



## RECEPTOROWE MECHANIZMY REGULACJI METABOLIZMU KWASÓW ŻÓLCIOWYCH I KSENOBIOTYKÓW. ZNACZENIE EKSPRESJI CYP3A4 DLA BEZPIECZEŃSTWA I SKUTECZNOŚCI FARMAKOTERAPII

Grażyna Kubiak-Tomaszewska<sup>1,\*</sup>, Jan Pachecka<sup>1,2</sup>, Jacek Łukaszewicz<sup>1</sup>, Piotr Tomaszewski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

<sup>2</sup> Wydział Ekologii, Wyższa Szkoła Ekologii i Zarządzania w Warszawie, ul. Olszewska 12, 00-792 Warszawa

\* autorka korespondująca, tel: +48 22 5720764, e-mail: [grazyna.kubiak-tomaszewska@wum.edu.pl](mailto:grazyna.kubiak-tomaszewska@wum.edu.pl)

Otrzymany 19.06.2016, zaakceptowany 22.08.2016, zamieszczony 11.12.2016

### STRESZCZENIE

Izoenzym CYP3A4 jest monooxygenazą zaangażowaną w procesy wewnątrzustrojowych przemian licznych związków endo- i egzogennych (ksenobiotyków), w tym ponad 50% znanych leków. W organizmie człowieka CYP3A4 wykazuje najwyższą aktywność enzymatyczną w hepatocytach i enterocytach. Kodujący to białko enzymatyczne gen *CYP3A4* podlega ekspresji regulowanej przez zróżnicowane czynniki egzo- i endogenne, w tym kwasy żółciowe oraz liczne leki, działające za pośrednictwem receptorów wewnątrzkomórkowych, takich jak np. PXR czy FXR. Zrozumienie mechanizmów ekspresji genu *CYP3A4* ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia bezpiecznej i skutecznej farmakoterapii.

**SŁOWA KLUCZOWE:** CYP3A4, ekspresja, regulacja, receptory jądrowe, PXR, FXR, biotransformacja ksenobiotyków, metabolizm leków, kwasy żółciowe, farmakoterapia

### ABSTRACT

MECHANISMS OF RECEPTOR-DEPENDENT REGULATION OF BILE ACID AND XENOBIOTIC METABOLISM. THE ROLE OF *CYP3A4* EXPRESSION IN THE SAFETY AND EFFECTIVENESS OF PHARMACOTHERAPY

The isoenzyme CYP3A4 is an important monooxygenase responsible for the metabolism of a large variety of endogenous and exogenous compounds (xenobiotics), including more than 50% of known drugs. The highest activity of CYP3A4 in human was found in hepatocytes and enterocytes. *CYP3A4* gene expression is regulated by diverse exogenous and endogenous factors, including bile acids and several drugs, acting *via* nuclear receptors, such as, for example, PXR or FXR. Understanding the mechanisms of *CYP3A4* gene expression is essential for ensuring the safety and effectiveness of pharmacotherapy.

**KEYWORDS:** CYP3A4, expression, regulation, nuclear receptors, PXR, FXR, xenobiotic biotransformation, drug metabolism, bile acids, pharmacotherapy

### 1. Wstęp

Organizm człowieka narażony jest na działanie bardzo licznych związków chemicznych występujących w środowisku, z których znaczną część stanowią substancje chemiczne obce organizmowi, określane wspólnym mianem ksenobiotyków. Substancje te dostają się do organizmu różnymi drogami. Mogą być np. wchłaniane z przewodu pokarmowego po wniknięciu doń z żywnością, napojami, używkami, mogą także penetrować przez drogi oddechowe, skórę i jamy ciała. Ksenobiotyki mogą być naturalnymi składnikami środowiska, np. metabolitami roślin, grzybów, zwierząt, protistów i prokariotów lub wynikiem działalności człowieka, np. pestycydy, dodatki do żywności, składniki kosmetyków, leków, substancje chemiczne stosowane w zróżnicowanych celach technicznych, uboczne produkty działalności przemysłowej człowieka stanowiące zanieczyszczenia środowiska. Ksenobiotykami są zarówno substancje wykazujące istotną aktywność biologiczną, jak też nie posiadające tego rodzaju aktywności [1].

Cechą fizyczną ułatwiającą doustrową penetrację wielu ksenobiotykom do organizmu jest ich lipofilność. Ce-

cha ta równocześnie znacznie utrudnia ich eliminację z ustroju, sprzyjając kumulacji w tkance tłuszczowej lub nerwowej.

Ochrona organizmu przed negatywnymi skutkami działania ksenobiotyków polega przede wszystkim na dążeniu do ich usunięcia z organizmu. W celu zwiększenia dynamiki eliminacji ksenobiotyków, poddawane są one w organizmie enzymatycznym przemianom metabolicznym, które dozwolą doprowadzić do powstania metabolitu/ów o zwiększonej hydrofilności, co sprzyja wydalaniu tych związków z moczem. Metabolizm ksenobiotyków prowadzi często, niejako przy okazji, do obniżenia lub zniesienia ich aktywności biologicznej, co jednak nie stanowi samo w sobie celu biotransformacji ksenobiotyków. W większości przypadków biotransformacja pozwala osiągnąć przedstawione wyżej skutki. Zdarza się jednak, jak to ma miejsce np. w przypadku związków lotnych wydalanych przez drogi oddechowe i skórę, że produkty metabolizmu, jako bardziej hydrofilne od substancji pierwotnej, są wolniej od niej eliminowane. W przypadku biotransformacji niektórych ksenobiotyków zachodzącej w neuronach centralnego układu nerwowego oraz neurogleju tworzenie hydrofilnych

metabolitów prowadzi do ograniczenia przenikania przez barierę krew-mózg, co nie sprzyja eliminacji [2]. Mimo przedstawionych tu specyficznych i raczej wyjątkowych sytuacji, biotransformacja większości ksenobiotyków umożliwia skuteczne zwiększenie dynamiki ich eliminacji z organizmu, stanowiąc zwykle efektywny mechanizm ochrony przed ich potencjalnie niekorzystnym działaniem.

