

ОСОБЕННОСТИ СТИМУЛЯЦИИ СТЕРЕОИДОГЕНЕЗА В СЕМЕННИКАХ ОРТОСТЕРИЧЕСКИМИ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКИМИ АГОНИСТАМИ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

© 2020 г. А. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач¹, Д. В. Дарьин², В. Н. Сорокоумов², А. О. Шпаков^{1,*}

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

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 28.01.20 г.

После доработки 13.03.20 г.

Принята к публикации 23.03.20 г.

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), связываясь с рецептором ЛГ/ХГЧ, активируют аденилатциклазную систему, регулирующую продукцию тестостерона (Т). Длительное введение ЛГ и ХГЧ вызывает десенситизацию этой системы и ослабляет стероидогенный ответ, вследствие чего ведется поиск новых агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ. Целью работы было изучить в сравнении с ХГЧ стимулирующие эффекты ранее разработанных тиено-[2,3-*d*]пиримидинов ТР03 и ТР04 и нового производного 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(4-аминопиримидин-5-карбоксамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР37) на активность аденилатциклазы (АЦ) в тестикулярных мембранах крыс, на продукцию Т и экспрессию генов рецептора ЛГ/ХГЧ и ключевых стероидогенных белков в семенниках при однократном и трехдневном введении самцам крыс. ХГЧ повышал активность АЦ в тестикулярных мембранах более эффективно, чем тиено-[2,3-*d*]пиримидины, а при однократном введении (50 и 100 МЕ/крысу) превосходил ТР03 и ТР04 (15–50 мг/кг) по стероидогенному эффекту. При трехдневном введении стероидогенный эффект ХГЧ был снижен в сравнении с ТР03 и ТР04. Через три дня обработки гонадотропином в семенниках была значительно повышена экспрессия генов, кодирующих StAR-белок и цитохром P450_{SCC}, но подавлена экспрессия генов *Lhr* и *Syp17a1*, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ и цитохром P450-17 α . ТР03 и ТР04 в небольшой степени повышали экспрессию гена StAR-белка, но слабо влияли на экспрессию других генов. Активное *in vitro* соединение ТР37 после непродолжительной стимуляции продукции Т, в дозе 50 мг/кг подавляло стероидогенную функцию, что, вероятно, обусловлено его деградацией и способностью подавлять экспрессию гена *Syp17a1*. Полученные данные указывают на значимые различия механизмов действия гонадотропинов и тиено-[2,3-*d*]пиримидинов с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на тестикулярный стероидогенез, а также на то, что длительное применение тиено-[2,3-*d*]пиримидинов для стимуляции продукции Т не приводит к ослаблению стероидогенеза и не вызывает резистентности к ЛГ.

Ключевые слова: рецептор лютеинизирующего гормона, низкомолекулярный агонист, стероидогенез, тестостерон, стероидогенный фермент

DOI: 10.31857/S0044452920040026

ВВЕДЕНИЕ

Основными регуляторами репродуктивной системы являются гонадотропины – лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его гомолог – хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), которые через посредство рецептора ЛГ/ХГЧ стимулируют продукцию половых стероидных гормонов в клетках Лейдига семенников и в фолликулярных клетках яичников. Рецептор ЛГ/ХГЧ относится к семейству сопряженных с G-белками рецепторов, семь раз пронизывающих плазматическую мембрану. При связывании с гонадотропинами он переходит в ак-

тивированное состояние, результатом чего является стимуляция различных типов ГТФ-связывающих белков – G_s-белков, опосредующих активацию аденилатциклазы (АЦ), катализирующей образование цАМФ, и G_{q/11}-белков, опосредующих активацию фосфолипазы С β , катализирующей образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина. При активации фосфоинозитидного пути повышается активность форболчувствительных изоформ протеинкиназы С, возрастает уровень внутриклеточного Ca²⁺ и активируются кальций-зависимые пути [1–3]. Длитель-

ная активация рецептора ЛГ/ХГЧ приводит к запуску β -аррестиновых каскадов, вызывающих как стимуляцию каскада митогенактивируемых протеинкиназ, так и интернализацию лиганд-рецепторных комплексов внутрь клетки, где они либо подвергаются деградации в протеасомах, либо после диссоциации транслоцируются в плазматическую мембрану [3, 4].

Низкая специфичность ЛГ и ХГЧ в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов и вызываемая ими гиперактивация рецептора ЛГ/ХГЧ могут стать причинами побочных эффектов и развития резистентности к гонадотропинам [5–7]. Вследствие этого на протяжении последних лет ведется поиск новых, селективных в отношении эффекторных белков агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ с умеренной активностью, не вызывающих резистентности к гонадотропинам. Наибольший интерес среди них представляют низкомолекулярные агонисты – производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина [8, 9]. Первое тиено-[2,3-*d*]пиримидиновое производное с активностью агониста рецептора ЛГ/ХГЧ, соединение Org 43553, было разработано в 2002 г. и в дальнейшем показало специфическую активность в условиях *in vitro* и *in vivo* [10–12]. В отличие от гонадотропинов, которые связываются с высокоаффинным ортостерическим сайтом, расположенным во внеклеточном домене рецептора ЛГ/ХГЧ, тиено-[2,3-*d*]пиримидины проникают в его трансмембранный канал и связываются с расположенным там аллостерическим сайтом. Вследствие этого гонадотропины относят к ортостерическим агонистам, в то время как производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина – к аллостерическим агонистам.

Нами ранее была синтезирована серия различающихся по структуре производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина, наделенных активностью аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ [13–16]. Одно из них, 5-амино-*N*-*m*рет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (соединение ТР03), при инкубации с плазматическими мембранами, выделенными из семенников крыс, повышало в них активность АЦ, ответственной за стимуляцию тестикулярного стероидогенеза, при инкубации с клетками Лейдига усиливало продукцию тестостерона (Т), а при пероральном и внутривентральном введении самцам крыс повышало у них уровень Т в крови и меняло экспрессию стероидогенных генов в семенниках, в том числе в условиях сахарного диабета [14–17]. Стимулирующее влияние ТР03 на активность АЦ и стероидогенез было выражено слабее в сравнении с таковым ХГЧ, но при этом являлось более специфичным в отношении аденилатциклазной системы и относительно слабо влияло на экспрессию рецептора ЛГ/ХГЧ в семенниках, обеспечивая сохранение чувствительности к эндогенным гонадотропинам. При введении ТР03 и ХГЧ самцам крыс были выявлены различия в их

влиянии на экспрессию стероидогенных генов [17]. Однако вопрос о том, являются ли различия в исследуемых эффектах характерными для всех производных тиено-[2,3-*d*]пиримидинов или выявляются только в случае ТР03, а также о том, как продолжительность воздействия влияет на эти эффекты, остается открытым. Не исследовано также то, как соотносится величина стимулирующего эффекта тиено-[2,3-*d*]пиримидинов на активность АЦ в условиях *in vitro* и на продукцию Т *in vivo* с их влиянием на интратестикулярную экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ и стероидогенные белки.

