
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА
В ПРОЦЕССЕ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДОВ У КРЫС**

© 2025 г. М. А. Водопетова¹, А. Д. Дмитриева¹, И. С. Левина², И. А. Морозов³,
П. М. Рубцов³, О. В. Смирнова¹, Т. А. Щелкунова^{1,*}

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

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 13.12.2024 г.

После доработки 18.03.2025 г.

Принята к публикации 11.04.2025 г.

Прогестерон выполняет главную роль в процессе подготовки женского организма к беременности и в ее сохранении. В женских репродуктивных органах обнаружены классические ядерные рецепторы прогестерона (nPRs), за счет взаимодействия с которыми прогестерон оказывает многочисленные эффекты в этих тканях. В последнее время обнаружены также мембранные рецепторы (mPRs) прогестерона в матке, плаценте, яичниках, молочных железах человека и животных. Предполагается, что эти рецепторы выполняют важные функции в сохранении беременности, в инициации родов. Однако их роль в этих процессах не изучена. Ранее нами были выявлены два соединения, имеющие сродство к mPRs разных подтипов, но при этом не взаимодействующие с nPRs. Их действие было продемонстрировано в различных клетках, но не было изучено *in vivo*. В настоящей работе главной целью было изучение действия одного из этих стероидов (LS-01) в классическом тесте на сохранение беременности у овариэктомированных самок крыс и на стимуляцию родового процесса для выявления роли mPRs. Для анализа главных мишеней действия селективного лиганда mPRs в матке была изучена экспрессия всех пяти подтипов mPRs, а также nPRs и мембранного компонента рецептора прогестерона (PGRMC1) до, в процессе и после окончания беременности. В результате проведенного исследования мы не выявили действия LS-01 ни на сохранение беременности, ни на стимуляцию родов у крыс. Однако изучение профиля экспрессии рецепторов прогестерона и корреляций этого профиля с концентрациями половых стероидов в сыворотке крови позволяет сделать предположение о разной роли подтипов мембранных рецепторов: прогестерон, действуя через mPR γ и nPRs, может способствовать сохранению беременности, а действуя через mPR β , способствовать инициации родов. Для выявления функций разных подтипов mPRs в репродукции и тонкой регуляции этого процесса необходим поиск лигандов, селективных для каждого мембранного рецептора.

Ключевые слова: ядерные рецепторы прогестерона, мембранные рецепторы прогестерона, экспрессия, регуляция, беременность, роды, селективные лиганды

DOI: 10.31857/S0869813925060028, **EDN:** TFRKTK

ВВЕДЕНИЕ

Прогестерон – гормон, который играет ключевую роль в поддержании беременности. Он необходим для релаксации миометрия, подавляет овуляцию, предотвращая возможность дополнительного оплодотворения, обеспечивает толерантность иммунной системы матери к плоду [1]. В процессе беременности прогестерон подавляет синтез простагландинов и снижает уровень рецепторов окситоцина. Свое действие этот стероидный гормон оказывает через два разных типа рецепторов – классические ядерные рецепторы прогестерона (nPRs) и мембранные рецепторы прогестерона (mPRs) семейства адипонектиновых и прогестиновых рецепторов пяти подтипов – mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ , mPR ϵ . Важную функцию адаптерного белка для mPR α , а возможно и для других рецепторов, выполняет мембранный компонент рецептора прогестерона – PGRMC1. Взаимодействие прогестерона с его ядерными рецепторами является наиболее изученным сигнальным путем, отвечающим за широкий спектр биологических эффектов прогестерона и играющим определяющую роль в сохранении беременности. В дополнение к нему прогестерон осуществляет свое физиологическое действие посредством использования неканонических сигнальных путей через активацию mPRs. Последние участвуют в регуляции функций матки, ее миоконтракtilной активности [2], однако данные об этом противоречивы, знаний о функции этих сигнальных путей в репродуктивных тканях у беременных и небеременных животных недостаточно.

