

## Ядерные рецепторы и метаболизм ксенобиотиков

С. Н. ЛАРИНА, И. В. ИГНАТЬЕВ, Н. В. ЧЕБЫШЕВ, В. Г. КУКЕС

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

### Nuclear Receptors and Metabolism of Xenobiotics

S. N. LARINA, I. V. IGNATIEV, N. V. CHEBYSHEV, V. G. KUKES

I. M. Sechenov Moscow Medical Academy. Institute of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Investigation of Medicinal Products, Moscow

#### Введение

Изучение биохимии метаболизма ксенобиотиков и роли в ней ферментов суперсемейства цитохрома P450 является важной и актуальной проблемой молекулярной фармакологии и токсикологии.

За последние годы накоплена информация о структуре и функции генов, кодирующих белки семейства цитохрома P450 [1]. Геномы млекопитающих содержат, по меньшей мере, 17 семейств таких генов. Члены этих семейств кодируют более 50 различных белков [2]. Четыре генных семейства, а именно *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* и *CYP4\**, кодируют специфические ферменты печени, которые, помимо своих основных эндогенных субстратов, метаболизируют практически весь спектр ксенобиотиков (лекарства, токсины и пр.), попадающих в человеческий 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 счёт изменения уровня транскрипции соответствующих генов. Подобная индукция является основным регулятором CYP P450-зависимого метаболизма [3]. Белки-цитохромы P450, кодируемые другими 13 генными семействами (*CYP5*, *CYP7*, *CYP8*, *CYP11*, *CYP17*, *CYP19*, *CYP21*, *CYP24*, *CYP26*, *CYP27*, *CYP39*, *CYP46* и *CYP51*), обычно не метаболизируют ксенобиотики. Они участвуют в метаболизме эндогенных веществ: продукты генов *CYP5* и *CYP8* участвуют в метаболизме тромбосанов и простаглицлинов; белки, кодируемые генами *CYP11*, *CYP17*, *CYP19* и *CYP21*, принимают участие в биосинтезе стероидных гормонов; продукты генов *CYP7*, *CYP24*, *CYP27* и *CYP51* катализируют ги-

дроксилирование при биосинтезе жёлчных кислот; *CYP26* играет важную роль в биосинтезе ретиноевой кислоты и т. д. Эти «биосинтетические» цитохромы также обладают тканеспецифичной регуляцией [4]. Главную роль в биотрансформации ксенобиотиков и лекарственных средств играют члены подсемейства *CYP3A*. Ферменты, кодируемые генами данной группы, метаболизируют большинство известных лекарственных средств (ЛС).

#### 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 определённых изоформ цитохрома P450 [5]. PCN-индуцируемый цитохром был выделен из клеток крыс, очищен и изучен. Этот фермент значительно отличался от известных на тот момент изоформ цитохрома P450. Анализ кДНК белка, получившего название CYP3A23, показал, что он является представителем нового генного семейства [6]. В настоящее время известно, что экспрессия гена *CYP3A23* крысы может быть индуцирована широким спектром веществ, включая стероиды, дексаметазон, бетаметазон, гидрокортизон,  $\alpha$ -метилпреднизолон, мифепристон, дегидроэпиандростерон, спиронолактон, триацетиллеандомицин (антибиотик), клотримазол, полихлорбифенилы, хлорорганические пестициды, никардипин (антагонист кальциевых каналов), метирапон (ингибитор 11-В-гидроксилазы), фенбарбитал и др.

У человека гомолог *CYP3A23* крысы представлен геном *CYP3A4*. Его продукт вовлечён 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

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а. ГНЦА

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

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*) [7]. Одним из наиболее сильных активаторов как *in vivo*, так и *in vitro* оказался макролидный антибиотик рифампицин [8]. Как и в случае гомологичного гена крысы *CYP3A23*, экспрессия гена человека *CYP3A4* индуцируется стероидами, включая дексаметазон, спиронолактон и ципротеронацетат [8]. Также индукторами *CYP3A4* являются многие ЛС: клотримазол (фунгицид), фенобарбитал, фенитоин, фенилбутазон, сульфидимидин, омепразол, лансопризол, метирапон и пр. [8].

Принципиально важно, что представители подсемейства генов *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 [8]. 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 рецепторов, 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 углеводов), PPAR $\alpha$ -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 высококонсервативными, 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 $\alpha$ , которые участвуют в индукции экспрессии генов, принадлежащих к семействам *CYP2*, *CYP3* и *CYP4*. В ответ на воздействие соответствующих сигнальных веществ (фенобарбитал для CAR-рецептора, прегненолон-6 $\alpha$ -карбонитрил и рифампицин для PXR-рецептора и клофибриновая кислота для PPAR $\alpha$ -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 перекрёстно взаимодействует с широким спектром прочих внутриклеточных сигнальных систем. Проведённые 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: высоковариабельным N-концевым доменом, центральным ДНК-связывающим доменом (DBD) и терминальным С-концевым доменом (LBD), отвечающим за взаи-

модействие с лигандами [9, 10]. Высококонсервативный DBD домен состоит из примерно 70 аминокислотных остатков, 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) [10]. 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 высоковариабелен как по длине, так и по аминокислотному составу.

