

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Regulace exprese klinicky významných
ABC transportérů léčivy a xenobiotiky.**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2006

Barbora Pospíšilová

Děkuji Petru Pávkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce.

Seznam použitých zkratk

| | |
|--|--|
| ABC transportéry | <i>angl.</i> „ATP binding cassette“ – skupina transportérů |
| GR α | glukokortikoidní receptor |
| ER | estrogenní receptor |
| VDR | receptor pro vitamín D |
| PXR | pregnanový X receptor |
| CAR | konstitutivní androstanový receptor |
| PPAR α , β , γ | <i>angl.</i> peroxisome proliferative activated receptor α , β , γ |
| FXR | farnesoidní X receptor |
| LXR | jaterní X receptor |
| AhR | aryl hydrokarbonový receptor |
| RXR | retinoidní X receptor |
| DBD | <i>angl.</i> DNA binding domain |
| LBD | <i>angl.</i> ligand binding domain |
| N-CoR | <i>angl.</i> nuclear receptor corepressor |
| SMRT | <i>angl.</i> silencing mediator of retinoid and thyroid receptors |
| SRC-1 | <i>angl.</i> steroid receptor coactivator-1 |
| SXR | <i>angl.</i> steroid X receptor |
| CYP | cytochrom P-450 |
| PCN | pregnenolon 16 α -karbonitril |

SPA *angl.* scintillation proximity assay

CARLA *angl.* coactivator receptor ligand assay

EC₅₀ efektivní koncentrace, která vyvolá 50% maximální účinek

DR *angl.* direct repeat

ER *angl.* everted repeat

HSP90 *angl.* heat shock protein 90

CAR-RE CAR responsivní sekvence

PXR-RE PXR responsivní sekvence

CCRP *angl.* CAR cytoplasmic retention protein

TCPOBOP 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridoxyl)] benzen

MDR1 *angl.* multidrug resistance protein 1

MRP2 *angl.* multidrug resistance-associated protein 2

OBSAH

| | |
|--|----|
| <u>1. CÍL</u> | 7 |
| <u>2. OBECNÁ ČÁST</u> | 9 |
| <u>2.1. NUKLEÁRNÍ RECEPTORY</u> | 10 |
| <u>2.2. ROZDĚLENÍ NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ</u> | 10 |
| <u>2.3. STRUKTURA NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ</u> | 12 |
| <u>2.4. AKTIVACE NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ</u> | 12 |
| <u>2.5. SIROTČÍ RECEPTORY PXR A CAR</u> | 12 |
| <u>3. PREGNANOVÝ NUKLEÁRNÍ RECEPTOR X</u> | 14 |
| <u>3.1. CHARAKTERISTIKA PXR</u> | 15 |
| <u>3.1.1. EXPRESE PXR</u> | 15 |
| <u>3.1.2. AKTIVACE PXR</u> | 16 |
| <u>3.1.2.1. SLOUČENINY AKTIVUJÍCÍ PXR</u> | 16 |
| <u>3.2. STRUKTURA PXR</u> | 18 |
| <u>3.2.1. VAZBA LIGANDU NA PXR</u> | 19 |
| <u>3.2.2. DNA-VAZEBNÉ VLASTNOSTI PXR</u> | 21 |
| <u>3.2.3. POLYMORFISMY PXR</u> | 21 |
| <u>3.3. PXR IN VIVO</u> | 22 |
| <u>3.3.1. MYŠÍ KMENY POSTRÁDAJÍCÍ PXR</u> | 22 |
| <u>3.3.2. MYŠÍ KMEN S "POLIDŠTĚLÝM" PXR</u> | 23 |
| <u>4. KONSTITUTIVNÍ ANDROSTANOVÝ RECEPTOR</u> | 24 |
| <u>4.1. CHARAKTERISTIKA CAR</u> | 25 |

| | |
|--|-----------|
| <u>4.1.1. AKTIVACE CAR</u> | 26 |
| <u>4.2. PŘEKRYV PXR A CAR</u> | 28 |
| <u>5. ABC TRANSPORTÉRY</u> | 29 |
| <u>5.1. OBECNÉ INFORMACE O ABC TRANSPORTÉRECH</u> | 30 |
| <u>5.2. TAKZVANÉ „LÉKOVÉ“ TRANSPORTÉRY ZE SKUPINY ABC</u> <u>TRANSPORTÉRŮ</u> | 30 |
| <u>6. CYTOCHROM P-450</u> | 32 |
| <u>6.1. CYTOCHROM P-450</u> | 33 |
| <u>6.2. IZOENZYMY CYP3A</u> | 33 |
| <u>6.3. INDUKCE CYP3A</u> | 34 |
| <u>6.4. RESPONSIVNÍ SEKVENCE V PROMOTORECH CYP3A</u> | 35 |
| <u>7. LÉKOVÉ INTERAKCE</u> | 38 |
| <u>7.1. LÉKOVÉ INTERAKCE</u> | 39 |
| <u>7.2. TŘEZALKA</u> | 39 |
| <u>7.3. RIFAMPICIN</u> | 40 |
| <u>7.4. ANTIPILEPTIKA</u> | 42 |
| <u>8. ZÁVĚR</u> | 43 |
| <u>9. PŘÍLOHA</u> | 46 |
| <u>9A. PŘEHLED GENŮ REGULOVANÝCH PXR</u> | 47 |
| <u>9B. PŘEHLED GENŮ REGULOVANÝCH CAR</u> | 58 |
| <u>10. LITERATURA</u> | 64 |

1. CÍL

Cílem mé diplomové práce bylo shrnout současné poznatky týkající se nukleárních receptorů pregnanového X receptoru PXR a konstitutivního androstanového receptoru CAR publikované ve světové odborné literatuře. Zaměřila jsem se především na obecnou problematiku mechanismů aktivace transkripční regulace cílových genů prostřednictvím PXR a CAR, popis regulačních oblastí nejznámějších cílových genů interagujících s PXR a CAR, expresi PXR a CAR v tkáních a nejdůležitější klinické interakce zprostředkované nukleárními receptory PXR a CAR.

Konkrétním cílem bylo vyhledat za použití databází PubMed a GeneBank ty geny z rodiny ABC transportérů, jejichž transkripční regulace je řízena receptory PXR nebo CAR. Dále vyhledat další geny první a druhé fáze biotransformace regulované prostřednictvím nukleárních receptorů PXR a CAR.

2. OBECNÁ ČÁST

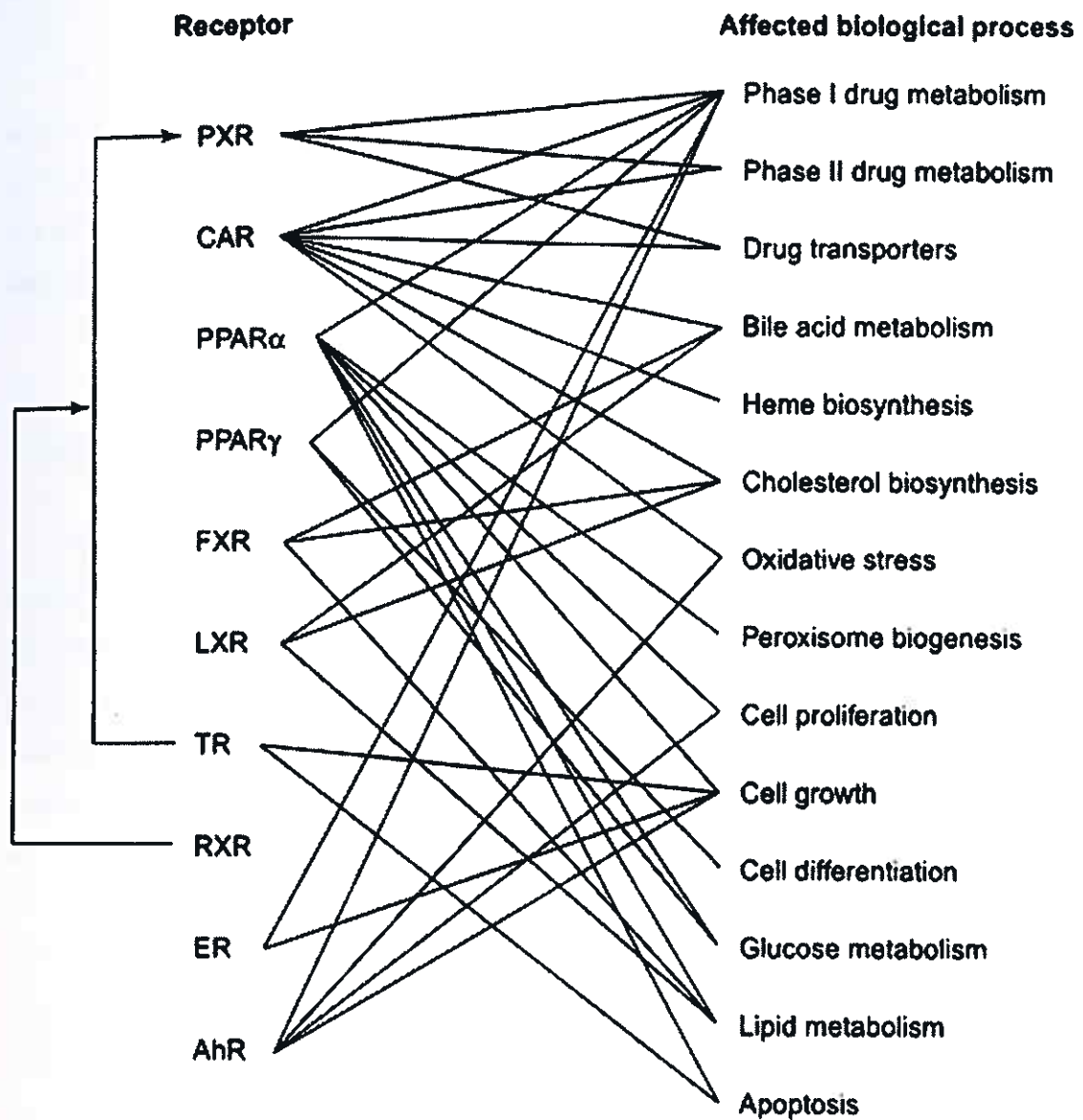
2.1. NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Nukleární receptory tvoří rodinu „ligandem aktivovaných“ transkripčních faktorů, které se podílí na regulaci exprese velkého počtu genů účastnících se buněčného metabolismu.

2.2. ROZDĚLENÍ NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

V lidském genomu je 48 nukleárních receptorů. Podle jejich vazebného charakteru je můžeme rozdělit do dvou skupin – receptory pro endokrinní hormony a sirotčí receptory. Do první skupiny nukleárních receptorů patří receptory pro běžné endokrinní hormony (glukokortikoidní receptor ($GR\alpha$), estrogenní receptor (ER), receptor pro vitamín D (VDR), receptor pro hormony štítné žlázy a další), jejichž ligandy byly objeveny mnohem dříve než receptory. Druhou skupinu tvoří receptory označované jako sirotčí (*angl.* orphan), protože jejich fyziologické ligandy nebyly dosud identifikovány (*viz* přehledový článek Giguere, 1999). Do této skupiny patří například pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR), které budou popsány dále.

Mezi dnes známé nukleární receptory (*viz* Obrázek 1) patří receptory účastnící se detoxikace a lékových interakcí (PXR a CAR); receptory, které se zdají být potenciálním lékovým cílem u metabolických onemocnění, například PPAR α a γ , farnesoidní X receptor (FXR), jaterní X receptor (LXR); receptory pro člověkem vyrobené toxiny ze životního prostředí (aryl hydrokarbonový receptor (AhR)); a retinoidní X receptor (RXR), který působí buď jako homodimer, nebo tvoří heterodimer s mnoha jinými receptory (včetně PXR, CAR, PPAR, FXR, LXR a TR) (*viz* přehledový článek Ulrich, 2003).



Obrázek1

Agonisté nukleárních receptorů regulují transkripci genů různých biologických procesů. Mezi receptory je mnoho překryvů a agonisté často reagují s více receptory. RXR může přímo ovlivnit transkripci, ale velká část jeho účinků se projeví prostřednictvím heterodimeru s jinými receptory (převzato a upraveno podle práce Ulricha, 2003).

2.3. STRUKTURA NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

Nukleární receptory mají společnou obecnou strukturu, kterou tvoří proměnlivá doména zakončená aminoskupinou (N-konec), doména vázající specifické sekvence DNA (*angl.* DNA binding domain; DBD) z přibližně 70 aminokyselin, a ligandy vázající doména (*angl.* ligand binding domain; LBD) zakončená karboxylovou skupinou (C-konec), která se skládá přibližně z 250 aminokyselin.

2.4. AKTIVACE NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

Aktivace nukleárních receptorů je komplikovaný proces, kterého se účastní ligandy, korepresorové proteiny, koaktivátory a další proteiny. Ligandy nukleárních receptorů jsou malé a lipofilní, a proto mohou difundovat do buněk. Po navázání ligandu na LBD dojde ke konformační změně nukleárního receptoru, což naruší interakce s korepresorovými proteiny (např. N-CoR a SMRT) a umožní interakce s koaktivátory transkripce (např. členové SRC-1 rodiny). Aktivované nukleární receptory se váží na krátké sekvence promotorové DNA cílových genů, označované jako responsivní sekvence, a tím stimulují expresi těchto cílových genů.

Mezi známé endogenní ligandy patří rozmanité lipofilní sloučeniny jako jsou steroidní hormony, hormony štítné žlázy, vitamín D. Díky rozvoji molekulárněbiologických metod byly identifikovány i fyziologické ligandy některých sirotčích receptorů – mastné kyseliny (receptory PPAR α , β , a γ), žlučové kyseliny (farnesoidní X receptor), oxysterolové metabolity cholesterolu (jaterní X receptor α a β). Sirotčí receptory jsou ale aktivovány především farmaky a dalšími xenobiotiky.