Цель работы состояла в сравнительном изучении стимулирующего влияния ХГЧ и производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина на активность АЦ в тестикулярных мембранах, на продукцию Т и экспрессию генов рецептора ЛГ/ХГЧ и ключевых стероидогенных белков в семенниках самцов крыс при однократном и трехдневном их введении. Наряду с соединениями ТР03 и структурно близким ему 5-амино-*N*-(*m*рет-бутил)-4-(3-(1-метил-1*H*-пиразол-4-карбоксамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамидом (ТР04), было изучено впервые синтезированное нами соединение 5-амино-*N*-(*m*рет-бутил)-4-(3-(4-аминопиримидин-5-карбоксамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР37).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для экспериментов использовали трехмесячных самцов крыс линии 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.), правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

В экспериментах использовали креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика, цАМФ, АТФ производства фирмы “Sigma” (США), ХГЧ производства Московского эндокринологического завода (Россия), [α -³²P]АТФ (150 ГБк/ммоль) производства “Изотоп” (Россия). Синтез тиено-[2,3-*d*]пиримидинов – соединений ТР03, ТР04 и ТР37, осуществляли путем ацилирования 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-*m*рет-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамидом, что обеспечивало включение в целевую молекулу варьруемого функционального заместителя. Реакцию проводили в *N,N*-диметилформамиде с добавками НАТУ и *N,N*-диизопропилэтиламина. Структуру синтезированных производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина подтверждали с помощью протонной ЯМР-спектроскопии (спектрометр Bruker Avance III 400, “Bruker”, Германия) и масс-спек-

трометрии (electrospray ionization – time of flight, ESI-TOF, спектрометр micrOTOF, “Bruker”, Германия). Все используемые в ходе синтеза реагенты были получены из фирмы “Sigma» (США).

В экспериментах *in vivo* производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вводили самцам крыс внутривентриально, однократно, в дозах 15, 25 и 50 мг/кг или в течение трех дней в суточных дозах 25 и 50 мг/кг. В каждой экспериментальной группе было по шесть животных. ХГЧ вводили подкожно в дозах 50 и 100 МЕ/крысу однократно или в течение трех дней. Инъекции проводили в 11.00. Контрольным животным вместо препаратов вводили ДМСО в те же сроки и в том же объеме. Согласно ранее полученным данным, введение ДМСО не влияет на стероидогенез у самцов крыс [14]. При однократном введении уровень Т оценивали до (10.00) и через 1, 3 и 5 ч (12.00, 14.00, 16.00) после введения препаратов, при введении в течение трех дней – до начала обработки и ежедневно через 3 ч после введения препаратов. Кровь для определения Т получали из хвостовой вены, используя местный наркоз с помощью анестезии 2%-ным лидокаином (2–4 мг/кг). Уровень Т определяли в нмоль/л с помощью наборов “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия), используя спектрофотометр Anthos Absorbance Reader 2020 (“Anthos Labtec Instruments”, Австрия).

Активность АЦ в плазматических мембранах, выделяемых из семенников интактных крыс, определяли как описано ранее [13]. Образцы тканей семенников промывали 40 мМ Tris-HCl-буфером (рН 7.4), содержащим 5 мМ MgCl₂, 10% сахарозу и ингибиторы протеаз (4°C), измельчали, гомогенизировали в 10 объемах того же буфера, гомогенат центрифугировали (1500 g, 10 мин), полученный супернатант отделяли и повторно центрифугировали (20000 g, 30 мин), осажденные мембраны ресуспендировали в буфере без сахарозы и использовали для определения активности АЦ. Для этого образцы мембран (50–100 мкг белка) инкубировали (37°C, 12 мин) в смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 37 КБк [α -³²P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы. Активность АЦ оценивали по количеству цАМФ, генерируемого в ходе ферментативной реакции, и выражали в пмоль цАМФ/мин/мг белка. Тиено-[2,3-*d*]пиримидины растворяли в ДМСО, в контрольные пробы добавляли растворитель без исследуемых соединений, рассматривая активность фермента в них как базальную.

Для изучения содержания мРНК в семенниках крыс использовали ПЦР в реальном времени как описано ранее [18], для чего с помощью реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) из тестикулярной ткани выделяли тотальную РНК. Обратную транс-

крипцию осуществляли с помощью набора MMLV RT Kit (“Евроген”, Россия). Количественную оценку экспрессии генов проводили с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Использовали следующие праймеры: *Lhr* (рецептор ЛГ/ХГЧ) – CTGCGCTGTCCTGGCC (For) и CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA (Rev); *Star* (StAR-белок) – AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC (For) и CACCTGGCACCACCTTACTT (Rev); *Cyp11a1* (цитохром P450_{sc}) – TATTCCGCTTTGCSTTTGAG (For) и CACGATCTCCTCCAACATCC (Rev); *Cyp17a1* (цитохром P450-17 α) – CATCCCCACAAGGCTAAC (For) и TGTGTCSTTGGGGACAGTAAA (Rev). В качестве референсных генов использовали гены β -актина (*Actb*) – CTGGCACCACACCTTCTACA (For) и AGGTCTCAAACATGATCTGGGT (Rev), и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) – GTGTTCTACCCCAATGTATCC (For) и GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT (Rev). Результаты анализировали с помощью порогового 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 контролю.

Статистический анализ экспериментальных данных 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, для сравнения трех групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости $p < 0.05$. Данные представляли как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Базальная активность АЦ в тестикулярных мембранах составила 24.3 ± 1.1 пмоль цАМФ/мин/мг белка. ХГЧ (10^{-8} М) и исследуемые производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина (10^{-4} М) достоверно ее повышали, причем стимулирующий АЦ эффект TP03 превосходил таковые TP04 и TP37, и все эффекты тиено-[2,3-*d*]пиримидинов в значительной степени уступали стимулирующему АЦ эффекту ХГЧ (рис. 1). Эти результаты указывают на способность исследуемых тиено-[2,3-*d*]пиримидинов, подобно гонадотропину, стимулировать активность аденилатциклазной сигнальной системы в семенниках, ответственной за регуляцию стероидогенеза в клетках Лейдига.

Через 1–5 ч после однократного введения самцам крыс соединений TP03 и TP04 в дозах 15–50 мг/кг уровень Т в крови достоверно повышался (табл. 1). Стероидогенные эффекты TP03 и TP04 были дозозависимыми, причем в дозах 25 и 50 мг/кг они достигали максимума через 3 ч, а затем начинали снижаться. Эффект TP03 был более выражен в

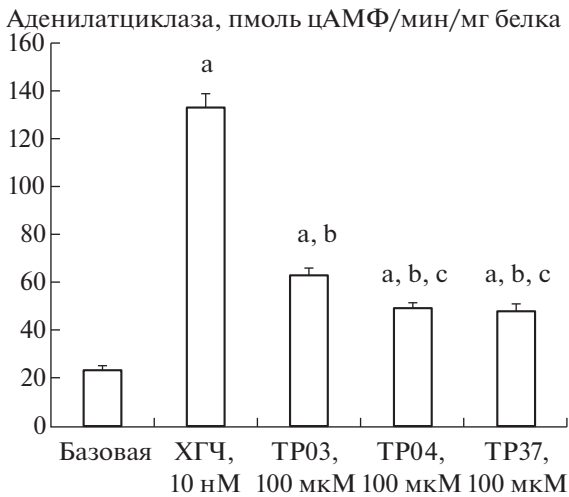


Рис. 1. Стимулирующий эффект ХГЧ и производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина на базальную активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс. ХГЧ взят в концентрации 10^{-8} М, ТР03, ТР04 и ТР37 – в концентрации 10^{-4} М. ^a – различия по сравнению с базальной активностью АЦ статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия по сравнению с ХГЧ-стимулированной активностью статистически значимы при $p < 0.05$; ^c – различия между активностью АЦ, стимулированной ТР03, и активностью фермента, стимулированной ТР04 или ТР37, статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

Fig. 1. Stimulatory effect of hCG and thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives on basal AC activity in rat testicular membranes. hCG is taken at a concentration of 10^{-8} M, ТР03, ТР04 and ТР37 at a concentration of 10^{-4} M. ^a – the differences versus basal AC activity are statistically significant at $p < 0.05$; ^b – differences versus hCG-stimulated activity are statistically significant at $p < 0.05$; ^c – differences between ТР03-stimulated AC activity and ТР04- or ТР37-stimulated activity are statistically significant at $p < 0.05$. Values presented as $M \pm SEM$, $n = 6$.

