
ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИХ СЕЛЕКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ

© 2024 г. Т. А. Щелкунова^{1,*}

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: schelkunova-t@mail.ru

Поступила в редакцию 12.06.2024 г.

После доработки 13.09.2024 г.

Принята к публикации 22.09.2024 г.

Прогестерон играет ключевую роль в процессах репродукции в женском организме, оказывает эффекты в ЦНС и других тканях. Прогестины широко применяются в клинике в контрацепции и гормональной терапии. Классические эффекты прогестерона осуществляются через ядерные рецепторы, являющиеся лиганд-зависимыми транскрипционными факторами. С 2003 г. в центре внимания оказались мембранные рецепторы прогестерона (mPRs) семейства адипонектиновых рецепторов пяти подтипов. Их роль во многих нормальных и патологических процессах в организме остается неясной. Определение механизмов действия прогестерона осложняется тем, что активация разных типов рецепторов может вызывать противоположные эффекты. Поиск селективных лигандов mPRs является актуальной задачей, поскольку применение таких соединений позволяет дифференцировать эффекты прогестинов, опосредуемые разными типами рецепторов. В обзоре анализируется действие трех селективных лигандов mPRs, описанных и изученных в настоящее время. Один из них широко применяется в международных исследованиях, два других выявлены и используются в нашей работе. Рассматриваются достоинства и недостатки этих трех соединений и проведенные с их использованием исследования функций mPRs. В заключение оцениваются перспективы создания новых селективных лигандов mPRs с учетом особенностей структуры их лиганд-связывающего кармана. Мы обнаружили, что 3-кетогруппа прогестерона и его производных, принципиально необходимая для связывания с ядерными рецепторами стероидов, неважна для взаимодействия с mPRs. Наш вывод был подтвержден в исследовании, опубликованном в 2022 г., с использованием методов моделирования и мутационного анализа. Именно эта особенность структуры будет в дальнейшем служить основой для разработки синтеза эффективных и избирательно взаимодействующих с mPRs соединений.

Ключевые слова: прогестины, стероиды, мембранные рецепторы, ядерные рецепторы, селективные лиганды, сигнальные каскады

DOI: 10.31857/S0869813924100026, EDN: VSEZPP

ВВЕДЕНИЕ

Прогестерон – стероидный гормон, необходимый для осуществления репродуктивных функций в женском организме и для регуляции разнообразных процессов в клетках многих органов. Он оказывает свое действие через два типа рецепторов, а также может влиять на активность ряда сенсоров. Классические ядерные рецепторы проге-

стерона (nPR), являющиеся лиганд-зависимыми транскрипционными факторами, к настоящему времени хорошо изучены. Известны две основные формы этих рецепторов – А и В, являющиеся продуктами одного гена [1]. В 2003 г. был идентифицирован новый тип рецепторов прогестерона [2] – мембранные рецепторы прогестерона (mPRs) семейства адипонектиновых и прогестиновых рецепторов, в настоящее время выявлено 5 подтипов этих рецепторов. Эти рецепторы обнаружены в репродуктивных и нерепродуктивных органах, в опухолевых тканях, в иммунных клетках. Оказалось, что действие прогестерона и его аналогов через разные типы рецепторов не только сильно различается, но может быть и противоположным. Действуя через ядерные рецепторы, прогестерон вызывал релаксацию миометрия матки. Действуя через mPRs, этот гормон стимулировал фосфорилирование легких цепей миозина в первичной культуре миометрия, вызывая сократительную активность этой ткани [3]. Предполагается также, что через разные рецепторы прогестины (прогестерон и его синтетические производные) могут оказывать противоположное действие на пролиферацию и гибель клеток, в том числе опухолевых, на процессы канцерогенеза [4, 5]. Поскольку эти гормоны широко используются в медицинской практике для гормональной терапии и контрацепции [6], огромное значение имеет поиск селективных лигандов определенного типа рецепторов. Селективные агонисты и антагонисты nPR установлены. Лиганды для mPRs, сочетающие высокое сродство к ним и полное отсутствие взаимодействия с nPR, пока не выявлены. Антагонисты mPRs также не обнаружены. В то же время на основании уже выявленных функций mPRs можно предполагать, что такие соединения перспективны в качестве иммуномодуляторов, потенциальных лекарств в лечении онкологических заболеваний, ожирения и диабета, болезней сосудов. В обзоре впервые суммированы результаты изучения эффектов и механизмов действия существующих в настоящее время селективных лигандов mPRs, используемых зарубежными и российскими авторами, а также подведены итоги изучения модификаций молекулы прогестерона, на основе которых ожидается прогресс в области получения соединений, избирательно и эффективно действующих через mPRs.

Рецепторы прогестерона

Классическое действие стероидных гормонов осуществляется через взаимодействие с ядерными рецепторами, в результате которого происходит конформационная перестройка, димеризация и связывание этих рецепторов с гормон-чувствительными элементами ДНК и корегуляторами, что приводит к изменению транскрипции генов-мишеней данной группы гормонов. Ядерные рецепторы прогестерона имеют доменную структурно-функциональную организацию. Существует две транскрипционно активных изоформы PR-A и PR-B, различающиеся фрагментом в 164 аминокислотных остатка с N-конца молекулы. Полноразмерная изоформа В состоит из N-концевого домена с двумя активационными функциями AF1 и AF3, центрального ДНК-связывающего домена с цинковыми пальцами, шарнирной области и лиганд-связывающего домена с AF2 около C-конца. Укороченная изоформа А не имеет AF3 и регулирует транскрипцию спектра генов-мишеней, существенно отличающихся от мишеней изоформы В. При появлении лиганда ядерные рецепторы, находящиеся в цитоплазме, связываются с ним, транслоцируются в ядро и осуществляют прямой контроль экспрессии генов [1].

Мембранные рецепторы прогестерона относятся к рецепторам прогестинового и адипонектинового семейства adipoQ (PAQR), в которое входит пять подтипов mPRs у позвоночных животных – mPR α (PAQR7), mPR β (PAQR8), mPR γ (PAQR5), mPR δ (PAQR6) и mPR ϵ (PAQR9), а также три рецептора адипонектина – AdipoR1, AdipoR2, AdipoR3 (PAQRs 1, 2, 3) и два белка, ассоциированных с дифференцировкой моноцитов в макрофаги (MMDs, PAQRs 10, 11) [7,8]. Белки mPRs состоят из 330–377 аминокислотных остатков, имеют множественные трансмембранные домены, являются посредниками в быстрой активации прогестероном неклассических внутриклеточных сигнальных

путей, которые обычно не являются геномными, но могут в конечном итоге приводить к геномным ответам [7]. Эволюционно и структурно mPRs не связаны с рецепторами, сопряженными с G-белками (GPCRs), однако изменение уровня цАМФ, эксперименты с ингибиторами активации G-белков, коиммунопреципитацией и анализом лигирования (*in situ* proximity ligation assays) доказали, что mPRs через G-белки активируют вторичную сигнализацию и клеточные реакции [8]. Обработка прогестероном увеличивала связывание [³⁵S]GTPγS с плазматическими мембранами клеток, экспрессирующими mPRs, что также указывало на активацию G-белков. Обработка нерадиоактивным GTPγS, коклюшным и холерным токсинами приводила к диссоциации G-белков от рецепторов, в результате чего уменьшалось количество мест связывания рецепторов и лигандов. Перечисленные методы обработки уменьшали связывание [3H]-прогестерона с mPRs, что указывает на их тесную связь с G-белками [7]. Идентичность активированных G-белков была определена иммунопреципитацией радиоактивно меченного GTPγS со специфическими антителами к α-субъединицам G-белков ингибирующего (Gi) и стимулирующего (Gs) типов. Подтипы mPRα, mPRβ, mPRγ активируют, как правило, ингибиторные G-белки, а mPRδ и mPRε – стимуляторные G-белки. Одним из исключений является связь mPRα со стимуляторным G (Golf) белком в сперме двух видов костистых рыб. Адипонектиновые рецепторы AdipoR1, AdipoR2, AdipoR3 имеют семь трансмембранных доменов и обратную топологию N- и C- концов на мембране в сравнении с GPCRs. В отношении мембранных рецепторов прогестерона последние данные показывают, что mPRs имеют ту же внутриклеточную ориентацию N-концов, что и другие члены семейства PAQR (AdipoR1, AdipoR2, AdipoR3). А вот C-концы этих белков внутриклеточные, как у GPCRs, поскольку они имеют дополнительный восьмой трансмембранный домен. Схематические структуры всех пяти подвидов mPRs, как они представляются на данный момент, приведены в обзоре 2023 г. [8]. Однако нужны еще экспериментальные доказательства, полученные с помощью крио-ЭМ или рентгеновского анализа кристаллизованных белков mPR, для подтверждения их мембранной топологии. Для mPRα сайт-направленный мутагенез позволяет предполагать, что внутриклеточная C-концевая область этого рецептора участвует в связывании и активации G-белка [7]. Однако есть примеры, демонстрирующие, что не всегда действие прогестина через mPRs опосредовано G-белками. При использовании репортерной системы анализа с рекомбинантной экспрессией mPRs в клетках дрожжей, не содержащих G-белков, было показано, что прогестины активируют сигнализацию mPRs. Это предполагает, что G-белки не требуются для передачи сигнала mPRs в дрожжевой модели [9]. Также в ряде клеток, таких как нейрональные клетки PC12 и клетки рака яичников, активация mPRs не приводила к изменению уровня цАМФ. Но в данном случае сигнал может передаваться βγ-субъединицами G-белков, их участие на этом основании исключить нельзя. Взаимодействие mPRs с прогестинами во многих клетках позвоночных активирует сигнальные пути фосфатидилинозитол-3-киназы (Pi3k)/серин-треонинкиназы (Akt) и митоген-активируемых протеинкиназ (MAPkinase) через сигнализацию βγ-субъединиц G-белков. Множественные сигнальные каскады опосредуют эффекты прогестерона через активацию G-белков, зависящую от mPRs, часто в одних и тех же клетках позвоночных, включая пути аденилатциклазы/цАМФ/PKA, Pi3k/Akt, MAPkinase/ERK1/2/фосфодиэстеразы (PDE) и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Кроме того, были идентифицированы внутриклеточные медиаторы сигнализации mPRs – белки JNK, mTOR, NFκB, Snail и CREB [7].