2.5. SIROTČÍ RECEPTORY PXR A CAR

Pregnanový nukleární receptor X (*angl.* pregnane X receptor; PXR; NR1I2; *syn.* steroid X receptor; SXR) a konstitutivní androstanový receptor (*angl.* constitutive androstane receptor; CAR; NR1I3) jsou významnými regulátory transkripce velkého počtu genů zapojených do metabolismu xenobiotik, včetně oxidace, konjugace

a transportu. Na základě interakce s xenobiotiky regulují expresi enzymů I. a II. fáze biotransformace a některých transportních proteinů. Při působení xenobiotika dochází ve většině případů k indukci exprese cílových genů biotransformačních enzymů a tím k urychlení eliminace xenobiotik. Receptory PXR a CAR tedy mají důležitou roli v ochraně organismu před nežádoucí kumulací xenobiotik a také některých endogenních látek (viz kapitoly 3. a 4.).

3. PREGNANOVÝ NUKLEÁRNÍ RECEPTOR X

3.1. CHARAKTERISTIKA PXR

Pregnanový nukleární receptor X, který patří do rodiny „ligandem aktivovaných“ transkripčních faktorů, je důležitou složkou obranných mechanismů těla proti toxickým a cizorodým látkám (xenobiotikům). PXR je aktivován širokým spektrem endo- a exogenních chemických sloučenin, mezi které patří např. steroidy, antibiotika, žlučové kyseliny, přírodní antidepresivum třezalka nebo pesticidy. Tyto ligandy vedou k aktivaci transkripce a indukci biotransformačních enzymů, a tím k urychlení eliminace xenobiotik. Proto je PXR, stejně jako jemu blízký příbuzný CAR, někdy označován jako xenosenzor. Protože je ale aktivován mnoha předepisovanými léky, představuje PXR také molekulární základ důležité třídy lékových interakcí.

3.1.1. EXPRESE PXR

V těle je PXR ve velké míře přítomen zejména v játrech, méně potom v tenkém a tlustém střevě, v žaludku a v ledvinách. Je tedy lokalizován ve stejných tkáních, ve kterých jsou nejvíce exprimovány a indukovány CYP3A geny (viz přehledový článek Kliewer a kol., 2002). U hlodavců byly dále detekovány nižší hladiny mRNA pro PXR v plicích, děloze, vaječnicích a placentě (Masuyama a kol., 2001).

Promotor PXR nebyl ještě detailně popsán. Bylo ale prokázáno, že glukokortikoid dexamethazon zvyšuje hladiny mRNA PXR v primárních kulturách lidských hepatocytů (Pascussi a kol., 2000) a H4IIE buňkách hepatomu potkanů (Huss a kol., 2000). Tento účinek je zřejmě zprostředkovaný glukokortikoidním receptorem (GR), protože vyžaduje pouze nanomolární koncentrace dexamethazonu a je blokován RU486, tedy látkou, která je antagonistou GR. Indukce hladin mRNA PXR může tedy být jednou z příčin výrazné stimulace exprese CYP3A dexamethazonem. Dále je zajímavé, že exprese PXR v játrech a vaječnicích myši se během březosti přibližně padesátkrát zvýšila (Masuyama a kol., 2001).

Tato zjištění naznačují, že exprese PXR může být stimulována dalšími hormony a kromě toho poukázaly na možnost, že je PXR zapojen do ochrany plodu a/nebo matky buď před xenobiotiky nebo před vysokými hladinami endogenních steroidů.

3.1.2. AKTIVACE PXR

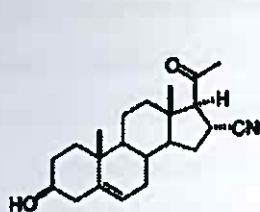
Sloučeniny, jež aktivují nukleární receptory, byly identifikovány v reportérových studiích (*angl. tzv. cell-based reporter assay*). Při těchto zkouškách je plasmid, kódující pro nás důležitý receptor, zabudován do buněk spolu s reportérovým konstruktem. Receptorový plasmid může kódovat buď celý receptor, nebo chiméru částí LBD a DBD receptoru a jiného proteinu, např. kvasinkového transkripčního faktoru GAL4. Reportérový plasmid obsahuje vazebná místa buď pro celý receptor, nebo pro chiméru, a to proti směru genu kódujícího reportérový protein, který může být snadno kvantifikován (např. luciferáza nebo chloramfenikolacetyltransferáza).

Výhodou chimér je, že eliminují tzv. pozadí, které je způsobeno endogenními receptory přítomnými v buňce, a že povolují screening ligandů bez předchozí znalosti promotorové struktury genů.

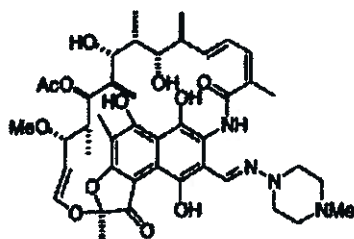
3.1.2.1. SLOUČENINY AKTIVUJÍCÍ PXR

V cell-based reporter assay je PXR aktivován různými sloučeninami (*viz* Obrázek 2). Studie provedené s myším PXR ukázaly, že je účinně aktivován pregnenolon 16 α -karbonitrilem (*angl. pregnenolone 16 α -carbonitrile; PCN*), klasickým induktorem CYP3A; glukokortikoidy (např. dexamethazonem) i antiglukokortikoidy (např. RU486) (*viz* přehledový článek Kliewer a kol., 1998). Tato zjištění poprvé naznačila, že by PXR mohl hrát roli v regulaci CYP3A.

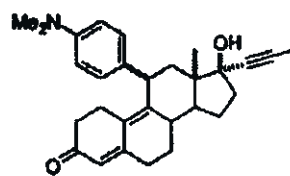
Další studie ukázaly překvapivé mezidruhové rozdíly v profilech aktivace PXR. Zatímco je PCN účinným aktivátorem PXR myši a potkanů, u receptorů člověka a králíka je jeho účinnost mnohem menší. Naopak rifampicin aktivuje lidský a králičí PXR, ale na receptory myši a potkanů nemá prakticky žádný účinek (*viz* přehledový článek Jones a kol., 2000). Profily aktivace PXR těchto sloučenin blízce korelují s tím, jak tyto sloučeniny indukují CYP3A v hepatocytech těchto různých druhů (*viz* přehledový článek Kocarek a kol., 1995). Tyto údaje prokázaly, že PXR slouží jako klíčový regulátor exprese CYP3A, a že indukční profil CYP3A je určen tím, z jakého druhu PXR pochází.



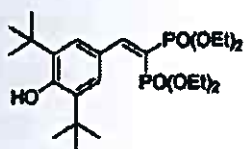
PCN



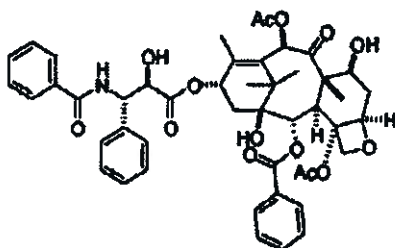
rifampicin



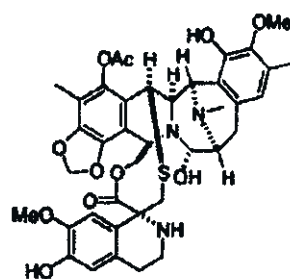
RU486



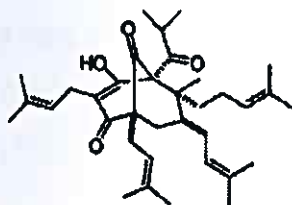
SR12813



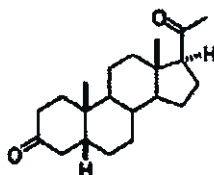
taxol



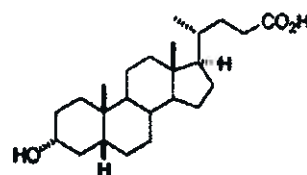
ET-743



hyperforin



5β-pregnane-3,20-dione



lithocholic acid

Obrázek 2

Ligandy lidského PXR. Chemická struktura xenobiotik a endogenních látek, které regulují činnost PXR.

ET-743 je antagonist PXR, všechny ostatní látky jsou agonisté PXR.

(podle přehledového článku Kliewera a kol., 2002)

Počet sloučenin schopných aktivovat PXR se rychle zvyšuje a patří mezi ně mnoho běžně používaných léků. Mezi xenobiotika aktivující PXR jednoho či více druhů patří známé induktory CYP3A jako je metyrapon, klotrimazol, fenobarbital, spironolakton a trans-nonachlor. Dalšími aktivátory PXR jsou blokátor kalciového kanálu nifedipin, inhibitor HIV proteázy ritonavir, cytostatika paklitaxel (viz Obrázek 2), tamoxifen a 4-hydroxytamoxifen, antidiabetikum troglitazon, hypolipidemika lovastatin a SR12813 (viz Obrázek 2), sedativum glutethimid a endokrinní disruptory bisfenol A, diethylhexylftalát a nonylfenol (viz přehledový článek Kliewer a kol., 2002).

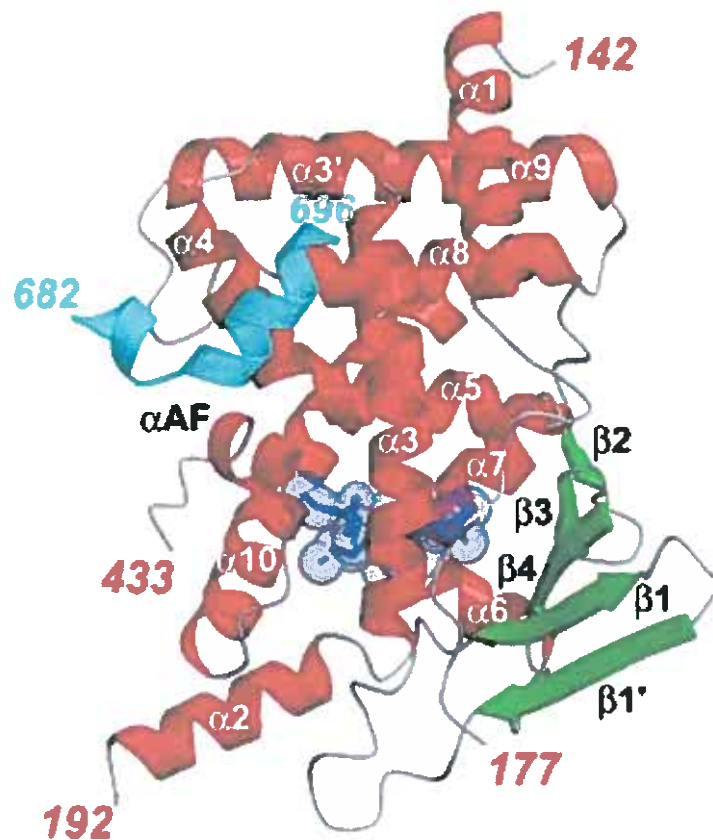
Kromě těchto xenobiotik je PXR aktivován také řadou přirozeně se vyskytujících steroidů. Všechny orthology PXR, od ryb až k člověku, účinně aktivuje progesteronový metabolit 5β -pregnan-3,20-dion (viz přehledový článek Moore a kol., 2000a; Obrázek 2). PXR aktivují i jiné steroidy, ale účinek se mění v závislosti na druhu. Myši PXR jsou aktivovány různými pregnany, včetně pregnenolonu a jeho 17α -hydroxylovaného derivátu. PXR králíka účinně aktivuje progesteron a jeho 17α -hydroxylovaný derivát. Lidský PXR je aktivován estradiolem a v menší míře také kortikosteronem (viz přehledový článek Jones a kol., 2000). Tato zjištění, spolu s objevením zvyšování hladiny exprimovaného PXR během gravidity (Masuyama a kol., 2001), naznačily zajímavou možnost, že se PXR zčásti vyvinul jako ochrana těla před vysokými koncentracemi endogenních steroidů.

Zatímco všechna výše uvedená xenobiotika jsou agonisty PXR, jeho první antagonistu byl objeven teprve nedávno. Je jím potenciální cytostatikum ecteinascidin 743 (ET-743; viz Obrázek 2), které ve velice nízkých koncentracích blokuje v cell-based reporter assays aktivaci lidského PXR prostřednictvím SR12813 nebo paklitaxelu (Synold a kol., 2001).

3.2. STRUKTURA PXR

Narozdíl od většiny nukleárních receptorů, které se svým ligandem interagují vysoce selektivně, vykazuje PXR nezvykle širokou substrátovou specifitu. Tyto nezvyklé ligand-vazebné vlastnosti jsou dány zčásti odlišnou strukturou tohoto receptoru (viz Obrázek 3).

Na LBD PXR byly provedeny krystalografické studie v přítomnosti i v nepřítomnosti ligandů a bylo zjištěno, že celková struktura je podobná jiným nukleárním receptorům: LBD tvoří 12 α -helixů složených do hydrofóbní kapsy ve spodní části proteinu (Watkins a kol., 2001). Ovšem objem této ligand-vážící kapsy je více než 1300 Å³, tedy mnohem více než u většiny ostatních nukleárních receptorů. Tento velký objem je částečně způsoben přítomností dvou přidavných pásů β -skládaného listu, který nebyl u ostatních receptorů této skupiny nalezen. Od ostatních nukleárních receptorů se PXR liší dále tím, že kapsa pro ligand má nezvykle hladký, eliptický tvar (viz přehledový článek Kliewer, 2003). Tato kombinace velkého objemu hydrofóbní ligand-vážící kapsy a jejího hladkého tvaru tedy umožňuje, aby PXR fungoval jako senzor lipofilních xenobiotik se širokou substrátovou specifitou.



Obrázek 3

Trojrozměrná struktura PXR.