сравнении с таковым ТР04 (табл. 1). Однако статистически значимые различия выявлялись только при использовании низкой дозы тиено-[2,3-*d*]пиримидинов – 15 мг/кг, на что указывает статистически значимое различие между значениями $AUC_{12.00-16.00}$ для этих групп животных ($p < 0.05$). Стероидогенные эффекты ХГЧ были выражены в большей степени, чем таковые ТР03 и ТР04. Так, различия между эффектами ХГЧ и обоих тиено-[2,3-*d*]пиримидинов были статистически значимыми, за исключением групп животных, обработанных 50 МЕ/крысу ХГЧ и 50 мг/кг ТР03, что иллюстрируют значения $AUC_{12.00-16.00}$ (табл. 1). Динамика изменения уровня Т при обработке крыс соединением ТР37 существенно отличалась от таковой для ТР03 и ТР04. После повышения через 1 ч после введения, в дальнейшем концентрация Т снижалась до контрольных значений (табл. 1). Эти данные демонстрируют, что ТР03 и ТР04, подобно

ХГЧ, обладают выраженным стероидогенным эффектом при действии на семенники крыс, в то время как ТР37 в этом отношении не эффективно.

Поскольку при продолжительном введении стероидогенные эффекты гонадотропинов с ЛГ-активностью ослабляются, нами было изучено влияние трехдневного введения тиено-[2,3-*d*]пиримидинов и ХГЧ на уровни Т в крови крыс, а также на экспрессию генов рецептора ЛГ/ХГЧ и стероидогенных белков в семенниках. Стимулирующий эффект ХГЧ на продукцию Т снижался во второй и третий дни его введения (табл. 2). Так, прирост уровня Т во второй и третий дни введения ХГЧ в дозе 100 МЕ/крысу составил 71 и 34% от такового в первый день обработки (табл. 2). В отличие от ХГЧ, динамика изменения стероидогенного эффекта ТР03 и ТР04 была иной – этот эффект возрастал с первого по третий дни обработки. Более того, в третий день стероидогенные эффекты ТР03 и ТР04 были сходными и не зависели от дозы (табл. 2). Если в первый день они уступали таковому ХГЧ, то в третий день, напротив, его превышали. Так, в третий день стимулирующие эффекты ТР03 и ТР04 (50 мг/кг) на продукцию Т были на 213 и 189% выше, чем соответствующие эффекты ХГЧ (100 МЕ/крысу). Значения AUC_{1-3} показывают, что продукция Т в группах крыс, которых в течение 3 дней обрабатывали ТР03 и ТР04, не различается, но превышает таковую в группе крыс с обработкой 50 МЕ/крысу ХГЧ. В случае использования ТР03 (50 мг/кг) отмечали более высокую продукцию Т, чем при использовании ХГЧ (100 МЕ/крысу) (табл. 2). Обработка крыс ТР37 не только не повышала уровень Т, но в третий день после введения препарата в дозе 50 мг/кг даже вызывала его снижение в сравнении с контролем (табл. 2).

Таким образом, при трехдневном введении стероидогенные эффекты ХГЧ снижались, соответствующие эффекты ТР03 и ТР04 усиливались, в то время как ТР37 заметного влияния на уровень Т не оказывал, действуя в высокой дозе, как ингибитор стероидогенеза. Через три дня введения ХГЧ в дозах 50 и 100 МЕ/крысу экспрессия гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ, в семенниках крыс в значительной степени подавлялась (рис. 2). Трехдневная обработка с помощью ТР03 и ТР37 (25 мг/кг) слабо влияла на экспрессию гена *Lhr*, в то время как ТР04 ее снижала, хотя и в меньшей степени в сравнении с гонадотропином. Это указывает на значительное ослабление чувствительности семенников к агонистам рецептора ЛГ/ХГЧ при обработке животных ХГЧ и на ее сохранение (ТР03 и ТР37) или умеренное снижение (ТР04) при их обработке тиено-[2,3-*d*]пиримидинами.

Показано, что ХГЧ, ТР03 и ТР04 достоверно повышают экспрессию гена *Star*, кодирующего белок StAR, катализирующий транспорт холестерина в митохондрии, причем эффект ХГЧ был выражен в

Таблица 1. Уровни тестостерона до и после однократного введения ХГЧ в двух дозах (50 и 100 МЕ/крысу, подкожно) и производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина в трех дозах (15, 25 и 50 мг/кг, внутривенно) самцам крыс
Table 1. Testosterone levels before and after a single injection of hCG at two doses (50 and 100 IU/rat, SC) and thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives at three doses (15, 25 and 50 mg/kg, IP) to male rats

	До введения/Before treatment, 10.00	Через 1 ч/After 1 h, 12.00	Через 3 ч/After 3 h, 14.00	Через 5 ч/After 5 h, 16.00	AUC _{12.00–16.00} , усл. ед./arb. units
Контроль/control	16.2 ± 2.4	16.7 ± 2.5	13.1 ± 2.2	15.4 ± 4.3	58.3 ± 7.8
ХГЧ, 50МЕ/крысу/hCG, 50 IU/rat	14.2 ± 2.2	58.2 ± 7.4 ^a	115.7 ± 12.2 ^a	89.9 ± 9.1 ^a	379.6 ± 31.1 ^b
ХГЧ, 100 МЕ/крысу/hCG, 100 IU/rat	18.9 ± 1.3	71.2 ± 8.3 ^a	153.5 ± 17.9 ^a	110.3 ± 11.6 ^a	488.5 ± 44.1 ^b
ТР03, 15 мг/кг/ТР03, 15 mg/kg	14.1 ± 2.7	36.6 ± 2.5 ^a	65.2 ± 2.6 ^a	63.2 ± 1.1 ^a	230.3 ± 6.4 ^{b,c,d}
ТР03, 25 мг/кг/ТР03, 25 mg/kg	12.7 ± 2.3	35.6 ± 3.4 ^a	87.1 ± 4.2 ^a	65.9 ± 1.2 ^a	275.7 ± 7.0 ^{b,c,d}
ТР03, 50 мг/кг/ТР03, 50 mg/kg	11.0 ± 1.4	38.9 ± 2.7 ^a	106.2 ± 6.3 ^a	77.0 ± 5.5 ^a	328.4 ± 11.6 ^{b,d}
ТР04, 15 мг/кг/ТР04, 15 mg/kg	15.1 ± 2.8	18.3 ± 2.4	40.3 ± 2.2 ^a	46.5 ± 6.2 ^a	145.4 ± 7.2 ^{b,c,d}
ТР04, 25 мг/кг/ТР04, 25 mg/kg	17.0 ± 4.1	35.0 ± 5.8	75.6 ± 5.5 ^a	60.4 ± 7.0 ^a	246.5 ± 16.1 ^{b,c,d}
ТР04, 50 мг/кг/ТР04, 50 mg/kg	14.1 ± 3.1	34.1 ± 7.4	84.0 ± 9.3 ^a	63.6 ± 8.1 ^a	265.6 ± 25.2 ^{b,c,d}
ТР37, 15 мг/кг/ТР37, 15 mg/kg	17.7 ± 4.3	35.2 ± 2.9 ^a	14.5 ± 1.9	12.3 ± 1.6	76.6 ± 6.2 ^{c,d}
ТР37, 25 мг/кг/ТР37, 25 mg/kg	20.2 ± 1.6	39.9 ± 3.5 ^a	17.6 ± 3.5	16.2 ± 4.1	91.2 ± 13.8 ^{c,d}
ТР37, 50 мг/кг/ТР37, 50 mg/kg	14.7 ± 2.6	32.0 ± 3.9 ^a	14.9 ± 1.7	11.2 ± 1.8	73.1 ± 6.1 ^{c,d}

