

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТЕРОИДОГЕННОГО ЭФФЕКТА 5-АМИНО-*N*-трет-БУТИЛ-2-(МЕТИЛТИО)-4-(3- (НИКОТИНАМИДО)ФЕНИЛ)ТИЕНО[2,3-*d*]-ПИРИМИДИН- 6-КАРБОКСАМИДА И ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ САМЦАМ КРЫС

© 2022 г. А. А. Степочкина<sup>1,2</sup>, А. А. Бахтюков<sup>1</sup>, К. В. Деркач<sup>1</sup>,  
В. Н. Сорокоумов<sup>1,2</sup>, А. О. Шпаков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: alex\_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 05.11.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

Для коррекции андрогенного дефицита необходимы разработка новых агонистов рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР) и оценка их стероидогенного эффекта при различной продолжительности и способах введения в сравнении с хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ), “золотым стандартом” активаторов стероидогенеза. Целью исследования было изучить эффект аллостерического ЛГР-агониста 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР03) при однократном и пятидневном внутрибрюшинном, подкожном и пероральном введении самцам крыс в сравнении с внутрибрюшинно или подкожно вводимым ХГЧ. Исследовали уровни тестостерона и экспрессию генов ЛГР и ферментов стероидогенеза. Предварительно определяли и в дальнейшем использовали дозы ТР03 и ХГЧ, вызывавшие 65–75% максимального стероидогенного эффекта. При однодневном и пятидневном внутрибрюшинном введении ТР03 (20 мг/кг) более эффективно стимулировал продукцию тестостерона, чем при подкожном и пероральном введении. Пятидневное внутрибрюшинное (но не подкожное) введение ТР03 повышало интраклеточную экспрессию генов ЛГР и холестерин-транспортирующего белка StAR, катализирующего скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза. Подкожное введение ХГЧ (20 МЕ/крысу) было эффективнее, чем внутрибрюшинное введение, и значительно повышало экспрессию гена дегидрогеназы 17β, катализирующей синтез андростендиона. Оба способа введения ХГЧ снижали экспрессию гена ЛГР. В отличие от ХГЧ, стероидогенный эффект ТР03 при пятидневном введении сохранялся. Сделан вывод о том, что стероидогенный эффект ТР03 наиболее выражен при внутрибрюшинном введении, а в случае ХГЧ при подкожном введении, и это ассоциировано с различным влиянием препаратов на экспрессию стероидогенных ферментов.

**Ключевые слова:** семенники, стероидогенез, тиенопиримидин, хорионический гонадотропин, внутрибрюшинное введение, подкожное введение, тестостерон

**DOI:** 10.31857/S0044452922010077

Важнейшими регуляторами репродуктивных функций у человека и млекопитающих являются лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его гомолог — хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Они осуществляют свои эффекты на клетки-мишени посредством связывания с внеклеточным доменом рецептора ЛГ. После связывания с гонадотропином рецептор ЛГ взаимодействует с различными типами гетеротримерных G-белков (G<sub>s</sub>, G<sub>q/11</sub>, G<sub>i/o</sub>) и β-аррестинами [1]. У мужчин снижение продукции ЛГ и ослабление чувствительности

к нему рецептора ЛГ становятся причинами гипогонадизма, андрогенного дефицита и бесплодия [2, 3]. Для стимуляции стероидогенной функции семенников обычно применяют препараты гонадотропинов (ЛГ, ХГЧ) или используют агонисты гонадолиберина, гипоталамического релизинг-фактора гонадотропинов [4, 5]. Однако оба подхода имеют существенные недостатки, что обусловлено десенситизацией рецепторов ЛГ в результате длительного воздействия фармакологических доз гонадотропинов и нарушением функционирования

гонадной оси вследствие истощения выброса гонадотропинов в ответ на стимуляцию агонистами гонадолиберина. У гонадотропиновой терапии имеется ряд побочных эффектов, вызванных структурными различиями между коммерческими препаратами гонадотропинов и эндогенными гонадотропинами [6, 7]. Применение заместительной терапии андрогенами по механизму отрицательной обратной связи подавляет активность гонадной оси, способно индуцировать рост андроген-зависимых опухолей и может привести к бесплодию [3].

Одной из альтернатив гонадотропинам являются аллостерические агонисты рецептора ЛГ [8, 9], в том числе разработанные нами производные тиено[2,3-*d*]-пиримидина [10–14]. Они взаимодействуют с аллостерическим сайтом, локализованным внутри трансмембранного домена рецептора [8]. Если в случае связывания рецептора ЛГ с гонадотропинами стабилизируется несколько активных конформаций, то при его связывании с аллостерическими агонистами стабилизируется преимущественно одна из них, в которой рецептор активирует только один тип G-белка или  $\beta$ -аррестина, тем самым запуская определенный внутриклеточный каскад. Так показано, что соединение Org43553 и разработанные нами тиено[2,3-*d*]-пиримидины TP01 и TP03 через G<sub>s</sub>-белки стимулируют фермент аденилатциклазу и цАМФ-зависимые пути, но слабо или вовсе не влияют на G<sub>q/11</sub>-белки и кальциевые пути [8, 11]. В то же время стимулирующие эффекты ЛГ и ХГЧ в отношении различных типов G-белков не являются высоко селективными, хотя известно, что ХГЧ в большей степени стимулирует G<sub>s</sub>-белки [1].