У грызунов начало родового процесса связано со снижением уровня прогестерона. У человека происходит функциональное выключение прогестерона, при этом падение его уровня в сыворотке крови не происходит [3]. Причиной функционального выключения прогестерона перед родами у человека считают: 1) изменение соотношения изоформ ядерных рецепторов прогестерона PR-A/PR-B в пользу изоформы А, которая может служить репрессором транскрипционной активности изоформы В либо стимулировать экспрессию генов белков сократительной активности миометрия [4–6]; 2) изменение содержания корегуляторов ядерных рецепторов [7]; 3) повышение уровня ферментов инактивации прогестерона в клетках миометрия [8]; 4) после открытия мембранных рецепторов прогестерона внесение их вклада в этот процесс [2]. Вклад mPRs в функциональное выключение прогестерона был изучен в работе на первичной культуре клеток миометрия человека, в которой было показано, что при родах относительное количество mPНК, кодирующей mPR β , было значительно увеличено по сравнению с уровнями в родовой ткани, тогда как mPНК mPR α не изменялась. Мембранные рецепторы усиливали транскрипционную активность PR-B в клетках миометрия в начале беременности, а в конце беременности преобладал репрессорный эффект высоких уровней доминантно-негативной изоформы PR-A. Показано, что через mPR α и mPR β происходило подавление экспрессии гена коактиватора рецепторов стероидных гормонов – SRC2 и активация p38 MAPK, вызывающая фосфорилирование легких цепей миозина, а значит, повышение сократительной активности миометрия. Авторы предположили, что поскольку уровень mPR β растет в конце беременности, у человека происходит переключение действия прогестерона через другой тип рецепторов с релаксирующего на сократительное. Эти данные предоставляют первое доказательство реципрокной регуляции функции двумя структурно различными классами стероидных рецепторов [2]. Таким образом, уровень прогестерона у человека перед родами не меняется, но меняется направленность его эффектов.

У крыс изучались негеномные эффекты прогестерона на сокращения миометрия с использованием полосок этой ткани, полученных от небеременных, беременных крыс и крыс после родов. Был показан как стимулирующий, так и ингибиторный

эффект прогестерона на сократительную активность миометрия в разных группах животных [9].

Прогестерон поддерживает покой матки во время беременности, подавляя избыточную активность иммунной системы, приводя к сдвигу соотношения Т-лимфоцитов Th1/Th2 в сторону Th2, увеличению содержания Treg клеток [10–12]. Роды – это воспалительный процесс, в значительной степени опосредованный макрофагами. Было показано, что в мышинных макрофагах изменения в экспрессии и передаче сигналов mPR α связаны с воспалительными реакциями, и что эти изменения могут способствовать функциональному выключению прогестерона, связанному с родами [13].

Таким образом, исследования демонстрируют сложный механизм действия прогестерона в процессе беременности и в ее финале как у человека, так и у других млекопитающих, который к настоящему времени все еще мало изучен. Остается неясной роль mPRs в этом процессе. В нашей лаборатории были выявлены селективные лиганды мембранных рецепторов – LS-01 и LS-02, действие которых изучалось на разных типах иммунных и опухолевых клеток [14–16]. Эти соединения не имеют сродства к ядерным рецепторам и не проявляют в отношении к ним ни агонистической, ни антагонистической активности, но взаимодействуют по крайней мере с тремя субтипами mPRs – α , β , γ . Первый селективный лиганд LS-01 (рис. 1) на все изученные объекты действовал односторонне с прогестероном, проявляя агонистическую активность в отношении mPRs.

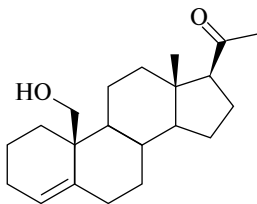


Рис. 1. LS-01: 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он.

На основании проведенных нами исследований структуры и активности возможных mPR-лигандов было сделано предположение, что 3-карбонильная группа в стероидной молекуле не является обязательной для взаимодействия лиганда с mPRs, в отличие от nPR, с которыми стероиды без этой группы не связываются. При этом 17-ацетильная группа прогестерона остается ключевым фрагментом для взаимодействия с mPRs [17]. Сделанные нами выводы были позже подтверждены данными работы по мембранной топологии mPR α и структуре его лиганд-связывающего домена (LBD), показавшей, что вблизи 3-кетогруппы прогестерона нет донора водородных связей, таким образом, 3-карбонильный кислород не является необходимым для связывания с mPR α [18]. Следовательно, использование LS-01 в экспериментах *in vivo* делает возможным дифференцированно активировать только mPRs в тканях, не оказывая воздействия на классические nPR, и позволяет более тонко регулировать физиологические эффекты прогестина. В экспериментах *in vivo* LS-01 до настоящего времени не использовался.

Целью нашей работы было изучение роли mPRs в поддержании беременности и в стимуляции родового процесса крыс. Для этого мы исследовали экспрессию mPRs и nPRs в матке самок крыс до беременности, на 9-й день беременности, перед родами на 22-й день беременности и после родов, а также эффекты прогестерона и селективного лиганда mPRs в эксперименте на сохранение беременности у овариэктомированных крыс и на индукцию родового процесса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Самки крыс стока Wistar содержались в соответствии с биоэтическими нормами. У животных был неограниченный доступ к пище и воде. В помещении поддерживалась температура 23 ± 2 °C с 12-часовой сменой освещенности. Для определения стадии эстрального цикла самок использовали вагинальный мазок. Мазки изучались без предварительного окрашивания под микроскопом. Стадию эстрального цикла определяли по соотношению чешуек, эпителиальных клеток, лейкоцитов. Для определения дня начала беременности брали вагинальный мазок. День обнаружения в мазке сперматозоидов считался первым днем беременности. Для наркоза использовали смесь раствора золетила (Virbas, Франция) и ксилазина (Ксиланит, ООО “НИТА-ФАРМ”, Россия). Итоговые дозы препаратов составляли: золазепам гидрохлорида – 5 мг/кг, тилетамина гидрохлорида – 5 мг/кг, ксилазина гидрохлорида – 1 мг/кг. В табл. 1 приведены краткие сведения обо всех животных, использованных в работе, с перечислением проводимых с ними процедур.