Примечание. Все препараты вводили в 11.00. ^a – различия по сравнению с начальным базовым уровнем Т статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия значений AUC_{12.00–16.00} по сравнению с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; ^{c,d} – различия значений AUC_{12.00–16.00} по сравнению с группами, обработанными ХГЧ в дозах 50 и 100 МЕ/крысу, соответственно, статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

Note. All drugs were injected at 11.00. ^a – differences versus the baseline T are statistically significant at $p < 0.05$; ^b – differences in AUC_{12.00–16.00} values versus control are statistically significant at $p < 0.05$; ^{c,d} – differences in AUC_{12.00–16.00} values versus the groups treated with hCG at doses of 50 and 100 IU/rat, respectively, are statistically significant at $p < 0.05$. Values presented as $M \pm SEM$, $n = 6$.

Таблица 2. Динамика изменения уровней тестостерона при трехдневном введении ХГЧ в суточных дозах 50 и 100 МЕ/крысу (подкожно) и тиено-[2,3-*d*]пиримидиновых производных в суточных дозах 25 и 50 мг/кг (внутрибрюшинно) самцам крыс.

Table 2. Dynamics of testosterone levels during a 3-day administration of hCG at daily doses of 50 and 100 IU/rat (SC) and thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives at daily doses of 25 and 50 mg/kg (IP) to male rats.

	0-й день/day 0	1-й день/day 1	2-й день/day 2	3-й день/day 3	AUC _{1–3} , усл. ед./arb. units
Контроль/Control	13.7 ± 2.6	12.8 ± 2.6	12.0 ± 2.8	14.4 ± 4.4	25.6 ± 4.7
ХГЧ, 50 МЕ/крысу/hCG, 50 IU/rat	8.9 ± 1.9	108.9 ± 18.6 ^a	87.3 ± 14.6 ^a	68.4 ± 13.3 ^a	176.0 ± 7.1 ^b
ХГЧ, 100 МЕ/крысу/hCG, 100 IU/rat	16.7 ± 4.2	150.2 ± 25.8 ^a	109.4 ± 22.0 ^a	60.6 ± 10.0 ^a	214.8 ± 11.2 ^b
ТР03, 25 мг/кг/ТР03, 25 mg/kg	13.9 ± 2.9	89.9 ± 14.7 ^a	146.3 ± 26.0 ^a	158.0 ± 27.2 ^a	270.2 ± 20.5 ^{b,c}
ТР03, 50 мг/кг/ТР03, 50 mg/kg	11.2 ± 2.3	102.4 ± 19.4 ^a	145.3 ± 24.7 ^a	159.3 ± 24.9 ^a	276.1 ± 10.6 ^{b,c,d}
ТР04, 25 мг/кг/ТР04, 25 mg/kg	15.2 ± 3.0	67.3 ± 10.9 ^a	129.6 ± 21.4 ^a	152.6 ± 28.6 ^a	239.5 ± 17.1 ^{b,c}
ТР04, 50 мг/кг/ТР04, 50 mg/kg	11.5 ± 2.0	77.6 ± 14.6 ^a	140.3 ± 25.7 ^a	148.1 ± 25.5 ^a	253.1 ± 18.5 ^{b,c}
ТР37, 25 мг/кг/ТР37, 25 mg/kg	16.5 ± 2.6	20.8 ± 3.8	18.2 ± 4.2	12.8 ± 3.2	35.0 ± 2.6 ^{c,d}
ТР37, 50 мг/кг/ТР37, 50 mg/kg	14.1 ± 3.3	16.3 ± 3.3	16.5 ± 3.1	5.9 ± 0.5 ^a	27.6 ± 2.8 ^{c,d}

Примечание. Препараты вводили в 11.00, уровни Т оценивали через 3 ч (в 14.00). ^a – различия по сравнению с уровнем Т до начала обработки (0-й день) статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия по сравнению с AUC_{1–3} в контрольной группе статистически значимы при $p < 0.05$; ^{c,d} – различия значений AUC_{12.00–16.00} по сравнению с группами, обработанными ХГЧ в дозах 50 и 100 МЕ/крысу, соответственно, статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

Note. All drugs were injected at 11.00; T levels were evaluated after 3 h (at 14.00). ^a – differences versus the T level before treatment (day 0) are statistically significant at $p < 0.05$; ^b – differences versus AUC_{1–3} values in the control group are statistically significant at $p < 0.05$; ^{c,d} – differences in AUC_{12.00–16.00} values versus groups treated with hCG at doses of 50 and 100 IU/rat, respectively, are statistically significant at $p < 0.05$. Values presented as $M \pm SEM$, $n = 6$.

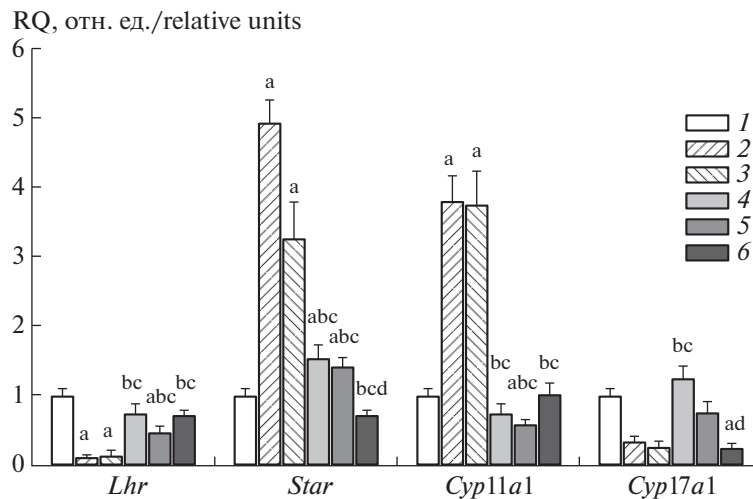


Рис. 2. Влияние трехдневного введения ХГЧ и производных тиено-[2,3-*d*]пиримидина самцам крыс на экспрессию в семенниках генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ и стероидогенные белки.