При использовании аллостерических агонистов важным является выбор оптимального пути доставки препарата. Для тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных при изучении их стероидогенного эффекта у крыс, как правило, применяют внутрибрюшинный (в/б) способ введения [8, 10, 11], в то время как подкожное (п/к) введение практически не используют. Учитывая устойчивость и хорошую всасываемость в желудочно-кишечном тракте, тиено[2,3-*d*]-пиримидины могут быть введены перорально, что невозможно в случае гонадотропинов, и это является их важным преимуществом перед гонадотропинами [9, 10]. В случае гонадотропинов (ХГЧ) используют как подкожный (п/к), так и внутримышечный способы введения, причем оба этих метода считают биоэквивалентными [15]. В условиях эксперимента чаще применяют п/к инъекции ХГЧ, но также, хотя и ограниченно, используют в/б введение [16–18]. При этом в/б введение ХГЧ мало изучено, хотя подобные исследования представляют интерес в аспекте сравнения эффективности и биодоступности препаратов гонадотропинов и тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых

производных, вводимых в основном в/б способом. В этой связи следует отметить, что сравнительные исследования стероидогенных эффектов низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ и гонадотропинов и их влияния на экспрессию стероидогенных белков при различных способах введения ранее не проводились.

Целью исследования было изучить стероидогенный эффект разработанного нами аллостерического агониста 5-амино-*N*-*mpem*-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (TP03) при его однократном и пятидневном в/б, п/к и пероральном введении самцам крыс в сравнении с в/б или п/к вводимым ХГЧ, который в настоящее время является “золотым стандартом” среди активаторов стероидогенеза. В случае однократного введения TP03 и ХГЧ оценивали динамику изменения уровня тестостерона в течение 5 ч после введения. В случае пятидневного введения оценивали динамику изменения уровня тестостерона, а в конце эксперимента оценивали экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ и основные ферменты стероидогенеза.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов были взяты трехмесячные самцы крыс Wistar, которых содержали на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Синтез TP03 осуществляли путем ацилирования 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-*mpem*-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, как описано ранее [11]. Для этого 1.0 эквивалент ацилируемого агента смешивали с 1.1 эквивалента никотиновой кислоты, 1.1 эквивалента гексафторфосфата 1-[бис(диметиламино)метил]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксида и 1.2 эквивалента *N,N*-диизопропилэтиламина в сухом *N,N*-диметилформамиде. Реакцию проводили в течение 5 ч при комнатной температуре, целевые продукты очищали с помощью перекристаллизации из этанола и адсорбционной колоночной хроматографии. Структуру TP03 подтверждали с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР и <sup>13</sup>C-ЯМР спектроскопии, используя спектрометр Bruker Avance III 400 (“Bruker”, Германия), и данных масс-спектрометрии, используя спектрометр micrOTOF (“Bruker”, Германия). Молекулярная масса TP03 составила 515.1301 (рассчитанная масса для иона [M+Na<sup>+</sup>] составила 515.1294).

Для оценки стероидогенного эффекта самцам крыс однократно или в течение 5 дней вводили ТР03 в диметилсульфоксиде (ДМСО) и ХГЧ (“Московский эндокринологический завод”, Россия) в физиологическом растворе. Препараты вводили ежедневно в 11.00 в/б, п/к (в область левой лопатки), в случае ТР03 также перорально. Контрольным животным вместо препаратов в те же сроки и в тех же объемах в/б, п/к или перорально вводили ДМСО или физиологический раствор. Поскольку по результатам предварительных экспериментов оба растворителя при различных способах введения не оказывали значимого влияния на уровни тестостерона, то в основных экспериментах в качестве контрольных групп использовали крыс с в/б введением ДМСО (обработка ТР03) и п/к введением физиологического раствора (обработка ХГЧ). В основном эксперименте в каждой группе было по пять животных. При этом сначала крысам ТП03, ХГЧ и их растворители вводили однократно, а через неделю отдыха соответствующим группам животных те же препараты вводили в течение пяти дней. Тем самым, в общей сложности в экспериментах использовали 35 животных, которых распределили на 7 групп.

Для исследования были выбраны дозы ТР03 и ХГЧ, при которых, по результатам предварительных экспериментов по изучению зависимости “доза-эффект” (табл. 1), повышение уровня тестостерона составило 65–75% от максимального. При однократном введении концентрацию тестостерона в крови оценивали до (10.00) и через 1 ч (11.00), 3 ч (13.00) и 5 ч (15.00) после введения препаратов, при пятидневном введении за день до введения препаратов (13.00) и ежедневно через 3 ч после введения (13.00). Образцы крови забирали из хвостовой вены с предварительной местной анестезией крыс с помощью 2% раствора лидокаина из расчета 2–4 мг/кг. Уровень тестостерона определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия) и спектрофотометра “Anthos Absorbance Reader 2020” (Австрия). В конце эксперимента (на 5-й день через 3 ч после введения препарата) крыс наркотизировали, используя ингаляцию 4–5% (v/v) изофлураном, и забирали у них семенники для оценки экспрессии генов.

Экспрессию мРНК для гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ, и для генов *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b* и *Hsd17b*, кодирующих холестерин-транспортирующий белок StAR, цитохромы P450<sub>sc</sub> и P450-17 $\alpha$  и 3 $\beta$ -гидростероиддегидрогеназы 3 $\beta$  и 17 $\beta$ , соответственно, осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. Для этого из семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (“Evrogen”, Россия). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV RT Kit (“Evrogen”, Россия), экспрессию оценивали с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для

оценки экспрессии генов целевых белков использовали следующие праймеры: *Lhr* – CTGCGCT-GTCTGGCC (For), CGACCTCATTAAGTCCCTGAA (Rev); *Star* – AAGGCTGGAAGAAG-GAAAGC (For), CACCTGGCACCACCTTACTT (Rev); *Cyp11a1* – TATTCCGCTTTGCSTTTGAG (For), CACGATCTCCTCCAACATCC (Rev); *Hsd3b* – AGGCCTGTGTCCAAGCTAGTGT (For), CTC-GGCCATCTTTTTGCTGTAT (Rev); *Cyp17a1* – CATCCCCACAAGGCTAAC (For), TGT-GTCTTGGGGACAGTAAA (Rev); *Hsd17b* – CCTTTGGCTTTGCCATGAGA (For), CAATC-CATCCTGCTCCAACCT (Rev), структура которых была описана ранее [19]. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), а также на основе данных литературы. В качестве референсных использовали гены *Actb* и *Gapdh*, кодирующие  $\beta$ -актин и глицеральдегидфосфатдегидрогеназу. Результаты анализировали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  и программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе, получавшей в течение 5 дней ДМСО (в/б).