(podle přehledového článku Kliewera a kol., 2002)

3.2.1. VAZBA LIGANDU NA PXR

Pro zjištění toho, zda ligandy aktivují PXR přímou vazbou na receptor, byly použity dva typy zkoušek vazby ligandů - scintillation proximity assay (SPA) a coactivator receptor ligand assay (CARLA).

U první z metod, SPA, byl jako radioligand využit [³H]SR12813 (viz přehledový článek Jones a kol., 2000) - SR12813 je látka snižující hladinu cholesterolu, která účinně indukuje expresi CYP3A v lidských hepatocytech. Na lidský PXR se váže s hodnotou efektivní koncentrace EC₅₀ přibližně 40nM a je tedy jedním z nejsilnějších aktivátorů tohoto receptoru u člověka. Protože ale při aktivaci PXR u hlodavců vykazuje SR12813 daleko slabší účinek, nelze ho využít při vazebných zkouškách na jejich receptorech (viz přehledový článek Jones a kol., 2000). Při SPA je lidský PXR imobilizován na kuličkách obalených scintilační látkou a inkubován s radioligandem. Ten je poté, co se naváže na receptor, dostatečně blízko, aby mohl aktivovat scintilační kuličky a může být detekován standardním scintilačním detektorem. Pomocí této metody může být měřena i vazba neradioaktivních ligandů a to na základě jejich schopnosti kompetovat s radioligandy o vazbu na PXR.

Druhou metodou k určení toho, zda se sloučenina váže na PXR je CARLA (Krey a kol., 1997), jež využívá toho, že navázání ligandu na nukleární receptor způsobí konformační změnu, která umožní interakci s koaktivátory (např. SRC-1). Tuto interakci lze změřit pomocí precipitace radioaktivně označeného koaktivátoru se zkoumaným receptorem. Touto metodou bylo dokázáno, že se sloučeniny váží přímo na PXR (viz přehledový článek Kliewer a kol., 1998).

Mezi látky, které se váží na lidský PXR, patří např. rifampicin, klotrimazol, fenobarbital, troglitazon a ritonavir – hodnoty efektivní koncentrace EC₅₀ pro tyto interakce se nacházejí v rozmezí od nízkých mikromolárních koncentrací u většiny sloučenin po milimolární koncentrace fenobarbitalu. Přímou na PXR se váží také přirozené steroidy 5β-pregnan-3,20-dion, kortikosteron a estradiol, s hodnotami efektivní koncentrace EC₅₀ v rozmezí nízkých a středních mikromolárních koncentrací. PCN se dle očekávání účinně váže na PXR hlodavců, ale ne na lidský ortholog PXR (viz přehledový článek Kliewer a kol., 1998).

3.2.2. DNA-VAZEBNÉ VLASTNOSTI PXR

Transkripci cílových genů regulují nukleární receptory vazbou na specifické responsivní sekvence. Členové podrodiny NR1, kam PXR patří, se váží vždy jako heterodimery s RXR na responsivní sekvence složené ze dvou kopií tradičního vazebného motivu AG(G/T)TCA. Tyto motivy jsou sestaveny buď jako direct repeat (DR) s mezerou tří (DR-3), čtyř (DR-4) nebo pěti (DR-5) nukleotidů, nebo jako everted repeat (ER), kde mají opačnou orientaci, s mezerou šesti (ER-6) nebo osmi (ER-8) nukleotidů. Vzájemná orientace a rozmístění těchto dvou tradičních sekvencí určuje, který z heterodimerů RXR se může navázat. Například heterodimery RXR s vitamínem D, thyroïdním hormonem a RXRs se vážou přednostně na tradiční sekvence tvořící DR-3, DR-4 nebo DR-5.

Heterodimer PXR s RXR je schopný vázat se k DR-3, DR-4, ER-6 a ER-8 motivům, tedy strukturně odlišným responsivním sekvencím (viz Obrázek 4). Nejdříve bylo prokázáno, že se heterodimer PXR s RXR účinně váže na DR-3 typ responsivních sekvencí pro xenobiotika, který je přítomen v promotorech CYP3A23 a CYP3A2 (viz přehledový článek Kliewer a kol., 1998). Heterodimer PXR/RXR se dále váže k DR-3 v CYP3A4 (Goodwin a kol., 1999) a k ER-6 v CYP3A4 (Lehmann a kol., 1998). Responsivní sekvence DR-3 a ER-6 jsou zachovány také v dalších xenobiotiky indukovatelných CYP, včetně CYP3A7 (Pascussi a kol., 1999). Kromě sekvencí DR-3 a ER-6 se PXR/RXR heterodimer váže také k DR-4 a DR-5 typu responsivních sekvencí (viz přehledový článek Blumberg a kol., 1998). DR-4 responsivní sekvence byly nalezeny například v promotorech genů CYP2B rodiny (Xie a kol., 2000a) a MDR1 (Geick a kol., 2001). Kast a kol. prokázali pomocí reportérových konstruktů obsahujících kopie responsivní sekvence ER-8, že heterodimer PXR/RXR se váže i na tuto sekvenci a účinně aktivuje geny, které ji obsahují, jako např. MRP2 (Kast a kol., 2002).

3.2.3. POLYMORFISMY PXR

V metabolismu léčiv se vyskytují významné rozdíly mezi jedinci. Tato interindividuální variabilita zřejmě souvisí s tím, že hladiny mRNA pro CYP3A4 v játrech se u jednotlivých osob liší více než padesátkrát. Některé provedené studie

naznačily, že by tyto rozdíly mohly být důsledkem genetických změn, ovšem doposud bylo popsáno pouze několik polymorfismů v CYP3A4 a nezdá se, že by tyto změny obecně ovlivňovaly expimaci nebo funkci CYP3A4 (Eichelbaum a kol., 2001).

Studie, které provedl Hustert a kol. a Zhang a kol. měly prokázat, zda jsou příčinou variability v metabolismu léčiv polymorfismy PXR. V genu pro lidský PXR zjistili přibližně 40 bodových mutací (*angl.* single nucleotide polymorphisms) mezi nimiž je 7 mutací, jež vedou k odlišným proteinům PXR u bělošské, afroamerické a/nebo africké populace (Hustert a kol., 2001; Zhang a kol., 2001). Čtyři z nich (R122Q, V140M, D163G, a A370T) vykazovaly změny v základní a/nebo rifampicinem indukované aktivitě v cell-based reporter assay. Četnost alel každého z těchto polymorfismů byla ale méně než 2%, tudíž není možné, aby tím byly vysvětleny interindividuální rozdíly v metabolismu léčiv (Hustert a kol., 2001; Zhang a kol., 2001).

Je zajímavé, že tři „tiché“ polymorfismy, které nemají za následek změnu aminokyseliny, korelují se změnami v expimaci CYP3A4 (Zhang a kol., 2001). Lokalizace těchto polymorfismů ale nenaznačuje žádný mechanismus, který by vysvětloval změny v aktivitě PXR. K určení toho, zda tyto, nebo jiné polymorfismy PXR mohou sloužit k předpovězení aktivity CYP3A4 *in vivo*, budou zapotřebí další studie (viz přehledový článek Kliewer a kol., 2002).

3.3. PXR IN VIVO

3.3.1. MYŠÍ KMENY POSTRÁDAJÍCÍ PXR

Studie prováděné na myších postrádajících funkční gen PXR poskytly genetický důkaz toho, že PXR reguluje metabolismus xenobiotik modulací CYP3A a dalších genů (Xie a kol., 2000b). Myši bez PXR se vyvíjely a rozmnožovaly zcela normálně, neobjevily se u nich žádné fenotypové odchylky a žádné podstatné rozdíly od přirozených myší neodhalila ani rozsáhlá sérová analýza. Vypadá to tedy, že PXR není nutný pro normální vývoj či normální fyziologii dospělých jedinců za standardních laboratorních podmínek.

Myši postrádající PXR ale reagovaly odlišně na expozici xenobiotiky. Zatímco u normálních myší způsobuje PCN hepatomegalií prostřednictvím indukce buněčné hypertrofie a hyperplazie, u myší bez PXR tyto účinky chyběly (Staudinger a kol., 2001). U těchto upravených myší byla také zjištěna odlišná regulace exprese Cyp3a11 po expozici xenobiotiky – ani PCN ani dexamethazon u nich neindukoval Cyp3a11 v játrech nebo střevě (Xie a kol., 2000a). Změny byly pozorovány také na úrovni enzymatické aktivity. U myší postrádajících PXR nezvýšil PCN 6 β -hydroxylaci testosteronu ani nezkrátil dobu trvání ochrnutí vyvolaného myorelaxanciem zoxazolaminem – oboje je mírou aktivity Cyp3a11 (Staudinger a kol., 2001). PXR tedy slouží jako klíčový regulátor exprese CYP3A11 *in vivo*.

Pomocí myší postrádajících PXR bylo dále prokázáno, že tento nukleární receptor reguluje i velký počet jiných genů, včetně těch, které kódují další enzymy cytochromu P450, konjugační enzymy a transportéry (Xie a kol., 2000b).

3.3.2. MYŠÍ KMEN S "POLIDŠTĚLÝM" PXR

Aby více prozkoumal mezidruhové rozdíly ve farmakologii PXR, exprimoval Xie se svými kolegy lidský PXR v játrech myší postrádajících PXR (Xie a kol., 2000a). Tak jak bylo očekáváno, nebyl Cyp3a11 v těchto „polidštělých“ myších indukován PCN, ale účinně ho aktivoval rifampicin, který je humánně-specifickým induktorem. Indukční profil CYP3A je tedy určen druhovým původem PXR.

4. KONSTITUTIVNÍ **ANDROSTANOVÝ RECEPTOR**

4.1. CHARAKTERISTIKA CAR

CAR je blízce příbuzný receptoru PXR. Tyto dva receptory mají přibližně ze 70% stejné zastoupení aminokyselin ve svých DBD, v LBD se aminokyseliny shodují z 50% (viz přehledový článek Blumberg a kol., 1998). Stejně jako PXR se i CAR podílí na regulaci genů I. a II. fáze biotransformace xenobiotik a má také důležitou roli v metabolismu některých endogenních látek, např. bilirubinu a žlučových kyselin.

Původně byl popsán jako MB67 – sirotčí nukleární receptor, který je přítomen v játrech a nezávisle na přítomnosti exogenního ligandu silně aktivuje reportérové konstrukty v cell-based assay (Baes a kol., 1994). Když bylo později zjištěno, že se na MB67 vážou metabolity testosteronu androstanol a androstenol a potlačují tím jeho základní účinek, byl tento receptor přejmenován na CAR (Forman a kol., 1998).

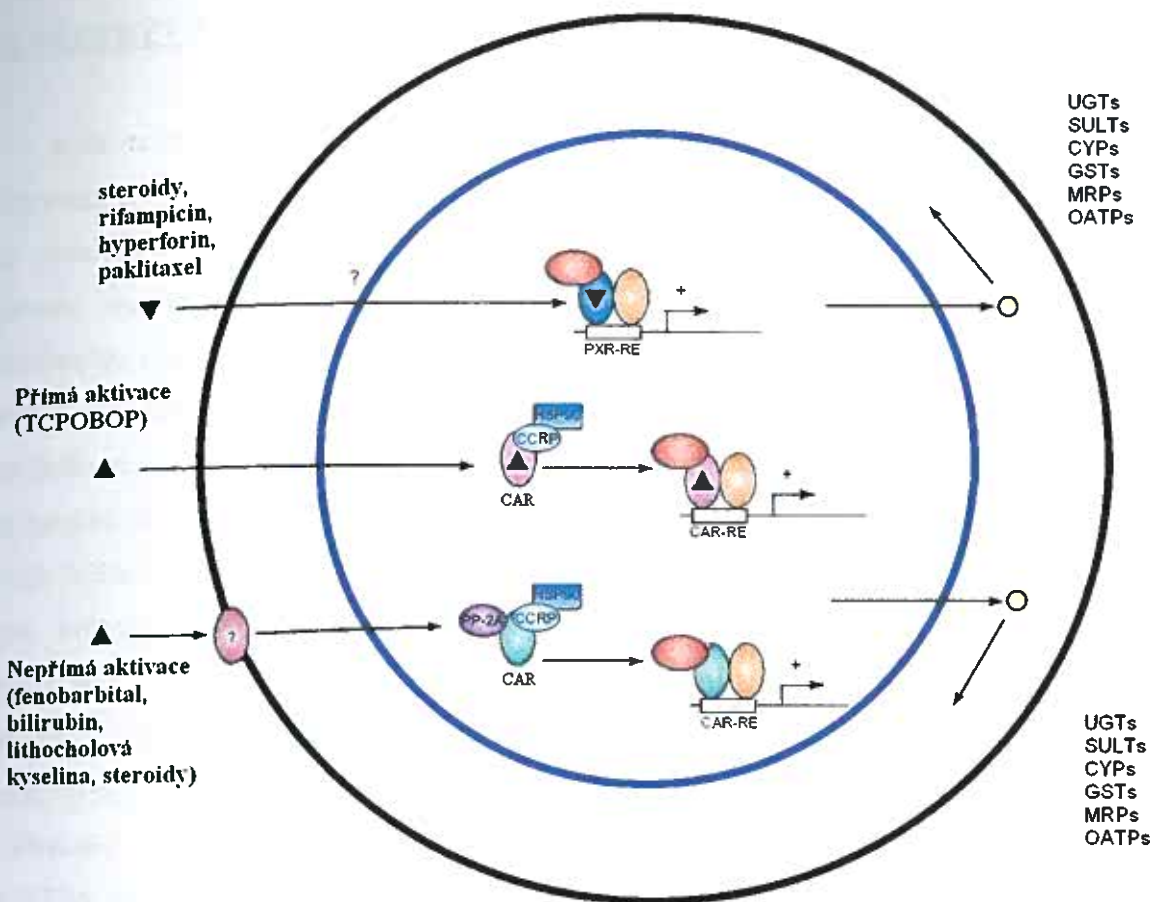
CAR a PXR jsou regulovány několika stejnými sloučeninami, včetně xenobiotik a přirozených steroidů, ale provedené studie, ve kterých byly CAR a PXR testovány souborem těchto látek v cell-based reporter assays, prokázaly mnohem větší specifitu interakcí CAR (viz přehledový článek Moore a kol., 2000a). Molekulární modelování LBD receptoru CAR založené na struktuře PXR naznačuje, že CAR má pravděpodobně mnohem menší kapsu pro navázání ligandu než PXR (viz přehledový článek Kliewer a kol., 2002). Avšak CAR, narozdíl od PXR, může být aktivován nepřímo různými chemickými látkami, které podněcují jeho translokaci do jádra.