Fig. 2. Effect of a 3-day administration of hCG and thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives to male rats on testicular expression genes encoding LH/hCG receptor and steroidogenic proteins.

1 – контроль; 2 – ХГЧ, 50 МЕ/крысу; 3 – ХГЧ, 100 МЕ/крысу; 4 – TP03, 25 мг/кг; 5 – TP04, 25 мг/кг; 6 – TP37, 25 мг/кг. ^a – различия по сравнению с контрольной группой статистически значимы при $p < 0.05$; ^{b, c} – различия по сравнению с группами, обработанными ХГЧ в дозах 50 или 100 МЕ/крысу, соответственно, статистически значимы при $p < 0.05$; ^d – различия между группами, обработанными TP03 и TP37, статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

1 – control; 2 – hCG, 50 IU/rat; 3 – hCG, 100 IU/rat; 4 – TP03, 25 mg/kg; 5 – TP04, 25 mg/kg; 6 – TP37, 25 mg/kg. ^a – differences versus the control group are statistically significant at $p < 0.05$; ^{b, c} – differences versus the groups treated with hCG at doses of 50 or 100 IU/rat, respectively, are statistically significant at $p < 0.05$; ^d – differences between the groups treated with TP03 and TP37 are statistically significant at $p < 0.05$. Values presented as $M \pm SEM$, $n = 6$.

существенно большей степени. Соединение TP37 не влияло на экспрессию *Star*, что согласуется с отсутствием у него стероидогенного эффекта (рис. 2). Гонадотропин в обеих исследуемых дозах стимулировал экспрессию гена *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450_{sc}, катализирующий синтез прегненолона из холестерина, и ингибировал экспрессию гена *Cyp17a1*, кодирующего цитохром P450-17 α , катализирующий синтез 17-гидроксипрогестерона и андростендиона из прогестерона (рис. 2). В отличие от ХГЧ, TP03 и TP04 существенно не влияли на экспрессию генов цитохромов. Соединение TP37, как и ХГЧ, снижало экспрессию гена *Cyp17a1* (рис. 2). Таким образом, несмотря на более выраженный в сравнении с ХГЧ стероидогенный эффект, TP03 и TP04 умеренно стимулировали (*Star*) или слабо влияли (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*) на экспрессию стероидогенных генов, в то время как ХГЧ отчетливо ее стимулировал (*Star*, *Cyp11a1*) или, напротив, ингибировал (*Cyp17a1*), что указывает на различия в механизмах действия гонадотропинов и тиено-[2,3-*d*]пиримидинов на систему стероидогенеза. При этом имеются различия между влиянием на экспрессию стероидогенных генов между различающимися по структуре тиено-[2,3-*d*]пиримидинами, как это показано на примере TP37.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активация гонадотропинами аденилатциклазной системы в клетках Лейдига является основным механизмом запуска тестикулярного стероидогенеза. Полученные нами данные укладываются в эту парадигму, хотя и с определенными ограничениями. Так, ХГЧ и все исследуемые тиено-[2,3-*d*]пиримидины при действии на тестикулярные мембраны, в которых локализованы начальные звенья аденилатциклазной системы – рецептор ЛГ/ХГЧ, гетеротримерный G_s-белок и фермент АЦ, стимулировали базальную активность АЦ, каталитического компонента этой системы. Нами показано, что стимулирующий АЦ эффект ХГЧ в насыщающей концентрации 10⁻⁸ М в среднем в 3–4 раза превосходил соответствующие эффекты TP03 и TP04, взятых в концентрации 10⁻⁴ М, обеспечивающей, как показано нами ранее, максимальную стимуляцию АЦ [14]. Это согласуется с тем, что стероидогенный эффект ХГЧ при его однократном введении самцам крыс был выше, чем таковой тиено-[2,3-*d*]пиримидинов TP03 и TP04, хотя различия в условиях *in vivo* были менее значимыми. Это обусловлено тем, что система обратных отрицательных связей, которая запускается на уровне клеток Лейдига и гонадной оси в условиях *in vivo* и модулирует стимулирующие эффекты аго-

нистов рецептора ЛГ/ХГЧ на стероидогенез, не функционирует в тестикулярных мембранах [2, 3, 19]. Другими словами, в тестикулярных мембранах наблюдается “чистый” эффект агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на стимулирующую стероидогенез аденлатциклазную систему.

Соединение TR37, которое по АЦ эффекту было сопоставимым с TR03 и TR04, при введении самцам крыс повышало продукцию Т через 1 ч, после чего его стероидогенный эффект затухал (табл. 1). Это указывает на то, что в условиях *in vivo* может происходить быстрая деградация молекулы TR37. В отличие от TR03 и TR04, TR37 имеет свободную, высоко реакционноспособную аминогруппу в четвертом положении пиримидинового кольца в варьруемой части тиено-[2,3-*d*]пиримидина. Эта группа является подходящей мишенью для микросомальных аминоксидаз, тем более что имеются данные о высокой реакционной способности аминогруппы в 4-аминопиримидинах, которая легко подвергается окислению и другим модификациям [20]. Следует отметить, что 4-аминопиримидин является частью тиаминдифосфата, кофактора для ряда ферментов, включая пируватдекарбоксилазу. В ходе ферментативных реакций 4-аминопиримидина подвергается не только таутомеризации, но и необратимым структурным изменениям [21]. Мы полагаем, что в результате деградации TR37 генерируются производные, наделенные активностью антагонистов или инверсионных агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ. В пользу этого свидетельствует то, что при трехдневном введении крысам соединения TR37 (50 мг/кг) уровень Т у них снижался ниже контрольных значений (табл. 2). Необходимо отметить, что изменение паттерна активности низкомолекулярных регуляторов G-белок-сопряженных рецепторов вследствие биодеградации этих регуляторов является распространенным явлением. Так, например, в процессе моногидроксилирования соединения VU0403602 с активностью положительного аллостерического модулятора метаболитного глутаматного рецептора 5-го типа, вызываемого цитохромом P₄₅₀, генерируются его производные с активностью агонистов, что приводит к судорогам и другим побочным эффектам при введении VU0403602 крысам [22].

Изучение динамики стероидогенного эффекта ХГЧ показало, что при его однократном введении после достижения максимума через 3 ч этот эффект снижается через 5 ч, а при трехдневном введении ослабевает во второй день и, в еще большей степени, в третий день обработки (табл. 1, 2). Стероидогенные эффекты TR03 и TR04, используемых в дозах 25 и 50 мг/кг, имели сходную с ХГЧ динамику в течение первых 5 ч после их однократного введения крысам, с максимумом через 3 ч. В то же время динамика стероидогенных эффектов гонадотропина и тиено-[2,3-*d*]пиримидинов при трехдневном введении существенно различалась. Эффекты

TR03 и TR04 во второй и третий дни были выше, чем в первый день, и начинали превышать таковой ХГЧ (табл. 2). Причинами ослабления стероидогенного эффекта ХГЧ могут быть показанные нами снижение, в среднем в 7 раз, экспрессии гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ, что должно ослаблять ответ семенников на гонадотропины, и снижение экспрессии гена *Cyp17a1*, кодирующего цитохром P450-17 α , что должно приводить к ослаблению заключительных стадий стероидогенеза, поскольку цитохром P450-17 α катализирует сразу две ферментативные реакции – превращение прогестерона в 17 α -гидроксипрогестерон и конверсию 17 α -гидроксипрогестерона в андростендион, предшественник Т.