Zjawisko biotransformacji ma szczególne znaczenie w przypadku ksenobiotyków będących lekami. Może ono prowadzić bowiem do zmniejszenia lub wręcz zniesienia ich aktywności biologicznej, stanowiącej podstawę aktywności farmakologicznej tych substancji, choć zdarza się też, że metabolity leków wykazują wyższą lub zmienioną co do kierunku aktywność metaboliczną. Sam fakt, iż lek traktowany jest przez układy enzymatyczne uczestniczące w procesach biotransformacji jak każdy ksenobiotyk, rodzi konieczność uwzględniania skutków metabolizmu zarówno na etapie projektowania leków, jak i opracowywania schematów dawkowania oraz całego profilu farmakoterapii. Procesy biotransformacji mają też istotny udział w kształtowaniu relacji chemicznych między metabolizowanymi substancjami, które leżą u podstaw interakcji w układach: lek-lek, lek-metabolit leku, metabolit leku-metabolit leku oraz lek lub metabolit leku vs. inne substancje ksenobiotyczne nie będące lekami lub ich metabolity [3,4,5,6].

## 2. Nadrodzina cytochromu P450

Nadrodzina cytochromu P450 (CYP) obejmuje liczne cysteinylo-hemowe białka enzymatyczne mające aktywność monoooksygenaz o mieszanej funkcji, stanowiące jeden z najistotniejszych systemów obrony organizmu przed wnikającymi do jego wnętrza ksenobiotykami. W nadrodzynie wyróżnia się trzy główne grupy rodzin CYP obejmujące: (a) CYP1-CYP3, charakteryzujące się niskim powinowactwem substratowym, odpowiedzialne za 70-80% reakcji I fazy biotransformacji ksenobiotyków, (b) CYP4, zaangażowane głównie w metabolizm kwasów tłuszczowych i niektórych spokrewnionych w swej budowie chemicznej z kwasami tłuszczowymi ksenobiotyków, (c) CYP5-CYP51, wykazujące wysokie powinowactwo do zróżnicowanych związków endogennych [7]. Izoenzymy z nadrodziny cytochromu P450 zaangażowane są w oksydacyjne przemiany egzo- i endogennych substancji organicznych, w tym liczne reakcje I fazy biotransformacji ksenobiotyków.

Grupą prostetyczną CYP jest układ hemowy, kowalencyjnie związany z apoenzymem. CYP jako czynnik utleniający wykorzystują cząsteczkę  $O_2$ , której jeden atom tlenu włączany jest do struktury metabolizowanego organicznego substratu, drugi zaś podlega redukcji do cząsteczki wody. Donorem równoważników redukcyjnych niezbędnych do wyżej opisanego procesu jest  $NADPH+H^+$  lub, alternatywnie,  $NADH+H^+$  [8,9,10].

Izoenzymy CYP wykazują zwykle szerokie powinowactwo substratowe, stwarzając tym samym możliwość utleniania zróżnicowanych chemicznie substratów, pod warunkiem występowania w ich strukturze konkretnych podatnych na oksydację ugrupowań [11,12,13]. Ważną cechą nadrodziny CYP jest możliwość indukcji genów kodujących liczne izoformy tych białek, co ma szczególne znaczenie w przypadku podrodziny CYP1A, CYP2B, CYP3A i CYP4A. Ekspresja tych białek może podlegać bardzo znacznemu nasileniu w obecności metabolizowanych przez nie ksenobiotyków. Zjawisko to ma charakter adaptacyjnego mechanizmu regulacyjnego wzmacniającego odpowiedź fizjologiczną w

warunkach wielokrotnego narażenia na oddziaływanie ksenobiotyków [11,12]. Na szczególną uwagę zasługuje wysoce podatna na indukcję podrodzina CYP3A, która jednocześnie jest odpowiedzialna za oksydacyjny metabolizm większości znanych ksenobiotyków [12,13].

## 3. Rodzina CYP3

Ludzkie izoenzymy cytochromu P450 należące do rodziny 3 (CYP3) stanowią około 60% wszystkich CYP występujących w wątrobie, choć ich aktywność stwierdzana jest również w wielu innych organach i narządach organizmu. Izoenzymy te zaangażowane są w metabolizm wielu związków, zarówno endogennych (np. endogenne steroidy), jak i egzogennych - ksenobiotyków. Podlegają one indukcji m.in. przez: endo- i egzogenne związki steroidowe (np. glukokortykoidy, spironolakton, deksametazon), kwasy żółciowe (kwas litocholowy), antybiotyki (np. erytromycyna, ryfampicyna) oraz barbiturany [8].

### 3.1. Podrodzina CYP3A

Izoenzymy z podrodziny CYP3A wykazują najwyższą aktywność w wątrobie, choć licznie reprezentowane są także w innych tkankach. Stanowią one najliczniejszą frakcję białek mikrosomalnych hepatocytów, którą szacuje się na około 60-146 pmol/mg białka mikrosomów [14]. Klaster genów CYP3A, obejmujący geny kodujące CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 oraz CYP3A43, zlokalizowany jest na cytochromie 7 (locus 7q21.1) [15,16]. Izoenzymy z podrodziny CYP3A odgrywają decydującą rolę w biotransformacji ponad 50% wszystkich znanych leków. Osiągająca w niektórych przypadkach ponad 85% zgodność sekwencji aminokwasów w strukturze I-rzędowej białka warunkuje podobnej skali specyficzność substratową izoenzymów z tej podrodziny [17].