Обычно mPRs обнаруживаются на плазматической мембране клетки, их также выявляют в эндоплазматическом ретикулуме, поскольку это – место синтеза, сворачивания и хранения мембранных белков. После действия лиганда представленность mPRs на клеточной мембране снижается, поскольку они подвергаются быстрой клатрин-зависимой интернализации (эндоцитозу), за которой следует постепенное восстановление их уровня на поверхности клетки. [7]. Процесс экспорта рецепторов на мембрану жест-

ко регулируется взаимодействием с несколькими регуляторными белками с функциями шаперонов, аксессуарных белков и белков, модифицирующих активность рецептора. Адаптерные белки, один из типов вспомогательных белков, обычно связываются с мембранными рецепторами через фосфотирозинсвязывающий домен и часто регулируют их сигнальные пути. В настоящий момент появились доказательства того, что APPL1, VLDL-рецептор и PGRMC1 действуют как адаптерные и шаперонные белки для mPRs, хотя подробности молекулярных механизмов их действия пока отсутствуют [10–12].

Мембранный компонент рецептора прогестерона 1 (PGRMC1) является членом особого подсемейства белков, содержащих домен цитохрома b5 (Cytb5), и называемого семейством мембранно-ассоциированных прогестероновых рецепторов (MAPR). PGRMC1 имеет много различных функций, включая действие в качестве адаптера и шаперона. Это связывающий гем белок, который участвует в широком спектре функций клеток и тканей, включая активность цитохромов P450, гомеостаз гема, канцерогенез, женскую репродукцию и контроль качества белка [13]. Он взаимодействует с многочисленными белками: P-450, Scap, Insig, EGFR, PAIRBP1, рецептором инсулина, что приводит к их перемещению или стабилизации; участвует в регуляции синтеза и транспорта гема, в транспорте холестерина и синтезе из него прегненолона и прогестерона, выполняет важную роль в регуляции энергетического метаболизма [14]. Методами коиммунопреципитации и анализа лигирования для выявления белок-белковых взаимодействий получены доказательства, что PGRMC1 также действует как адаптер или шаперонный белок для mPR α . Это показано на клетках рака молочной железы MDA-MB-231, на человеческих гранулезных/лютеиновых клетках, в ооцитах данио-рерио [12, 15–17]. Результаты ряда работ показывают, что PGRMC1 образует рецепторный комплекс с mPR α , который необходим для локализации mPR α на клеточной мембране и mPR α -зависимой сигнализации в различных моделях клеток позвоночных. Однако молекулярные механизмы, регулирующие взаимодействия между mPR α и PGRMC1, остаются неясными.

Есть данные о взаимовлиянии разных типов рецепторов прогестерона. Так, активация mPRs усиливает действие PR-B в поддержании миометрия в состоянии покоя на ранних сроках беременности, а в конце беременности способствует функциональной отмене действия прогестерона, позволяя миометрию сокращаться [18].

Изучение эффектов селективного лиганда mPR α

10-этил-19-норпрогестерона (Org OD 02-0)

До 2017 г. из мировой научной литературы были известны два соединения, считающиеся селективными лигандами mPR α . Они были выявлены в 2010 г. в единственной работе, посвященной поиску избирательно взаимодействующих с mPR α стероидов [19]. В этой работе использовался эмпирический подход идентификации таких соединений, заключающийся в зондировании лиганд-связывающего кармана mPR α путем конкурентного связывания различных по структуре синтезированных стероидов с дополнительными заместителями в разных положениях углеродного скелета молекулы. Большинство использованных стероидов имело очень низкое сродство к mPR α . 10-этил-19-норпрогестерон (Org OD 02-0) и 19 α -метилпрогестерон (Org OD 13-0) имели высокое или сходное с прогестероном сродство к mPR α , но оба стероида связывались с nPR в цитозольной фракции MCF-7 линии клеток молочной железы человека с относительной конкурентной активностью (ОКА) 12.9% и 2.3% от активности прогестерона соответственно. Org OD 13-0 практически не использовался в дальнейших работах, его эффекты неизвестны. Org OD 02-0, наоборот, очень активно применяется в научных исследованиях для выявления участия mPRs в действии прогестининов (табл. 1). Сродство этого стероида к nPR может быть достаточным для активации ядерных рецепторов, поэтому в работе, где это соединение исследовалось, была сделана про-

верка, как оно действует на транскрипционную активность ядерного рецептора В, экспрессированного в MCF-7 наряду с репортерной системой анализа активности nPR. В качестве репортерной системы использовалась векторная конструкция с геном люциферазы под MMTV – промотором, являющимся гормончувствительным элементом (ГЧЭ) для nPR. Было показано, что в данной системе Org OD 02-0 не являлся агонистом PR-B, поскольку не стимулировал его транскрипционную активность [19]. Отсюда был сделан вывод, что это соединение можно считать селективным лигандом mPR α . Однако изучение агонистической активности с одним вариантом ГЧЭ и в одном типе клеток не является гарантией, что такая активность не выявится на других объектах. Известно многообразие действия стероидных гормонов при разных концентрациях в клетках с различным фенотипом. К тому же в этих экспериментах проверялась активность одной изоформы nPR-B, транскрипционная активность nPR-A не изучалась в присутствии Org OD 02-0. Изоформа nPR-B является более мощным активатором транскрипции, однако другая изоформа также обладает собственной транскрипционной активностью. В клетках опухоли молочной железы T47D-YA с изоформой nPR-A и T47D-YB с изоформой nPR-B было показано, что только 25 генов, регулируемых прогестероном, были общими для обеих изоформ рецептора, 229 регулировались только nPR-B, а 83 – только nPR-A [20]. Проверялась и антагонистическая активность Org OD 02-0 в вышеупомянутой системе. Показано, что она хоть и недостоверно, но снижает транскрипционную активность nPR-B, индуцированную прогестероном [19]. Поэтому главным недостатком этого соединения является его довольно высокая относительная конкурентная активность (12.9%) по отношению к прогестерону за связывание с nPR. Org OD 02-0 используется в работах в качестве селективного лиганда mPR α , но есть вероятность, что это соединение влияет на транскрипционную активность ядерных рецепторов. И такие факты уже появились в литературе, о чем будет сказано ниже.

Изучение связывающей активности Org OD 02-0 было проведено сначала только с mPR α и nPR человека. Но в дальнейшем было показано, что этот стероид связывается с mPR δ и mPR ϵ [21], а также с mPR других видов животных, оказывает эффекты в тканях, где уровень mPR α низок, а содержание mPR β , наоборот, очень высоко [22]. Поэтому делается предположение, что Org OD 02-0 является лигандом mPRs разных подтипов мембранных рецепторов. Однако в литературе чаще всего традиционно это соединение упоминается как селективный лиганд mPR α .

Стероид Org OD 02-0 использовался для доказательства участия mPR α в многообразных процессах в целом ряде работ. В линии BeWo плацентарных клеток, происходящей из хориокарциномы человека, изучался механизм преждевременных родов, связанный с повышенным уровнем воспалительных цитокинов. Использование специфического агониста Org OD 02-0 позволило получить доказательства того, что активация mPR α ингибирует эффекты цитокина IL-1 β , предиктора преждевременных родов. Изменялась экспрессия генов mPRs и других рецепторов прогестерона в плацентах человека с недоношенными плодами в сравнении с нормой, указывая на важность соотношения различных типов рецепторов в этих процессах [23].

Изучалась стимуляция подвижности сперматозоидов прогестинами у костистых рыб – атлантических горбылей (*Micropogonias undulatus*) и южной камбалы (*Paralichthys lethostigma*). Гиперподвижность инициировалась посредством mPR α и включала активацию пути Pi3k/Akt и повышение уровня активности фосфодиэстеразы. Специфический агонист mPR α 10-этил-19-норпрогестерон (Org OD 02-0) имитировал стимулирующее действие эндогенного прогестина этих видов, 17,20- β , 21-тригидрокси-4-прегнен-3-она (20 β -S) влиял на подвижность сперматозоидов [24]. Также в опосредованной mPR α стимуляции прогестинами 20 β -S и Org OD 02-0 гиперподвижности сперматозоидов активировался через путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR и ErbB2) и MAPK (MEK1/2, Erk1/2) [25]. Обработка сперматозоидов 20 β -S или Org OD 02-0 приводила к повышению уровня цАМФ через mPR α ,

сопряженных в этих клетках со стимулирующими G-белками (Golf), активирующими мембранную аденилатциклазу [26]. Таким образом, повышение фертильности у костистых рыб, связанное с быстрой индукцией прогестином 20β -S гиперподвижности сперматозоидов, опосредуют три сигнальных каскада – мембранной аденилатциклазы/цАМФ, рецептора эпидермального фактора роста EGFR/ Erk и Pi3k/Akt/фосфодиэстеразы, приводящие к повышению содержания кальция в течение 10 с. С использованием специфического агониста mPR α , Org OD 02-0, были получены доказательства того, что действие прогестина опосредуется mPR α в сочетании со стимулирующим G-белком (Golf) [27].