Zatímco PXR je lokalizován zejména v jádře, je CAR v neaktivním stavu lokalizován převážně v cytoplazmě (viz přehledový článek Goodwin a Moore, 2004). Odtud se pak při aktivaci ligandem dostává tzv. translokací do jádra. Typickým induktorem tohoto receptoru je fenobarbital – v provedených studiích bylo prokázáno, že za mnoho jeho již dobře popsáných biologických účinků je odpovědný právě CAR. U hlodavců vyvolal fenobarbital výraznou hypertrofii a hyperplazii jater a značnou indukci exprese CYP2B, u myši, u kterých byl gen pro CAR přerušen homologní rekombinací, tyto účinky zcela chyběly (Wei a kol., 2000).

4.1.1. AKTIVACE CAR

Byly popsány dva způsoby aktivace CAR (viz Obrázek 4). Prvním je přímá vazba ligandu na nukleární receptor v cytoplazmě a následná translokace komplexu receptoru, ligandu a koaktivujících proteinů (např. HSP90) do jádra. Takto aktivují transkripci např. CITCO (6-(4-chlorfenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim) anebo, u myšičího receptoru, TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridoxyl)]benzen). Při druhém způsobu je CAR aktivován nepřímo, bez navázání ligandu na receptor – tuto nepřímou aktivaci vyvolává např. fenobarbital nebo fenytoin (viz přehledový článek Goodwin a Moore, 2004). Protože je účinek fenobarbitalu blokován okaidovou kyselinou, která je inhibitorem fosfatázy, zdá se, že mechanismus, jímž fenobarbital moduluje aktivitu CAR, zahrnuje fosforylaci (Kawamoto a kol., 1999).

Po translokaci komplexu CAR a koaktivátorů z cytoplazmy do jádra tvoří tento komplex heterodimer s RXR, a poté se váže na CAR-RE responsivní sekvence v promotorech regulovaných genů.



Obrázek 4

Na obrázku je znázorněn mechanismus aktivace PXR a CAR. PXR je aktivován přímou vazbou ligandu na PXR, který je lokalizován v jádře. Po navázání ligandu se vytváří komplex s RXR a tento komplex se naváže na PXR responivní sekvence (PXR-RE) regulovaných genů.

CAR je v neaktivním stavu lokalizován v cytoplazmě v komplexu s CAR cytoplasmic retention proteinem (CCRP) a heat shock proteinem (HSP90). Může být aktivován dvěma cestami. Při první se ligand váže na CAR v cytoplazmě a komplex je translokován do jádra. Druhým, ne příliš prostudovaným způsobem je nepřímá aktivace, při níž se tvoří komplex fosfatázy 2A (PP-2A), CCRP, CAR a HSP90. Tento komplex bez vazby ligandu na CAR přestupuje do jádra, kde se váže na responivní sekvenci (CAR-RE) v promotoru regulovaných genů.

(převzato z Pávek a kol., 2005)

4.2. PŘEKRYV PXR A CAR

Role receptorů PXR a CAR v regulaci metabolismu xenobiotik se částečně překrývají. Maglich se svými kolegy provedl studii s PXR a CAR přirozených myší, aby prokázal odlišné, ale překrývající se účinky těchto nukleárních receptorů na genovou transkripci. Pomocí PCN, selektivního agonisty PXR, a TCPOBOP, selektivního agonisty CAR zjistili, že oba receptory specificky a koordinovaně řídí mnoho myších genů včetně těch, které jsou zapojeny do oxidační a konjugační fáze metabolismu léčiv a transportu léčiv v játrech a tenkém střevě, společně s mnoha geny zapojenými do metabolismu bilirubinu, žlučových kyselin a steroidů (Maglich a kol., 2002). Některé z genů byly regulovány společně oběma receptory, jiné pouze jedním nebo druhým typem těchto nukleárních receptorů. Podobné odpovědi, ovšem s některými zjevnými druhově specifickými účinky, zjistili i u kultivací lidských hepatocytů při použití rifampicinu (selektivní agonista PXR u lidí) a fenobarbitalu (agonista pro lidský PXR a CAR).

Původně se zdálo, že nukleární receptory CAR a PXR regulují geny CYP2B a CYP3A (Honkakoski a kol., 1998b; přehledový článek Kliewer a kol., 1998). CAR reguluje geny CYP2B vazbou k DR-4 „fenobarbitalové“ responsivní sekvenci (Honkakoski a kol., 1998a). Ta se liší od DR-3 a ER-6 sekvencí lokalizovaných v CYP3A a vypadalo to tedy, že signalizační dráhy PXR a CAR jsou odlišné. Pak bylo ale prokázáno, že se k DR-4 „fenobarbitalové“ responsivní sekvenci váže také PXR a reguluje tak geny v cell-based reporter assays i *in vivo* u transgenních myší s konstitutivně aktivním VP16-human PXR (Xie a kol., 2000b). Stejně tak CAR se může vázat k DR-3 a ER-6 responsivním sekvencím, které byly původně popsány jako vazebná místa PXR/RXR a reguluje expresi CYP3A (Xie a kol., 2000b; Wei a kol., 2000).

Překryv cílových genů CAR a PXR se ale netýká pouze rodin CYP2B a CYP3A. V játrech regulují PXR a CAR společně členy rodin CYP2C, glutathion-S-transferáz, sulfotransferáz a UDP-glukoronosyltransferáz a transportéry MRP2 (Kast a kol., 2002; Maglich a kol., 2002).

Tato zjištění naznačila jisté překryvy signalizačních drah CAR a PXR, ale jsou zde specifické geny, které jsou aktivovány pouze buď agonisty CAR nebo PXR, což zřejmě přispívá k odlišné farmakologii xenobiotik.

5. ABC TRANSPORTÉRY

5.1. OBECNÉ INFORMACE O ABC TRANSPORTÉRECH

Nadrodina ABC (z *angl.* ATP-binding cassette) zahrnuje geny produkující membránové proteiny, které se účastní na energii závislém transportu širokého spektra substrátů přes extra- a intracelulární membrány, a to včetně produktů metabolismu, lipidů, iontů, sterolů a léčiv.

Do skupiny ABC transportérů dnes řadíme 48 popsaných membránových transportérů schopných transportu substrátů za spotřeby energie z hydrolyzy ATP (viz databáze <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html>).

Genetické variace v těchto genech způsobují nebo přispívají ke vzniku mnoha onemocnění člověka, mezi které patří například cystická fibróza, neurologická onemocnění, degenerace sítnice, poruchy transportu cholesterolu a žluči, anémie. Bylo také zjištěno, že zvýšená exprese určitých ABC transportérů se vyskytuje v rakovinných buněčných liniích a tumorech, které jsou farmakorezistentní (tzv. multidrug resistance fenomén) vůči řadě cytostatik.

„Zakonzervování“ motivů ATP-vážících domén genů ABC transportérů v průběhu evoluce umožnilo identifikaci nových členů této nadrodiny na základě sekvenční homologie nukleotidů a proteinů. Pomocí fylogenetických analýz bylo 48 známých lidských ABC transportérů rozděleno do sedmi odlišných podrodin proteinů. Pro každý gen bylo zjištěno přesné umístění v lidských chromozomech a byl dále charakterizován.

5.2. TAKZVANÉ „LÉKOVÉ“ TRANSPORTÉRY ZE SKUPINY ABC TRANSPORTÉRŮ

Jako tzv. lékové (z *angl.* drug) transportéry se dnes označují především P-glykoproteinový/MDR1 transportér (ABCB1), Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2, ABCC2) a Brest Cancer Resistance (BCRP, ABCG2) transportéry. Tyto transportéry transportují řadu léčiv na různých místech organismu, ovšem jejich endogenní substráty dosud nebyly identifikovány. Proto se předpokládá, že tyto transportéry jsou součástí detoxikačních a obranných mechanismů těla (viz přehledový článek Schinkel a kol., 2004).

Transkripční regulace lidského P-glykoproteinu a MRP2 transportéru byla popsána prostřednictvím nukleárního receptoru PXR (Geick a kol. 2001; Kast a kol. 2002). V minulém roce bylo dále zjištěno, že lidský P-glykoproteinový transportér je řízen prostřednictvím CAR (Burk a kol., 2005). O regulaci dalších lidských transportérů ze skupiny ABC nejsou ve světové literatuře přesvědčivé údaje. Několik prací sice uvádí indukci některých ABC transportérů známými ligandy PXR, responsivní sekvence v promotorových oblastech těchto genů však nebyly popsány. Další údaje o regulaci hlodavčích orthologů ABC transportérů jsou uvedeny v Příloze (viz kapitola 9.).

6. CYTOCHROM P-450

6.1. CYTOCHROM P-450

Členové nadrodiny hemobsahujících monooxygenáz cytochromu P-450 (CYP) jsou důležitou součástí I. fáze biotransformace lipofilních chemických látek (Nelson a kol., 1996). Zatímco jsou některé z těchto cytochromů při interakci se substráty vysoce selektivní, jiné oxidují velmi široké spektrum látek, včetně xenobiotik.

Pro řadu ze 48 dnes známých cytochromů P-450 nebyla detailně prostudována transkripční regulace prostřednictvím nukleárních receptorů PXR a CAR. Naopak promotorová oblast nejdůležitějšího cytochromu P-450 u člověka, CYP3A4 byla detailně popsána v několika nezávislých studiích.

Cytochrom CYP3A4 je nejvíce exprimovaný izoenzym cytochromu P-450 v játrech (30% jaterního cytochromu P-450) i střevě (70%), jeho podíl na celkovém metabolismu léčiv je však ještě významnější – předpokládá se, že se podílí na metabolismu poloviny léčiv (Mičuda a kol., 1998), proto se budu v této práci věnovat podrobněji pouze rodině enzymů CYP3A.

6.2. IZOENZYMY CYP3A

Díky své široké substrátové specifitě a tomu, že jsou ve velké míře přítomny v játrech a střevu, tedy tkáních, které jsou běžně vystaveny chemickým škodlivinám z prostředí, jsou isozymy CYP3A zvláště významné pro metabolismus xenobiotik u lidí a dalších savců (viz přehledový článek Maurel a kol., 1996).

Exprese izozymů CYP3A (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7) může být indukována strukturně různými chemickými látkami, z nichž mnohé jsou zároveň substrátem CYP3A (viz přehledový článek Maurel a kol., 1996). Tato indukce zajišťuje mechanismus pro amplifikaci detoxikační odpovědi během doby, kdy je tělo vystaveno xenobiotiku, po jeho odbourání se koncentrace CYP3A vrací na obvyklou hladinu.

Protože je více než polovina předepisovaných léčiv metabolizována isozymy CYP3A, je indukce jejich exprese významná ve vztahu k možným život ohrožujícím lékovým interakcím, kdy jeden lék urychluje metabolismus druhého (viz kapitola 7.).

Indukce CYP3A a dalších enzymů lékového metabolismu může také vést k nadprodukci toxických metabolitů. Například thiazolidinové antidiabetikum troglitazon, které bylo staženo kvůli závažné hepatotoxicitě, je prostřednictvím CYP3A oxidováno na chinonový metabolit, který způsobuje poškození jater oxidačním stresem (He a kol., 2001).

6.3. INDUKCE CYP3A

Už před více než třiceti lety bylo zjištěno, že určité steroidy, včetně syntetického PCN, indukují expresi určitých isoform CYP (Selye, 1971). Tyto PCN-inducibilní CYP byly vyčištěny a ukázalo se, že jsou odlišné od dříve popsaných isoform (Elshourbagy a Guzelian, 1980).

Další výzkumy na hepatocytech potkana ukázaly, že exprese tohoto CYP, který byl označen jako CYP3A23, je kromě PCN také významně aktivována glukokortikoidem dexamethazonem (Schuetz a kol., 1984). Provedené studie ale naznačily, že molekulární mechanismus, který je podkladem aktivace exprese CYP2A23 dexamethazonem, je odlišný od signalizačních drah klasických glukokortikoidních receptorů (GR; NR3C1; viz přehledový článek Kliewer, 2002).

Dnes víme, že mezi látky, které indukují expresi CYP3A23 a CYP3A2 u potkanů, patří strukturně nepodobné sloučeniny jako je PCN, dexamethazon, betamethazon, hydrokortizon, α -methylprednisolon, mifepriston (RU486), dehydroepiandrosteron, spironolakton; makrolidové antibiotikum triacetyloleandomycin; antimykotikum klotrimazol; polychlorované bifenyly; chlorované organické pesticidy trans-nonachlor a γ -chlordan; blokátor kalciového kanálu nikardipin; inhibitor 11β -hydroxylázy metyrapon; a barbiturát fenobarbital (viz přehledový článek Kliewer a kol., 2002).

V játrech zdravého dospělého člověka převládá CYP3A4, který je zde přítomen ve velkém množství a udává se, že je zapojen do oxidačního metabolismu velkého množství sloučenin. Indukce exprese CYP3A4 xenobiotiky je dobře zdokumentována (viz přehledový článek Maurel a kol., 1996). Protože mezi látky indukující CYP3A4

patří také většina předepisovaných léčiv, je tento jev podkladem četných, klinicky významných, lékových interakcí.

