

УДК 577.15

СТЕРОИДОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО
АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА
ПРИ ЕГО ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ-САМЦАМА. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач¹, Д. В. Дарьин², А. О. Шпаков^{1,*}

Представлено академиком РАН Л. Г. Магазаником 03.07.2018 г.

Поступило 02.08.2018 г.

Производное тиенопиримидина TP03 (низкомолекулярный агонист рецептора лютеинизирующего гормона, ЛГР) при введении крысам-самцам популяции Wistar стимулировало продукцию тестостерона (“Т”), повышенный уровень которого сохранялся в течение 7 дней, и повышало экспрессию гена ЛГР. В то же время стероидогенный эффект хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), который значительно повышал уровень “Т” в первый день обработки, в дальнейшем ослаблялся, что сопровождалось снижением в семенниках экспрессии гена ЛГР, свидетельствующим о развитии резистентности клеток Лейдига к ХГЧ. При обработке ХГЧ в семенниках зарегистрировали компенсаторное повышение экспрессии генов стероидогенных ферментов — цитохрома P450_{sc} и дегидрогеназы 3β-HSD. При обработке TP03 этот эффект отсутствовал.

Ключевые слова: низкомолекулярный агонист рецептора лютеинизирующего гормона, тиенопиримидины, тестостерон, хорионический гонадотропин человека, стероидогенез.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524846760-763>

Гонадотропины, лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), действие которых осуществляется через рецептор, в настоящее время широко используются для коррекции дисфункций репродуктивной системы у мужчин и женщин, а также во вспомогательных репродуктивных технологиях. Однако применение гонадотропинов в клинике сопряжено с рядом нежелательных эффектов, среди которых синдром гиперстимуляции яичников и быстрое развитие резистентности тканей-мишеней [1–3]. Наряду с этим природные формы гонадотропинов, выделяемые из мочи, характеризуются высокой степенью гетерогенности, а рекомбинантные формы существенно отличаются от природных гонадотропинов по спектру специфической активности [1, 4]. Всё вышесказанное свидетельствует о том, что одной из актуальных задач молекулярной эндокринологии является разработка новых агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ [5, 6].

Наибольший интерес среди них представляют тиенопиримидиновые производные, в том числе синтезированный и изученный нами ранее 5-амино-

N-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (TP03). Это соединение селективно стимулирует у крыс аденилатциклазную сигнальную систему в мембранах клеток тестикул, не влияя на фосфоинозитидные сигнальные пути [7]. При пероральном и внутривнутрибрюшинном введении крысам-самцам повышает у них уровень тестостерона (“Т”), эти эффекты TP03 сопоставимы с таковыми ХГЧ [8]. Поскольку имеются данные о том, что при многократной обработке ХГЧ чувствительность к нему клеток Лейдига, в которых осуществляется синтез “Т”, снижается [1, 4, 9], то остро встает вопрос о сохранении стероидогенного эффекта TP03 при его длительном применении.

Целью работы было сравнительное изучение влияния длительной обработки крыс-самцов с помощью TP03 и ХГЧ на уровень “Т” в крови и экспрессию генов рецептора ЛГ/ХГЧ и ключевых стероидогенных белков в семенниках. Исследовали экспрессию генов *Lhr*, *Star*, *Cyp11a1* и *Hsd3b*, кодирующих соответственно рецептор ЛГ/ХГЧ, белок StAR, обеспечивающий стадию, лимитирующую скорость синтеза “Т” — транспорт холестерина в митохондрии, цитохром P450_{sc}, катализирующий превращение холестерина в прегненолон в митохондриях, и 3β-гидроксистероиддегидрогеназу (3β-HSD), катализирующую превращение прегне-

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской Академии наук, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный университет

*E-mail: alex_shpakov@list.ru

нолона в прогестерон в эндоплазматическом ретикулеуме [10, 11].

Использовали трёхмесячных крыс-самцов Wistar, которым внутрибрюшинно вводили ТР03 ежедневно в течение недели в дозе 15 мг/кг (группа 2) или по такой же схеме подкожно ХГЧ по 100 МЕ каждому животному (группа 3). Препараты вводили в 11.00. Крысам контрольной группы (группа 1) вместо препаратов вводили стерильный физиологический раствор. Концентрацию “Т” в образцах крови, полученных из хвостовой вены животных, определяли с помощью набора Тестостерон-ИФА (“Алкор-Био”, Россия). Величину концентрации “Т” определяли до начала эксперимента и через 3 ч после введения препаратов ежедневно в течение недели обработки крыс ХГЧ или ТР03. По окончании экспериментов животных декапитировали под наркозом и извлекали образцы ткани семенников для оценки в них генной экспрессии. Все процедуры выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН и European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС).