### 3.2. Izoenzym CYP3A4

CYP3A4, pełniący funkcję znanych i klasyfikowanych już wcześniej enzymów, m. in. 3-monoooksygenazy chininy (syn. oksydaza nifedypiny; E.C. 1.14.13.67), 6-hydroksylazy taurochenodeoksycholanu (E.C. 1.14.13.97), monoooksygenazy albendazolu (E.C. 1.14.13.32), czy 2-exomonooksygenazy 1,8-cyneolu (E.C. 1.14.13.157), jest białkiem enzymatycznym wykazującym, podobnie jak wszystkie izoenzymy z podrodziny CYP3A, najwyższą aktywność w wątrobie. Wysoką ekspresję genu CYP3A4 wykazano także w enterocytach, gdzie odgrywa on znaczącą rolę w biotransformacji leków podawanych *per os*, a nieco niższą w nerkach, płucach i mózgu, gdzie stwierdzono aktywność porównywalną z aktywnością innego cytochromu z tej samej rodziny, CYP3A5 [18]. Gen CYP3A4, o długości 27306 pz, leży na chromosomie 7 (locus 7q.21.1; początek: 99,756,960 pz od *pter*, koniec 99,784,265 pz od *pter*) i wykazuje dosyć znaczny polimorfizm w populacji ludzkiej, wynikający przede wszystkim z mutacji punktowych typu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*). Jest typowym dla eukariontów genem nieciągłym, zawierającym aż 14 eksonów [16].

Badania wykazały, że u noworodków aktywność CYP3A4 jest praktycznie zerowa. Aktywność charakterystyczna docelowo dla osób dorosłych osiągana jest około pierwszego roku życia. Wykazano także istotne zróżnicowanie aktywności CYP3A4 pomiędzy kobietami i mężczyznami [19,20]. Izoenzym ten odpowiedzialny jest za biotransformację oko-

to 50% leków, katalizując głównie reakcje ich hydroksylacji, N-dealkilacji oraz N-dehalogenizacji [21]. Jest on także odpowiedzialny za występowanie licznych interakcji w przywołanych już wcześniej relacjach: lek-lek, lek-metabolit leku, metabolit leku-metabolit leku oraz lek lub metabolit leku vs. inne substancje ksenobiotyczne nie będące lekami lub ich metabolity.

Z powyższych względów pełne zrozumienie mechanizmów ekspresji genu *CYP3A4* oraz jego polimorfizmu jest niezwykle istotne dla opracowania bezpieczniejszych i bardziej skutecznych metod farmakoterapii uwzględniającej indywidualny profil genetyczny pacjenta. Dążenie takie stanowi istotny element coraz szerzej propagowanej obecnie terapii personalizowanej [15].

#### 4. Regulacja aktywności *CYP3A4*

Odkrycie w 1998 r. jądrowego receptora X pregnanu, PXR (ang. *pregnane X receptor*) dało początek pracom badawczym pozwalającym na coraz pełniejsze wyjaśnienie mechanizmu wywoływanej przez liczne ksenobiotyki indukcji układów enzymatycznych odpowiedzialnych za ich biotransformację. Mechanizm ten prowadzi do adaptacyjnego zwiększenia szybkości eliminacji tych ksenobiotyków, w tym licznych leków, z organizmu [15].

PXR, znany też pod nazwą jądrowego receptora steroidów i ksenobiotyków SXR (ang. *steroid and xenobiotic receptor*), należy według współczesnej klasyfikacji receptorów jądrowych do podrodziny 1, grupy I, pod numerem 2 (NR1I2). Receptor ten uczestnicząc w nasileniu ekspresji genów kodujących izoenzymy cytochromu P450 z podrodziny *CYP3A* stanowi aktywowany przez ligand czynnik transkrypcyjny, będący równocześnie sensorem dla wielu odległych strukturalnie związków [22]. U podłoża aktualnej wiedzy na temat regulacji aktywności *CYP3A4* leżą badania dotyczące jego indukcji przez rifampicynę, klotrimazol i mifepriston (RU486) [3]. Związki te, podobnie jak wiele innych ksenobiotyków organicznych, zwłaszcza tych o charakterze lipofilnym, powodują nasilenie transkrypcji genu *CYP3A4*, w wyniku ich oddziaływania aktywującego na receptor PXR. Receptor ten uważany jest obecnie za główny sensor chemiczny, regulujący ekspresję szeregu genów biorących udział w metabolizmie i transporcie ksenobiotyków [23].

##### 4.1. Receptor PXR

Opisany w 1998 r. receptor PXR, zwany także, jak wzmiankowano wcześniej, receptorem SXR lub receptorem aktywowanym przez pregnany - PAR (ang. *pregnane activated receptor*) [24], jest typowym przedstawicielem rodziny receptorów jądrowych, do której należą receptory steroidów, retinoidów oraz hormonów tarczycy. Tak jak i one, białko PXR zawiera w N-końcowej sekwencji łańcucha polipeptydowego fragment mający funkcję regulacyjną, oznaczany symbolem AF-1 (ang. *activation function-1*). Uczestniczy on w aktywacji receptora dokonywanej bez udziału liganda (np. ksenobiotyku), wynikającej z oddziaływania z kompleksem transkrypcyjnym właściwego genu. Domena ta zawiera bowiem w swej sekwencji fragment o długości ok. 70 reszt aminokwasowych odpowiedzialny za oddziaływanie z odpowiednią sekwencją DNA w regionie promotorowym genu i zwany domeną wiążącą DNA - DBD (ang. *DNA-binding domain*). C-końcowy fragment łańcucha polipeptydowego PXR o długości ok. 300 reszt aminokwasowych ma

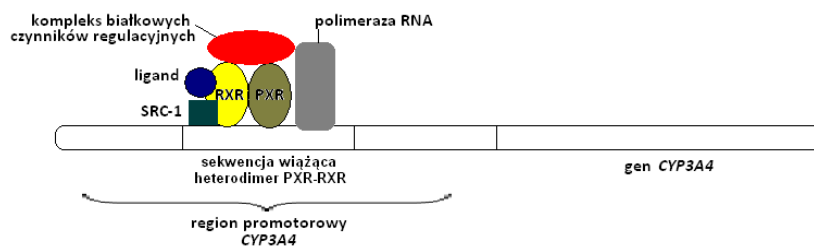
również funkcję regulacyjną i oznaczany jest symbolem AF-2. Jest on odpowiedzialny za oddziaływanie z ligandem, gdyż zawiera domenę wiążącą ligand - LBD (ang. *ligand-binding domain*) [25,26].