В данном случае nPR как транскрипционные факторы не могут принимать участие в процессе активации сперматозоидов из-за отсутствия в них рибосом, плотной упаковки ДНК и быстрого развития процесса. Поэтому Org OD 02-0 в этих клетках может действовать только через взаимодействие с mPRs.

Прогестерон оказывает благотворное влияние на сердечно-сосудистую систему человека, вызывая быстрое увеличение продукции оксида азота (NO) в эндотелиальных клетках сосудов. Прогестерон и Org OD 02-0 связывались с мембранной фракцией эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) с характеристиками, присутствующими mPRs, тогда как агонисты nPR промегестон (R5020) и медроксипрогестерон ацетат продемонстрировали низкую аффинность связывания. Иммуноцитохимический и вестерн-блот-анализ подтвердили, что mPRs экспрессируются на плазматических мембранах в HUVEC. Под действием прогестерона и Org OD 02-0 повышались уровень NO, активность эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и фосфорилирование eNOS. Агонист nPR R5020 не оказывал такого эффекта. Нокдаун экспрессии mPR, но не nPR, блокировал эти процессы. Использование ингибиторов показало участие киназных путей PI3K/Akt и ERK в действии прогестерона на продукцию NO и фосфорилирование eNOS [28]. Показано расслабляющее действие прогестерона непосредственно на гладкомышечные клетки сосудов посредством активации mPR α . Прогестерон и селективный агонист mPR Org OD-02-0, но не агонист nPR R5020, вызывали быстрое снижение концентраций Ca^{2+} в цитозоле и индукцию мышечной релаксации. Это действие прогестерона включало поглощение Ca^{2+} сарко/эндоплазматическим ретикуломом (SR) и увеличение активности Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA). Обработка культивируемых гладкомышечных клеток пупочной артерии человека прогестероном и Org OD 02-0, но не с R5020, увеличивала фосфорилирование фосфоламбана, что приводило к растормаживанию SERCA. Быстрый эффект прогестерона и Org OD-02-0 на внутриклеточный уровень Ca^{2+} и релаксацию гладкомышечных клеток сосудов посредством активации mPR α осуществлялся через регуляцию функций SERCA2 и фосфоламбана сигнальными путями, включающими Gi, MAP-киназы и Akt/Pi3k и подавление активности RhoA, фосфорилирование ROCK, то есть ингибирование передачи сигналов RhoA/ROCK [29, 30].

В этих работах очень убедительно доказано с применением селективных агонистов и нокдауна гена с помощью siRNA, что прогестерон стимулирует выработку NO в эндотелии HUVECs и оказывает расслабляющее действие на гладкомышечные клетки сосудов посредством взаимодействия именно с mPR α , сопряженного здесь с ингибиторными G-белками, активируя передачу сигналов через каскады Pi3k/Akt и MAPK.

Прогестерон подавляет активацию Т-клеток человека во время беременности. Приток Ca^{2+} является важным сигналом для пролиферации Т-клеток после активации их фитогемагглютинином (ФГА). Было показано, что прогестерон воздействовал на клеточную мембрану Т-клеток, вызывая быстрые реакции, включая повышение внутриклеточной концентрации свободного кальция Ca^{2+} . При этом он подавлял пролиферацию Т-клеток, активируемую ФГА. Интересно, что и ФГА, и прогестерон индуцируют повышение Ca^{2+} , но прогестерон и агонист nPR R5020 дозозависимо подавляли индуцированный ФГА приток Ca^{2+} , это приводило к иммуносупрессии Т-клеток, ингибиро-

ванию их пролиферации, активируемому ФГА. Аналогичный дозозависимый эффект подавления клеточного притока Ca^{2+} и пролиферации происходили при использовании ингибитора канала TRPC и селективного канала TRPC3. Аналог прогестерона Org OD 02-0 также вызывал дозозависимое подавление притока Ca^{2+} , но не влиял на пролиферацию. Делается предположение, что прогестерон и R5020 способны быстро снижать стимулированный ФГА устойчивый приток Ca^{2+} , вероятно, за счет блокады каналов TRPC3, что подавляет пролиферацию Т-клеток [31]. Посредником в действии прогестерона и его аналогов (R5020/Org OD 02-0) на подавление притока Ca^{2+} в покоящиеся Т-клетки является сPKC β II, которая активируется негеномным мембранным путем и вызывает иммуносупрессию [32]. Данные, полученные в этом исследовании, трудно интерпретировать, особенно если учитывать, что в Т-клетках человека никто не выявил mPR, но только mPRs [33, 34]. Авторы работы предполагают, что какую-то роль в действии прогестерона и R5020 играет мембранный компонент рецептора прогестерона PGRMC1. Но функции этого белка столь обширны, а связывать он может самые разные соединения, в том числе стероидные, поэтому механизмы выявленных эффектов в Т-клетках требуют дальнейшего изучения.

Прогестины участвуют в модуляции физиологических процессов в шванновских клетках, основных нейроглиальных клетках периферической нервной системы. Исследовалось возможное участие mPRs в нейропротекторных эффектах прогестинов в иммортализованных шванновских клетках S42. Все пять подтипов mPRs и PGRMC1 были обнаружены в этих клетках на клеточной мембране. Прогестерон и mPR-специфичный агонист Org-OD-02-0 связывались с этими мембранами, что указывает на функциональность обнаруженных mPRs. Org-OD-02-0 быстро увеличивал миграцию клеток в экспериментах *in vitro*, указывая на возможную роль mPRs в процессе регенерации нервов. Действие Org-OD-02-0 было опосредовано активацией ингибирующего G-белка и снижением внутриклеточного уровня цАМФ. Долгосрочная активация mPRs приводила к увеличению уровня экспрессии миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG). В совокупности эти результаты показали, что mPRs присутствуют и активны в шванновских клетках, модулируя их физиологические процессы [35]. В первичной культуре шванновских клеток крысы был обнаружен другой паттерн экспрессии mPRs. Подтипы mPR α (PAQR7) и β (PAQR8) были основными идентифицированными вариантами mPRs, причем различной субклеточной локализации. Активация ядерного рецептора прогестерона его специфическим агонистом R5020 стимулировала экспрессию mPRs, а активация mPRs специфическим агонистом Org OD 02-0 изменяла их субклеточную локализацию, приводила к активации Akt, но не ERK1/2, а также к снижению экспрессии миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG), морфологическим изменениям, изменениям экспрессии нескольких маркеров дифференцировки шванновских клеток и увеличению миграции и пролиферации этих клеток [36]. Таким образом, в первичной культуре шванновских клеток крысы и в иммортализованных шванновских клетках S42 наблюдалось противоположное действие Org OD 02-0 на экспрессию миелин-ассоциированного гликопротеина – MAG, авторы объясняют это разным уровнем экспрессии mPR δ и разными сроками действия в клетках. Высказано предположение, что долгосрочный эффект вызывает падение экспрессии MAG, в то время как краткосрочный эффект приводит к ее увеличению, вызванному главным образом снижением уровня цАМФ [36]. Теми же авторами исследовалась роль mPRs в стволовых клетках (ASC) жировой ткани человека, дифференцированных в клетки, подобные шванновским клеткам (SCL-ASC). В исследовании показано, что mPRs присутствовали как в недифференцированных, так и в дифференцированных ASC. Активация mPR α способствовала миграции и дифференцировке клеток SCL-ASC, увеличению экспрессии и секреции BDNF, нейротрофина с прорегенеративной активностью. Анализ показал участие сигнальных путей Src и Pi3k-Akt при активации mPR α в SCL-ASC клетках. Эти результаты позволили предположить, что mPR α может играть положительную роль в регенерации

периферических нервов [37, 38]. Действительно, активация mPR α с помощью Org OD 02-0 в клетках SCL-ASC повлияла на регенеративные параметры в двух линиях нейрональных клеток – IMR-32 и SH-SY-5Y, усиливая рост нейритов, защищая от гибели и увеличивая экспрессию маркеров регенерации периферических нервов (CREB3, ATF3, GAP43). Инкубационная клеточная среда от необработанных Org OD 02-0 клеток SCL-ASC действовала значительно слабее. Добавление Org OD 02-0 к такой инкубационной среде влияло на гибель нейрональных клеток, но не на рост нейритов. Следовательно, влияние Org OD 02-0 на рост нейритов зависит от клеток SCL-ASC, из которых высвобождается BDNF и IGF-2. А его влияние на выживаемость нейрональных клеток обусловлено прямой активацией mPR на самих нейрональных клетках. Трансфекция SCL-ASC с помощью siRNA mPR α показала, что именно этот рецептор отвечает за благотворное влияние на рост нейритов. Этот же факт подтвердился в экспериментах с совместным культивированием SCL-ASC и SH-SY-5Y клеток [39]. В исследовании 2023 г. тех же авторов изучалась предполагаемая нейропротекторная роль mPR α на нейрональных клетках SH-SY-5Y с использованием двух известных фармакологических клеточных моделей болезни Паркинсона. Применение химических веществ, обычно используемых на клеточных культурах для имитации повреждения при этом заболевании, 6-гидроксидофамина (6-OHDA) и активного MPTP метаболита 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP⁺), вызывало гибель клеток. Прогестерон и специфический агонист mPR Org OD 02-0 были эффективны в снижении гибели клеток SH-SY5Y, вызванной 6-OHDA и MPP⁺, тогда как агонист nPR промгестон (R5020) и агонист рецептора GABA_A мусцимол оказались неэффективными. Эксперименты, проведенные с нокаутом генов и селективными фармакологическими агонистами, показали, что mPR α является рецептором, ответственным за наблюдаемые нейропротекторные эффекты, запускаемые сигнальные пути Pi3k-Akt и ERK в клетках SH-SY5Y. Авторы предполагают, что mPR α может играть нейропротекторную роль при патологии болезни Паркинсона [40]. Во всяком случае *in vitro* его участие убедительно доказано.