Jedním z nejúčinnějších aktivátorů exprese CYP3A4 *in vivo* i *in vitro* (za použití primárních kultur lidských hepatocytů) je makrocyclické antibiotikum rifampicin (viz Obrázek 2). Tak jako u hlodavčího CYP3A23 je i exprese lidského CYP3A4 indukována steroidy, včetně dexamethazonu, RU486 (viz Obrázek 2), spironolaktonu a cyproteronacetátu. Dále CYP3A4 indukuje antimykotikum klotrimoxazol, fenobarbital, fenytoin, fenylbutazon, sulfadimidin, inhibitory protonové pumpy omeprazol a lansoprazol, a metyrapon (viz přehledový článek Kliewer, 2002).

Indukce členů CYP3A podrodiny se liší v závislosti na druhu. Například zatímco exprese lidských CYP3A4 a králičích CYP3A6 je silně aktivována antibiotikem rifampicinem, hlodavčí CYP3A23 a CYP3A2 jsou tímto léčivem indukovány omezeně. Naopak PCN je účinným induktorem CYP3A potkanů, ale expresi lidských CYP3A4 a králičích CYP3A6 indukuje pouze slabě (viz přehledový článek Kocarek a kol., 1995). Tyto údaje naznačily, že v receptorech, které odpovídají na xenobiotika a indukují expresi CYP3A genů, jsou pravděpodobně důležité, druhově specifické, rozdíly.

6.4. RESPONSIVNÍ SEKVENCE V PROMOTORECH CYP3A

Responsivní sekvence byly definovány v promotorech genů kódujících lidské, králičí a hlodavčí CYP3A izozymy (mj. lidský CYP3A4 nebo králičí CYP3A6). Každá z těchto responsivních sekvencí obsahuje dvě kopie vazebného místa nukleárního receptoru AGTTCA. Tato dvě vazebná místa jsou sestavena buď jako direct repeat s mezerou tří (DR-3) nebo čtyř (DR-4) nukleotidů, nebo jako everted repeat, kde mají opačnou orientaci, s mezerou šesti nukleotidů (ER-6). V některých genech se v direct i everted repeat vyskytují odchylky od tradiční sekvence AGTTCA (viz Obrázek 5). PXR se ke každé z těchto responsivních sekvencí váže vždy jako heterodimer s RXR.

Při studii, ve které byly chimérické CYP3A23- (báze -220 až -56), CYP3A4- (báze -179 až -35) a CYP3A6- (báze -220 až -56) reportérové konstrukty vneseny do hepatocytů potkana, byly tyto geny silně aktivovány dexamethazonem a PCN, ale ne

rifampicinem. V primárních kulturách hepatocytů králíka byly CYP3A4 reportérové plazmidy aktivovány rifampicinem a dexamethazonem, ale ne PCN. Bylo tak vhodně ukázáno, že mezidruhové rozdíly v indukci CYP3A jsou určeny spíše buněčným prostředím než strukturou genu (Barwick a kol., 1996). Citlivost na dexamethazon, PCN a rifampicin byla zjištěna u 18-ti bázového motivu, který zahrnuje nukleotidy -170 až -153 a -177 až -160 z CYP3A4 a CYP3A6. Tento element obsahoval motiv ER-6 (Barwick a kol., 1996). Goodwin a kol. dále identifikovali sekvenci DR-3 v oblasti mezi - 7836 až -7208 promotorové oblasti genu CYP3A4, která má vyšší afinitu k receptorům PXR i CAR, a která se spolu s ER-6 tzv. proximální oblasti promotoru spolupodílí na maximálním indukčním efektu (Goodwin a kol. 1999).

DIRECT REPEAT (DR) 3

CYP3A23 TGA ACT TCA TGA ACT
 <----- <-----

CYP3A2 TGA ACT TTA TGA ACT
 <----- <-----

CYP3A2 TGACCT TCT TGACCT
 <----- <--x--

CYP3A4 TGA ACT TGC TGA ACC
 <----- <-----

DIRECT REPEAT (DR) 4

CYP2B1 TGTACT TTCC TGACCT
 Cyp2b10 <·x... <-----

CYP2B6 TGTACT TTCC TGA ACC
 <·x... <-----

CYP2B6 TGGACT TTCC TGA ACC
 <·x... <-----

CYP2C9 CAACT CTTC TGACCT
 xx---- <-----

MDR1 TGA ACT AACT TGACCT
 <----- <-----

EVERTED REPEAT (ER) 6

CYP3A23 TTA ACT CAAAGG AGGTCA
 <x----- >----->

CYP3A4 TGA ACT CAAAGG AGGTCA
 <----- >----->

CYP3A5 TGA ACT CAAAGG AGGTAA
 <----- >----x>

CYP3A6 TGA ACT CAGAGG AGGTCA
 <----- >----->

CYP3A7 TTA ACT CAATGG AGGTCA
 <x----- >----->

MDR1 TGAGAT TAAACA AGTTCA
 <--xx- >----->

EVERTED REPEAT (ER) 8

MRP2 TGA ACT CTTAACCA AGTTCA
 <----- >----->

Obrázek 5

Responsivní sekvence PXR-RE (*angl.* PXR response elements).

PXR se váže jako heterodimer s RXR k DR-3, DR-4, ER-6 a ER-8 elementům v regulační oblasti uvedených genů.

Na obrázku jsou uvedeny tradiční sekvence (*angl.* half-site) a jejich orientace.

Odchyly od tradiční sekvence AG(G/T)TCA jsou označeny (x).

(podle přehledového článku Kliewera a kol., 2002)

7. LÉKOVÉ INTERAKCE

7.1. LÉKOVÉ INTERAKCE

V současné době, kdy pacienti často užívají současně více druhů léků, jsou lékové interakce závažným problémem. Ačkoli se PXR původně vyvinul jako součást obranného mechanismu těla proti lipofilním xenobiotikům, je právě jeho aktivace základem důležité třídy lékových interakcí.

Aktivace PXR léčivem (například rifampicinem aj.) a následná indukce exprese CYP3A4 může vést k nežádoucímu urychlení metabolismu jiných léčiv. CYP3A4 se týká metabolismu více než 50% předepisovaných léčiv, takže léčiva aktivující PXR mohou snížit klinickou účinnost více než poloviny všech ostatních léčiv, která jsou podána společně s nimi, často s život ohrožujícími následky

V odborné literatuře byla popsána celá řada interakcí, které se vysvětlují na základě indukce biotransformačních enzymů prostřednictvím nukleárních receptorů PXR a CAR. V rámci své diplomové práce uvádím jen tři příklady nejznámějších interakcí s hypericinem, rifampicinem a vybranými antiepileptiky.

7.2. TŘEZALKA

PXR není aktivován pouze léčivy, ale také dalšími chemickými sloučeninami. Na konci devadesátých let se v odborné lékařské literatuře objevila řada článků popisujících interakce rostlinného antidepresiva třezalky (*lat.* Hypericum perforatum; *angl.* St. John's wort) s různými předepisovanými léky - orálními kontraceptivy, imunosupresivem cyclosporinem, inhibitorem HIV proteázy indinavirem, antikoagulanciem warfarinem a kardiotonikem digoxinem (Ernst, 1999; Johne a kol., 1999). Ve všech případech vedla třezalka ke zřetelnému poklesu účinných koncentrací léčiva.

Následně bylo prokázáno, že třezalka aktivuje PXR v cell-based reporter assays a indukuje expresi CYP3A4 v primárních kulturách lidských hepatocytů (Moore a kol., 2000b). Analýza jednotlivých chemických sloučenin, kterých třezalka obsahuje více než dvacet ukázala, že látkou aktivující PXR je hyperforin (*viz* Obrázek 2), jenž je zodpovědný za antidepresivní účinek třezalky. Hyperforin se váže přímo na PXR

s vysokou afinitou – hodnota efektivní koncentrace EC_{50} přibližně 20nM (Moore a kol., 2000b).

Tyto studie poskytly molekulární vysvětlení interakcí mezi třezalkou a předepisovanými léčivy a naznačily, že třezalka bude interagovat i s dalšími léčivy metabolizovanými CYP3A4.

Zjištění toho, že PXR, významný regulátor exprese CYP3A4, je zodpovědný za mnoho lékových interakcí, bylo velmi důležité. Pomocí moderních metod jako je cell-based assays a scintillation proximity binding assays je možné identifikovat chemické sloučeniny, které budou indukovat expresi CYP3A4 již v počátečních etapách výzkumu léků. Vyvíjené léčivé látky tak mohou být testovány na to, zda aktivují PXR a pokud ano, je možné je nahradit látkami se stejnou terapeutickou účinností, jež schopnost aktivovat PXR postrádají.

Například antidiabetika troglitazon, pioglitazon a rosiglitazon jsou účinnými agonisty PPAR γ , ale pouze troglitazon je zároveň silným agonistou PXR (viz přehledový článek Jones a kol., 2000). Zatímco troglitazon interagoval u lidí s dalšími léky a působil hepatotoxicky, což vedlo k jeho stažení (Watkins a kol., 1998), u pioglitazonu a rosiglitazonu, které PXR neaktivují, se tyto nežádoucí účinky neobjevily.

Dalším příkladem je cytostatikum paklitaxel a jeho analog docetaxel. Antineoplastický účinek obou léčiv je obdobný, avšak paklitaxel účinně aktivuje PXR zatímco docetaxel ne (Synold a kol., 2001). Rozdíl v aktivaci PXR je zřejmě příčinou lepších farmakokinetických vlastností docetaxelu.

7.3. RIFAMPICIN

Lehmann a kol. identifikovali antituberkulotikum rifampicin jako silný ligand receptoru PXR (Lehmann a kol. 1998). Již předtím se však vědělo, že tato látka je silným induktorem řady jaterních izoenzymů cytochromu P-450. Prostřednictvím indukce biotransformace spolupodaných léčiv (především skrze cytochrom CYP3A4) byly pro rifampicin popsány závažné nebo velmi závažné lékové interakce s desítkami léčiv (viz přehledný článek Niemi a kol., 2003; Suchopár a kol., 2005). Látky, se kterými byly popsány závažné lékové interakce s rifampicinem uvádí tabulka 1.

Tabulka 1

Léčiva, u nichž byly dokumentovány klinicky závažné lékové interakce s rifampicinem.

| | | |
|------------------|----------------|-------------|
| Chinidin | Imatinib | Ondasetron |
| Cyklosporin A | Ifosfamid | Propafenon |
| Dapson | Itrakonazol | Ritonavir |
| Delavirdin | Karvediol | Saquinavir |
| Dextromethorfan | Ketokonazol | Simvastatin |
| Disopyramid | Klarithromycin | Sirolimus |
| Dolasetron | Kodein | Takrolimus |
| Ethinylestradiol | Meflochin | Tamoxifen |
| Etorikoxib | Methadon | Tolbutamid |
| Everolimus | Midazolam | Toremifen |
| Fenprokuron | Morfin | Triazolam |
| Gliklazid | Nateglinid | Verapamil |
| Glimepirid | Nelfinavir | Vorikonazol |
| Glipizid | Nifedipin | Warfarin |
| Haloperidol | Nilvadipin | Zopiklon |
| Indinavir | Norethisteron | |

Tabulka byla sestavena na základě informací z Kompendia lékových interakcí INFOPHARM 2005 (Suchopár a kol. 2005) a přehledného článku Niemi a kol. 2003.

7.4. ANTIPILEPTIKA

U antiepileptik fenobarbitalu, primidonu, fenytoinu a karbamazepinu bylo prokázáno, že aktivují PXR a CAR *in vitro* (viz přehledový článek Moore a kol., 2000a). Navíc již v minulosti byla popsána řada lékových interakcí zprostředkovaných indukci biotransformačních enzymů cytochromu P-450 (např. CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6) těmito léčivy (viz přehledový článek Patsalos a kol., 2003).

Za všechny uvádím dva příklady závažných lékových interakcí. Ross se svými kolegy prokázal interakce fenobarbitalu, primidonu a karbamazepinu s antikoagulanciem warfarinem. Prostřednictvím indukce biotransformace warfarinu vedou tato antiepileptika ke snížení jeho antikoagulační aktivity (Ross a kol., 1980), což může mít život ohrožující následky. V jiné studii byla popsána interakce fenytoinu, který, na základě indukce biotransformačního enzymu CYP3A4, snižuje plazmatické koncentrace cyklosporinu A (Freeman a kol., 1984).

8. ZÁVĚR

Do nadrodiny ABC transportérů řadíme membránové proteiny, které přenášejí různé molekuly přes extra- i intracelulární membrány, a to za spotřeby energie z hydrolýzy ATP. Řada klinicky důležitých léčiv je transportována lékovými transportéry, které zásadním způsobem řídí jejich absorpci, distribuci i eliminaci. Expresi některých těchto transportních proteinů (MDR1, MRP2, Mrp3, Mrp4) je regulována nukleárními receptory PXR a CAR. Tyto dva receptory se také podílí na ovlivnění exprese enzymů I. a II. fáze biotransformace.

Receptory PXR a CAR se vyvinuly jako součást detoxikačního systému organismu a chrání tělo jak před xenobiotiky, tak i před kumulací některých endogenních látek. Xenobiotika a endogenní sloučeniny, jež jsou ligandy PXR a CAR, aktivují tyto nukleární receptory a tím indukují expresi cílových genů, které se podílejí na biotransformaci nebo eliminaci xenobiotik. Po odstranění xenobiotika z těla již nejsou receptory aktivovány a koncentrace cílových genů se vrací na původní hladinu.