В 1997 году был клонирован ген *PXR* из генома мыши. Собственно тогда рецептор и получил свое название [11]. Ген, кодирующий *PXR*-рецептор человека был клонирован позднее тремя независимыми группами. Соответственно, помимо названия «*PXR*», он имеет еще два альтернативных — «*PAR*» и «*SXR*». В обзоре, для удобства, мы называем его *PXR*.

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 [12].

Среди млекопитающих идентичность нуклеотидных последовательностей LBD домена совпадает не более чем на 75%, что является необычно низким значением для ортологичных 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 различиями 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 [12]. 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 больше-

го сходства в профилях активации *PXR*-рецепторов этих трех видов и человека, по сравнению с другими видами животных.

DBD домены *PXR*-рецепторов млекопитающих высококонсервативны и имеют гомологию аминокислотного состава более 95% [13].

В настоящее время для многих видов показано наличие генетического полиморфизма *PXR*-рецепторов. Различные изоформы возникают при альтернативном сплайсинге, либо за счёт существования альтернативных промоторов. Например, при сплайсинге внутри рамки считывания, приводящем к делеции 41 аминокислоты с N конца LBD домена *PXR*-рецептора мыши, образуется изоформа *PXR2*, обладающая более узким диапазоном индукторов [11]. У человека был описан похожий вариант, в котором отсутствует 37 аминокислот [14]. 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 [15]. 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 транскрибируются только при синтезе *hPAR2* изоформы.

## 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 (за исключением рыб) проявляют высокое сродство не только к ксенобиотикам, но также и к различным стероидам, включая жёлчные кислоты. Однако каждый рецептор имеет свой собственный, несколько отличный от других, профиль активации. Например, *PXR*-рецепторы курицы и рыбы активируются меньшим числом различных жёлчных кислот, чем *PXR*-рецепторы других видов. Возможно, у данных видов активация *PXR*-рецепторов жёлчными кислотами не выполняет гепатопротекторную функцию. Напротив, *PXR*-рецепторы собаки и свиньи активируются в большей степени жёлчными кислотами, чем какими-либо другими стероидами. Эти данные позволяют предположить, что у разных видов *PXR*-

рецептор эволюционировал по пути распознавания различных стероидов. Уникальный профиль активации PXR-рецепторов, вероятно, отражает видоспецифические различия метаболизма желчных кислот.

Исследования, проведенные на PXR-рецепторе мыши, показали эффективную активацию как классическим индуктором СУР3А РСN, так и антиглюкокортикоидами [11]. Эти данные позволили предположить, что PXR-рецептор играет важную роль в регуляции активности СУР3А. Между тем, хотя РСN 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 [13]. При этом профили активации PXR-рецепторов пересекаются с профилями индукции СУР3А [8, 13]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что PXR-рецептор служит ключевым регулятором экспрессии генов СУР3А семейства, а также что именно особенности работы PXR-рецепторов определяют профили индукции СУР3А белков.

Спектр веществ, являющихся активаторами PXR-рецептора, постоянно расширяется, в том числе за счёт ЛС [16]. Среди ксенобиотиков, которые активируют PXR-рецепторы, известны такие индукторы СУР3А системы, как метирапон, клотримазол, фенобарбитал, спиринолактон и транснахлор. 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. [16].

Также ортологичные PXR-рецепторы всех видов, от рыбы до человека, эффективно активируются метаболитом прогестерона  $5\beta$ -прегнан-3,2d-дионом.

Характер активации PXR-рецепторов другими стероидами видоспецифичен. PXR-рецептор мыши активируется различными прегнанами, включая прегненолон и его  $17\alpha$ -гидроксильированные производные [11, 13]. PXR-рецептор кролика эффективно активируется прогестероном и его  $17\alpha$ -гидроксильированными производными [10]. PXR-рецептор человека эффективно активируется эстрадиолом и, в меньшей степени, кортикостероидами. Эти данные, а также факт повышения уровня экспрессии гена *PXR* во время беременности [17], позволяют предположить, что основной функцией PXR-рецептора является защита организма от высоких концентраций эндогенных стероидов. Недавно сообщалось об открытии первого ингибитора PXR-рецептора. Мощный цитостатик эктеинасцидин 743 (ET-743) блокирует его работу

(как следствие прекращается индукция генов *CYP3A4* и *MDR1*) в опытах *in vitro* [18].