Еще на рубеже 1970–1980-х годов было установлено, что длительное воздействие ЛГ и ХГЧ на клетки Лейдига в условиях *in vitro* и *in vivo* снижает количество функционально активных рецепторов ЛГ/ХГЧ и ослабляет ответ АЦ на стимуляцию гонадотропинами [23–25]. Через три дня после инъекции самцам крыс 75 МЕ ХГЧ содержание рецепторов ЛГ/ХГЧ в семенниках животных снижалось до 5–10% от контрольного уровня [23]. В дальнейшем было установлено, что важную роль в снижении чувствительности клеток Лейдига к гонадотропинам и в ослаблении стероидогенного ответа играют изменения распределения рецепторов ЛГ/ХГЧ во внутриклеточных компартментах [26, 27]. В клинических исследованиях было показано, что длительное введение гонадотропинов вызывает образование вторичных антител, что приводит к аутоиммунному ингибированию рецепторов ЛГ/ХГЧ в семенниках и снижению стероидогенного ответа, а также способно нарушать функционирование щитовидной железы, блокируя рецепторы тиреотропного гормона, структурно близкие рецепторам ЛГ/ХГЧ [28, 29].

Снижение экспрессии и активности цитохрома P450-17 α приводит к острому дефициту андрогенов, что обусловлено, как отмечалось выше, его ключевой ролью в тестикулярном стероидогенезе. В настоящее время ингибиторы цитохрома P450-17 α , наделенные антиандрогенной активностью, используются для лечения рака предстательной железы и других андроген-зависимых опухолей [30, 31]. В основе вызываемого острым иммобилизационным стрессом дефицита Т лежит ингибирование активности цитохрома P450-17 α в семенниках, сопровождаемое накоплением в них прогестерона и значительным снижением интратестикулярного уровня 17 α -гидроксипрогестерона и Т [32]. В экспериментах по многократному введению ХГЧ пациентам и экспериментальным животным было продемонстрировано ингибирующее воздействие такой обработки на активность цитохрома P450-17 α , в том числе при повторной инъекции высокой дозы ХГЧ [33, 34]. В то же время однократное введение ХГЧ через 2 ч приводило к повышению активности ци-

тохрома P450-17 α в семенниках крыс, но в дальнейшем вызывало снижение активности этого фермента [33]. В пользу подавления стимулирующего эффекта гонадотропинов на активность и экспрессию цитохрома P450-17 α через 6 ч после обработки свидетельствуют и результаты изучения стероидогенного эффекта ХГЧ в яичниках крысы [35, 36].

Нами выявлено снижение экспрессии гена *Cyp17a1* не только при введении крысам ХГЧ в течение трех дней, но и при введении им TR37. Однако если в первом случае отмечали ослабление экспрессии стероидогенных генов, но уровень Т в крови оставался повышенным, то при использовании TR37 уровень Т не превышал контрольных значений. При этом экспрессия гена *Cyp17a1* в группах, обработанных TR03 и TR04, не отличалась от таковой в контроле, что указывает на отсутствие негативного влияния на нее длительной обработки животных этими соединениями (рис. 2).

В семенниках крыс с трехдневным введением ХГЧ, наряду со снижением экспрессии *Cyp17a1*, многократно повышалась экспрессия генов, кодирующих белок StAR и цитохром P450_{sc}, ответственные за начальные стадии стероидогенеза. Важно отметить, что повышение экспрессии белка StAR, как правило, положительно коррелирует со способностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ повышать продукцию Т [2]. Однако соединения TR03 и TR04, которые в третий день в сравнении с ХГЧ имели более выраженный стероидогенный эффект, лишь в небольшой степени повышали экспрессию *Star* и не влияли на экспрессию цитохромов. Поскольку TR03 и TR04, в отличие от ХГЧ, не подавляют экспрессию цитохрома P450-17 α , катализирующего заключительные стадии стероидогенеза, то, как можно полагать, умеренная стимуляция экспрессии белка StAR оказывается достаточной для обеспечения высокой интенсивности синтеза Т при действии на семенники этих тиено-[2,3-*d*]пиримидинов. Наиболее вероятной причиной этого является более высокая избирательность действия тиено-[2,3-*d*]пиримидинов по отношению к аденилатциклазной сигнальной системе и их слабое влияние на фосфоинозитидный и β -аррестинный пути, как это было ранее показано нами для TR03 и другими авторами для структурно близкого ему соединения Org43553 [11, 15]. Стимуляция экспрессии белка StAR и цитохрома P450_{sc} осуществляется в основном вследствие cross-talk между цАМФ-зависимыми и фосфоинозитидными путями и каскадом митогенактивируемых протеинкиназ [37, 38]. Поскольку тиено-[2,3-*d*]пиримидины слабо влияют на фосфолипазу С β , фторбол-чувствительные изоформы протеинкиназы С и ERK1/2-киназы, то регуляторные эффекты TR03 и TR04 на экспрессию стероидогенных генов реализуются преимущественно через цАМФ-зависи-

мые механизмы и не приводят к гиперстимуляции экспрессии *Star* и *Cyp11a1*, как это происходит при действии ХГЧ. Известно, что активация гонадотропинами фосфоинозитидного пути и ERK1/2-киназа подавляет экспрессию и активность цитохрома P450-17 α и приводит к накоплению прогестерона в стероидогенных клетках [39]. В нашем случае при длительном воздействии ХГЧ также отмечаются снижение экспрессии гена *Cyp17a1* и ослабление ХГЧ-стимулированной продукции Т.