Jak wykazały liczne badania, ekspresja PXR jest wysoka w tych tkankach, w których obserwowana jest wysoka ekspresja *CYP3A4*, czyli w wątrobie i jelitach. Jak widać, szczególnie nasilona ekspresja PXR dotyczy komórek narządów najbardziej narażonych na kontakt z ksenobiotykami, w tym narządów, które jako pierwsze kontaktują się z tego rodzaju substancjami. O szczególnej roli tego receptora świadczy fakt jego zaangażowania w procesy indukcji wielu kluczowych enzymów biorących udział w procesach biotransformacji licznych ksenobiotyków, w tym około 80% stosowanych obecnie leków [24]. Tym samym mechanizm regulacji ekspresji genów tzw. *CYP-klastra 7q21.1* za pośrednictwem PXR ma istotny udział we wspomnianych wcześniej interakcjach między lekami i innymi ksenobiotykami oraz ich metabolitami [27].

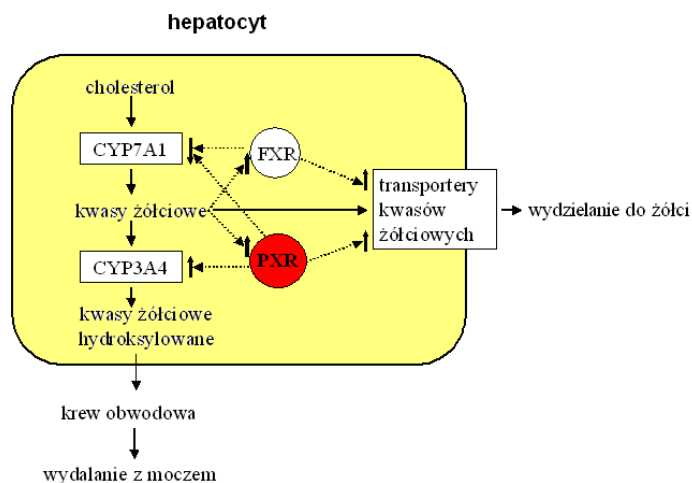
Agonistami PXR są liczne endo- i egzogenne steroidy (m. in. progesteron, 17 $\alpha$ -hydroksyprogesteron, 17 $\alpha$ -hydroksypregnenolon, 5 $\alpha$ -dihydroprogesteron, 5 $\beta$ -dihydroprogesteron, allopregnanolon, kortykosteron, cyproteron, spiroinolakton, deksametazon, mifepriston), antibiotyki (m.in. ryfampicyna, ryfaksymina), paklitaksel, meklizyna, niektóre leki przeciwgrzybicze, szerzej analizowane dalej kwasy żółciowe, a także hiperforyna z ziela dziurawca (*Herba Hyperici*) i wiele innych substancji pochodzenia roślinnego [15].

PXR uczestniczy nie tylko w regulacji aktywności enzymów zaangażowanych w procesy biotransformacji, ale także w regulacji aktywności nośników błonowych biorących udział w eliminacji potencjalnie szkodliwych związków chemicznych. Potwierdzeniem tego może być obserwowana w licznych badaniach wysoka ekspresja PXR nie tylko w wątrobie i jelicie, ale także w nerce [28]. W mniejszym, acz nadal znaczącym stopniu ekspresja PXR ma miejsce w komórkach nabłonków płucnych, błony śluzowej żołądka, a także monocytach czy elementach komórkowych bariery krew-mózg, gdzie również może mieć istotny udział w regulacji ekspresji układów enzymatycznych odpowiedzialnych za biotransformację ksenobiotyków. Znaczna ekspresja PXR w innych tkankach i narządach takich jak macica, jajniki, łożysko, gruczoł mleczny, nadnercza, szpik kostny czy pewne obszary mózgu może stanowić element systemu zabezpieczającego przed nadmiernym wzrostem stężeń aktywnych biologicznie steroidów [29].

Ludzki PXR wykazuje prawie 100% zgodność sekwencji aminokwasowej w zakresie domeny wiążącej DNA ze swoimi odpowiednikami izolowanymi z komórek królika, myszy czy szczura. Mechanizm działania PXR jest analogiczny jak w przypadku receptora witaminy D, czy innych receptorów typu „X” (ryc. 1). Po związaniu liganda receptor tworzy heterodimer z jądrowym receptorem X retinoidów - RXR (ang. *retinoid X receptor*). Kompleks ten rozpoznaje sekwencje najwyższej zgodności: 5'-AGTTCA-N3/N4-AGTTCA-3' (powtórzenia sekwencji AGTTCA rozdzielone trzema lub czterema dowolnymi nukleotydami), położone w regionie promotora genu *CYP3A4*. Po związaniu powstałego heterodimeru PXR/RXR z rozpoznawaną sekwencją DNA umożliwiony zostaje dostęp i wiązanie kolejnych czynników transkrypcyjnych, łącznie z białkami modyfikującymi strukturę chromatyny i białkami acetylującymi histony. Kolejnym etapem jest przyłączenie się polimerazy RNA i rozpoczęcie



Ryc. 1. Schemat budowy kompleksu transkrypcyjnego indukowanego przez PXR.