Функции прогестерона в миометрии хорошо известны, но негеномные эффекты при сокращениях миометрия беременных изучены слабо. Поэтому было проведено исследование негеномных эффектов прогестерона во время беременности с использованием полосок миометрия, полученных от небеременных, беременных крыс и крыс после родов. Прогестерон не вызывал ритмических сокращений в миометрии небеременных, но индуцировал ритмичные сокращения миометрия беременных с пиком эффекта на 21-й день беременности. Однако сокращения миометрия уменьшались после родов и снижались до уровня небеременных через 7 дней после родов. Кроме того, прогестерон стабильно ингибировал сильные сокращения миометрия, вызванные KCl, во время беременности. Актиномицин D и циклогексимид не влияли на сократительные эффекты прогестерона, а Org OD 02-0 эффективно их имитировал. Было выявлено значительное увеличение экспрессии гена mPR β во время беременности, а уровни экспрессии mPR α , mPR γ , mPR δ и mPR ϵ оставались неизменными. Авторы работы сделали вывод, что стимулирующий негеномный эффект прогестерона во время беременности на сократительную активность миометрия был индуцибельным, зависел от mPR β и мог участвовать в процессе родов. Ингибиторный эффект прогестерона был конститутивным, зависел от других mPRs и мог участвовать в поддержании беременности [41]. Прямых доказательств действия Org OD 02-0 на сократительную активность миометрия беременных через mPR β в данной работе не приводится.

Изучение роли mPR с использованием Org OD 02-0 проводилось в опухолевых тканях. В двух клеточных линиях рака молочной железы SKBR3 и MDA-MB-468, в клетках которых не выявляются nPR, но обнаружены подтипы mPR α , mPR β и mPR γ , исследовали эффекты прогестерона и Org OD 02-0 в сравнении с действием тестостерона, 17 β -эстрадиола, дексаметазона и агониста и антагониста nPR (R5020 и RU486). Только прогестерон и Org OD 02-0 в этих клеточных линиях значительно уменьшали

гибель клеток и апоптоз в ответ на исключение из среды инкубации сыворотки. При этом происходила быстрая активация ингибирующего G-белка, а также активация киназы p42/44 MAP (ERK 1/2). Повышалась активность Akt под действием прогестерона в этих клетках, а снижения активности каспазы 3 не наблюдалось. Таким образом, показано, что прогестерон может действовать через mPR, ингибируя апоптоз в клетках рака молочной железы [42]. Поскольку в изучаемых клетках нет nPR, действие Org OD 02-0 через мембранные рецепторы в данном случае не вызывает сомнения.

Прогестерон способствует прогрессированию глиобластомы, наиболее частой и агрессивной опухоли головного мозга из-за ее высокой способности к миграции и проникновению в нормальную ткань мозга. Прогестерон стимулирует пролиферацию, миграцию и клеточную инвазию за счет активации nPR. Однако использование антагониста nPR RU486 только частично блокировало эффекты прогестерона. Поэтому были проведены исследования влияния активации mPR α на пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиобластомы человека. Клеточные линии глиобластомы человека U87 и U251 были обработаны специфическим агонистом mPR α .

Org OD 02-0 увеличивал количество клеток U87 и U251 за счет усиления их пролиферации, также увеличивал миграцию и инвазию клеток U87 и U251. Распространение и инвазия клеток U87 уменьшались, когда экспрессия mPR α подавлялась. Org OD 02-0 увеличивал фосфорилирование киназ Src и Akt в обеих клеточных линиях. Эти данные показывают, что прогестерон оказывает свое влияние на прогрессирование глиобластомы человека не только за счет взаимодействия с nPR, но также через клеточные сигнальные пути, активируемые mPR α [43]. Однако учитывая возможность действия Org OD 02-0 как агониста nPR, участие mPR α в исследуемых процессах в клетках U251 глиобластомы не может считаться доказанным.

Экспрессия mPR α была выявлена у пациентов с аденокарциномой легких и влияла на эффективность лечения EGFR-тирозинкиназным ингибитором EGFR-TKI. Прогестерон или его производное Org OD 02-0, действуя через mPR α , усиливали функцию EGFR-TKI по подавлению пролиферации, миграции и инвазии клеток аденокарциномы легких *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, активация mPR α запускала каскад, ингибирующий EGFR-Src-ERK1/2 путь, тем самым способствуя противоопухолевому эффекту [44]. Те же авторы показали, что mPR α опосредует способность прогестерона ингибировать рост клеток аденокарциномы легких, приводя следующие доказательства: mPR α экспрессировался в клетках аденокарциномы легких A549 и PC-9 и локализовался на клеточной мембране; прогестерон и Org OD 02-0 ингибировали пролиферацию клеток аденокарциномы легких; с помощью нокдауна экспрессии mPR α показано участие этого рецептора в действии прогестерона и Org OD 02-0 на ингибирование пролиферации клеток аденокарциномы легких; mPR α опосредовал способность прогестерона и Org OD 02-0 ингибировать PKA/CREB и PKA/ β -катенин сигнальные пути; прогестерон и Org OD 02-0 ингибировали рост опухоли аденокарциномы легкого в модели ксенотрансплантатной опухоли у мышей *in vivo* [45]. Вводимые мышам клетки A549 не содержали nPR, но в них искусственно экспрессировали mPR α . Поэтому Org OD 02-0, как, впрочем, и сам прогестерон, мог действовать только через этот рецептор и осуществлял при этом противоопухолевый эффект.

Работ с использованием Org OD 02-0 *in vivo* немного. Одна из них касается изучения действия прогестерона и агониста mPR α в моделях пролактиномы. Предварительно были изучены функции mPRs в гипофизе. Экспрессия mPR α была самой высокой среди mPRs в передней доле гипофиза крыс. Иммуоокрашивание mPR α было обнаружено в соматотрофах, гонадотрофах и лактотрофах. 63% mPR α -положительных клеток в гипофизе были лактотрофами, это позволило предположить, что mPR α участвует в контроле секреции пролактина (ПРЛ). Для проверки гипотезы гипофизы крыс инкубировали либо с прогестероном, либо со специфическим агонистом mPR α Org OD 02-0, измеряя затем секрецию ПРЛ. Как прогестерон, так и Org OD 02-0 снижали се-

крецию ПРЛ. На клеточной линии GH3, полученной из опухоли гипофиза крысы, было показано, что прогестерон и Org OD 02-0 ингибировали высвобождение ПРЛ, а агонист mPR R5020 был неэффективен. Исследование клеточных механизмов активности mPR α показало, что прогестерон и Org OD 02-0 уменьшали накопление цАМФ, тогда как R5020 не оказывал такого эффекта. Высвобождение ПРЛ блокировалось предварительной обработкой коклюшным токсином, ингибитором белков Go/Gi. TGF β 1 является мощным ингибитором секреции пролактина в лактотрофах. Прогестерон и Org OD 02-0, но не R5020, повышали уровень активированного TGF β 1. Этот эффект не наблюдался при трансфекции клеток mPR α -siRNA. Получены доказательства того, что mPR α опосредует ингибирующее действие прогестерона на секрецию ПРЛ посредством снижения уровня цАМФ и активации TGF β 1 в популяции лактотрофов [46]. Затем изучалась роль mPRs в развитии пролактиномы *in vivo*. С этой целью экспрессию mPRs в гипофизе изучали в трех животных моделях пролактиномы: а) трансгенные мыши с дефицитом дофаминового рецептора D2; б) трансгенные мыши со сверхэкспрессией β -субъединицы хорионического гонадотропина человека (hCG β); в) крысы, получавшие эстрогены. Экспрессия mPRs и nPR была значительно снижена в опухолях гипофиза по сравнению с нормой. Однако относительная доля mPR α и mPR β была значительно выше в пролактиномах. Селективный агонист mPR Org OD 02-0 значительно ингибировал высвобождение ПРЛ как в нормальных, так и в опухолевых эксплантатах гипофиза, проявляя более выраженный эффект в опухолевых тканях. Поскольку прогестерон также регулирует секрецию ПРЛ, косвенно воздействуя на дофаминергические нейроны, было изучено участие mPRs в этом эффекте. Обнаружено, что гипоталамус имеет высокую экспрессию mPRs. Как прогестерон, так и Org OD 02-0 увеличивали высвобождение дофамина в экспантатах гипоталамуса. В условиях *in vivo*, которое обеспечивает действие как на гипофиз, так и на гипоталамус, агонист mPR Org OD 02-0 значительно подавлял гиперпролактинемия у трансгенных самок мышей с пролактиномой. Однократное введение этого соединения значительно снижало уровень пролактина в сыворотке. Были обнаружены гендерные различия в содержании рецепторов: у самцов экспрессировались более высокие уровни гипофизарного mPR α/β , и у них в этих моделях мышцей не развивается пролактинома. Результаты позволили предположить, что активация mPRs может представлять собой новый инструмент для лечения пациентов с гиперпролактинемией, особенно для тех, которые обладают устойчивостью к дофаминергическим препаратам [47]. Однако в экспериментах *in vivo* нельзя исключить, что Org OD 02-0 действует в том числе и через nPR.

Еще одна работа была посвящена изучению эффектов Org OD 02-0 *in vivo*. Однократное введение прогестерона увеличивало частоту апноэ у новорожденных крыс, тогда как финастерид (который блокирует превращение прогестерона в аллопрегнанолон, являясь антагонистом 5 α -редуктазы) снижал частоту апноэ. Нейроактивный метаболит прогестерона аллопрегнанолон является модулятором рецепторов GABA $_A$. Агонист nPR R5020 снижал частоту апноэ у самцов, а агонист mPR Org OD 02-0 уменьшал частоту апноэ и у самцов, и у самок и уменьшал частоту дыхания у самок. При хроническом введении прогестерон снижал частоту апноэ более эффективно у самцов, чем у самок. Сделан вывод, что частота апноэ у новорожденных крыс частично определяется половыми особенностями, балансом между прогестероном и аллопрегнанолоном, GABA $_A$ -рецепторами и рецепторами прогестерона [48]. В данном случае прогестерон действует на частоту апноэ через оба типа рецепторов. Половые различия могут быть результатом разного уровня nPR и mPRs у самок и самцов в дорсальной части ствола мозга. Возможная активация ядерных рецепторов Org OD 02-0 в этом процессе не играет роли.