Статистический анализ проводили с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007”. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ . Данные представляли как  $M \pm SEM$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основываясь на зависимости “доза-эффект” для различных способов введения препаратов были выбраны дозы 20 мг/кг для в/б и п/к введения, доза 40 мг/кг для перорального введения ТР03 и доза 20 МЕ/крысу для в/б и п/к введения ХГЧ. В этих дозах достигался 65–75% от максимального стероидогенного эффекта препарата при соответствующем способе введения (табл. 1).

При однократном введении показано, что в случае ТР03 наиболее эффективным было в/б введение, в то время как п/к и пероральный способы были сопоставимыми и по максимальному стероидогенному эффекту, и по значениям  $AUC_{1-5(ч)}$ , представляющим интегрированную площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ)-время(ч)” (табл. 2). При п/к и пероральном введении стимулирующий эффект ТР03 запаздывал по сравнению с таковым при в/б введении (табл. 2). В случае ХГЧ п/к введение было более эффективным, позволяя уже через 1 ч после введения препарата достичь значительного повышения уровня тестостерона. Значение  $AUC_{1-5(ч)}$  для п/к введения на

**Таблица 1.** Уровни тестостерона до и через 1, 3 и 5 ч после однократного внутривенного, подкожного и перорального введения различных доз ТР03 и однократного подкожного и внутривенного введения различных доз ХГЧ самцам крыс Wistar

	До	Через 1 ч	Через 3 ч	Через 5 ч	AUC
К, ДМСО, в/б	14.74 ± 0.87	17.52 ± 2.09	17.99 ± 1.76	16.66 ± 1.85	70.2 ± 5.9
ТР03 10, в/б	14.87 ± 2.05	26.28 ± 2.25	37.03 ± 3.54	37.85 ± 4.20	138.2 ± 12.7*
ТР03 15, в/б	17.04 ± 3.03	34.57 ± 3.67	56.58 ± 6.06	58.34 ± 3.46	206.1 ± 18.1*
ТР03 25, в/б	15.64 ± 1.85	41.95 ± 6.00	72.76 ± 6.45	75.68 ± 8.43	263.2 ± 23.5*
ТР03 50, в/б	15.83 ± 2.63	41.34 ± 4.46	79.36 ± 6.95	76.79 ± 4.92	276.9 ± 22.9*
К, ДМСО, п/к	16.53 ± 1.72	17.89 ± 2.88	16.91 ± 1.74	16.25 ± 2.80	68.0 ± 8.9
ТР03 10, п/к	17.05 ± 1.39	17.58 ± 2.32	22.63 ± 2.55	24.88 ± 3.67	87.7 ± 10.6
ТР03 15, п/к	16.66 ± 3.79	17.70 ± 3.06	27.31 ± 3.65	29.70 ± 4.95	102.0 ± 14.2
ТР03 25, п/к	13.59 ± 2.43	15.69 ± 2.76	28.80 ± 3.48	32.21 ± 3.51	105.5 ± 11.5
ТР03 50, п/к	16.96 ± 2.26	20.16 ± 2.48	29.75 ± 3.18	32.51 ± 2.63	112.2 ± 11.0*
К, ДМСО, пер.	12.09 ± 1.49	13.78 ± 1.95	15.09 ± 1.98	14.85 ± 2.27	58.8 ± 7.1
ТР03 15, п/о	14.44 ± 1.49	14.35 ± 1.70	18.27 ± 1.08	22.17 ± 1.70	73.1 ± 3.5
ТР03 25, п/о	15.49 ± 2.01	15.58 ± 2.10	24.58 ± 3.68	33.58 ± 2.34	98.3 ± 10.7
ТР03 50, п/о	12.86 ± 2.14	16.03 ± 2.82	31.46 ± 2.78	44.32 ± 2.89	123.3 ± 6.9*
ТР03 75, п/о	13.97 ± 2.81	15.78 ± 2.53	33.00 ± 4.39	46.44 ± 4.59	128.2 ± 15.2*
К, физ. р-р, п/к	15.55 ± 1.70	17.16 ± 2.17	16.53 ± 2.53	14.37 ± 2.16	64.6 ± 9.3
ХГЧ 5, п/к	11.61 ± 1.90	24.58 ± 4.62	42.97 ± 5.23	43.69 ± 5.81	154.2 ± 17.2*
ХГЧ 10, п/к	14.82 ± 2.42	44.90 ± 4.66	86.96 ± 9.08	79.41 ± 7.20	298.2 ± 25.6*
ХГЧ 20, п/к	12.68 ± 1.94	70.04 ± 6.69	111.86 ± 11.19	107.89 ± 9.53	401.7 ± 35.0*
ХГЧ 50, п/к	15.79 ± 2.11	80.32 ± 8.45	148.57 ± 12.50	124.23 ± 9.18	501.6 ± 37.8*
ХГЧ 100, п/к	16.98 ± 2.16	87.56 ± 8.23	152.31 ± 17.78	114.45 ± 10.26	506.6 ± 43.9*
К, физ. р-р, в/б	13.98 ± 1.06	15.01 ± 2.38	14.31 ± 1.30	12.37 ± 1.08	56.0 ± 5.4
ХГЧ 5, в/б	15.71 ± 3.73	20.26 ± 2.57	49.22 ± 5.72	60.81 ± 5.33	179.5 ± 17.9*
ХГЧ 10, в/б	13.56 ± 1.66	24.11 ± 2.10	67.78 ± 10.14	64.63 ± 4.95	224.3 ± 23.7*
ХГЧ 20, в/б	13.14 ± 1.89	37.83 ± 2.87	80.78 ± 10.58	80.79 ± 6.41	280.2 ± 29.1*
ХГЧ 50, в/б	17.04 ± 1.94	63.14 ± 5.88	96.95 ± 12.25	84.03 ± 10.69	341.1 ± 39.2*
ХГЧ 100, в/б	15.41 ± 2.23	79.39 ± 4.19	94.46 ± 6.36	89.29 ± 7.75	357.6 ± 21.6*