Ryc. 2. Udział PXR w regulacji homeostazy kwasów żółciowych.

transkrypcji genu *CYP3A4*. Wiadomo, że mutacje występujące w regionie wiązania heterodimeru PXR-RXR mogą prowadzić, w zależności od miejsca występowania, do obniżenia efektywności ekspresji genu *CYP3A4* o 20 do 80% [27,28,30,31].

Szczegółowe badania struktury receptora PXR wykazały, że jako przedstawiciel rodziny receptorów jądrowych wykazuje on pewne unikalne właściwości, polegające na specyficznej konformacji przestrzennej jego domeny wiążącej ligand. Jest to bardzo rozległa (>1100 Å), sferycznie ukształtowana „kieszka” o charakterze silnie hydrofobowym, ze względu na otaczające ją reszty aminokwasów o niepolarnych łańcuchach bocznych. Dzięki temu selektywność receptora PXR w stosunku do swoich hydrofobowych, drobnocząsteczkowych ligandów jest dosyć niska i pokrywająca się w większości z zestawem substratów cytochromu *CYP3A4*. Dzięki temu receptor PXR podlega aktywacji przez szerokie spektrum niskopolarnych, hydrofobowych związków organicznych, ze steroidami pochodzenia naturalnego oraz licznymi ksenobiotykami na czele [24,25,28,31,32,33].

Niezależnie od roli ksenosensora, jaką pełnić może PXR, receptor ten bierze udział w regulacji metabolizmu i eliminacji wielu związków endogennych. Należą do nich cholesterol i kwasy żółciowe, których homeostaza regulowana jest przy udziale szeregu receptorów jądrowych, takich jak: receptor X farnesoidów - FXR (ang. *farnesoid X receptor*; NR1H4), wątrobowy receptor X - LXR (ang. *liver X receptor*; NR1H2), homolog 1 receptora wątrobowego - LRH-1 (ang. *liver receptor homolog-1*), konstytutywny receptor androstanu - CAR (ang. *constitutive androstane receptor*) i tzw. mały heterodimeryczny czynnik towarzyszący - SHP (ang. *small heterodimer partner*). W odniesieniu do regulacji metabolizmu kwasów żółciowych PXR współ-

działa z FXR. W przypadku zaburzeń przemiany cholesterolu może dojść do wewnątrzkomórkowej kumulacji kwasów żółciowych i nasilenia ich toksycznego oddziaływania na błony biologiczne. Receptor PXR uruchamia wtedy mechanizmy regulacyjne blokujące biosyntezę kwasów żółciowych z cholesterolu, indukując równocześnie odpowiednie szlaki i nośniki transportowe odpowiedzialne za sekrecję kwasów żółciowych poza komórkę [34]. Ten sposób działania jest ewolucyjnym przystosowaniem PXR do udziału w procesie ochrony organizmu przed toksycznym oddziaływaniem wielu, zwłaszcza lipofilnych związków pochodzenia zarówno endo-, jak i egzogenne [22].

Kwasy żółciowe w warunkach normalnych niezbędne są dla zapewnienia prawidłowego przebiegu absorpcji jelitowej lipidów pokarmowych oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Z drugiej strony kwasy żółciowe, w stężeniach przekraczających górną granicę ich wartości normalnych, i to nie tylko z racji na swą aktywność powierzchniową, mogą stać się czynnikiem toksycznym, zwłaszcza dla błon biologicznych, których podstawą budowy jest podwójna warstwa lipidowa. O ile jednak w warunkach fizjologicznych stężenie kwasów żółciowych utrzymywane jest w zakresie bezpiecznych wartości normalnych dzięki systemom regulacyjnym, których uproszczony schemat przedstawia ryc. 2, to w przypadku chorób wątroby przebiegających z cholestazą, takich jak np. marskość żółciowa wątroby, znaczny wzrost stężenia kwasów żółciowych w krążeniu ogólnym prowadzi do ich toksycznych oddziaływań ogólnoustrojowych z racji na zbyt małą, a nadto upośledzoną przez te związki, wydajność mechanizmów przedstawionych na ryc. 2.

W warunkach fizjologicznych oraz przy nieznacznym podwyższeniu całkowitego stężenia kwasów żółciowych we krwi, związki te wiążą się wewnątrz hepatocytów z recep-

torami PXR i FXR prowadząc do ich aktywacji. Jej efektem jest częściowe wyciszenie ekspresji genu *CYP7A1*, a w konsekwencji ograniczenie syntezy kwasów żółciowych. Równocześnie zachodzi stymulacja białek transportowych eksportujących kwasy żółciowe przez błonę bieguna żółciowego, co nasila równocześnie ich wydzielanie wraz z żółcią. PXR stymuluje również ekspresję genu *CYP3A4*, dzięki czemu wzrasta szybkość hydroksylacji kwasów żółciowych, a zatem ich przekształcenie w formy rozpuszczalne w wodzie, transport tych metabolitów przez błonę bieguna naczyniowego hepatocytu do krwi obwodowej oraz ich wydalanie z moczem. Na ryc. 2 liniami ciągłymi oznaczono przepływy metabolitów, natomiast przerywanymi działania regulacyjne [31].

Niektóre ligandy PXR mogą być przydatne w leczeniu cholestazy. U pacjentów z cholestazą stwierdzono w moczu podwyższone stężenia 6-hydroksylowanych kwasów żółciowych, łącznie z kwasem lithocholowym. Pochodne te powstają w procesie biotransformacji kwasów żółciowych przy udziale *CYP3A4*. Z tego względu dodatkowa indukcja tego izoenzymu, dokonywana za pośrednictwem PXR, np. przez ryfampicynę, powoduje wyraźne zmniejszenie objawów cholestazy. Podobne działanie wykazuje kwas ursodeoksycholowy - UDCA, również będący ligandem PXR, a także napar z dziurawca, od wieków stosowany w leczeniu dolegliwości wątrobowych przebiegających z cholestazą [23,28,29,31,33].