Наконец, *in vivo* изучалось действие Org OD 02-0 у рыб. Прогестины вызывают процесс созревания и овуляции ооцитов рыб посредством координации негеномных и геномных действий. Был изучен эффект Org OD 02-0, селективного агониста mPR α , на созревание ооцитов рыб и овуляцию *in vitro* и *in vivo*. Org OD 02-0 запускал созре-

вание ооцитов *in vitro* и *in vivo*. Удивительно, но Org OD 02 вызывал также овуляцию как *in vivo*, так и *in vitro*. Яйцеклетки после овуляции, вызванной Org OD 02, можно было оплодотворить искусственным осеменением. Молодняк развивался нормально. Эти результаты показали, что Org OD 02-0 действовал как агонист не только mPR α , но и ядерного рецептора прогестерона (nPR) [49]. Таким образом, эти результаты свидетельствуют, что Org OD 02 может активировать nPR в физиологических условиях.

Рассмотренные работы показали, что Org OD 02 через mPR α и mPRs других подтипов [22, 41] активировал как ингибиторные Gi, так и стимулирующие Golf белки, запускающие сигнальные каскады Pi3k/Akt, EGFR/ERK, RhoA/ROCK, cPKC β II, Src, TGF β 1 или вызывая ингибирование EGFR- Src-ERK1/2, PKA/CREB и PKA/ β -катенин сигнальных путей. При этом происходили разнонаправленные изменения в клетках в зависимости от их фенотипа: повышение содержания Ca²⁺ в сперматозоидах и повышение их активности, снижение концентрации Ca²⁺ в цитозоле гладкомышечных клеток сосудов и их релаксация, индукция ритмичных сокращений миометрия беременных крыс, подавление притока Ca²⁺ в T-клетки. В клетках рака молочной железы и глиобластомы Org OD 02 вызывал ингибирование апоптоза, активацию пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток, но ингибировал рост опухолей аденокарциномы легкого (табл. 2).

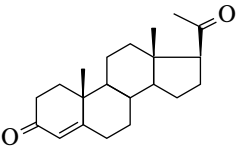
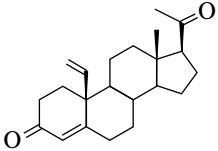
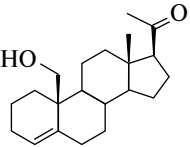
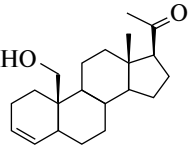
Изучение эффектов селективных лигандов mPRs

19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он (LS-02)

Поскольку отсутствуют данные о трехмерной структуре mPR, необходимые для моделирования их специфических лигандов, в нашей работе было проведено зондирование лиганд-связывающего кармана mPR α человека, гетерологично экспрессируемого в дрожжевых клетках, с использованием прегнановых стероидов, несущих дополнительное шестичленное кольцо D' [50, 51], ряда производных прогестерона и некоторых природных стероидов с последовательно меняющимися фрагментами структуры стероидного скелета [52]. Для этого был проведен радиолигандный анализ по измерению связывания [³H]-прогестерона в отсутствие и в присутствии возрастающих концентраций немеченных конкурентов с мембранной фракцией дрожжей. Большинство использованных стероидов имело очень низкое сродство к mPR α , хотя среди них были соединения с высокой константой взаимодействия с nPR. На основании анализа нашей работы и работы зарубежных исследователей, о которой говорилось ранее [19], был выявлен ряд структурных детерминант, определяющих избирательность связывания полученных соединений с mPRs по сравнению с ядерными рецепторами. Были синтезированы новые аналоги прогестерона, взаимодействие которых с mPRs было изучено радиолигандным методом в клетках человека с высоким уровнем их экспрессии и отсутствием nPR. В этой работе впервые была исследована роль 3-кетона во взаимодействии с мембранными рецепторами прогестерона. Обнаружилось, что для mPRs в отличие от nPR эта группировка не имеет определяющего значения для связывания. В работе 2017 г. среди вновь синтезированных производных прогестерона были выявлены два соединения, являющиеся 3-дезоксистероидами. Это 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он (LS-02), которые связывались с mPRs, но не взаимодействовали с nPR (табл. 1) [53]. Относительная конкурентная активность (ОКА) этих стероидов составляла 10% и 24% от ОКА прогестерона для mPRs соответственно, и 0,2–0,3% для nPR. Индекс дискриминации mPR / nPR этих соединений был 50 и 80, что значительно выше индекса Org OD 02-0, равного 20. В модельной дрожжевой системе с экспрессионной и репортерной плазмидой, несущей ген ядерного рецептора прогестерона В человека и репортерный ген β -галактозидазы, была изучена агонистическая и антагонистическая активность этих соединений [54]. Транскрипционная активность рецептора оценивалась по экспрессии репортерного гена β -галактозидазы под промотором цитохрома С, содержащего пять гормон-чувст-

вительных элементов (HREs), активируемых лиганд-рецепторным комплексом. Для определения агонистической активности соединений изучалась транскрипционная активность nPR-B при добавлении серийных разведений изучаемых стероидов. Для тестирования антагонистической или ингибирующей активности соединений дрожжевые клетки инкубировали сначала с прогестероном в такой минимальной концентрации, которая дает максимальную экспрессию гена-репортера. Затем добавляли серийные разведения тестируемых на антагонистическую активность соединений. Было показано, что LS-01 и LS-02 не обладают ни агонистической, ни антагонистической активностью в отношении nPR-B [54]. Таким образом, данные стероиды можно считать селективными лигандами mPRs. В дальнейшей работе оказалось, что несмотря на относительно низкое сродство, эти соединения оказывают эффекты в клетках, где изучалось их действие. Следует отметить, что, в отличие от самого прогестерона и большинства его производных, выявленные нами селективные лиганды не связываются не только с nPR, но и с ядерными рецепторами других стероидов, поскольку лишены необходимой для такого взаимодействия кето/гидрокси-группы в третьем положении кольца А [55, 56]. Анализ полученных позднее данных позволяет предположить, что использованный в 19-м положении заместитель, по-видимому, оказался неудачным и препятствует взаимодействию LS-01 и LS-02 с mPRs.

Таблица 1. Строение стероидов

Структура соединения	Название	nPR RBA, %	mPR α RBA, %	Индекс дискриминации mPR α / nPR
	прогестерон	100	100	1.0
	10-этинил-19-норпрогестерон Org OD 02-0	12.9	257.7	20
	19-гидроксипрегн-4-ен-20-он LS-01	0.2	10.3	52
	19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он LS-02	0.3	23.9	80

Примечание. RBA – относительное сродство связывания стероидных лигандов к nPR и mPRs; индекс дискриминации – предпочтительность mPR α / nPR по сравнению с прогестероном.

Действие селективных лигандов LS-01 и LS-02 на экспрессию цитокинов про- и противовоспалительного действия изучалось в активированных иммунных клетках человека. Были использованы Т-лимфоциты линии Jurkat, моноциты линии THP-1 и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека. В работе была исследована экспрессия mPRs и pPRs в изучаемых клетках. Только в моноцитах THP-1 была выявлена мРНК pPRs наряду с очень высоким уровнем мРНК mPR β . В Т-лимфоцитах и в PBMC обнаружена только экспрессия mPR α , mPR β , а мРНК pPRs отсутствовала. Селективные лиганды действовали однонаправленно с прогестероном во всех клетках. В PBMC под действием этих стероидов повышался уровень мРНК и секретируемого белка провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-6, мРНК INF γ , понижался – мРНК IL-2, повышался уровень мРНК противовоспалительного цитокина TGF β , понижался – мРНК IL-4 и секретируемого белка IL-10. В моноцитах, как в PBMC, повышалась экспрессия IL-1 β , TNF α , но экспрессия IL-10 также повышалась, а TGF β достоверно не менялась. В Т-лимфоцитах Jurkat понижалась экспрессия IL-2 и TNF α , повышалась IL-10, а TGF β не менялась. Таким образом, прогестины действуют на иммунные клетки через mPRs и оказывают как про-, так и противовоспалительные эффекты в зависимости от фенотипа этих клеток. В различных типах иммунных клеток три изучаемых соединения действовали между собой одинаково, но оказывали разные, иногда даже противоположные эффекты. Селективные лиганды mPRs перспективны как иммуномодуляторные прогестины, не оказывающие побочного действия на ткани и органы, клетки которых экспрессируют ядерные рецепторы стероидных гормонов [34].