*Примечание.* \* – различия между значением AUC в группе с обработкой препаратами и таковым в соответствующем контроле статистически значимы при  $p < 0.05$ . Во всех группах  $n = 5$ . Крыс использовали повторно, с интервалом отдыха между обработками не менее 5 дней, начиная с введения ДМСО, физиологического раствора или низких доз препаратов, но не более трех последовательных обработок. После в/б и п/к введения ТР03 в дозах 25 или 50 мг/кг, перорального введения ТР03 в дозах 50 и 75 мг/кг и в/б и п/к введения ХГЧ в дозах 20, 50 и 100 МЕ/крысу повторную обработку не проводили. В общей сложности в экспериментах использовали 60 крыс, которых распределили на 12 групп. Значения представлены как  $M \pm SEM$ .

30% превышало таковое при в/б введении гонадотропина (табл. 2).

Введение препаратов в течение 5 дней также показало более высокую эффективность в/б введения ТР03 по сравнению с п/к и пероральным введени-

ем и п/к введения ХГЧ по сравнению с в/б введением. На это указывают как динамика изменения уровня тестостерона в крови животных, так и значения  $AUC_{1-5(д)}$ , представляющие собой интегрированную площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ)-время(дни)” (рис. 1).

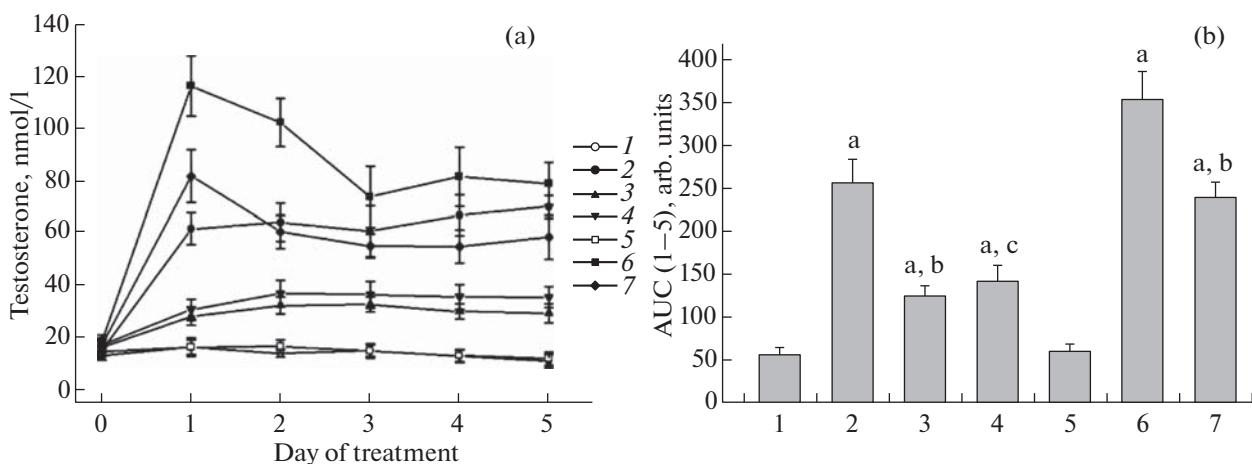
**Таблица 2.** Уровни тестостерона до и через 1–5 ч после однократного внутривнутрибрюшинного (20 мг/кг), подкожного (20 мг/кг) и перорального (40 мг/кг) введения ТР03 и однократного подкожного (20 МЕ/крысу) и внутривнутрибрюшинного (20 МЕ/крысу) введения ХГЧ самцам крыс Wistar

	до	Через 1 ч	Через 3 ч	Через 5 ч	AUC <sub>1–5(ч)</sub>
К1, ДМСО, в/б	14.74 ± 0.87	17.52 ± 2.09	17.99 ± 1.76	16.66 ± 1.85	70.2 ± 5.9
ТР03, в/б	14.21 ± 1.54	36.82 ± 2.87 <sup>a</sup>	65.57 ± 6.44 <sup>a</sup>	65.93 ± 4.30 <sup>a</sup>	233.9 ± 19.1 <sup>b</sup>
ТР03, п/к	17.37 ± 2.40	18.23 ± 2.58	29.55 ± 2.49 <sup>a</sup>	32.74 ± 4.62 <sup>a</sup>	110.1 ± 9.4 <sup>b</sup>
ТР03, пер	13.17 ± 2.11	15.62 ± 2.60	30.56 ± 3.04 <sup>a</sup>	38.79 ± 3.47 <sup>a</sup>	115.5 ± 11.0 <sup>b</sup>
К2, физ.р-р, п/к	15.55 ± 1.70	17.16 ± 2.17	16.53 ± 2.53	14.37 ± 2.16	64.6 ± 9.3
ХГЧ, п/к	13.61 ± 1.68	73.41 ± 5.96 <sup>a</sup>	118.26 ± 13.08 <sup>a</sup>	113.68 ± 10.91 <sup>a</sup>	423.6 ± 36.1 <sup>b</sup>
ХГЧ, в/б	14.96 ± 2.10	36.36 ± 6.13 <sup>a</sup>	88.34 ± 8.44 <sup>a</sup>	92.83 ± 8.67 <sup>a</sup>	305.9 ± 30.3 <sup>b</sup>

*Примечание.* <sup>a</sup> – различия с исходным уровнем тестостерона в соответствующей группе статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между значением AUC<sub>1–5(ч)</sub> в группе с обработкой препаратами и таковым в соответствующем контроле статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 5$ .  $M \pm SEM$ .