PXR pobudzany przez liczne zróżnicowane endo- i egzogenne ligandy stanowi ważny element mechanizmu obronnego z zakresu chemoprotekcji. Mechanizm ten wyjaśnia znany fakt działania ochronnego niektórych ligandów PXR, a tym samym induktorów *CYP3A4* (np. 16 $\alpha$ -karbonitrylu pregnanolonu), które chronią komórki przed hepatotoksycznym oddziaływaniem innych substancji, np. kwasu lithocholowego (LCA) [30,31,32,33].

#### 4.2. Receptor FXR

Receptor FXR należy do jądrowych receptorów aktywowanych przez steroidy. Wysoką ekspresję tego receptora stwierdza się, oprócz nadnerczy, w narządach szczególnie mocno zaangażowanych w biotransformację ksenobiotyków, takich jak wątroba, jelita i nerki [35].

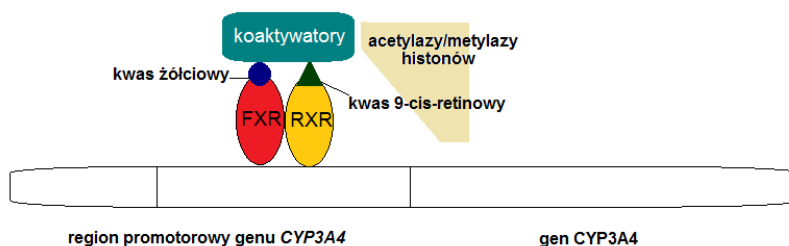
W strukturze receptora FXR wyróżnić można m. in. N-końcową domenę wiążącą DNA - DBD, elastyczny fragment łącznikowy oraz domenę wiążącą ligand - LBD, która w warunkach braku oddziaływania liganda wiąże korepresor. Po związaniu liganda korepresor ulega wyparciu, a towarzysząca temu zmiana konformacji białka receptorowego ekspozuje domeny wiążące koaktywatory - NIDs (ang. *nuclear receptor interaction domains*). Koaktywatorami FXR są białka posiadające charakterystyczny motyw strukturalny o

sekwencji Leu-X-X-Leu-Leu, np. czynnik transkrypcyjny MAF1 (ang. *musculoaponeurotic fibrosarcoma factor 1*) [36]. Powstały kompleks (ryc. 3) oddziałuje z heterodimerem PXR/CAR lub RXR związanym z kwasem 9-cis-retinowym, który wiąże się z regionem promotorowym genu *CYP3A4* [35].

Badania prowadzone na ludzkich izolowanych hepatocytach wykazały, że po związaniu GW4064, jak również kwasu trans-retinowego z FXR, receptor ten nasila ekspresję białka SHP, które hamuje aktywacyjny wpływ heterodimeru PXR/CAR na transkrypcję genu *CYP3A4* [36].

Efektywnymi agonistami receptora FXR są kwasy żółciowe, i to zarówno endogenne (zwłaszcza cholowy i chenodeoksycholowy), jak i półsyntetyczne i syntetyczne ich pochodne np. kwas obeticholowy, ale też liczne leki, np. stosowana w leczeniu otyłości feksaramina i substancje pochodzenia roślinnego, np. diterpenowy związek - kafestol, występujący w kawie.

Analizując rolę FXR w metabolizmie kwasów żółciowych, stwierdzić należy, że za pomocą, tzw. klasycznego szlaku transaktywacji FXR reguluje nie tylko ekspresję genów biorących udział w biosyntezie kwasów żółciowych w wątrobie, ale także nośników umożliwiających transport tych związków do i z hepatocytów [34,37,38]. Receptor ten jest częścią układu ustalającego parametry homeostazy kwasów żółciowych w skali całego organizmu [34]. Znajomość mechanizmów regulacji ekspresji genu *CYP3A4* przy udziale receptora FXR jest szczególnie ważna w przypadku farmakoterapii cholestazy. Wykazano między innymi, że podawanie ryfampicyny pacjentom z cholestazą znacząco nasila wydalanie 6 $\alpha$ -glukuronidów kwasów: hyocholowego i hyodeoksycholowego, będących 6-hydroksypochodnymi kwasów żółciowych. Świadczy to o nasileniu ekspresji *CYP3A4* katalizującego reakcje ich powstawania [39]. Należy także zwrócić uwagę na fakt, iż stosowanie u pacjentów z cholestazą induktorów *CYP3A4* oddziałujących poprzez FXR, w warunkach przyjmowania przez nich leków ze względu na współwystępowanie innych chorób, może znacząco wpływać na ich działanie, jeżeli podlegają biotransformacji przy udziale *CYP3A4*. Przykładem może być tu nifedypina stosowana w chorobach sercowo-naczyniowych oraz przeciwnowotworowy cyklofosfamid [39,40]. Chociaż PXR i FXR aktywowane są przez różne formy kwasów żółciowych, to oba aktywowane są przez LCA. Wskazuje to potencjalne możliwości leczenia cholestazy i innych zmian patologicznych, w toku których dochodzi do gromadzenia się toksycznych metabolitów w wątrobie, poprzez aktywację samego PXR, lub też w skojarzeniu z aktywacją FXR [30,31,32,33].



Ryc. 3. Schemat budowy kompleksu transkrypcyjnego indukowanego przez FXR.