Таким образом, нами впервые показано, что при однократном введении ХГЧ превосходит по стероидогенному эффекту тиено-[2,3-*d*]пиримидины TR03 и TR04 с активностью аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, в то время как при трехдневном введении эффект ХГЧ, напротив, уступает таковому TR03 и TR04. Это обусловлено различиями в паттерне регуляции экспрессии генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ и стероидогенные белки, в семенниках крыс при их длительной обработке ХГЧ и тиено-[2,3-*d*]пиримидинами. Ослабление стероидогенного эффекта ХГЧ обусловлено ингибированием экспрессии генов рецептора ЛГ/ХГЧ и ключевого фермента стероидогенеза цитохрома P450-17 α , в то время как TR03 и TR04 на эти показатели заметного влияния не оказывают. Тиено-[2,3-*d*]пиримидиновое производное TR37, сопоставимое по способности активировать АЦ с соединениями TR03 и TR04, в условиях *in vivo* не только быстро теряло способность стимулировать тестикулярный стероидогенез, но при трехдневном введении в дозе 50 мг/кг снижало продукцию Т. Это может быть обусловлено деградацией TR37, приводящей к генерации соединений с антагонистической активностью по отношению к рецептору ЛГ/ХГЧ, способных подавлять экспрессию цитохрома P450-17 α . Полученные данные свидетельствуют о возможности длительного применения тиено-[2,3-*d*]пиримидиновых производных для стимуляции стероидогенеза, без ослабления стероидогенной функции и развития резистентности семенников к гонадотропинам. При этом, однако, нужно учитывать возможность деградации активных *in vitro* тиено-[2,3-*d*]пиримидинов, что может привести не только к их инактивации, но и к генерации соединений, ингибиторов тестикулярного стероидогенеза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122). ЯМР исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования”, масс-спектры высокого разрешения получены на оборудовании ресурсного центра СПбГУ “Методы анализа состава вещества”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ulloa-Aguirre A., Crepieux P., Poupon A., Maurel M.C., Reiter E.* Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism. *Rev. Endocr. Metab. Disorders.* 12 (4): 259–274. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9176-2>
2. *Riccetti L., De Pascali F., Gilioli L., Poti F., Giva L.B., Marino M., Tagliavini S., Trenti T., Fanelli F., Mezzullo M., Pagotto U., Simoni M., Casarini L.* 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 (1): 2. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
3. *Riccetti L., Yvinec R., Klett D., Gallay N., Combarnous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M.A.* Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin display biased agonism at the LH and LH/CG receptors. *Sci. Rep.* 7 (1): 940. 2017.
4. *Casarini L., Reiter E., Simoni M.* β -Arrestins regulate gonadotropin receptor-mediated cell proliferation and apoptosis by controlling different FSHR or LHCG intracellular signaling in the hGL5 cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 437: 11–21. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.005>
5. *Cailleux-Bounacer A., Reznik Y., Cauliez B., Menard J.F., Duparc C., Kuhn J.M.* Evaluation of endocrine testing of Leydig cell function using extractive and recombinant human chorionic gonadotropin and different doses of recombinant human LH in normal men. *Eur. J. Endocrinol.* 159: 171–178. 2008.
6. *Veldhuis J.D., Liu P.Y., Takahashi P.Y., Keenan D.M.* Dynamic testosterone responses to near-physiological LH pulses are determined by the time pattern of prior intravenous LH infusion. *Am. J. Physiol.* 303 (6): E720–E728. 2012. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00200.2012>
7. *Шпаков А.О.* Гонадотропины – от теории к клинической практике. Санкт-Петербург: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2018. 347 с. ISBN 978-5-7422-6330-2. [*Shpakov A.O.* Gonadotropiny – ot teorii k klinicheskoy praktike. Sankt-Peterburg: POLITEKH-PRESS. 2018. 347 p. ISBN 978-5-7422-6330-2. (In Russ)].
8. *Lane J.R., Ijzerman A.P.* Allosteric approaches to GPCR drug discovery. *Drug Discov. Today Technol.* 10 (2): e219–e221. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2013.01.006>
9. *Шпаков А.О.* Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов. *Цитология.* 57(3): 167–176. 2015. [*Shpakov A.O.* New achievements in the development and study of the mechanisms of action of the low molecular weight agonists of receptors of the thyroid-stimulating and the luteinizing hormones. *Tsitologiya.* 57(3): 167–176. 2015. (In Russ)].
10. *van Straten N.C., Schoonus-Gerritsma G.G., van Someren R.G., Draaijer J., Adang A.E., Timmers C.M., Hanssen R.G., van Boeckel C.A.* The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: Thienopyrimidines with therapeutic potential for ovulation induction. *ChemBioChem.* 3 (10): 1023–1026. 2002.
11. *van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G.* A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 378(5): 503–514. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
12. *van de Lagemaat R., Raafs B.C., van Koppen C., Timmers C.M., Mulders S.M., Hanssen R.G.* Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH. *Endocrinology.* 152 (11): 4350–4357. 2011. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>
13. *Шпаков А.О., Дарьин Д.В., Деркач К.В., Лобанов П.С.* Стимулирующее влияние тиенопиримидиновых производных на аденилатциклазную сигнальную систему в семенниках крыс. Докл. Акад. Наук. 456 (4): 494–498. 2014. [*Shpakov A.O., Dar'in D.V., Derkach K.V., Lobanov P.S.* The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylyl cyclase systems in the rat testes. *Dokl. Biochem. Biophys.* 456: 104–107. 2014. <https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>].
14. *Деркач К.В., Дарьин Д.В., Бахтюков А.А., Лобанов П.С., Шпаков А.О.* Изучение функциональной активности новых низкомолекулярных агонистов рецептора лютеинизирующего гормона *in vitro* и *in vivo*. Биол. мембр. 33 (4): 263–271. 2016. <https://doi.org/10.7868/S0233475516040046> [*Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O.* *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: Memb. Cell Biol.* 10 (4): 294–300. 2016. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>].
15. *Деркач К.В., Бахтюков А.А., Шпаков А.А., Дарьин Д.В., Шпаков А.О.* Особенности регуляции гетеротримерных G-белков хорионическим гонадотропином и низкомолекулярным агонистом рецептора лютеинизирующего гормона. *Цитология.* 59(7): 474–481. 2017. [*Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Shpakov A.A., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Specificity of heterotrimeric G protein regulation by human chorionic gonadotropin and low-molecular agonist of luteinizing hormone receptor. *Cell Tissue Biol.* 11 (6): 475–482. 2017. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17060037>].
16. *Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Степачкина А.М., Шпаков А.О.* Низкомолекулярный агонист рецептора лютеинизирующего гормона эффективно стимулирует аденилатциклазу в тестикулярных мембранах и стероидогенез в семенниках крыс