Далее исследовали влияние ТР03 и ХГЧ на экспрессию гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ, а также на экспрессию генов *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b* и *Hsd17b*, кодирующих холестерин-транспортующий StAR-белок, и стероидогенные ферменты – цитохромы P450<sub>сcc</sub> и P450-17 $\alpha$  и гидростероиддегидрогеназы-3 $\beta$  и -17 $\beta$  соответственно. Было выявлено не только различие между эффектами ТР03 и ХГЧ на экспрессию исследуемых генов, но и влияние на них способа доставки препарата. Так, ТР03 при в/б введении повышал экспрессию гена

*Lhr*, а при п/к и пероральном введении практически не влиял на нее. В то же время ХГЧ при обоих исследованных способах доставки значимо снижал экспрессию гена рецептора ЛГ (табл. 3). Все препараты, хотя и в различной степени, повышали экспрессию гена *Star*, но различия с контролем были статистически значимы только для обоих способов введения ХГЧ и в/б введения ТР03 (табл. 3). При в/б введении ТР03 повышал экспрессию гена *Cyp17a*, а при п/к – экспрессию гена *Hsd17b*. При пероральном способе введения, несмотря на выра-



**Рис. 1.** Уровни тестостерона в крови (а) и значения AUC<sub>1–5(д)</sub> (б) при внутривнутрибрюшинном, подкожном и пероральном введении ТР03 и подкожном и внутривнутрибрюшинном введении ХГЧ в течение пяти дней самцам крыс Wistar.

Обозначения: 1 – контроль-1, ДМСО, в/б; 2 – ТР03, 20 мг/кг, в/б; 3 – ТР03, 20 мг/кг, п/к; 4 – ТР03, 40 мг/кг, перорально; 5 – контроль-2, физиологический раствор, п/к; 6 – ХГЧ, 20 МЕ/крысу, п/к; 7 – ХГЧ, 20 МЕ/крысу, в/б.

На рисунке 1б: <sup>a</sup> – различия между группами с обработкой препаратами и соответствующими контролями статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между в/б и п/к введением статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – различия между в/б и пероральным введением статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 5$ .  $M \pm SEM$ .

**Таблица 3.** Экспрессия генов рецептора ЛГ и стероидогенных белков в семенниках самцов крыс после их обработки с помощью ТР03 и ХГЧ в течение пяти дней

	<i>Lhr</i>	<i>Star</i>	<i>Cyp11a</i>	<i>Hsd3b</i>	<i>Cyp17a</i>	<i>Hsd17b</i>
К1, ДМСО, в/б	1.00 ± 0.12	1.03 ± 0.05	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.09	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06
ТР03, в/б	2.45 ± 0.39 <sup>a</sup>	3.38 ± 0.36 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.11	0.92 ± 0.07	2.20 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.11
ТР03, п/к	0.95 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.69 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.20	0.98 ± 0.08	1.12 ± 0.16 <sup>b</sup>	2.16 ± 0.38 <sup>a</sup>
ТР03, пер	1.36 ± 0.23	1.58 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.10	0.90 ± 0.06	1.25 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.06 <sup>b</sup>
К2, физ.р-р, п/к	1.05 ± 0.11	1.02 ± 0.09	1.14 ± 0.11	1.11 ± 0.11	0.95 ± 0.04	1.11 ± 0.12
ХГЧ, п/к	0.43 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.82 ± 0.34 <sup>a</sup>	6.22 ± 0.77 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.19	6.42 ± 0.59 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.14 <sup>a</sup>
ХГЧ, в/б	0.30 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.20 <sup>ab</sup>	1.54 ± 0.14	1.84 ± 0.30 <sup>ab</sup>	4.67 ± 0.51 <sup>ab</sup>

*Примечание.* Образцы ткани взяты через 3 ч после последнего введения препаратов. <sup>a</sup> – различия между группами с обработкой препаратами и соответствующими контролями статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между в/б введением ТР03 и п/к или пероральным введением ТР03, а также между п/к и в/б введением ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ .  $n = 5$ .  $M \pm SEM$ .

женный стероидогенный эффект, ТР03 не оказывал заметного влияния на экспрессию генов, кодирующих стероидогенные ферменты (табл. 3). При п/к введении ХГЧ в среднем в 6 раз повышал экспрессию генов обоих цитохромов, в то время как при в/б введении гонадотропин в значительной степени повышал экспрессию гена *Hsd17b* и в меньшей степени экспрессию генов *Cyp11a* и *Cyp17a* (табл. 3).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные указывают на то, что низкомолекулярный аллостерический агонист ТР03 в наибольшей степени повышает уровень тестостерона при его в/б введении самцам крыс, как при однократном введении, так и в течение 5 дней. П/к и пероральный способы введения в этом отношении были менее эффективными, причем снижался не только максимальный и суммарный (AUC) стероидогенный эффект ТР03, но и отмечалась отставание, в сравнении с в/б введением, в динамике развития этого эффекта. Причиной этого, как мы полагаем, является то, что гидрофобный по природе тиено[2,3-*d*]-пиримидин сравнительно медленно поступает в кровь при п/к и пероральном введении и в меньших количествах достигает основных мишеней своего действия – тестикулярных клеток Лейдига, в которых осуществляются все стадии синтеза тестостерона. Следует отметить, что, несмотря на сниженную эффективность стероидогенного эффекта ТР03, пероральный способ введения имеет большие перспективы, поскольку позволяет избежать инъекционных способов введения препарата, что расширяет сферу его применения в фармакологии. Устойчивость в желудочно-кишечном тракте и способность вса-

сываться в кровь при пероральном введении являются значимыми преимуществами тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных перед гонадотропинами, которые могут вводиться только инъекционным путем.