PXR je receptor se širokou substrátovou specifitou, což je dáno jeho strukturou, která se poněkud liší od ostatních nukleárních receptorů. CAR sice vykazuje větší specifičnost vůči ligandům, avšak narozdíl od PXR může být některými sloučeninami (například fenobarbitalem) aktivován nepřímo. Role těchto dvou receptorů se částečně překrývají, ale jsou zde specifické geny aktivované pouze agonisty PXR nebo CAR.

Mezi xenobiotika aktivující PXR a CAR patří řada léčiv. Ačkoli se tedy PXR původně vyvinul jako obranný mechanismus, představuje v dnešní době, kdy mnoho pacientů užívá současně více léků, molekulární základ lékových interakcí, při kterých je metabolismus léčiva urychlen spolupodaným léčivem. Do dnešního dne byla popsána už celá řada interakcí, jež jsou způsobeny indukcí biotransformačních enzymů prostřednictvím nukleárních receptorů PXR a CAR. A je pravděpodobné, že u dalších, dosud nevysvětlených interakcí, bude potvrzena stejná příčina.

Získané znalosti o PXR a CAR nám dnes ale umožňují minimalizovat tyto lékové interakce. Pomocí současných metod lze testovat jaký účinek mají nově vyvíjená i už schválená léčiva na PXR a CAR a tím předpovědět jejich potenciální interakce. Již během výzkumu nového léčiva, je tedy možné zjistit, zda bude látka aktivovat PXR a/nebo CAR a pokud ano, nahradit tuto látku látkou jinou, jež tento účinek nemá a tak

omezit možné budoucí lékové interakce. Stejně zkoušky lze použít také u fytofarmak a volně prodejných potravních doplňků, které se také často užívají společně s léčivy a mohou ovlivňovat jejich účinek.

Poznatky o PXR a CAR a o interakcích, které jsou následkem jejich aktivace, by také mohly v budoucnu pomoci při bezpečnějším předepisování léčiv. Pokud budou lékaři seznámeni s touto problematikou, mohou volbou léčiva neaktivujícího PXR či CAR předejít potenciálním lékovým interakcím.

9. PŘÍLOHA

9A. PŘEHLED GENŮ REGULOVANÝCH PXR

Informace o genech, které jsou regulovány prostřednictvím PXR, byly vyhledány v databázích PubMed a GeneBank. Patří mezi ně geny pro transportéry, enzymy CYP450, konjugační enzymy a také pro některé receptory. Geny uvedené velkým písmem jsou lidské, malým písmem jsou označeny geny hlodavců.

ABC-transportéry:

a) MDR1 (multidrug resistance protein 1)

alternativní názvy:

ATP-binding cassette, podrodina B, člen 1; ABCB1

P-glykoprotein 1; PGY1

GP170

Membránový protein kódovaný tímto genem je členem nadrodiny ABC transportérů, které přenášejí různé molekuly přes extra- a intracelulární membrány. ABC geny se dělí na sedm odlišných podrodin - ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, White. P-glykoprotein je členem podrodiny MDR/TAP, jež se podílí na lékové rezistenci. Protein kódovaný tímto genem je ATP-dependenční léková efluxní pumpa pro xenobiotické sloučeniny se širokou substrátovou specifitou. Odpovídá za snížené hromadění léčiv v rezistentních buňkách a je častou příčinou rezistence vůči cytostatikům. Tento protein také působí jako transportér v hematoencefalické bariéře a v placentě, kde má zásadní význam pro ochranu plodu před možným škodlivým působením xenobiotik. MDR1 je ve velmi vysoké míře přítomen v nadledvinách, ve vysoké míře v ledvinách, méně v plicích, játrech, tlustém střevě; a nízké hladiny MDR1 jsou v mnoha dalších tkáních. Gen pro MDR1 je také exprimován v některých lidských nádorech.

b) MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2)

alternativní názvy:

ATP-binding cassette, podrodina C, člen 2; ABCC2

canalicular multispecific organic anion transporter 2; CMOAT2

Protein, který je kódovaný tímto genem, patří do nadrodiny ABC transportérů. Je členem podrodiny CFTR/MRP, jež se podílí na lékové rezistenci. MRP2 je přítomen v hepatocytech a účastní se transportu konjugátů farmak a endogenních látek do žluči. Mezi substráty MRP2 patří cytostatika, například vinblastin, a proto se předpokládá, že tento protein přispívá k lékové rezistenci u buněk savců.

c) Mrp3 (multidrug resistance-associated protein 3)

druh: myš

alternativní názvy:

ATP-binding cassette, podrodina C, člen 3; ABCC3

canalicular multispecific organic anion transporter 3; CMOAT3

Sekrece žluči v játrech je z velké části řízena ABC transportéry, které jsou umístěny v kanalikulární membráně a zprostředkovávají ATP-dependentní transport žlučových kyselin, fosfolipidů a organických iontů. Kanalikulární hlodavčí ABC-proteiny jsou rozdělovány na: MDR1 (ABCB1), MDR3 (ABCB4) a SPGP (ABCB11), který se podobá MDR1 P-glykoproteinu, zatímco MRP2 (ABCC2) je strukturou a sekvencí podobný MRP1 (ABCC1) a transportuje podobné substráty. Mrp3 je členem MRP podrodiny, která se podílí na lékové rezistenci. Jeho funkce ještě nebyla stanovena, je možné, že se účastní transportu žluči a intestinální exkreci organických aniontů.

Další transportéry z jiných rodin:

a) Oatp2 (organic anion transporter 2)

druh: potkan

alternativní názvy:

solute carrier organic anion transporter family, člen 1B1; SLCO1B1

liver-specific transporter; LST1

organic anion transporter C; OATPC

organic anion transporter 1B1; OATP1B1

dříve: solute carrier family 21 (organic anion transporter), člen 6; SLC21A6

Oatp2 zprostředkovává transport mnoha organických aniontů včetně žlučových kyselin, konjugátů estrogenu, ouabainu a digoxinu. Je možné, že se podílí na toxicitě digoxinu. V játrech se účastní odstraňování endogenních sloučenin a xenobiotik z krve.

b) OATP2 (organic anion transporter 2)

alternativní názvy:

solute carrier organic anion transporter family, člen 1B1; SLCO1B1

liver-specific transporter; LST1

organic anion transporter C; OATPC

organic anion transporter 1B1; OATP1B1

dříve: solute carrier family 21 (organic anion transporter), člen 6; SLC21A6

OATP2 zprostředkovává transport mnoha organických aniontů v lidském těle. Bylo prokázáno, že OATP2 transportuje konjugované steroidy, zejména 17- β -glukuronosyl estradiol; eikosanoidy; a thyroidní hormony nezávisle na sodíku. V játrech se účastní odstraňování endogenních sloučenin a xenobiotik z krve.

Konjugační enzymy:

a) SULT2A1 (rodina cytosolických sulfotransferáz 2A, dehydroepiandrosteron-preferující, člen 1)

alternativní názvy:

sulfotransferáza, dehydroepiandrosteron-preferující; STD

DHEA sulfotransferáza

dehydroepiandrosteron sulfotransferáza

Sulfotransferázy (ST) mají důležitou roli v metabolismu léčiv a endogenních sloučenin, protože katalyzují přeměnu těchto látek na sulfátové konjugáty, které jsou více hydrofilní a lépe rozpustné ve vodě, a tím usnadňují jejich eliminaci z organismu. Sulfatace může být také důležitá pro regulaci mnoha endogenních sloučenin, jako jsou steroidy a neurotransmitery, jelikož mění biologické vlastnosti těchto sloučenin. Jednotlivé sulfotransferázy se liší v tkáňové distribuci a substrátové specifitě. SULT2A1 je přítomna zejména v játrech a nadledvinkách kde probíhá sulfatace steroidů a žlučových kyselin.

b) UGT1A1 (rodina UDP-glykosyltransferáz 1, polypeptid A1)

alternativní názvy:

uridindifosfátglykosyltransferázová rodina 1, polypeptid A1

uridindifosfát glykosyltransferáza 1; UGT1
UDP-glykosyltransferáza 1
uridindifosfát glukuronosyltransferáza
fenol / bilirubin UDP-glukuronosyltransferáza
GNT1

Gen UGT1A1 kóduje UDP-glukuronosyltransferázu, enzym glukuronizace, při které jsou malé lipofilní molekuly, jako jsou steroidy, bilirubin, hormony a léčiva, přeměňovány na ve vodě rozpustné, snadno eliminovatelné metabolity. Hlavním substrátem tohoto enzymu je bilirubin, mírnou aktivitu vykazuje také s jednoduchými fenoly, flavony a C18 steroidy. Mutace v genu UGT1A1 jsou příčinou Crigler-Najjarova syndromu typu I. a II. a Gilbertova syndromu.

c) UGT1A3 (rodina UDP-glykosyltransferáz 1, polypeptid A3)

alternativní názvy:

UGT1C

Tento gen rovněž kóduje UDP-glukuronosyltransferázu, enzym glukuronizace. Mezi substráty tohoto enzymu patří estron, 2-hydroxyestron a metabolity benzo- α -pyrenu.

d) UGT1A4 (rodina UDP-glykosyltransferáz 1, polypeptid A4)

alternativní názvy:

UGT1D

Gen UGT1A4 je dalším z genů kódujících glukuronizační enzym UDP-glukuronosyltransferázu. Tento enzym vykazuje mírnou glukuronizační aktivitu vůči bilirubinu, větší vůči aminům, steroidům a sapogeninům.

e) Gsta1 (α -1 glutathion S-transferáza)

druh: myš

alternativní názvy:

glutathion S-transferáza A1

GST, třída α , 1

Glutathion S-transferázy jsou enzymy podílející se na detoxikaci elektrofilních sloučenin, mezi něž patří například karcinogeny nebo léčiva, jejich konjugací s glutathionem za vzniku thioéterů. Geny kódující tyto enzymy jsou vysoce polymorfni. Tyto polymorfismy mohou měnit individuální vnímavost ke karcinogenům a toxinům

a ovlivňovat toxicitu a účinnost některých léčiv. Existují dvě formy glutathion S-transferázy, cytoplasmatická a membránová, které jsou kódovány dvěma odlišnými genovými rodinami. V současnosti je známo osm tříd cytoplasmatických glutathion S-transferáz, tento gen kóduje glutathion S-transferázu patřící do třídy α . Geny třídy α jsou nejhojněji exprimované glutathion S-transferázy v játrech. Kromě metabolismu bilirubinu a důležitých cytostatik v játrech, vykazuje tato třída enzymů glutathion peroxidázovou aktivitu, čímž chrání buňky před kyslíkovými radikály a produkty peroxidace.

f) Gsta2 (α -2 glutathion S-transferáza)

druh: potkan

alternativní názvy:

glutathion S-transferáza A2

glutathion S-transferáza 2; GST2

jaterní GST2

GST, třída α , 2

Tento gen kóduje enzym glutathion S-transferázu, který patří do třídy α cytoplasmatických glutathion S-transferáz. Kromě toho, že se účastní metabolismu mnoha xenobiotik, je také zapojen do transportu některých endogenních sloučenin, například bilirubinu a hemu.

g) Gsta4 (α -4 glutathion S-transferáza)

druh: myš

alternativní názvy:

glutathion S-transferáza A4

Glutathion S-transferázy katalyzují konjugaci redukovaných glutathionů a různých elektrofilních sloučenin, včetně mnoha známých karcinogenů a mutagenů. Gsta4 je cytoplasmatická forma glutathion S-transferázy. Gsta4 je účinný katalyzátor konjugace 4-hydroxynonenalu, což je důležitý produkt peroxidační degradace arachidonové kyseliny a marker oxidačního stresu.

h) Gstm1 (μ -1 glutathion S-transferáza)

druh: potkan

alternativní názvy:

glutathion S-transferáza M1

glutathion transferáza, třída μ , 1

GST1

hepatární a fibroblastová GST1

Tento gen kóduje glutathion S-transferázu ze třídy μ cytoplasmatických glutathion S-transferáz. Tato třída enzymů katalyzuje konjugaci elektrofilních sloučenin s glutathionem a tím umožňuje jejich eliminaci. Tento enzym je považován za tzv. „scavenger“, protože neutralizuje škodlivé metabolity cizorodých sloučenin. U některých lidských populací se objevuje vysoké procento absence tohoto genu a zdá se, že tato deficience je rizikovým faktorem rakoviny, jelikož zvyšuje vnímavost vůči karcinogenům.

ch) Gstm2(μ -2 glutathion S-transferáza)

druh: potkan

alternativní názvy:

glutathion S-transferáza 4, GST4

glutathion S-transferáza M2

GST, svalová, GSTM

Také tento gen kóduje glutathion S-transferázu ze třídy μ cytoplasmatických glutathion S-transferáz, které konjugací elektrofilních sloučenin s glutathionem umožňují jejich eliminaci. Gstm2 má důležitou úlohu v metabolismu xenobiotik a v odpovědi na oxidační stres. Gstm2 je vysoce polymorfní, čímž je dána variabilita ve vnímavosti vůči karcinogenům a toxinům a ovlivněna toxicita a účinnost některých léčiv.