Экспериментально было подтверждено, что многие активаторы PXR-рецептора связываются с ним непосредственно. Молекула PXR-рецептора способна образовывать комплексы с различными химическими соединениями, имеющими молекулярную массу от 250 до 800 кДа.

### 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 [2].

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 [19]. А воздействие 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) определяет, какие именно гетеродимеры могут с ней связываться. Например, гетеродимеры PXR-рецептора с VDR-рецептором, с рецептором тиреоидного гормона и с RXR-рецептором связываются с последовательностью, состоящей из двух прямых повторов со спейсерным участком в 3–5 п. н. [2]. Гетеродимер PXR/RXR также связывается с DR-3 последовательностью, входящей в состав промоторов генов *CYP3A23* и *CYP3A2* [1] 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.

Наблюдается значительное сходство строения участков узнавания PXR-рецепторов у разных видов. Поэтому межвидовые особенности профилей индукции СУР3А основаны на разли-

чиях в транскрипционных факторах и различиях аффинитета ортологов PXR-рецепторов, согласно предположению [20]. Поэтому современные стратегии исследований направлены на использование трансгенных животных (мышей), у которых собственный ген *PXR* заменён его человеческим аналогом. У таких мышей, как и у человека, происходит индукция CYP3A рифампицином [21].

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* [22], *MDR1* [23]), а также с последовательностью ER-8, расположенной в 5'концевом участке гена *MRP2* [24]. 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).

Следует отметить, что сайты связывания гетеродимера PXR/RXR обнаружены во многих генах различных семейств цитохромов P450.

Любопытно также то, что некоторые индукторы CYP3A также являются индукторами гликопротеина P, кодируемого геном *MDR1*, что объясняют наличием общих регуляторных последовательностей в промоторах данных генов [23].

### 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 [24]. 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 ко-

торых 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 [16].

### Роль PXR-рецептора в метаболизме ксенобиотиков

Идентификация и характеристика PXR-рецептора была важным событием в изучении системы защиты организма от воздействия ксенобиотиков [11]. Экспрессия гена *PXR* индуцируется большим числом эндогенных и экзогенных веществ, включая стероиды, антибиотики, противогрибковые вещества, жёлчные кислоты и антидепрессанты. Изучение трёхмерной 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-цисретиноевой 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* [25]. Поэтому его активация различными ЛС создает молекулярную основу для лекарственных взаимодействий. Исследования, направленные на изучение работы PXR-рецептора, крайне важны при разработке новых ЛС.

### PXR-рецептор как основа лекарственного взаимодействия

Индукция экспрессии *CYP3A4* является основой лекарственного взаимодействия, при котором одно ЛС усиливает метаболизма другого. Большинство ЛС индуцируют *CYP3A4* через активацию PXR-рецептора. К примеру, экстракт зверобоя 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 [26].

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. 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 [13]. У человека, в случае лекарственного взаимодействия, он вызывает резкий гепатотоксический эффект. По этой причине данный препарат был отозван с рынка. Аналогичные по своим терапевтическим свойствам пиоглитазон и росиглитазон не взаимодействуют с PXR-рецептором и не проявляют этих нежелательных эффектов.

В качестве второго примера можно привести цитостатики паклитаксел и доцетаксел. Оба лекарства имеют сходную антинеопластическую активность. Однако паклитаксел является эффективным активатором PXR-рецептора, а доцетаксел — нет [18], что позволяет применять тот или иной препарат в зависимости от ситуации.

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 [27]. CAR-рецептор запускает каскад биохимических реакций в ответ на воздействие фенобарбитала.

У грызунов фенобарбитал вызывает индукцию экспрессии генов *CYP2B* семейства. Этот эффект полностью отсутствовал у CAR(-) нокаутных мышей. В неактивном состоянии CAR-рецептор локализуется в цитоплазме [28]. Фенобарбитал ак-

тивирует 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 [28].

Исходно было показано, что CAR- и PXR-рецепторы контролируют работу генов *CYP2B* и *CYP3A* соответственно [11]. Затем было обнаружено, что PXR-рецептор также способен регулировать гены *CYP2B* [22]. Перекрытие целевых генов для PXR- и CAR-рецепторов распространяется не только на семейства *CYP2B* и *CYP3A*. Также происходит совместная регуляция генов семейства *CYP2C*, генов *GST* семейства, генов, кодирующих сульфотрансферазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы и гена *MRP2* [22]. 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 [5]. 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. Кроме того, спектры активации PXR- и CAR-рецепторов указывают на то, что эти белки имеют общие лиганды с другими рецепторами, например, тиазолидиндион троглитазон активирует как PXR-рецептор, так и PPAR $\alpha$ -рецептор, SR-12813 связывается как с PXR-рецептором, так и с FXR-рецептором, эндогенные стероиды влияют как на PXR- и CAR-рецепторы, так и на стероидные гормональные рецепторы. Таким образом, конкуренция за лиганды, возможно, представляет один из вариантов рецепторного взаимодействия.