Как известно, ХГЧ широко применяют для лечения гипогонадотропного гипогонадизма у мужчин [5] и индукции созревания ооцитов и обеспечения поддержания лютеиновой фазы в ходе *in vitro* фертилизации у женщин [20], причем вводят его либо п/к, либо внутримышечно [15]. При осуществлении контролируемой индукции овуляции в последние годы также апробируют внутриматочное введение ХГЧ [21]. Несмотря на то что изначально традиционным путем введения ХГЧ считали внутримышечные инъекции, п/к способ в настоящее время считают предпочтительным, поскольку он обеспечивает желаемый клинический эффект с меньшими неудобствами для пациента и не уступает внутримышечному по эффективности [15]. В/б введение ХГЧ в медицине не используют, но этот способ нашел применение при изучении физиологических эффектов гонадотропина в экспериментах на животных, в том числе при исследовании его стероидогенного эффекта [16–18], а также наиболее широко применяется для введения низкомолекулярных агонистов рецепторов гонадотропинов [8, 10, 11].

Нами показано, что при п/к введении ХГЧ его стимулирующий эффект на уровень тестостерона существенно превосходит таковой при в/б введении, о чем свидетельствуют более высокие значения AUC<sub>1–5(ч)</sub> и AUC<sub>1–5(д)</sub> и более выраженный максимальный стероидогенный эффект гонадотропина. При этом в случае п/к введения значимый подъем уровня тестостерона отмечается уже через

1 ч после введения гонадотропина, составляя 57% от такового через 3 ч после п/к введения. В то же время как при в/б введении подъем уровня тестостерона через 1 ч составляет всего 29% от такового через 3 ч, что указывает на более медленное поступление препарата к клеткам Лейдига (табл. 2).

Выявленные нами различия в динамике и эффективности стероидогенного эффекта ТР03 и ХГЧ при различных способах введения ассоциированы и с различиями их влияния на экспрессию стероидогенных ферментов и рецептора ЛГ. Необходимо отметить, что такой сравнительный анализ был проведен впервые как для низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ, так и для ХГЧ. Поскольку исследование проводили на 5-й день эксперимента, после длительной активации рецептора ЛГ и всей системы тестикулярного стероидогенеза, то различия в экспрессии, как мы полагаем, могут быть обусловлены не столько эффективностью действия самих агонистов рецептора ЛГ, сколько функционированием всей системы обратных связей, контролирующей экспрессию белков, вовлеченных в стероидогенез. В результате были выявлены следующие факты.

Несмотря на то что в конце эксперимента уровни тестостерона в крови крыс при их обработке ТР03 и ХГЧ были сопоставимыми, экспрессия гена, кодирующего рецептор ЛГ, в семенниках животных менялась разнонаправленно. В случае ТР03 при всех способах введения она не снижалась, а при в/б введении даже повышалась, в то время как в случае п/к и в/б инъекций ХГЧ экспрессия гена *Lhr* отчетливо снижалась. Эти данные указывают на то, что одной из причин ослабления стероидогенного эффекта при длительном введении ХГЧ, независимо от способа доставки препарата, является снижение количества рецепторов ЛГ, и это можно рассматривать как результат запуска системы отрицательных обратных связей, индуцированной как высокими концентрациями гонадотропина, так и повышенным уровнем тестостерона [22]. ТР03 не оказывает подобного эффекта, что во многом объясняет стабильность его стероидогенного эффекта во времени. Ранее нами было показано, что сохранение или даже усиление экспрессии ЛГ является характерной чертой для различных тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных при их длительном в/б введении самцам крыс, и в норме, и при патологии [19, 23, 24].

Транспортный белок StAR катализирует скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза — перенос холестерина в митохондрии, где осуществляются начальные стадии синтеза стероидных гормонов [25]. При этом ТР03 при в/б введении и ХГЧ при обоих изученных способах введения в значительной степени стимулировали экспрессию гена этого белка (табл. 3), что характерно для активато-

ров стероидогенеза. В случае п/к и перорального введения ТР03 стимулирующие эффекты этого агониста на экспрессию гена *Star* были выражены значительно слабее, и это было ассоциировано с менее выраженными стимулирующим эффектом ТР03 на продукцию тестостерона (рис. 1, табл. 3).

Цитохромы P450<sub>sc</sub> и P450-17 $\alpha$  катализируют превращение холестерина в прегненолон (P450<sub>sc</sub>) и превращение прогестерона сначала в 17-оксипрогестерон, а затем в андростендион (P450-17 $\alpha$ ) [26]. Экспрессия генов, кодирующих эти цитохромы, в значительной степени повышалась при пятидневном п/к введении ХГЧ, в то время как в/б введение ХГЧ влияло на нее в существенно меньшей степени. Довольно неожиданным является различие в соотношении экспрессии гена *Cyp17a* цитохрома P450-17 $\alpha$  и гена *Hsd17b* дегидрогеназы 17 $\beta$ , катализирующей заключительную стадию стероидогенеза — превращение андростендиона в тестостерон, при различных способах введения ХГЧ. Так, при п/к введении экспрессия *Cyp17a* повышалась в шесть раз, а экспрессия *Hsd17b*, напротив, имела тенденцию к снижению (соотношение значений RQ для *Cyp17a/Hsd17b* составило 9.58), в то время как при в/б введении на фоне слабо выраженного повышения экспрессии *Cyp17a* отмечали значительное повышение экспрессии *Hsd17b* (соотношение *Cyp17a/Hsd17b* составило 0.39). Такое варьирование экспрессии, вероятно, обусловлено различиями в динамике синтеза и накопления различных прекурсоров тестостерона в ходе длительной стимуляции стероидогенеза.