Далее действие LS-01 и LS-02 было изучено в клетках аденокарциномы поджелудочной железы человека VxPC3, содержащей высокий уровень mPR α и mPR γ . Ядерные рецепторы не были обнаружены в этих клетках. Здесь эффекты селективных лигандов существенно отличались между собой. Прогестерон и соединение LS-01 действовали одинаково практически на все исследуемые процессы пролиферации и гибели клеток. Соединение LS-02 оказывало собственные эффекты, отличающиеся от действия двух других изучаемых стероидов [57]. В работе изучалось влияние стероидов на жизнеспособность клеток, на различные проявления апоптотических процессов, на экспрессию генов факторов, связанных с этими процессами, а также участие двух киназ – p38 MAPK и JNK в сигнальных каскадах при активации mPRs с использованием их ингибиторов SB203580 и SP600125. Действие первого ингибитора парадоксальным образом усиливало в ряде случаев эффекты изучаемых прогестинов. Загадка получила объяснение, когда было изучено активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK под действием стероидов и на фоне ингибиторов. Ингибитор SB203580 блокирует связывание АТФ в соответствующем кармане p38 MAPK, но он не ингибирует фосфорилирование p38 MAPK вышерасположенными в сигнальном каскаде (upstream) киназами. На фоне ингибитора фосфорилирование киназы p38 усиливалось, но не могло ее активировать. По механизму отрицательной обратной связи вышерасположенные в сигнальном каскаде киназы, видимо, активировались, пытаясь восстановить инактивированный ингибитором фермент. Самым интересным был факт значительного усиления активирующего фосфорилирования JNK на фоне ингибитора p38 MAPK SB203580. Очевидно, в VxPC3 клетках JNK и p38 MAPK фосфорилировались общей вышерасположенной в сигнальном каскаде киназой. Активация JNK на фоне ингибитора p38 MAPK приводила к усилению эффектов стероидов, опосредуемых этой киназой. Действие ингибитора SP600125 связано с подавлением активирующего фосфорилирования JNK и не имело побочных эффектов. Было обнаружено антипролиферативное подавляющее действие прогестерона и LS-01 на клетки аденокарциномы поджелудочной железы человека VxPC3 с участием сигнального каскада JNK. При этом мишенями этого действия были гены белков циклина D1, p21, Ki67, PCNA. Прогестерон и соединение LS-01 оказывали проапоптотическое действие, стимулируя процесс фрагментации ДНК ядер клеток с участием сигнального каскада p38 MAPK. При этом подавлялась экспрессия

гена антиапоптотического белка BCL2A1. Соединение LS-02 не влияло на процесс пролиферации, но вызывало апоптотические изменения в проницаемости мембран, связанные с появлением фосфатидилсерина на поверхности клеток. Выявленными мишенями действия этого стероида были гены белков каспазы 9, DAPK (Death-associated protein kinase 1), HRK (harakiri). LS-02 активировал оба сигнальных каскада JNK и p38 MAPK. Возможно, отличающееся действие LS-01 и LS-02 в клетках ВхРС3 связано с активацией разных подтипов mPRs и сигнальных каскадов, поскольку сродство этих стероидов к конкретным субтипам mPRs – α , β и γ пока не изучено детально [57].

В клетках LNCaP карциномы простаты не было обнаружено ни nPRs, ни mPRs. Влияния прогестерона, а также LS-01 и LS-02 на жизнеспособность этих клеток не было выявлено [57].

В клетках HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека был обнаружен высокий уровень только одного рецептора прогестиннов – mPR β . С использованием селективных лигандов mPRs и прогестерона были изучены функции этого белка и участие p38 MAPK и JNK в сигнальных каскадах при его активации. Действие LS-01, LS-02 и прогестерона в клетках HepG2 было антипролиферативным и проапоптотическим, а также однонаправленным в связи с наличием лишь одного подтипа mPRs. Стероиды подавляли жизнеспособность клеток, стимулировали появление фосфатидилсерина на наружной поверхности мембран, связанное с процессом апоптоза, но не влияли на фрагментацию ДНК ядер в использованном интервале времени. Возможно, поздние проявления апоптоза еще не успели проявиться в этих клетках в изученные сроки. Активирующего фосфорилирования p38 MAPK не наблюдалось под действием данных соединений, но происходила активация всех изоформ JNK. Только прогестерон достоверно изменял экспрессию генов факторов, связанных с пролиферацией и апоптозом в клетках HepG2. При этом изменения не всегда соответствовали его результирующему эффекту. LS-01 и LS-02 не влияли на транскрипцию изученных генов, возможно, из-за их более низкого сродства к mPR β и недостаточной его активации [58].

Таблица 2. Механизмы действия и эффекты селективных лигандов mPRs

Клетки/ткани	Мишени	Участие G-белков	Сигнальные пути	Функции	Ссылка
BeWo линия плацентарных клеток человека	mPR α			Ингибирование эффектов IL-1 β , снижающего жизнеспособность клеток	[23]
Сперматозоиды костистых рыб	mPR α	Golf-белки α , $\beta\gamma$, $\beta\gamma$	Активация сигнальных путей: adenylyl cyclase/cAMP, EGFR/ERK1/2 и Pi3k/Akt/phosphodiesterase	Повышение уровня внутриклеточного Ca ²⁺ , ведущее к гиперактивности сперматозоидов	[24–27]
Эндотелиальные клетки сосудов человека	mPR α	Gi-белки G α	Активация сигнальных путей Pi3k/Akt и ERK	Повышение активности и фосфорилирования eNOS, увеличение продукции NO	[28]

Продолжение таблицы 1

Гладкомышечные клетки сосудов человека	mPR α	Gi-белки G α	Активация сигнальных путей ERK и Akt/Pi3k, подавление RhoA/ROCK	Увеличение активности SERCA 2, снижение концентрации Ca $^{2+}$ в цитозоле, индукция релаксации	[29–30]
T-клетки человека			Активация сигнальных путей cPKC β II	Подавление притока Ca $^{2+}$ в клетки, вызванного фитогемагглютинином	[31–32]
Линия S42 шванновских клеток крысы	mPRs	Gi-белки G α		Увеличение миграции клеток, увеличение экспрессии MAG	[35]
Шванновские клетки крысы	mPR α и β		Активация сигнальных путей Akt, но не ERK1/2	Снижение экспрессии MAG, регуляция дифференцировки, увеличение миграции и пролиферации клеток	[36]
Стволовые клетки (ASC) жировой ткани человека, дифференцированные в клетки, подобные шванновским (SCL-ASC)	mPR α		Активация сигнальных путей Src и Pi3k/Akt	Стимуляция миграции, пролиферации и дифференцировки SCL-ASC, увеличение экспрессии и секреции BDNF и IGF-2	[37–39]
Нейрональные клетки SH-SY-5Y	mPR α		Активация сигнальных путей Pi3k/Akt и ERK	Снижение гибели клеток в бессывороточной среде. Снижение гибели клеток, вызванной 6-OHDA и MPP+	[39–40]
Миометрий беременных, небеременных крыс и крыс после родов	mPR β			Индукция ритмичных сокращений к 20-му дню беременности	[41]
	mPR α , γ , δ , ϵ			Ингибирование в течение беременности сильных сокращений миометрия, вызванных KCl	
Линии рака молочной железы SKBR3 и MDA-MB-468	mPR α	Gi-белки	Активация сигнальных путей ERK 1/2 и Akt	Уменьшение гибели клеток и апоптоза в бессывороточной среде	[42]

Продолжение таблицы 1

Линии глиобластомы U87 и U251	mPR α		Активация сигнальных путей Src и Akt	Усиление пролиферации, миграции и инвазии клеток	[43]
Линии аденокарциномы легких A549 и PC-9	mPR α		Ингибирование EGFR-Src-ERK1/2 пути	Повышение чувствительности к тирозинкиназному ингибитору EGFR и усиление его функции в подавлении пролиферации, миграции и инвазии клеток	[44]
			Ингибирование PKA/CREB и PKA/ β -катенин	Ингибирование пролиферации клеток, ингибирование роста опухоли в модели ксенотрансплантации	[45]
Лактотрофы гипофиза крысы и клетки линии GH3 из опухоли гипофиза крысы	mPR α	Gi- белки	Активация TGF β 1	Снижение секреции пролактина	[46]
Дофаминергические нейроны гипоталамуса и пролактиномы мышей и крыс	mPRs			Увеличение секреции дофамина в гипоталамусе. Подавление гиперпролактинемии	[47]
Дыхательные нейроны в вентролатеральной части продолговатого мозга у новорожденных крыс	mPRs			Уменьшение частоты апноэ у обоих полов новорожденных крыс, уменьшение частоты дыхания у самок	[48]
Ооциты рыб				Индукция созревания ооцитов и овуляции	[49]
T-лимфоциты линии Jurkat	mPR α , mPR β			Понижение экспрессии IL-2 и TNF α , повышение экспрессии IL-10	[34]

Окончание таблицы 1

Моноциты линии THP-1	mPR β			Повышение экспрессии IL-1 β , TNF α , IL-10	[34]
PBMC человека	mPR α , mPR β			Повышение экспрессии и секреции IL-1 β , TNF α , IL-6, экспрессии INF γ и TGF β . Понижение экспрессии IL-2, IL-4 и секреции IL-10	[34]
Линия ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека	mPR α , mPR γ		Активация сигнальных путей JNK и p38 MAPK	Подавление пролиферации, подавление экспрессии циклина D1, Ki67, PCNA, усиление p21. Стимуляция апоптоза, подавление экспрессии BCL2A1, повышение экспрессии каспазы 9, DAPK, HRK	[57]
Линия HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека	mPR β		Активация JNK но не p38 MAPK	Подавление жизнеспособности клеток, стимуляция апоптоза	[58]

Перспективы

К настоящему времени выявленные селективные лиганды mPRs, используемые в различных исследованиях, представлены тремя соединениями – Org OD 02-0, LS-01 и LS-02. Первое имеет существенное сродство к nPRs и в некоторых случаях проявляет себя как агонист этих рецепторов [49]; другие два не взаимодействуют с nPRs и с другими ядерными рецепторами стероидов, но их сродство к mPRs низкое [53], поэтому эффекты часто слабее, чем у прогестерона. В 2021 г. вышел обзор, в котором была сделана попытка обобщить имеющиеся данные о строении взаимодействующих с mPRs соединений и проанализировать их различия в связывании с nPRs и mPRs. На основании этого анализа были выявлены основные структурные фрагменты молекулы стероида, которые ответственны за эффективность связывания и избирательность взаимодействия с mPRs. Были предложены направления модификации стероидного каркаса для создания новых селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона [59].