### 4.3. Inne receptory

Badania Fukumori i wsp. wykazały, że indukcja CYP3A4 w hodowlach enterocytów ludzkich zachodzi w obecności kalcytriolu -1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, co świadczy o udziale w regulacji ekspresji CYP3A4 receptora witaminy D - VDR (ang. *vitamin D receptor*) [41]. Wykazano istnienie zjawiska kooperatywności pomiędzy czterema różnymi regionami wiążącymi heterodimer PXR/VDR: CLEM4-ER6, DR3, prER6 (prPXRE) i DR4, w toku indukcji CYP3A4 w ludzkich hepatocytach [42]. Wykazano także, że kwasy litocholowy i ursocholowy są agonistami receptora VDR, prowadząc do indukcji CYP3A4 w enterocytach człowieka [42,43].

Kolejnym receptorem zaangażowanym, co prawda w znacznie mniejszym stopniu, w regulację ekspresji CYP3A4 jest cytoplazmatyczny konstytutywny receptor androstanów - CAR. Receptor ten, wykazujący znaczne podobieństwo strukturalne do receptora PXR, w warunkach braku pobudzenia tworzy nieaktywny kompleks z białkami opiekuńczymi oraz białkiem CCRP. Po związaniu liganda CAR odłącza się od kompleksu białek cytoplazmatycznych i ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie tworzy kompleks z receptorem PXR. Powstały heterodimer wiąże się z sekwencjami promotorowymi (DR6 i DR3) w strukturze genu CYP3A4 prowadząc do nasilenia jego ekspresji [44,45].

### 5. Podsumowanie

Zarówno indukcja, jak i represja genów kodujących enzymy i inne białka (np. nośniki), zaangażowane w procesy biotransformacji leków w organizmie, może być przyczyną zróżnicowanej odpowiedzi na lek, wpływając istotnie na bezpieczeństwo i skuteczność farmakoterapii. Mechanizmy regulacji ekspresji genu CYP3A4 są złożone z racji na potencjalny udział wielu receptorów ulegających aktywacji lub hamowaniu przy udziale zróżnicowanych czynników, działających jako agoniści lub antagoniści tych receptorów albo innego rodzaju kofaktory modulujące.

Szczegółowe poznanie złożonych mechanizmów regulacji ekspresji enzymów, takich jak CYP3A4, oraz innych białek uczestniczących w wewnątrzustrojowych przemianach leku, w powiązaniu z rozwojem wiedzy o polimorfizmie genetycznym tych białek, stwarza coraz pełniejsze podstawy dla optymalizacji farmakoterapii zarówno pod względem jej profilu, jak też eliminacji negatywnych konsekwencji złożonych interakcji między lekami i innymi ksenobiotykami oraz ich metabolitami.

### 6. Wykaz skrótów

AF-1	fragment sekwencji łańcucha polipeptydowego o funkcji regulacyjnej/aktywacyjnej (ang. <i>activation function-1</i> )
CAR	konstytutywny receptor jądrowy androstanów (ang. <i>constitutive androstane receptor</i> )
CCRP	sercowe białko C-reaktywne (ang. <i>cardiac C-reactive protein</i> )
CLEM4	konstytutywny wątrobowy moduł wzmacniający - enhancer 4 (ang. <i>constitutive liver enhancer module 4</i> )
CYP	cytochrom P450 (ang. <i>cytochrome P450</i> )
DBD	domena wiążąca DNA (ang. <i>DNA-binding domain</i> )
DR3 i 4	klasyczne motywy typu DR (ang. <i>direct repeat with 3 or 4 bp spacer</i> ) w dystalnym regionie promotora VDRE
ER6	nieklasyczny motyw typu ER6 (ang. <i>everted repeat</i> )

	with 6 bp spacer) w proksymalnym regionie promotora VDRE
FXR	receptor jądrowy farnesoidów X (ang. <i>farnesoid X receptor</i> )
LBD	domena wiążąca ligand (ang. <i>ligand-binding domain</i> )
LCA	kwasy litocholowy (ang. <i>lithocholic acid</i> )
LHR-1	homolog 1 wątrobowego receptora jądrowego X (ang. <i>liver receptor homolog-1</i> )
LXR	wątrobowy receptor jądrowy X (ang. <i>liver X receptor</i> )
MAF1	czynnik transkrypcyjny będący homologiem czynnika transkrypcyjnego kodowanego przez onkogen włóknakomięsaka ściany jamy brzusznej (ang. <i>musculoaponeurotic fibrosarcoma factor 1</i> )
NADH+H <sup>+</sup>	dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy, forma zredukowana (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form</i> )
NADPH+H <sup>+</sup>	fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego, forma zredukowana (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form</i> )
NIDs	domeny receptorów jądrowych wiążące koaktywatory (ang. <i>nuclear receptor interaction domains</i> )
PXR	receptor jądrowy pregnanów X (ang. <i>pregnane X receptor</i> )
SXR	receptor jądrowy steroidów i ksenobiotyków (ang. <i>steroid and xenobiotic receptor</i> )
RXR	rodzina jądrowych receptorów retinoidów X (ang. <i>retinoid X receptor</i> )
SHP	mały heterodimerski „partner” białkowy (ang. <i>small heterodimer partner</i> ) wiążący i inaktywujący czynnik transkrypcyjny FTF
UDCA	kwasy ursodeoksycholowy (ang. <i>ursodeoxycholic acid</i> )
VDR	receptor witaminy D (ang. <i>vitamin D receptor</i> )