Экспрессию генов определяли с помощью количественной ПЦР, для чего из тканей семенников с помощью TRIzol Reagent (“ThermoFisher Scientific”, США) выделяли суммарную РНК. Кодировочную ДНК получали обратной транскрипцией, используя набор MMLV RT Kit (“Евроген”, Россия). Смесь для амплификации содержала 10 нг ПЦР-продукта, прямой и обратный праймеры (0,4 мкМ), среду qPCRmix-HS SYBR + LowROX (“Евроген”). Измерение амплификационных сигналов проводили с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (“ThermoFisher Scientific”). В качестве референсных использовали гены глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и β -актина (*Actb*). Структуры праймеров идентичны использованным нами ранее [12]. Анализ результатов проводили с помощью порогового метода $\Delta\Delta C_t$. Значения RQ рассчитывали как отношение показателей к таковым контрольной группы.

Статистический анализ данных проводили с помощью метода ANOVA (программа компании “Manugistics Inc.”, США). Различия между пробами оценивали с помощью критерия *t* Стьюдента и рассматривали как достоверные при $p \leq 0,05$.

Мы обнаружили, что ХГЧ и ТР03 начиная с первого дня обработки достоверно повышали уровень “Т” при сравнении с показателями контрольных животных. Однако динамика изменения стимулирующего эффекта ХГЧ и ТР03 была разной. При обработке крыс ХГЧ в первый день при-

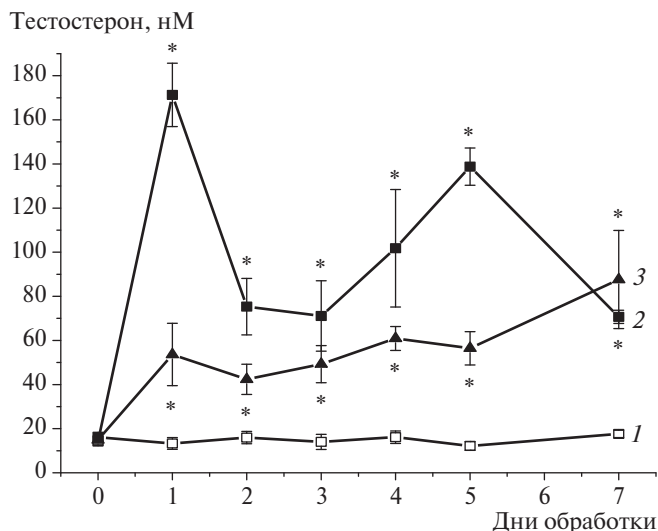


Рис. 1. Влияние семидневной обработки самцов крыс с помощью ХГЧ или ТР03 на уровень тестостерона в крови животных. 1 — контроль, 2 — ХГЧ, 3 — ТР03; $2M \pm S.E.M.$, $n = 5$ для каждой группы, $*p < 0,05$ при сравнении с контролем.

рост концентрации “Т” был максимальным и составил 158 ± 15 нМ ($n = 5$). Затем он снизился и на 5-й день вновь повысился, хотя и в меньшей степени, и впоследствии опять ослабел (рис. 1). Стимулирующее влияние ТР03 изменялось в существенно меньшей степени и достигало максимума на 7-й день эксперимента. Необходимо отметить, что если в первый день обработки прирост концентрации “Т”, вызываемый ТР03, был в 4 раза ниже такового для ХГЧ, то к концу эксперимента стероидогенные эффекты препаратов были сопоставимыми (рис. 1). Полученные результаты указывают на то, что при однократном введении стимулирующий продукцию “Т” эффект ТР03 был ниже, чем в случае ХГЧ. Однако при длительном введении эффект ТР03, в отличие от такового ХГЧ, сохранялся и даже усиливался.

Одной из причин различий стероидогенной активности ТР03 и ХГЧ могли быть специфические изменения чувствительности к ним рецепторов ЛГ/ХГЧ в клетках Лейдига. Об этом свидетельствовали наши данные о влиянии обработки ХГЧ и ТР03 на экспрессию гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ в клетках семенников крыс. После однократного введения ХГЧ мы зарегистрировали двукратное снижение экспрессии гена *Lhr*. Сниженный уровень сохранялся через 3 и 7 дней после начала обработки (рис. 2). После однократного введения ТР03 мы наблюдали лишь тенденцию к снижению экспрессии гена *Lhr*, но через 7 дней она парадоксальным образом повысилась в 3 раза (рис. 2). По-