Izoenzymy cytochromu P-450:

a) CYP3A4 (cytochrom P-450, podrodina 3A, polypeptid 4)

alternativní názvy:

CYP3; CYP3A

P450, rodina III

P450-III, steroidy indukovatelný

glukokortikoidy indukovatelný P450; P450C3

cytochrom P-450PCN1

nifedipin oxidáza

CYP3A4 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Proteiny cytochromu P-450 jsou monooxygenázy, které katalyzují mnoho reakcí zapojených do metabolismu léčiv a do syntézy cholesterolu, steroidů a dalších lipidů. CYP3A4 je nejvíce exprimovaný izoenzym cytochromu P-450 v játrech dospělého člověka. Jeho expresi indukují glukokortikoidy. CYP3A4 je odpovědný za oxidační metabolismus širokého spektra xenobiotik, včetně přibližně 60% všech používaných léčiv. Mezi tato léčiva patří například acetaminofen, kodein, cyklosporin A, indinavir, amlodipin, atorvastatin, zolpidem, diazepam a erythromycin.

b) CYP2C9 (cytochrom P-450, podrodina 2C, polypeptid 9)

alternativní názvy:

cytochrom P-450, fenobarbitalem indukovatelný

CYP2C9 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Je to jedna z nejdůležitějších isoform CYP450 pro metabolismus léčiv. Exprese CYP2C9 je indukována rifampicinem. Mezi léčiva, která jsou metabolizována CYP2C9 patří například warfarin, fenytoin, tolbutamid, glipizid, diklofenak a ibuprofen. Studie prokázaly, že existují jedinci, kteří jsou pomalými metabolizátory fenytoinu a tolbutamidu, což naznačuje, že tento gen je polymorfní.

c) CYP2C19 (cytochrom P-450, podrodina 2C, polypeptid 19)

alternativní názvy:

mefenytoin 4-hydroxyláza

P450C2C

CYP2C

CYP2C19 kóduje klinicky významný enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Do širokého spektra léčiv, jejichž metabolismus je katalyzován CYP2C19, patří například antikonvulzivum mefenytoin, antiulcerózum omeprazol, antidepresiva diazepam a některé barbituráty a antimalarikum proguanil. Polymorfismy v genu CYP2C19 vedou ke změně schopnosti metabolizovat mefenytoin (tzv. pomalí a rychlí metabolizátoři mefenytoinu).

d) CYP1A2 (cytochrom P-450, podrodina 1A, polypeptid 2)

alternativní názvy:

cytochrom P-450, indukovatelný aromatickými sloučeninami

dioxinem indukovatelný P3-450

fenacetin O- deethyláza

Tento gen kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Cytochrom P-450 – monooxygenázový systém katalyzuje mnoho reakcí metabolismu léčiv a syntézy cholesterolu, steroidů a dalších lipidů. CYP1A2 představuje téměř 15% cytochromového systému v játrech. Více než 20 klinicky používaných léčiv je částečně nebo úplně metabolizováno prostřednictvím CYP1A2, například kofein, teofylin, imipramin, estradiol, ondansetron, klozapin a propranolol. Jeho exprese je indukována některými polycyklickými aromatickými uhlovodíky, z nichž několik bylo nalezeno v cigaretovém kouři.

e) CYP3A7 (cytochrom P-450, podrodina 3A, polypeptid 7)

CYP3A7 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Tento enzym hydroxyluje testosteron a dehydroepiandrosteron 3-sulfát, který je zapojen do tvorby estriolu během gravidity. Tento enzym také metabolizuje některé jedy jako například aflatoxin B1.

f) Cyp3a11 (cytochrom P-450, podrodina 3a, polypeptid 11)

druh: myš

g) Cyp3a13 (cytochrom P-450, podrodina 3a, polypeptid 13)

druh: myš

Tyto geny kódují enzymy cytochromu P-450 u myší. Cyp3a13 je přítomen ve větší míře ve střevě, Cyp3a11 v játrech. Oba tyto enzymy se podílí na first-pass efektu při metabolismu některých sloučenin.

h) Cyp2b10 (cytochrom P-450, podrodina 2b, polypeptid 10)

druh: myš

Cyp2b10 kóduje enzym cytochrom P-450 – monooxygenázového systému u myší. Gen Cyp2b10 obsahuje fenobarbitalovou responsivní sekvenci, na kterou se jako odpověď na působení fenobarbitalu váže heterodimer CAR/RXR a také PXR/RXR.

ch) CYP2B6 (cytochrom P-450, podrodina 2B, polypeptid 6)

alternativní názvy:

cytochrom P-450, fenobarbitalem indukovatelný

Také CYP2B6 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450, která je důležitým katalyzátorem biotransformačních reakcí. Exprese CYP2B6 je indukována fenobarbitalem. Prostřednictvím CYP2B6 jsou metabolizována například cytostatika cyklofosfamid a ifosfamid.

i) CYP7A1 (cytochrom P-450, podrodina 7A, polypeptid 1)

alternativní názvy:

CYP7

cholesterol 7 α -hydroxyláza

cholesterol 7 α -monooxygenáza

CYP7A1 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450, který katalyzuje v játrech první krok přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny. Je tedy důležitý pro regulaci syntézy žlučových kyselin, základního mechanismu eliminace cholesterolu z těla.

Další enzymy:

a) Aldh1a1 (aldehyd dehydrogenázová rodina 1, podrodina A1)

druh: myš

alternativní názvy:

aldehyd dehydrogenáza 1; ALDH1

acetaldehyd dehydrogenáza 1

ALDH, jaterní cytosolová

retinal dehydrogenáza 1; RALDH1

Aldehyd dehydrogenáza je důležitý enzym, účastní se metabolismu alkoholu – přeměňuje acetaldehyd, vzniklý z ethanolu působením alkohol dehydrogenázy, na acetát. V játrech existují dvě isoformy tohoto enzymu – cytosolová (ALDH1) a mitochondriální (ALDH2). Tento gen kóduje cytosolovou isoformu enzymu, která má vysokou afinitu k aldehydům a je silně inaktivována disulfiramem.

b) PAPSS2 (3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát syntáza 2)

alternativní názvy:

fosfoadenosin-fosfosulfát syntetáza 2

PAPS syntáza 2

PAPS syntetáza 2

ATP sulfuryláza/adenosin fosfosulfát kináza 2; ATPSK2

ATP sulfuryláza/APS kináza 2

SK2

Sulfatace je důležitý způsob modifikace endogenních (lipidy, proteiny, a uhlovodíky) a exogenních (xenobiotika a léčiva) sloučenin. U savců je pro všechny sulfotransferázy, enzymy katalyzující sulfataci, donorem sulfátové skupiny 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát (*angl.* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, PAPS), který je syntetizován z ATP a anorganického sulfátu prostřednictvím dvou isoform – PAPSS1 a PAPSS2. Narozdíl od mRNA pro PAPSS1, která je ve velkém množství přítomna v lidském mozku, je mRNA pro PAPSS2 ve velkém množství přítomna v lidských játrech. Při sulfataci nejprve ATP sulfuryláza katalyzuje syntézu adenosin-fosfosulfátu (APS) z ATP a SO_4^{2-} a v dalším kroku APS kináza fosforyluje APS v přítomnosti další molekuly ATP za vzniku PAPS. V nižších organismech jsou tyto děje katalyzovány jednotlivými enzymy.

c) ALAS1 (delta-aminolevulánová syntáza)

alternativní názvy:

ALAS

ALAS, ALASH

Delta-aminolevulánová syntáza katalyzuje kondenzaci glycinu se sukcinyl-CoA za vzniku delta-aminolevulánové kyseliny. Tento v jádře kódovaný mitochondriální enzym je první a limitující enzym biosyntézy hemu u savců.

Receptory:

a) Car (konstitutivní androstanový receptor β)

alternativní názvy:

nukleární receptory, podrodina 1, skupina I, člen 3; NR113

CAR

CAR- β

MB67

Tento gen kóduje konstitutivní androstanový receptor, který je popsán v následující kapitole. PXR, který je blízce příbuzný CAR, se podílí i na regulaci genu pro CAR.

b) AhR (aryl hydrokarbonový receptor)

AhR kóduje ligandem aktivovaný transkripční faktor, který se účastní regulace biologické odpovědi na aromatické uhlovodíky. Receptor AhR reguluje enzymy metabolismu xenobiotik, například enzymy cytochromu P-450. Mezi jeho ligandy patří široké spektrum aromatických uhlovodíků, které mohou být toxické, nebo mít teratogenní či imunosupresivní účinky. Předpokládá se, že toto působení je zprostředkováno právě AhR.

c) Pxr (pregnanový X receptor)

alternativní názvy:

nukleární receptory, podrodina 1, skupina I, člen 2; NR1I2

steroidní a xenobiotický receptor; SXR

PAR

PAR1

PAR2

Tento gen kóduje nukleární pregnanový X receptor (viz výše). PXR se tedy sám účastní regulace genu pro PXR.

9B. PŘEHLED GENŮ REGULOVANÝCH CAR

Informace o genech regulovaných prostřednictvím CAR, byly vyhledány v databázích PubMed a GeneBank. Patří mezi ně geny pro transportéry, enzymy CYP450, konjugační enzymy a také pro některé nukleární receptory. Geny uvedené velkým písmem jsou lidské, malým písmem jsou označeny geny hlodavců.

ABC transportéry

a) MDR1 (multidrug resistance protein 1)

alternativní názvy:

ATP-binding cassette, podrodina B, člen 1; ABCB1

P-glykoprotein 1; PGY1

GP170

Membránový protein kódovaný tímto genem je členem nadrodiny ABC transportérů, které přenášejí různé molekuly přes extra- a intracelulární membrány. ABC geny se dělí na sedm odlišných podrodin - ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20 a White. P-glykoprotein je členem podrodiny MDR/TAP, jež se podílí na lékové rezistenci. Protein kódovaný tímto genem je ATP-dependentní léková efluxní pumpa pro xenobiotické sloučeniny se širokou substrátovou specifikou. Odpovídá za snížené hromadění léčiv v rezistentních buňkách a je častou příčinou rezistence vůči cytostatikům. Tento protein také působí jako transportér v hematoencefalické bariéře a v placentě, kde má zásadní význam pro ochranu plodu před možným škodlivým působením xenobiotik. MDR1 je ve velmi vysoké míře přítomen v nadledvinách, ve vysoké míře v ledvinách, méně v plicích, játrech, tlustém střevě, a nízké hladiny MDR1 jsou v mnoha dalších tkáních. Gen pro MDR1 je také exprimován v některých lidských nádorech.

b) Mrp3 (multidrug resistance-associated protein 3)

druh: myš

alternativní názvy:

ATP-binding cassette, podrodina C, člen 3; ABCC3

canalicular multispecific organic anion transporter 2; CMOAT2

Sekrece žluči v játrech je z velké části řízena ATP-binding cassette (ABC) typem proteinů, které jsou umístěny v kanalikulární membráně a zprostředkovávají ATP-dependentní transport žlučových kyselin, fosfolipidů a organických iontů. Kanalikulární hlohavčí ABC-proteiny jsou rozdělovány na: MDR1 (ABCB1), MDR3 (ABCB4) a SPGP (ABCB11), který se podobá MDR1 P-glykoproteinu, zatímco MRP2 (ABCC2) je strukturou a sekvencí podobný MRP1 (ABCC1) a transportuje podobné substráty. Mrp3 je členem MRP podrodiny, která se podílí na lékové rezistenci. Jeho funkce ještě nebyla stanovena, je možné, že se účastní transportu žluči a intestinální exkreci organických aniontů.

c) Mrp4 (multidrug resistance-associated protein 4)

druh: potkan

alternativní názvy:

ATP-binding cassette, podrodina C, člen 4; ABCC4

multispecific organic anion transporter B; MOATB

Mrp4 kóduje membránový protein z nadrodiny ABC transportérů, které přenášejí různé molekuly přes extra- a intracelulární membrány. Rakovinné buňky, které mají zvýšenou produkci lékových transportérů, se mohou stát rezistentními vůči širokému spektru léčiv s různou strukturou nebo různými buněčnými cíly. Tento jev se nazývá léková rezistence (*angl.* multidrug resistance, MDR). Mrp4 je členem podrodiny MRP ABC transportérů, která se na lékové rezistenci podílí. Zprostředkovává uvolňování redukovaného glutathionu z hepatocytů do krve kotransportem s monoanionickými žlučovými solemi.

Konjugační enzymy:

a) Sult2A1 (rodina sulfotransferáz, cytosolická 2A, dehydroepiandrosteron-preferující, člen 1)

druh: myš

alternativní názvy:

sulfotransferáza, dehydroepiandrosteron-preferující; STD

DHEA sulfotransferáza

dehydroepiandrosteron sulfotransferáza

Sulfotransferázy (ST) mají důležitou roli v metabolismu léčiv a endogenních sloučenin, protože katalyzují přeměnu těchto látek na sulfátové konjugáty, které jsou více hydrofilní a lépe rozpustné ve vodě, a tím usnadňují jejich eliminaci z organismu. Sulfatace může být také důležitá pro regulaci mnoha endogenních sloučenin, jako jsou steroidy a neurotransmitery, jelikož mění biologické vlastnosti těchto sloučenin. Jednotlivé sulfotransferázy se liší v tkáňové distribuci a substrátové specifitě. Sult2A1 je přítomna zejména v játrech a nadledvinkách kde probíhá sulfatace steroidů a žlučových kyselin.

b) Sult1a1 (rodina sulfotransferáz 1A, fenol-preferující, člen 1)

druh: potkan

alternativní názvy:

sulfotransferáza, fenol-preferující 1; STP1

fenolová sulfotransferáza, termostabilní forma; STP

ST1A3

Sulfotransferázy katalyzují sulfátovou konjugaci mnoha hormonů, neurotransmiterů, léčiv a xenobiotik. Fenol-preferující sulfotransferáza je široce distribuována v lidských a živočišných tkáních. Tato destičková sulfotransferáza se nachází v lidském těle ve dvou formách – první formou je termostabilní nebo-li fenol-metabolizující forma, která je regulována prostřednictvím CAR, druhou formou je termolabilní nebo-li monoamin-metabolizující forma (SULT1A3; STM). Gen Sult1a1 kóduje termostabilní formu a katalyzuje sulfátovou konjugaci katecholaminů a fenolových léčiv.

c) UGT1A1 (rodina UDP-glykosyltransferáz 1, polypeptid A1)

alternativní názvy:

uridindifosfátglykosyltransferázová rodina 1, polypeptid A1

uridindifosfát glykosyltransferáza 1; UGT1

UDP-glykosyltransferáza 1

uridindifosfát glukuronosyltransferáza

fenol / bilirubin UDP-glukuronosyltransferáza

GNT1

Gen UGT1A1 kóduje UDP-glukuronosyltransferázu, enzym glukuronizace, při které jsou malé lipofilní molekuly, jako jsou steroidy, bilirubin, hormony a léčiva, přeměňovány na ve vodě rozpustné, snadno eliminovatelné metabolity. Hlavním

substrátem tohoto enzymu je bilirubin, mírnou aktivitu vykazuje také s jednoduchými fenoly, flavony a C18 steroidy. Mutace v genu UGT1A1 jsou příčinou Crigler-Najjarova syndromu typu I. a II. a Gilbertova syndromu.