Функциональные домены nPRs были идентифицированы, а их структуры подробно изучены еще в 1998 г. [55, 56]. Остатки алифатических и ароматических аминокислот в лиганд-связывающем домене (LBD) окружают гидрофобное ядро прогестерона. Структура LBD, выявленная с помощью рентгеноструктурного анализа, показывает, что 3-кетогруппа прогестерона принимает водородные связи от двух аминокислотных остатков Q725 и R766 [55, 56, 60]. Это было подтверждено мутационным анализом,

показывающим, что мутанты Q725A или R766H демонстрируют полную потерю аффинности связывания с pPR-B [60]. Эти результаты иллюстрируют важность 3-кетогруппы в прогестероне в связывании с pPRs. 20-кетогруппа прогестерона не связывается с LBD водородными связями, важны только гидрофобные контакты для связывания прогестерона с этой частью LBD.

В 2022 г. появилось новое исследование, посвященное поиску путей к созданию новых селективных лигандов mPRs. Было осуществлено моделирование структуры mPR α на основе структуры рецепторов адипонектина (AdipoR), определенной по их кристаллам рентгеноструктурным анализом. Модель гомологии mPR α показала, что водородная связь 20-кетогруппы прогестерона с остатком глутамина (Q) в положении 206 в связывающем кармане этого рецептора критически важна. Это подтвердил мутационный анализ, который не выявил связывания прогестерона с мутантным рецептором при замене глутамина (Q) 206 на аланин или аргинин. Модель предсказала гидрофобные взаимодействия прогестерона с аминокислотными остатками, окружающими лиганд-связывающий карман, в том числе с валином 146, мутация которого с заменой на полярный серин привела к полной потере связывания прогестерона. Но что особенно важно, модель mPR α показала отсутствие донора водородной связи вблизи 3-кетогруппы прогестерона. Исследования активности взаимодействия mPR α с 3-дезоксистероидами показали, что в отличие от pPRs, для связывания с mPR α 3-карбонильный кислород не является необходимым [61]. Таким образом, эта работа подтвердила наши исследования и правильность выбора 3-дезоксистероидов LS-01 и LS-02. Очевидно, именно эта особенность структуры – отсутствие кислородной функции в третьем положении, будет в дальнейшем основой для разработки синтеза эффективных и избирательно взаимодействующих с mPRs соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используемые в настоящее время селективные лиганды mPRs – Org OD 02-0, LS-01 и LS-02 имеют существенные недостатки и не перспективны как лекарственные средства для клинического применения, но позволяют исследовать функции изучаемых мембранных рецепторов в эксперименте. Их использование помогло выработать стратегию для выработки направлений модификации стероидной молекулы с высокой эффективностью и избирательностью взаимодействия. Мембранные рецепторы прогестерона могут играть значительную роль в гомеостазе, создавая баланс между воспалением и иммуносупрессией. Разработка аналогов прогестерона как препаратов, нацеленных на специфическое действие через mPRs, может иметь терапевтическое значение для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, во время трансплантации, при терапии рака, при беременности, когда есть риск потери плода, при болезни сосудов, пролактинемии, болезни Паркинсона, мужском бесплодии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета гранта Российского научного фонда № 23-25-00071, <https://rscf.ru/project/23-25-00071/>. Никаких дополнительных грантов на проведение и/или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP* (2016) Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol* 428: 3831–3849.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.020>
2. *Zhu Y, Bond J, Thomas P* (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2237–2242.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0436133100>
3. *Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhous EW, Randeve HS, Thomas P* (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol* 20: 1519–1534.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0243>
4. *Atif F, Yousuf S, Stein DG* (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multi-forme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 146: 62–73.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.007>
5. *Atif F, Sayeed I, Yousuf S, Ishrat T, Hua F, Wang J, Brat DJ, Stein DG* (2011) Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: in vitro and in vivo evidence. *Mol Med* 17: 1084–1094.
<https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00255>
6. *Hapgood JP, Africander D, Louw R, Ray RM, Rohwer JM* (2014) Potency of progestogens used in hormonal therapy: toward understanding differential actions. *J Steroid Mol Biol* 142: 39–47
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.08.001>
7. *Thomas P* (2022) Membrane Progesterone Receptors (mPRs, PAQRs): Review of Structural and Signaling Characteristics. *Cells* 11: 1785.
<https://doi.org/10.3390/cells11111785>
8. *Thomas P, Pang Y, Kelder J* (2023) Membrane progesterone receptors on the cell membrane: A review highlighting potential export motifs in mPR α regulating its trafficking to the cell surface. *Steroids* 199: 109295.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109295>
9. *Moussatche P, Lyons TJ* (2012) Non-genomic progesterone signaling and its non-canonical receptor. *Biochem Soc Trans* 40: 200–204.
<https://doi.org/10.1042/BST20110638>
10. *Liu Z, Xiao T, Peng X, Li G, Hu F* (2017) APPLs: More than just adiponectin receptor binding proteins. *Cell Signal* 52: 76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.018>
11. *Nader N, Dib M, Courjaret R, Hodeify R, Machaca R, Graumann J, Machaca K* (2018) The VLDL receptor regulates membrane progesterone receptor trafficking and nongenomic signaling. *J Cell Sci* 131: 212522.
<https://doi.org/10.1242/jcs.212522>
12. *Thomas P, Pang Y, Dong J* (2014) Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progestin receptor α (mPR α) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): Evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology* 155: 1107–1119.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1991>
13. *McGuire MR, Espenshade PJ* (2023) PGRMC1: An enigmatic heme-binding protein. *Pharmacol Ther* 241: 108326.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108326>
14. *Cahill MA, Medlock AE* (2017) Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 171: 11–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.12.020>
15. *Sueldo C, Liu X, Peluso JJ* (2015) Progesterone and adipoQ Receptor 7, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1), and PGRMC2 and their role in regulating progesterone's ability to suppress human granulosa/luteal cells from entering into the cell cycle. *Biol Reprod* 93: 63.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131508>
16. *Aizen J, Pang Y, Harris C, Converse A, Zhu Y, Aguirre M, Thomas P* (2018) Roles of progesterone receptor membrane component 1 and membrane progestin receptor alpha in regulation of zebrafish oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol* 263: 51–61.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.009>
17. *Wu X-J, Thomas P, Zhu Y* (2018) Pgrmc1 knockout impairs oocyte maturation in zebrafish. *Front Endocrinol* 9: 560.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00560>

18. *Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS, Thomas P* (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol* 20: 1519–1534. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0243>
19. *Kelder J, Azevedo R, Pang Y, Vlieg J, Dong J, Thomas P* (2010) Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor (mPR) and to nuclear progesterone receptor: Correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPR-specific agonists. *Steroids* 75: 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.01.010>
20. *Jacobsen BM, Horwitz KB* (2012) Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357: 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.016>
21. *Pang Y, Dong J, Thomas P* (2013) Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology* 154: 283–295. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1772>
22. *Boukari R, Rossignol O, Baldy C, Marcouiller F, Bairam A, Joseph V* (2016) Membrane progesterone receptor- β , but not - α , in dorsal brain stem establishes sex-specific chemoreflex responses and reduces apnea frequency in adult mice. *J Appl Physiol* (1985) 121: 781–791. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00397.2016>
23. *Zachariades E, Mparmpakas D, Pang Y, Rand-Weaver M, Thomas P, Karteris E* (2012) Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. *Placenta* 33: 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.002>
24. *Tan W, Thomas P* (2014) Activation of the Pi3k/Akt pathway and modulation of phosphodiesterase activity via membrane progesterin receptor-alpha (mPRalpha) regulate progesterin-initiated sperm hypermotility in Atlantic croaker. *Biol Reprod* 90: 105. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112896>
25. *Tan W, Thomas P* (2015) Involvement of epidermal growth factor receptors and mitogen-activated protein kinase in progesterin-induction of sperm hypermotility in Atlantic croaker through membrane progesterin receptor-alpha. *Mol Cell Endocrinol* 414: 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.023>
26. *Tan W, Aizen J, Thomas P* (2014) Membrane progesterin receptor alpha mediates progesterin-induced sperm hypermotility and increased fertilization success in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Gen Comp Endocrinol* 200: 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.02.003>
27. *Tan W, Pang Y, Tubbs C, Thomas P* (2019) Induction of sperm hypermotility through membrane progesterin receptor alpha (mPR α): A teleost model of rapid, multifaceted, nongenomic progesterin signaling. *Gen Comp Endocrinol* 279: 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.002>
28. *Pang Y, Dong J, Thomas P* (2015) Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308: E899–E911. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00527.2014>
29. *Pang Y, Thomas P* (2019) Role of mPR α (PAQR7) in progesterone-induced Ca²⁺ decrease in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Endocrinol* 63: 199–213. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0019>
30. *Pang Y, Thomas P* (2021) Involvement of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) in mPR α (PAQR7)-mediated progesterone induction of vascular smooth muscle relaxation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320: E453–E466. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00359.2020>
31. *Lin VH, Chen JJ, Liao CC, Lee SS, Chien EJ* (2016) The rapid immunosuppression in phytohemagglutinin-activated human T cells is inhibited by the proliferative Ca(2+) influx induced by progesterone and analogs. *Steroids* 111: 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.01.010>
32. *Lin VH, Chien A, Chien EJ* (2023) The rapid activation of cPKC β II by progesterone results in the negative regulation of Ca²⁺ influx in human resting T cells. *J Chin Med Assoc* 86: 885–891. <https://doi.org/10.1097/jcma.0000000000000970>
33. *Dosiou C, Hamilton A, Pang Y, Overgaard M, Tulac S, Dong J, Thomas P, Giudice L* (2008) Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol* 196: 67–77. <https://doi.org/10.1677/joe-07-0317>