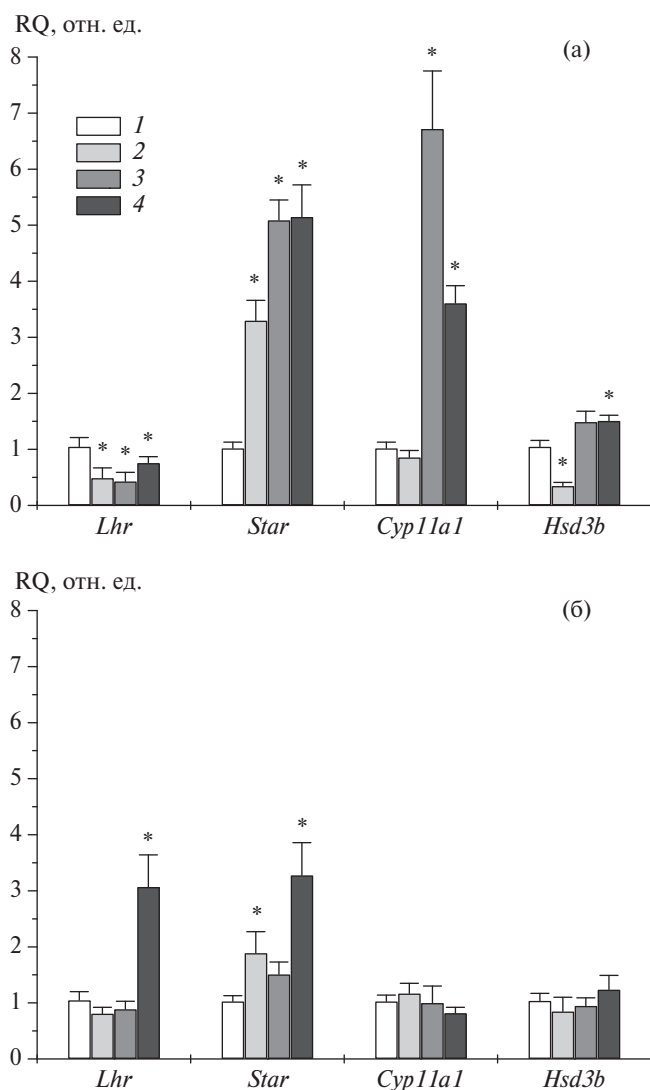


Рис. 2. Влияние обработки крыс-самцов с помощью ХГЧ (а) и ТР03 (б) на экспрессию генов *Lhr*, *Star*, *Cyp11a1* и *Hsd3b*, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ и стероидогенные белки в клетках семенников. 1 — без обработки, 2 — однократное введение, 3 — введение в течение 3-х дней, 4 — введение в течение 7-ми дней. Уровень экспрессии мРНК генов нормировали по уровню экспрессии мРНК генов *Gapdh* и *Actb*. Значения RQ рассчитаны по отношению к контрольной группе. * — различия с контролем статистически значимы при $p < 0,05$. Значения представлены как $M \pm SEM$. $n = 5$.

лученные результаты свидетельствовали о значительном снижении экспрессии гена *Lhr* в клетках семенников крыс при их обработке ХГЧ, что привело к развитию резистентности клеток Лейдига к гонадотропинам с ЛГ-активностью. Введение ТР03 не только не повлияло, но при длительном введении усилило экспрессию гена *Lhr*, сохраняя чувствительность семенников к агонистам рецептора ЛГ/ХГЧ. Это хорошо соответствовало динамике изменения

стероидогенного эффекта ТР03. Необходимо отметить, что развитие резистентности гонад к действию гонадотропинов является одной из ключевых проблем их применения для лечения репродуктивных дисфункций и во вспомогательных репродуктивных технологиях [2, 13]. Как показали наши исследования, ТР03 в этом отношении является хорошей альтернативой гонадотропинам.

Далее мы исследовали влияние однократной и длительной обработки крыс ХГЧ и ТР03 на экспрессию генов основных белков стероидогенеза в семенниках животных. Экспрессия гена *Star* при всех сроках обработки обоими препаратами была повышена. Однако в случае ХГЧ это повышение было более выраженным — в среднем в 3–5 раз (рис. 2). Мы зафиксировали следующую закономерность: чем в большей степени снижались экспрессия гена *Lhr* и стимулирующее влияние препарата на продукцию “Т”, тем в большей степени повышалась экспрессия гена *Star* (рис. 2). Это может указывать на компенсаторный характер такого повышения в клетках Лейдига в условиях ослабления передачи в них генерируемого гонадотропинами сигнала и, как следствие, снижения стимулирующего влияния протеинкиназы А (основная мишень агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ) на активность белка StAR. Повышение экспрессии гена *Star* при действии высоких доз ХГЧ на клетки Лейдига в условиях *in vitro* отмечали и другие авторы [9].