### 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 такие эндоген-

ные метаболиты, как жёлчные кислоты и стероиды. В противоположность большинству других ядерных рецепторов, обладающих узким диапазоном специфичности, PXR-рецептор эволюционировал как сенсор широкого спектра веществ. Несмотря на то, что данный белок является, в некотором смысле, «неразборчивым» рецептором, существуют интересные различия в механизме его индукции у различных видов животных. Эти различия, вероятно, отражают особенности экологии видов или субстратного взаимодействия. В то же время профили активации могут различаться вследствие особенностей метаболизма (пример — биосинтез жёлчных кислот).

Поскольку основная функция PXR-рецептора — защита организма от действия широкого спектра ксенобиотиков, он является причиной осложнений при одновременном применении нескольких лекарственных средств. Установлено, что активация PXR-рецептора вызывает це-

лый класс опасных для жизни лекарственных взаимодействий, при которых одно вещество усиливает метаболизм другого. Использование накопленной к настоящему моменту информация о структуре и функции PXR-рецептора поможет свести к минимуму такие взаимодействия. Дальнейшее изучение субстратов данного рецептора позволит открывать новые ЛС. Детальный анализ пространственной структуры LBD 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 приведёт к значительному повышению безопасности в процессе начальных стадий клинических исследований. Изучение гомологичных рецепторов и профилей их активации у различных видов животных позволит выявить наиболее релевантные модели для изучения лекарственных средств *in vivo*.

## ЛИТЕРАТУРА

- Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J. et al. Pharmacogenetics. 1996; 6: 1—42.
- Mangelsdorf D. J., Evans R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell 1995; 83: 841—850.
- Conney A. H. Cancer Res 1982; 42: 4875—4917.
- Jefcoate C. R. (Ed.) In Advances in Molecular and Cell Biology. JAI Press, Greenwich, CT. 1996; 14: 1—379.
- Pascussi J., Jounaidi Y., Drocourt L., Domergue J. 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; 260: 377—381.
- Hardwick J. P., Gonzalez F. J., Kasper C. B. Cloning of DNA complementary to cytochrome P-450 induced by pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile. Characterization of its mRNA, gene, and induction response. J Biol Chem 1983; 258: 10182—10186.
- Watkins P. B., Wrighton S. A., Maurel P., Schuetz E. G. et al. Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 82: 6310—6314.
- Kocarec 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; 23: 415—421.
- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Ibid; 1995; 83: 835—839.
- Giguere V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. Endocr Rev 1999; 20: 689—725.
- Kliewer S. A., Moore J. T., Wade T. M., Staudinger J. L. et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. Cell 1998; 92: 73—82.
- 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; 16: 5: 977—986.
- 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; 14: 27—39.
- Elshourbagy N. A., Guzelian P. S. Separation, purification, and characterization of novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile. J Biol Chem 1980; 255: 1279—1285.
- 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; 29: 1454—1459.
- Kliewer et al. Endocrine Rewiev, October 2002; 23: 5: 687—702.
- Masuyama H., Hiramatsu Y., Mizutani Y. et al. The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. Mol Cell Endocrinol 2001; 172: 47—56.
- Synold T. W., Dussault I., Forman B. M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. Nat Med 2001; 7: 584—590.
- Wan Y. U. Y., An D., Cai Y., Repa J. et al. Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. Mol Cell Biol 2000; 20: 4436—4444.
- 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. Mol Pharmacol 1996; 50: 10—16.
- Wei P., Zilang J., Egan-Hafley M. et al. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. Nature 2000; 407: 920—923.
- Xie W., Barwick J. L., Simon C. M., Pierce A. M. et al. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. Genes Dev 2000; 14: 3014—3023.
- Geick A., Eichelbaum M., Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. Ibid; 2001; 276: 14581—14587.
- 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 Boil Chem 2002; 277: 2908—2915.
- Xie W., Barwick J. L., Downes M., Blumberg B. et al. Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. Nature 2000; 406: 435—439.
- Moore L. B., Parks D. J., Jones S. A., Bledsoe R. K. et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. J Biol Chem 2000; 275: 15122—15127.
- Dotzlaw H., Leygue E., Watson P., Murphy L. The human orphan receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue. Clin. Cancer Res 1999; 5: 2103—2107.
- 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; 19: 6318—6322.