### 7. Bibliografia

1. Długosz A. Stokłosa A. Kłodnicka A. Ginek. Pol. 2007, 78, 632-636.
2. Parkinson P. Ogilvie BW. Buckley DB. Kazmi F. Czerwiński M., Parkinson O. w Klaassen C. [Edit.]. Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, McGraw-Hill Education, London 2013.
3. Anzenbacher P. Eva Anzenbacherová E. w: Anzenbacher P. Tanager UM. [Edit.]: Metabolism of drugs and other xenobiotics. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Dresden 2012.
4. Maruyama M. Matsunaga T. Harada E. Ohmori S. Biol. Pharm. Bull. 2007, 30(11), 2091-207.
5. Lu C. Miwa GT. Prakash S.R. Gani L-S. Balani SK. Drug. Metab. Dispos. 2007, 35(1), 79-85.
6. Michalets EL. Pharmacotherapy 1998, 18, 84-112.
7. Skagen KJ. Interindividual Variability in the Cytochrome P450 3A4 drug metabolizing enzyme: effect of the CYP3A4\*1G genetic variant. University of Montana Missoula 2014, <http://scholarworks.umt.edu>.
8. Lewis DF. Pharmacogenomic 2004, 5(3), 305-318.
9. McKinnon RA. Sorich MJ., Ward MB. J Pharm. Pract. Res. 2008, 38(1), 55-57.
10. Meunier B. de Visser SP. Sason Shaik S. Chem. Rev. 2004, 104, 3947-3980.
11. Tompkins LM., Wallace AD. J. Biochem. Mol. Toxicol. 2007, 21(4), 176-81.
12. Zanger UM. Schwab M. Pharmacol. Ther. 2013, 138, 103-141.
13. Thummel KE.J. Clin. Invest. 2007, 117(11), 3173-3176.

14. Ohtsuki S. Schaefe, O. Kawakami H. Inoue T. Liehner S. Saito A. Ishiguro N. Kishimoto W. Ludwig-Schwellinger E. Ebner T. Terasaki T. *Drug Metab. Dispos.* 2012, 40, 83-92.
15. Kliewer SA. Goodwin B. Willson TM. *Endocrine Rev.* 2002, 23, 687-702.
16. GenAtlas human gene database, <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>.
17. William JA. Ring BJ. Cantrell VE. Jones DR. Eckstein J. Ruterbories K. *Drug Metab. Dispos.* 2002, 30, 883-891.
18. Daly AK. *Clin. Pharmacokinet.* 2006, 45, 13-31.
19. Medsafe. *Drug Metabolism - The Importance of Cytochrome P450 3A4. Prescriber Update* 35(1), 4-6.
20. Soldin OP. Chung SH. Mattison DR. *J. Biomed. Biotech.* 2011, 2011, 1-14.
21. Johnson EF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 338, 331-336.
22. Guengerich FP. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, 39, 1-17.
23. Orans J. Teotico DG. Redinbo MR. *Mol. Endocrinol.* 2005, 19, 2891-2900.
24. Sinz M.W. *Drug Metabol. Rev.* 2013, 45(1), 3-14.
25. Kobayashi T. Kodani Y. Nozawa A. Endo Y. Sawasaki T. *FEBS Lett.* 2008, 582(18), 2737-2744.
26. Luo G. Cunningham M. Kim S. Burn T. Lin J. Sinz M. Hamilton G. Rizzo Ch. Jolley S. Gilbert D. Downey A. Mudra D. Graham R. Karoll K. Xie J. Madan A. Parkinson A. Christ D. Selling B. Lecluyse E. Gan L-S. *Drug. Metabol. Dis.* 2002, 30(7), 795-804.
27. Hasegawa M. Kapelyukh Y. Tahara H. Seibler J. Rode A. Krueger S. *Mol. Pharmacol.* 2011, 80, 518-528.
28. Kliewer SA. *J. Nutr.* 2003, 133, 2444S-2447S.
29. Matic M. Mahns A. Tsoi M. Corradin A. Polly P. Rpbertson GR. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39, 478-483.
30. Martinez-Jimenez CP. Jover R. Donato MT. Castell JV. Gomez-Lechon MJ. *Curr. Drug Metab.* 2007, 8, 185-194.
31. Haddad A. Davis M. Langman R. *Support Care Cancer* 2007, 15, 251-257.
32. LeCluyse E.L. *Chem. Biol. Interact.* 2001, 134, 283-28.
33. Kliewer S.A. Willson T.M. *J. Lipid Res.* 2002, 43, 359-364.
34. Handshin C. Meyer UA. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, 433, 387-396.
35. Zhang S. Pan X. Jeong H. *Drug Metab. Dispos.* 2015, 43, 743-748.
36. Hariparsad N. Chu X. Yabut J. Labhart P. Hartley D.P. Dai X. Evers R. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 1160-1173.
37. Soisson SM. Parthasarathy G. Adams AD. Sahoo S. Sitlani A. Sparrow C. Jisong Cui J. Becker JW. *PNAS* 2008, 105(14), 5337-5342.
38. Wang YD. Chen WD. Moore DD. Huang W. *Cell Res.* 2008, 18(11), 1087-1095.
39. Chen J. Zhao K-N. Chen Ch. *Ann. Transl. Med.* 2014, 2(1), 7-15.
40. Zhang J. Tian Q. Yung Chan S. *Drug Metab. Rev.* 2005, 37, 611-703.
41. Fukumori S. Murata T. Taguchi M. Hashimoto Y. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2007, 22, 377-381.
42. Thummel K.E. Brimer C. Yasuda K. Thottassery J. Senn T. Lin Y. *Mol. Pharmacol.* 2001, 60, 1399-1406.
43. Makishima M. Lu TT. Xie W. Whitfield GK. Domoto H. Evans RM. *Science* 2002, 296, 1313-1316.
44. Kobayashi K. Sueyoshi T. Inoue K. Moore R. Negishi M. *Mol. Pharmacol.* 2003, 64, 1069-1075.
45. Moore LB. Parks DJ. Jones SA. Bledsoe RK. Consler TG. Stimmel JB. Goodwin B. Liddle C. Blanchard SG. Wilson TM., Collins JL. Kliewer SA. *J. Biol. Chem.* 2000a, 275, 15122-15227.