В условиях многодневной обработки крыс ХГЧ существенно повысилась экспрессия гена *Cyp11a1*, а на 7-й день мы зарегистрировали статистически значимое повышение экспрессии гена *Hsd3b* (рис. 2). Все эти изменения также являются составляющими компенсаторной реакции, развивающейся в условиях резистентности клеток Лейдига к гонадотропинам и ослабления стимулированных ими сигнальных каскадов, мишенями которых являются цитохром P450_{sc} и 3β-HSD [10, 11]. Наряду с этим в первый день обработки гонадотропином мы выявили снижение на 67% экспрессии гена *Hsd3b*. Снижение экспрессии 3β-HSD в культуре клеток Лейдига при их обработке высокими дозами ХГЧ ранее было показано в работе [14]. Примечательно, что в случае использования для обработки крыс ТР03 изменений экспрессии генов, кодирующих цитохром P450_{sc} и 3β-HSD, мы не наблюдали (рис. 2).

Таким образом, мы показали, что ТР03, низкомолекулярный агонист рецептора ЛГ/ХГЧ, при обработке им крыс-самцов в течение 7 дней устойчиво повышал продукцию “Т”, сохраняя, а на 7-й день повышая экспрессию гена, кодирующего рецептор

ЛГ/ХГЧ, и существенно не влияя на экспрессию генов основных ферментов стероидогенеза (цитохрома P450_{sc}, 3 β -HSD) в клетках семенников, что свидетельствует о сохранении чувствительности клеток Лейдига к эндогенным гонадотропинам и об адекватном ответе системы стероидогенеза на её активацию агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ. Хорионический гонадотропин человека вызывал сильный подъём уровня “Т” в первый день обработки, но в последующие дни его стероидогенный эффект снизился, что сопровождалось снижением в клетках семенников экспрессии гена *Lhr*, свидетельствующим о развитии резистентности клеток Лейдига к гонадотропинам, и компенсаторным повышением экспрессии транспортного белка StAR и ферментов стероидогенеза. Всё это привело к ослаблению ответа семенников на эндогенные гонадотропины и является механизмом, который обуславливает развитие резистентности к ним тканей-мишеней [1, 4, 15].

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 16–04–00126 и частично государственного задания № АААА-А18-118012290427-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ezcurra D., Humaidan P. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014. V. 12. P. 95.
2. Banker M., Garcia-Velasco J.A. // *J. Hum. Reprod. Sci.* 2015. V. 8. P. 13–17.
3. Riccetti L., De Pascali F., Gilioli L., et al. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2017. V. 15. P. 2.
4. Cole L.A. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012. V. 10. P. 24.
5. van de Lagemaat R., Raafs B.C., van Koppen C., et al. // *Endocrinology.* 2011. V. 152. P. 4350–4357.
6. Шпаков А.О. // *Цитология.* 2015. Т. 57. № 3. С. 167–176.
7. Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., et al. // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell Biol.* 2016. V. 10. P. 294–300.
8. Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Shpakov A.A., et al. // *Cell Tissue Biol.* 2017. V. 11. P. 475–482.
9. Lejeune H., Sanchez P., Chuzel F., et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998. V. 144. P. 59–69.
10. Payne A.H., Hales D.B. // *Endocr. Rev.* 2004. V. 25. P. 947–970.
11. Aghazadeh Y., Zirkin B.R., Papadopoulos V. // *Vitam. Horm.* 2015. V. 98. P. 189–227.
12. Бахтюков А.А., Соколова Т.В., Дарьин Д.В. и др. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2017. Т. 103. № 10. С. 1181–1192.
13. Riccetti L., Yvenc R., Klett D., et al. // *Sci. Rept.* 2017. V. 7. P. 940.
14. Tang P.Z., Tsai-Morris C.H., Dufau M.L. // *Endocrinology.* 1998. V. 139. P. 4496–4505.
15. Keenan D.M., Iranmanesh A., Veldhuis J.D. // *Amer. J. Physiol.* 2011. V. 300. P. 349–350.

THE STEROIDOGENIC EFFECT OF A LOW-MOLECULAR AGONIST OF LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR IN THE COURSE OF ITS ADMINISTRATION TO MALE RATS

A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach, D. V. Dar'in, A. O. Shpakov

Presented by Academician of the RAS L.G. Magazanik July 3, 2018

Received August 2, 2018

The thienopyrimidine derivative TP03 (a low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor, LHR), when administered to male Wistar rats, stimulated the production of testosterone (“T”), elevated level of which was maintained for 7 days, and increased the expression of the LHR gene. At the same time, the steroidogenic effect of human chorionic gonadotropin (hCG), which significantly increased the “T” level on the first day of treatment, was further weakened, which was accompanied by a decrease in the expression of the LHR gene in the testes, indicating the development of resistance of Leydig cells to hCG. In the testes, the hCG treatment induced a compensatory increase in the expression of genes of the steroidogenic enzymes, such as the cytochrome P450_{sc} and the dehydrogenase 3 β -HSD. In the case of TP03 treatment this effect was absent.

Keywords: low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor, thienopyrimidines, testosterone, human chorionic gonadotropin, steroidogenesis.