34. Polikarpova AV, Levina IS, Sigai NV, Zavarzin IV, Morozov IA, Rubtsov PM, Guseva AA, Smirnova OV, Shchelkunova TA (2019) Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. *Steroids* 145: 5–18.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.02.009>
35. Castelnovo LF, Magnaghi V, Thomas P (2019) Expression of membrane progesterone receptors (mPRs) in rat peripheral glial cell membranes and their potential role in the modulation of cell migration and protein expression. *Steroids* 142: 6–13.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.09.009>
36. Castelnovo LF, Caffino L, Bonalume V, Fumagalli F, Thomas P, Magnaghi V (2020) Membrane Progesterone Receptors (mPRs/PAQRs) Differently Regulate Migration, Proliferation, and Differentiation in Rat Schwann Cells. *J Mol Neurosci* 70: 433–448.
<https://doi.org/10.1007/s12031-019-01433-6>
37. Castelnovo LF, Thomas P (2021) Membrane progesterone receptor α (mPR α /PAQR7) promotes migration, proliferation and BDNF release in human Schwann cell-like differentiated adipose stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 531: 111298.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111298>
38. Castelnovo LF, Thomas P, Magnaghi V (2021) Membrane progesterone receptors (mPRs/PAQRs) in Schwann cells represent a promising target for the promotion of neuroregeneration. *Neural Regen Res* 16: 281–282.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.290885>
39. Castelnovo LF, Thomas P (2022) Membrane Progesterone Receptor α (mPR α /PAQR7) Promotes Survival and Neurite Outgrowth of Human Neuronal Cells by a Direct Action and Through Schwann Cell-like Stem Cells. *J Mol Neurosci* 72: 2067–2080.
<https://doi.org/10.1007/s12031-022-02057-z>
40. Castelnovo LF, Thomas P (2023) Progesterone exerts a neuroprotective action in a Parkinson's disease human cell model through membrane progesterone receptor α (mPR α /PAQR7). *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1125962.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1125962>
41. Yoshida A, Yasuda K, Okada H (2024) Changes in the conflicting nongenomic effects of progesterone in rat myometrium during pregnancy. *Life Sci* 340: 122454.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122454>
42. Dressing GE, Aleya R, Pang Y, Thomas P (2012) Membrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors. *Horm Cancer* 3: 101–112.
<https://doi.org/10.1007/s12672-012-0106-x>
43. González-Orozco JC, Hansberg-Pastor V, Valadez-Cosmes P, Nicolas-Ortega W, Bastida-Beristain Y, Fuente-Granada M, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2018) Activation of membrane progesterone receptor-alpha increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 477: 81–89.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.06.004>
44. Lu X, Guan A, Chen X, Xiao J, Xie M, Yang B, He S, You S, Li W, Chen Q (2020) mPR α mediates P4/Org OD02-0 to improve the sensitivity of lung adenocarcinoma to EGFR-TKIs via the EGFR-SRC-ERK1/2 pathway. *Mol Carcin* 59: 179–192.
<https://doi.org/10.1002/mc.23139>
45. Xiao J, Chen X, Lu X, Xie M, He B, He S, You S, Chen Q (2020) Progesterone/Org inhibits lung adenocarcinoma cell growth via membrane progesterone receptor alpha. *Thorac Cancer* 11: 2209–2223.
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.13528>
46. Camilletti MA, Ferraris J, Abeledo-Machado A, Converse A, Faraoni EY, Pisera D, Gutierrez S, Thomas P, Díaz-Torga G (2018) Participation of membrane progesterone receptor α in the inhibitory effect of progesterone on prolactin secretion. *J Neuroendocrinol* 30: e12614.
<https://doi.org/10.1111/jne.12614>
47. Camilletti MA, Abeledo-Machado A, Perez PA, Faraoni EY, De Fino F, Rulli SB, Ferraris J, Pisera D, Gutierrez S, Thomas P, Díaz-Torga G (2019) mPRs represent a novel target for PRL inhibition in experimental prolactinomas. *Endocr Relat Cancer* 26: 497–510.
<https://doi.org/10.1530/ERC-18-0409>
48. Joseph V, Uppari N, Kouchi H, De Bruyn C, Boukari R, Bairam A (2018) Respiratory regulation by steroids in newborn rats: a sex-specific balance between allopregnanolone and progesterone receptors. *Exp Physiol* 103: 276–290.
<https://doi.org/10.1113/EP086807>
49. Rezanujjaman M, Tanvir R, Ali MH, Tokumoto T (2020) An agonist for membrane progestin receptor (mPR) induces oocyte maturation and ovulation in zebrafish in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 529: 347–352.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.208>

50. *Kamernitzky AV, Levina IS* (2005) Pregna-D' -pentaranes, progestins and antiprogestins: I. Separation of biological functions of steroid hormones. *Russ J Bioorg Chem* 31: 115–129.
<https://doi.org/10.1007/s11171-005-0015-7>
51. *Kamernitzky AV, Levina IS* (2005) Pregna-d' -pentaranes, progestins and antiprogestins: II. Pathways and realization mechanisms of separate biological functions of steroid hormones. *Russ J Bioorg Chem* 31: 227–238.
<https://doi.org/10.1007/s11171-005-0028-2>
52. *Lisanova OV, Shchelkunova TA, Morozov IA, Rubtsov PM, Levina IS, Kulikova LE, Smirnov AN* (2013) Approaches to the design of selective ligands for membrane progesterone receptor alpha. *Biochemistry (Moscow)* 78: 236–243.
<https://doi.org/10.1134/S0006297913030048>
53. *Polikarpova AV, Maslakova AA, Levina IS, Kulikova LE, Kuznetsov YV* (2017) Selection of progesterone derivatives specific to membrane progesterone receptors, *Biochemistry (Moscow)* 82: 140–148.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917020055>
54. *Michurina AO, Polikarpova AV, Levina IS, Kulikova LE, Zavarzin IV, Guseva AA, Morozov IA, Rubtsov PM, Smirnova OV, Shchelkunova TA* (2018) Agonistic and Antagonistic Effects of Progesterone Derivatives on the Transcriptional Activity of Nuclear Progesterone Receptor B in Yeast Model System. *Biochemistry (Moscow)* 83: 574–585.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918050103>
55. *Williams SP, Sigler PB* (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393: 392–396.
<https://doi.org/10.1038/30775>
56. *Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB* (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5998–6003.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5998>
57. *Goncharov AI, Levina IS, Shliapina VL, Morozov IA, Rubtsov PM, Zavarzin IV, Smirnova OV, Shchelkunova TA* (2021) Cytotoxic Effects of the Selective Ligands of Membrane Progesterone Receptors in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells BxPC3. *Biochemistry (Moscow)* 86: 1446–1460.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921110080>
58. *Shchelkunova TA, Levina IS, Morozov IA, Rubtsov PM, Goncharov AI, Kuznetsov YV, Zavarzin IV, Smirnova OV* (2023) Effects of Progesterone and Selective Ligands of Membrane Progesterone Receptors in HepG2 Cells of Human Hepatocellular Carcinoma. *Biochemistry (Moscow)* 88: 1920–1932.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923110202>
59. *Levina IS, Kuznetsov YV, Shchelkunova TA, Zavarzin IV* (2021) Selective ligands of membrane progesterone receptors as a key to studying their biological functions in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 207: 105827.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105827>
60. *Letz M, Bringmann P, Mann M, Mueller-Fahrnow A, Reipert D, Scholz P, Wurtz JM, Egner U* (1999) Investigation of the binding interactions of progesterone using muteins of the human progesterone receptor ligand binding domain designed on the basis of a three-dimensional protein model. *Biochim Biophys Acta* 1429: 391–400.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00249-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00249-0)
61. *Kelder J, Pang Y, Dong J, Schaftenaar G, Thomas P* (2022) Molecular modeling, mutational analysis and steroid specificity of the ligand binding pocket of mPR α (PAQR7): Shared ligand binding with AdipoR1 and its structural basis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 219: 106082.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106082>

Investigation the Functions of Membrane Progesterone Receptors Using their Selective Ligands

T. A. Shchelkunova^{a, *}

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: Schelkunova-t@mail.ru*

Progesterone plays a key role in reproductive processes in the female body and has effects in the central nervous system and other tissues. Progestins are widely used clinically in contraception and hormonal therapy. The classical effects of progesterone are mediated through nuclear receptors, which are ligand-dependent transcription factors. Since 2003, membrane progesterone receptors (mPRs) of the adiponectin receptor family of five subtypes have been in the spotlight. Their role in many normal and pathological processes in the body remains unclear. Determining the mechanisms of action of progesterone is complicated by the fact that activation of different types of receptors can cause opposite effects. The search for selective ligands of mPRs is an important task, since the use of such compounds makes it possible to differentiate the effects of progestins mediated by different types of receptors. The review analyzes the action of three selective ligands of mPRs, described and studied at present. One of them is widely used in international research, the other two have been identified and used in our work. The advantages and defects of these three compounds and the studies of mPRs functions conducted using them are considered. In conclusion, the prospects for creating new selective mPRs ligands are assessed, taking into account the structural features of their ligand-binding pocket. We found that the 3-keto group of progesterone and its derivatives, which is fundamentally required for binding to nuclear steroid receptors, is not important for interaction with mPRs. Our conclusion was confirmed in a study published in 2022 using modeling techniques and mutational analysis. It is this structural feature that will further serve as the basis for the development of the synthesis of compounds that are effective and selectively interact with mPRs.

Keywords: progestins, steroids, membrane receptors, nuclear receptors, selective ligands, signaling cascades