Izoenzymy cytochromu P-450:

a) CYP3A4 (cytochrom P-450, podrodina 3A, polypeptid 4)

alternativní názvy:

CYP3; CYP3A

P450, rodina III

P450-III, steroidy indukovatelný

glukokortikoidy indukovatelný P450; P450C3

cytochrom P-450PCN1

nifedipin oxidáza

CYP3A4 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Proteiny cytochromu P-450 jsou monooxygenázy, které katalyzují mnoho reakcí zapojených do metabolismu léčiv a do syntézy cholesterolu, steroidů a dalších lipidů. CYP3A4 je nejvíce exprimovaný izoenzym cytochromu P-450 v játrech dospělého člověka. Jeho expresi indukují glukokortikoidy. CYP3A4 je odpovědný za oxidační metabolismus širokého spektra xenobiotik, včetně přibližně 60% všech používaných léčiv. Mezi tato léčiva patří například acetaminofen, kodein, cyklosporin A, indinavir, amlodipin, atorvastatin, zolpidem, diazepam a erythromycin.

b) CYP2B6 (cytochrom P-450, podrodina 2B, polypeptid 6)

alternativní názvy:

cytochrom P-450, fenobarbitalem indukovatelný

Také CYP2B6 kóduje enzym cytochrom P-450 – monooxygenázového systému a jeho exprese je indukovatelná fenobarbitalem. CYP2B6 metabolizuje některá xenobiotika, například cytostatika cyklofosfamid a ifosfamid.

c) CYP2C9 (cytochrom P-450, podrodina 2C, polypeptid 9)

alternativní názvy:

cytochrom P-450, fenobarbitalem indukovatelný

CYP2C9 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Je to jedna z nejdůležitějších isoform CYP450 pro metabolismus léčiv. Exprese CYP2C9 je indukována rifampicinem. Mezi léčiva, která jsou metabolizována CYP2C9 patří například warfarin, fenytoin, tolbutamid, glipizid, diklofenak a ibuprofen. Studie prokázaly, že existují jedinci, kteří jsou pomalými metabolizátory fenytoinu a tolbutamidu, což naznačuje, že tento gen je polymorfní.

d) CYP2C19 (cytochrom P-450, podrodina 2C, polypeptid 19)

alternativní názvy:

mefenytoin 4-hydroxyláza

P450C2C

CYP2C

CYP2C19 kóduje klinicky významný enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Do širokého spektra léčiv, jejichž metabolismus je katalyzován CYP2C19, patří například antikonvulzivum mefenytoin, antiulcerózum omeprazol, antidepressiva diazepam a některé barbituráty a antimalarikum proguanil. Polymorfismy v genu CYP2C19 vedou ke změně schopnosti metabolizovat mefenytoin (tzv. pomalí a rychlí metabolizátoři mefenytoinu).

e) CYP2A6 (cytochrom P-450, podrodina 2A, polypeptid 6)

alternativní názvy:

kumarin 7-hydroxyláza

cytochrom P-450, fenobarbitalem indukovatelný; P450PB

CYP2A3 (dříve)

CYP2A6 kóduje enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Proteiny cytochromu P-450 jsou monooxygenázy katalyzující mnoho reakcí zapojených do metabolismu léčiv a syntézy cholesterolu, steroidů a dalších lipidů. Exprese CYP2A6 je indukována fenobarbitalem. Enzym CYP2A6 katalyzuje hydroxylaci kumarinu, podílí se také na metabolismu nikotinu, aflatoxinu B1, nitrosaminů a některých léčiv. U některých jedinců byly nalezeny polymorfismy tohoto genu. Tito jedinci nemetabolizují účinně

kumarin a nikotin a jsou označováni jako pomalí metabolizátoři. Polymorfismy ovlivňují také vnímavost vůči rakovině plic a/nebo jater.

f) CYP2B1 (cytochrom P-450, podrodina 2B, polypeptid 1)

CYP2B1 kóduje enzym cytochrom P-450 – monooxygenázového systému a je indukovatelný fenobarbitalem. CYP2B1 katalyzuje hydroxylaci mastných kyselin.

g) Cyp2b2 (cytochrom P-450, podrodina 2B, polypeptid 2)

druh: potkan

Cyp2b2 kóduje fenobarbitalem-indukovatelný enzym z nadrodiny cytochromu P-450. Cyp2b2 se podílí na metabolismu nikotinu a některých léčiv a aktivuje (pro)karcinogeny.

h) Cyp2b10 (cytochrom P-450, podrodina 2b, polypeptid 10)

druh: myš

Cyp2b10 kóduje enzym cytochrom P-450 – monooxygenázového systému u myši. Gen Cyp2b10 obsahuje fenobarbitalovou responsivní sekvenci, na kterou se jako odpověď na působení fenobarbitalu váže heterodimer CAR/RXR a také PXR/RXR.

Další enzymy:

ALAS1 (delta-aminolevulánová syntáza)

alternativní názvy:

ALAS

ALAS, ALASH

Delta-aminolevulánová syntáza katalyzuje kondenzaci glycinu se sukcinyl-CoA za vzniku delta-aminolevulánové kyseliny. Tento v jádře kódovaný mitochondriální enzym je první a limitující enzym biosyntézy hemu u savců.

10. LITERATURA

- BAES M., GULICK T., CHOI H.S., MARTINOLI M.G., SIMHA D., MOORE D.D. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1544–1551.
- BARWICK J.L., QUATTROCHI L.C., MILLS A.S., POTENZA C., TUKEY R.H., GUZELIAN P.S. 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.
- BLUMBERG B., SABBAGH W., JUGUILON H., BOLADO J., VAN METER C.M. a kol. SXR, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor. *Genes Dev* 1998; 12: 3195–3205.
- BURK O., ARNOLD K.A., GEICK A., TEGUDE H., EICHELBAUM M. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *BiolChem.* 2005; 386(6): 503-13.
- EICHELBAUM M., BURK O. CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 2001; 7:285–287.
- ELSHOURBAGY N.A., GUZELIAN P.S. Separation, purification, and characterization of a novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone 16 α -carbonitrile. *J Biol Chem* 1980; 255: 1279-1285.
- ERNST E. Second thoughts about safety of St. John's wort. *Lancet* 1999; 354: 2014–2016.
- EVANS R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
- FORMAN B.M., TZAMELI I., CHOI H.S., CHEN J., SIMHA D. a kol. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR. *Nature* 1998; 395: 612–615.
- FREEMAN D.J., LAUPACIS A., KEOWN P.A., STILLER C.R., CARRUTHERS S.G. Evaluation of cyclosporin-phenytoin interaction with observations on cyclosporin metabolites. *Br J Clin Pharmacol.* 1984; 18(6): 887-93.
- GEICK A., EICHELBAUM M., BURK O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 14581–14587.
- GIGUERE V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine Rev.* 1999; 20 (5): 689-725.

- GOODWIN B., HODGSON E., LIDDLE C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of *CYP3A4* by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 1329–1339.
- GOODWIN B., MOORE J.T. CAR: detailing new models. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(8): 437-441.
- HE K., WOOLF T.F., KINDT E.K., FIELDER A.E., TALAAT T.E. Troglitazone quinone formation catalyzed by human and rat CYP3A: an analytical CYP oxidation reaction. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 191-198.
- HONKAKOSKI P., MOORE R., WASHBURN K.A., NEGISHI M. Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital-responsive enhancer module in the *CYP2B10* gene. *Mol Pharmacol* 1998a; 53: 597–601.
- HONKAKOSKI P., ZELKO I., SUEYOSHI T., NEGISHI M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the *CYP2B* gene. *Mol Cell Biol* 1998b;18: 5652–5658.
- HUSS J.M., KASPER C.B. Two stage glucocorticoid induction of *CYP3A23* through both the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 48-57.
- HUSTERT E., ZIBAT A., PRESECAN-SIEDEL E., EISELT R., MUELLER R. a kol. Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward *CYP3A4*. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 1454–1459.
- JOHNE A., BROCKMOLLER J., BAUER S., MAURER A., LANGHEINRICH M. a kol. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66: 338–345.
- JONES S.A., MOORE L.B., SHENK J.L., WISELY G.B., HAMILTON G.A. a kol. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 27-39.
- KAST H.R., GOODWIN B., TARR P.T., JONES S.A., ANISFELD A.M. a kol. 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; 277(4): 2908–2915.
- KAWAMOTO T., SUEYOSHI T., ZELKO I., MOORE R., WASHBURN K. a kol. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the *CYP2B* gene. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6318–6322 .

- KLIEWER S.A., MOORE J.T., WADE L., STAUDINGER J.L., WATSON M.A. a kol. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 1998; 92: 73-82.
- KLIEWER S.A., GOODWIN B., WILLSON T.M. The nuclear Pregnancy X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine Rev.* 2002; 23(5): 687-702.
- KLIEWER S.A. Nutritional Genomics in Cancer Processes: The Nuclear Pregnane X Receptor Regulates Xenobiotic Detoxification. *American Society for Nutritional Sciences* 2003; 0022-3166/03.
- KOCAREK T.A., SCHUETZ E.G., STROM S.C., FISHER R.A., GUZELIAN P.S. Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 415-421.
- KREY G., BRAISSANT O., L'HORSET F., KALKHOVEN E., PERROUD M. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 779-791.
- LEHMANN J.M., MCKEE D.D., WATSON M.A., WILLSON T.M., MOORE J.T. a kol. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate *CYP3A4* gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 1998; 102(5): 1016-102.
- MAGLICH J.M., STOLTZ C.M., GOODWIN B., HAWKINS-BROWN D., MOORE J.T. a kol. Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 638-646.
- MASUYAMA H., HIRAMATSU Y., MIZUTANI Y., INOSHITA H., KUDO T. The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 172: 47-56.
- MAUREL P. The CYP3A family. In: *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects.* (Ioannides C., ed); Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. 1996; pp 241-270.
- MIČUDA S., MARTÍNKOVÁ J., CHLÁDEK J., ANZENBACHER R. Význam polymorfizmu metabolismu léčiv v moderní farmakoterapii. *Remedia* 1998; 8: 226-236.
- MOORE L.B., PARKS D.J., JONES S.A., BLEDSOE R.K., CONSLER T.G. a kol. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 2000a; 275: 15122-15127.

- MOORE L.B., GOODWIN B., JONES S.A., WISELY G.B., SERABJIT-SINGH C.J. a kol. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000b; 97: 7500–7502.
- NELSON D.R., KOYMANS L., KAMATAKI T., STEGEMAN J.J., FEYEREISEN R. a kol. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1-42.
- NIEMI M., BACKMAN J.T., FROMM M.F., NEUVONEN P.J., KIVISTO K.T. Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(9): 819-850.
- PASCUSSI J.M., DROCOURT L., FABRE J.M., MAUREL P., VILAREM M.J. Dexamethazone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor- α expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 361-372.
- PASCUSSI J.M., JOUNAIDI Y., DROCOURT L., DOMERGUE J., BALABAUD C. a kol. Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 377–381.
- PATSALOS P.N., PERUCCA E. Clinically important drug interactions in epilepsy: interactions between antiepileptic drugs and other drugs. *Lancet Neurol.* 2003; 2(8): 473-481.
- PÁVEK P., ČERVENÝ L., MIČUDA S., ŠTAUD F. a kol. Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia* 2005; 15: 380-384.
- ROSS J.R., BEELEY L. Interaction between carbamazepine and warfarin. *Br Med J.* 1980; 14; 280(6229): 1415-6.
- SELYE H. Hormones and resistance. *J Pharm Sci* 1971; 60: 1-28.
- SCHINKEL A.H., JONKER J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 21; 55(1):3-29.
- SCHUETZ E.G., WRIGHTON S.A., BARWICK J.L., GUZELIAN P.S. Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 α -carbonitrile regulate *de novo* synthesis of a common form of cytochrome P-450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver *in vivo*. *J Biol Chem* 1984; 259: 1999-2006 .

STAUDINGER J., LIU Y., MADAN A., HABEEBU S., KLAASSEN C.D. Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 1467–1472.

SUCHOPÁR J. a kol. *Kompendium lékových interakcí - INFOPHARM 2005*. InfoPharm Praha 2005.

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.

ULRICH R.G. The toxicogenomics of nuclear receptor agonists. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003; 7: 505-510.

WATKINS P.B., WHITCOMB R.W. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl J Med* 1998; 338: 916–917.

WATKINS R.E., WISELY G.B., MOORE L.B., COLLINS J.L., LAMBERT M.H. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science* 2001; 292: 2329–2333.

WEI P., ZHANG J., EGAN-HAFFEY M., LIANG S., MOORE D.D. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 2000; 407: 920–923.

XIE W., BARWICK J.L., DOWNES M., BLUMBERG B., SIMON C.M. a kol. Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. *Nature* 2000a; 406: 435–439.

XIE W., BARWICK J.L., SIMON C.M., PIERCE A.M., SAFE S. a kol. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev* 2000b; 14: 3014–3023.

ZHANG J., KUEHL P., GREEN E.D., TOUCHMAN J.W., WATKINS P.B. a kol. The human pregnane Xreceptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics* 2001;11: 555–572.