В отличие от ХГЧ, ТР03 при всех вариантах введения сравнительно слабо влиял на экспрессию генов стероидогенных ферментов, и лишь в сравнительно небольшой степени повышал экспрессию гена *Cyp17a* цитохрома P450-17 $\alpha$  в случае в/б введения и гена дегидрогеназы 17 $\beta$  в случае п/к введения. Эти данные указывают на то, что ТР03, обеспечивая сравнимый с ХГЧ стероидогенный эффект, не вызывает гиперактивации экспрессии генов всех ключевых стероидогенных ферментов, которая сохраняется на уровне, близком к таковому в контроле. Это свидетельствует о том, что повышение продукции тестостерона, вызываемое низкомолекулярным агонистом, обеспечивается путем поддержания высокого уровня активности стероидогенных ферментов и не требует повышения их экспрессии.

Нами показано, что в случае ХГЧ п/к способ введения более предпочтителен в сравнении с в/б введением, на что указывает более выраженный стероидогенный эффект п/к введенного гонадотропина. Выявленные различия, как мы полагаем, обусловлены различной биодоступностью ХГЧ при п/к и в/б введении и различиями в паттерне генной экспрессии цитохрома P450-17 $\alpha$  и дегидрогеназы

17β, катализирующих заключительные стадии тестостероидогенеза. В случае гидрофобного по природе тиено[2,3-*d*]-пиримидинового производного ТР03, действующего на аллостерический сайт рецептора ЛГ, в/б введение оказалось намного более эффективным, чем п/к и пероральное введение. Это указывает на то, что интерес, с точки зрения фармакологии, в случае ТР03 могут представлять в/б введение, а также пероральное, как наиболее удобный и естественный способ доставки лекарственных препаратов. Показано также, что, в отличие от гонадотропина, обработка животных с помощью ТР03 приводит к устойчивому во времени (при пятидневном введении) стероидогенному эффекту, умеренно влияя на экспрессию генов стероидогенеза и не снижая экспрессию рецептора ЛГ в семенниках, что может свидетельствовать в пользу сохранения чувствительности семенников к эндогенным гонадотропинам.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122). Физико-химическая характеристика ТП03 проведена с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования”, для получения масс-спектров высокого разрешения использовано оборудование ресурсного центра СПбГУ “Методы анализа состава вещества”.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.О.Ш., А.А.Б., К.В.Д., А.М.С.), сбор данных (А.А.Б., А.М.С., В.Н.С., К.В.Д.), обработка данных (А.А.Б., А.М.С., К.В.Д., А.О.Ш.), написание и редактирование манускрипта (А.О.Ш., А.М.С., А.А.Б., К.В.Д.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ricetti L, De Pascali F, Gilioli L, Poti F, Giva LB, Marino M, Tagliavini S, Trenti T, Fanelli F, Mezzullo M, Pagotto U, Simoni M, Casarini L* (2017) Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 15: 2. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
- Kaprara A, Huhtaniemi IT* (2018) The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* 86: 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>
- Fink J, Schoenfeld BJ, Hackney AC, Maekawa T, Horie S* (2021) Human chorionic gonadotropin treatment: a viable option for management of secondary hypogonadism and male infertility. *Expert Rev Endocrinol Metab* 16: 1–8. <https://doi.org/10.1080/17446651.2021.1863783>
- Rastrelli G, Vignozzi L, Maggi M* (2016) Different Medications for Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocr Dev* 30: 60–78. <https://doi.org/10.1159/000439332>
- Swee DS, Quinton R* (2019) Managing congenital hypogonadotropic hypogonadism: a contemporary approach directed at optimizing fertility and long-term outcomes in males. *Ther Adv Endocrinol Metab* 10: 2042018819826889. <https://doi.org/10.1177/2042018819826889>
- Fournier T* (2016) Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Ann Endocrinol (Paris)* 77: 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.012>
- Hershko Klement A, Shulman A* (2017) hCG Triggering in ART: An Evolutionary Concept. *Int J Mol Sci* 18: 1075. <https://doi.org/10.3390/ijms18051075>
- van Koppen CJ, Zaman GJ, Timmers CM, Kelder J, Mosselman S, van de Lagemaat R, Smit MJ, Hanssen RG* (2008) A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 378: 503–514. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
- Nataraja SG, Yu HN, Palmer SS* (2015) Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 142. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
- Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS, Shpakov AO* (2014) Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl Biol Sci* 459: 326–329. <https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
- Derkach KV, Dar'in DV, Bakhtyukov AA, Lobanov PS, Shpakov AO* (2016) In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane and Cell Biology* 10: 294–300. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
- Derkach KV, Legkodukh AS, Dar'in DV, Shpakov AO* (2017) The stimulating effect of thienopyrimidines structurally similar to Org 43553 on adenylate cyclase activity in the testes and on testosterone production in male rats. *Cell Tissue Biol* 11: 73–80. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17010035>
- Shpakov AO, Dar'in DV, Derkach KV, Lobanov PS* (2014) The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylate cyclase systems in the rat testes. *Dokl Biochem Biophys* 456: 104–107. <https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>



14. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Shpakov AO* (2020) Differential stimulation of testicular steroidogenesis by orthosteric and allosteric agonists of luteinizing hormone receptor. *J Evol Biochem Physiol* 56: 439–450. <https://doi.org/10.1134/S0022093020050075>
15. *Jin J, Zhu L, Chen M, Xu H, Wang H, Feng X, Zhu X, Zhou Q* (2015) The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Prefer Adherence* 9: 923–942. <https://doi.org/10.2147/PPA.S87271>
16. *Sreenivasulu G, Senthikumar B, Sridevi P, Rajakumar A, Rasheeda MK* (2012) Expression and immunolocalization of 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase during testicular cycle and after hCG induction, in vivo in the catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen Comp Endocrinol* 175: 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.09.002>
17. *Movsas TZ, Weiner RL, Greenberg MB, Holtzman DM, Galindo R* (2017) Pretreatment with Human Chorionic Gonadotropin Protects the Neonatal Brain against the Effects of Hypoxic-Ischemic Injury. *Front Pediatr* 5: 232. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00232>
18. *Nikmahzar E, Jahanshahi M, Elyasi L, Saeidi M, Babakordi F, Bahlakeh G* (2019) Human chorionic gonadotropin attenuates amyloid- $\beta$  plaques induced by streptozotocin in the rat brain by affecting cytochrome c-ir neuron density. *Iran J Basic Med Sci* 22: 166–172. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.31412.7569>
19. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Gureev MA, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Romanova IV, Morina IYu, Stepanchikina AM, Shpakov AO* (2020) Comparative study of the steroidogenic effect of human chorionic gonadotropin and thieno[2,3-*d*]pyrimidine-based allosteric agonist of luteinizing hormone receptor in young adult, aging and diabetic male rats. *Int J Mol Sci* 21: 7493. <https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
20. *Lawrenz B, Coughlan C, Fatemi HM* (2019) Individualized luteal phase support. *Curr Opin Obstet Gynecol* 31: 177–182. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000530>
21. *Gao M, Jiang X, Li B, Li L, Duan M, Zhang X, Tian J, Qi K* (2019) Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer can improve in vitro fertilization-embryo transfer outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 112: 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.02.027>
22. *Althumairy D, Zhang X, Baez N, Barisas G, Roess DA, Bousfield GR, Crans DC* (2020) Glycoprotein G-protein Coupled Receptors in Disease: Luteinizing Hormone Receptors and Follicle Stimulating Hormone Receptors. *Diseases* 8: 35. <https://doi.org/10.3390/diseases8030035>
23. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Romanova IV, Sorokoumov VN, Sokolova TV, Govdi AI, Morina IYu, Perminova AA, Shpakov AO* (2021) Effect of low-molecular-weight allosteric agonists of the luteinizing hormone receptor on its expression and distribution in rat testes. *J Evol Biochem Physiol* 57: 208–220. <https://doi.org/10.1134/S0022093021020034>
24. *Derkach KV, Romanova IV, Bakhtyukov AA, Morina IYu, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Shpakov AO* (2021) Effect of a low-molecular-weight allosteric agonist of the luteinizing hormone receptor on the functional state of the testes in aging and diabetic rats. *Bull Exp Biol Med* 171: 81–86. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05177-5>
25. *Miller WL* (2007) Steroidogenic acute regulatory protein (STAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771:663–676. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2007.02.012>
26. *Zirkin BR, Papadopoulos V* (2018) Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod* 99: 101–111. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y059>

**A COMPARATIVE STUDY OF THE STEROIDOGENIC EFFECT  
OF 5-AMINO-*N*-*tert*-BUTYL-2-(METHYLTHIO)-  
4-(3-(NICOTINAMIDO)PHENYL)THIENO[2,3-*d*]-PYRIMIDINE-  
6-CARBOXAMIDE AND CHORIONIC GONADOTROPIN  
WITH DIFFERENT METHODS OF ADMINISTRATION TO MALE RATS**

**A. M. Stepanchikina<sup>a,b</sup>, A. A. Bakhtyukov<sup>a</sup>, K. V. Derkach<sup>a</sup>,  
V. N. Sorokoumov<sup>a,b</sup>, and A. O. Shpakov<sup>a,#</sup>**

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup> *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: alex\_shpakov@list.ru*

To correct androgen deficiency, it is necessary to develop a new luteinizing hormone receptor (LHR) agonists and evaluate their steroidogenic effect with different duration and routes of administration in comparison with human chorionic gonadotropin (hCG), the “gold” standard of steroidogenesis activators. The aim of the work was to study the effect of the allosteric LHR agonist 5-amino-*N*-*tert*-butyl-2-(methylsulfanyl)-4-(3-(nicotinamido)phenyl)thieno[2,3-*d*]-pyrimidine-6-carboxamide (TP03) after a single-dose and five-day intraperitoneal, subcutaneous and oral administration to male rats versus intraperitoneally or subcutaneously administered hCG. Testosterone levels and gene expression of LHR and steroidogenic enzymes were investigated. The doses of TP03 and hCG were preliminarily determined and subsequently used, causing 65–75% of the maximum steroidogenic effect. The TP03 (20 mg/kg) stimulated testosterone production more effectively with one- or five-day intraperitoneal administration than with subcutaneous and oral administration. Five-day intraperitoneal

(but not subcutaneous) administration of TP03 increased the intra-testicular expression of the genes for LHR and the cholesterol-transporting protein StAR, which catalyzes the rate-limiting stage of steroidogenesis. The subcutaneous administration of hCG (20 IU/rat) was more effective than intraperitoneal administration, and significantly increased the expression of the  $17\beta$  dehydrogenase gene, which catalyzes the synthesis of androstenedione. Both methods of hCG administration reduced the expression of the LHR gene. In contrast to hCG, after five days of administration, the steroidogenic effect of TP03 persisted. It was concluded that the steroidogenic effect of TP03 is most pronounced with intraperitoneal administration, and in the case of hCG, with subcutaneous administration, which is due to differential effects of these drugs on the expression of steroidogenic enzymes.

*Keywords:* testes, steroidogenesis, thienopyrimidine, chorionic gonadotropin, intraperitoneal administration, subcutaneous administration, testosterone