- с диабетом 1-го типа. Биол. Мембр. 36 (5): 322–331. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S0233475519050037> [Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Ste-pochkina A.M., Shpakov A.O. A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenylyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. Biochemistry (Moscow). Suppl. Series A: Membr. Cell Biol. 13 (4): 301–309. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>]
17. Бахтукоев А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шпаков А.О. Стероидогенный эффект низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона при его введении самцам крыс. Докл. Акад. Наук. 484 (6): 103–106. 2019. [Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O. Conservation of steroidogenic effect of the low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its long-term administration to male rats. Dokl. Biochem. Biophys. 484 (1): 78–81. 2019. <https://doi.org/10.1134/S1607672919010216>]
 18. Бахтукоев А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шарова Т.С., Шпаков А.О. Ослабление базальной и стимулированной агонистами рецептора лютеинизирующего гормона продукции тестостерона у стареющих самцов крыс. Успехи геронтологии. 31 (5): 654–661. 2018. [Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Sharova T.S., Shpakov A.O. Decrease in the basal and luteinizing hormone receptor agonist-stimulated testosterone production in aging male rats. Adv. Gerontol. 9 (2): 179–185. 2019. doi: 10.1134/S2079057019020036].
 19. Veldhuis J.D., Dufau M.L. Steroidal regulation of biologically active luteinizing hormone secretion in men and women. Hum. Reprod. 8 (2): 84–96. 1993.
 20. Raczynska E.D., Kolczyńska K., Stepniowski T.M. Consequences of one-electron oxidation and one-electron reduction for 4-aminopyrimidine–DFT studies. J. Mol. Model. 18 (8): 3523–3533. 2012.
<https://doi.org/10.1007/s00894-012-1358-7>
 21. Balakrishnan A., Gao Y., Moorjani P., Nemeria N.S., Titmann K., Jordan F. Bifunctionality of the thiamin diphosphate cofactor: assignment of tautomeric/ionization states of the 4'-aminopyrimidine ring when various intermediates occupy the active sites during the catalysis of yeast pyruvate decarboxylase. J. Am. Chem. Soc. 134 (8): 3873–3885. 2012.
<https://doi.org/10.1021/ja211139c>
 22. Bridges T.M., Rook J.M., Noetzel M.J., Morrison R.D., Zhou Y., Gogliotti R.D., Vinson P.N., Jones C.K., Niswender C.M., Lindsley C.W., et al. Biotransformation of a Novel Positive Allosteric Modulator of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5 Contributes to Seizures in Rats Involving a Receptor Agonism-Dependent Mechanism. Drug Metab. Dispos. 41 (9): 1703–1714. 2013.
 23. Purvis K., Torjesen P.A., Haug E., Hansson V. hCG suppression of LH receptors and responsiveness of testicular tissue to hCG. Mol. Cell. Endocrinol. 8(1): 73–80. 1977.
 24. Jahnsen T., Purvis K., Torjesen P.A., Hansson V. Temporal relationship between hCG induced desensitization of LH/hCG responsive adenylyl cyclase and downregulation of LH/hCG receptors in the rat testis. Arch. Androl. 6 (2): 155–162. 1981.
 25. Veijola M., Kellokumpu S., Rajaniemi H. The effect of varying doses of hCG on the in vivo uptake by rat testis and serum testosterone response. Horm. Res. 19 (3): 191–199. 1984.
 26. Diaz E.S., Pellizzari E., Casanova M., Cigorraga S.B., Denduchis B. Type IV collagen induces down-regulation of steroidogenic response to gonadotropins in adult rat Leydig cells involving mitogen-activated protein kinase. Mol. Reprod. Dev. 72 (2): 208–215. 2005.
 27. Wolf-Ringwall A.L., Winter P.W., Roess D.A., George Barisas B. Luteinizing hormone receptors are confined in mesoscale plasma membrane microdomains throughout recovery from receptor desensitization. Cell. Biochem. Biophys. 68 (3): 561–569. 2014.
<https://doi.org/10.1007/s12013-013-9738-x>
 28. Thau R.B., Goldstein M., Yamamoto Y., Burrow G.N., Phillips D., Bardin C.W. Failure of gonadotropin therapy secondary to chorionic gonadotropin-induced antibodies. J. Clin. Endocrinol. Metab. 66 (4): 862–867. 1988.
 29. Ogura T., Mimura Y., Otsuka F., Kishida M., Yokota K., Suzuki J., Nagai A., Hirakawa S., Makino H., Tobe K. Hypothyroidism associated with anti-human chorionic gonadotropin antibodies secondarily produced by gonadotropin therapy in a case of idiopathic hypothalamic hypogonadism. J. Endocrinol. Invest. 26 (11): 1128–1135. 2003.
 30. Vasaitis T.S., Bruno R.D., Njar V.C. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 125 (1–2): 23–31. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2010.11.005>
 31. Ye L., Chen X., Li X., Zhu Q., Yu L., Guo J., Chen B., Akingbemi B.T., Ge R.S., Li H. Effects of methoxychlor and its metabolite 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane on human and rat 17 α -hydroxylase/17,20-lyase activity. Toxicol. Lett. 225 (3): 407–412. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.011>
 32. Orr T.E., Taylor M.F., Bhattacharyya A.K., Collins D.C., Mann D.R. Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 alpha-hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors. J. Androl. 15 (4): 302–308. 1994.
 33. Chasalow F., Marr H., Haour F., Saez J.M. Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization in rats. J. Biol. Chem. 254 (13): 5613–5617. 1979.
 34. Forest M.G., Roulier R. Kinetics of the steroidogenic response of the testis to stimulation by hCG. V. Blockade of 17–20 lyase induced by hCG is an age-dependent phenomenon inducible by pre-treatment with hCG. Ann. Endocrinol. (Paris). 45: 281–290. 1984.
 35. Suzuki K., Tamaoki B. Acute decrease by human chorionic gonadotropin of the activity of preovulatory ovarian 17 alpha-hydroxylase and C-17-C-20 lyase is due to decrease of microsomal cytochrome P-450 through de novo synthesis of ribonucleic acid and protein. Endocrinology. 113 (6): 1985–1991. 1983.
 36. Johnson D.C., Griswold T. Relationship between in vivo and in vitro 17 alpha-hydroxylase and C17,20-lyase activity in ovaries of immature hypophysectomized rats treat-

- ed chronically with human chorionic gonadotropin. *J. Steroid. Biochem.* 24 (2): 637–643. 1986.
37. *Stocco D.M., Wang X., Jo Y., Manna P.R.* Multiple Signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* 19: 2647–2659. 2005.
38. *Manna P.R., Stocco D.M.* The role of specific mitogen-activated protein kinase Signaling cascades in the regulation of steroidogenesis. *J. Signal Transduct.* 2011: 821615. 2011.
<https://doi.org/10.1155/2011/821615>
39. *Manna P.R., Huhtaniemi I.T., Stocco D.M.* Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3, 5 -cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells. *Endocrinology.* 150 (7): 3308–3317. 2009.

FEATURES OF TESTICULAR STEROIDOGENESIS STIMULATION BY ORTHOSTERIC AND ALLOSTERIC AGONISTS OF LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR

A. A. Bakhtyukov^a, K. V. Derkach^a, D. V. Dar'in^b, V. N. Sorokoumov^b, and A. O. Shpakov^{a, #}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b *St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: alex_shpakov@list.ru*

Luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (hCG), due to binding to the LH/hCG receptor, activate the adenylyl cyclase (AC) system which regulates testosterone (T) production. Long-term administration of LH and hCG causes desensitization of this system and attenuates the steroidogenic response, thereby necessitating the search for new agonists of LH/hCG receptor. The aim of the work was to study, as compared to hCG, stimulatory effects of the previously developed thieno[2,3-d]pyrimidines, TP03 and TP04, and new derivative, 5-amino-N-(*tert*-butyl)-4-(3-(4-aminopyrimidine-5-carboxamido)phenyl)-2-(methylthio)thieno[2,3-d]pyrimidine-6-carboxamide (TP37), on AC activity in rat testicular membranes, as well as on T production and gene expression of the LH/hCG receptor and key testicular steroidogenic proteins under conditions of a single and 3-day administration to male rats. hCG increased AC activity in testicular membranes more efficiently compared to thieno[2,3-d]pyrimidines, and after a single injection (50 and 100 IU/rat) was superior to TP03 and TP04 (15–50 mg/kg) in its steroidogenic effect. After a 3-day administration (a single injection a day), the steroidogenic effect of hCG was attenuated compared to that for TP03 and TP04. After 3 days of treatment with gonadotropin, testicular expression of genes encoding the StAR protein and cytochrome P450_{scc} was considerably increased, but expression of the *Lhr* and *Cyp17a1* genes encoding LH/hCG receptor and cytochrome P450-17 α was suppressed. TP03 and TP04 slightly increased StAR gene expression but did not affect expression of other genes. TP37, which was active *in vitro*, after a short stimulation of T production, suppressed the steroidogenic function at a dose of 50 mg/kg, probably due to its degradation and the ability to suppress *Cyp17a1* gene expression. Our data indicate significant differences in the mechanisms underlying the effect of gonadotropins and thieno[2,3-d]pyrimidines with an activity of LH/hCG receptor agonists on testicular steroidogenesis. We also demonstrate that long-term administration of thieno[2,3-d]pyrimidines to stimulate T production does not attenuate steroidogenesis and induces no LH resistance.

Keywords: luteinizing hormone receptor, low molecular weight agonist, steroidogenesis, testosterone, steroidogenic enzyme