting by promoter or enhancer sequences at specific recognition sites. These target genes include metabolizing enzymes, cytochrome P450 (CYP), transporters and nuclear receptors. Ligand activated nuclear receptors play essential role in sensing of xenobiotic substances including drugs, environment chemical pollutant and nutritional ingredients. PXR is a key regulator of CYP3A expression, metabolizing more 50% prescribed drugs in mammals. Amino acid sequence comparison of the ligand binding domains of different PXR orthologs revealed an unusual high divergence. This divergence explains the species differences observed in P450 induction by different drugs.

Key words: biotransformation, cytochrome P450, nuclear receptors, species differences.