В первой серии исследования изучалась экспрессия рецепторов прогестерона и белков пролиферативной и сократительной активности матки при беременности и в контроле. Группа самок из 14 животных стока Wistar массой 200–230 г подвергалась эвтаназии без беременности, в разные сроки беременности и после родов: без ссаживания с самцами ($n = 3$), у которых в момент эвтаназии наблюдалась фаза эструса, на 9-й день беременности ($n = 4$), на 22-й день беременности ($n = 3$) и в течение одного часа после родов ($n = 4$). У животных забиралась ткань матки для выделения РНК и изучения экспрессии рецепторов прогестерона, а также кровь для получения сыворотки, в которой определяли концентрации прогестерона и эстрадиола.

Во второй серии исследования изучалось действие селективного лиганда mPRs LS-01 на сохранение беременности у овариэктомированных самок в сравнении с прогестероном. Эта серия состояла из двух экспериментов. В первом эксперименте был воспроизведен классический тест Corner&Allen сохранения беременности под действием прогестерона, в котором участвовали 10 овариэктомированных самок массой 190–220 г, одной половине которых вводился прогестерон ($n = 5$), другой – растворитель ($n = 5$). Во втором эксперименте серии участвовало 19 самок крыс стока Wistar массой 200–230 г. Половозрелых самок помещали в клетки с фертильными самцами. На следующее утро мазки животных проверяли на наличие сперматозоидов. Обнаружение сперматозоидов в мазке считалось началом беременности. Беременных самок подвергали овариэктомии на 9-й день. В день операции и ежедневно до 21-го дня беременности крысам подкожно вводили 1 мкг эстрогена вместе LS-01 или с прогестероном. Контрольные группы получали только эстрон или только растворитель – пропиленгликоль в том же объеме. Концентрации вводимых веществ были следующими: прогестерон 10 мг/мл, селективный лиганд 10 мг/мл, эстрон 10 мкг/мл. Первой подгруппе (1а) вводили 5 мг прогестерона и 1 мкг эстрогена ($n = 6$), второй подгруппе (2а) – 5 мг селективного лиганда и 1 мкг эстрогена ($n = 5$), третьей подгруппе (3а) – растворитель и 1 мкг эстрогена ($n = 5$), четвертой подгруппе (4а) – только растворитель ($n = 3$). На 22-й день всех животных декапитуировали под наркозом, матки извлекали и подсчитывали количество живых плодов в каждом маточном роге, производили забор крови [19].

В третьей серии исследования изучалось действие селективного лиганда mPRs LS-01 на стимуляцию родового процесса в сравнении с контролем и действием прогестерона. В эксперименте участвовало 12 беременных самок стока Wistar массой 200–230 г. Самок крыс помещали в клетки с фертильными самцами. Обнаружение сперматозоидов в мазке считалось 1-м днем беременности. У крыс уровень прогестерона перед родами снижается, начиная с 18-го дня [20]. Введение прогестерона сохраняет его высокий уровень и задерживает роды. Чтобы выяснить, как влияет на начало родового процесса

LS-01, крысам ежедневно подкожно, начиная с 17-го дня беременности, вводили либо 5 мг LS-01 ($n = 4$) – 16 группа, либо пропиленгликоль ($n = 4$) – 26 группа, либо – 5 мг прогестерона ($n = 4$) – 36 группа. После родов животных подвергали эвтаназии и производили забор крови для определения уровня прогестерона. В группе с введением прогестерона родовой процесс не мог начаться, поэтому беременных самок в этой группе подвергали гуманной эвтаназии на 26–28-й день беременности.

Таблица 1. Сведения об экспериментальных группах животных

Серия	Эксперимент	Группа животных	Беременность	Овариэктомия	Введение гормона	Эвтаназия и забор материала
I		Без беременности в стадии эструса	Без беременности	Нет	Нет	0-й день
		9-й день беременности	9-й день беременности	Нет	Нет	9-й день беременности
		22-й день беременности	22-й день беременности	Нет	Нет	22-й день беременности
		После родов	после родов	Нет	Нет	Через час после родов
II	1	1	Беременность	На 9-й день	С 9-го дня прогестерон и эстрон	22-й день беременности
		2	Беременность	На 9-й день	С 9-го дня эстрон	22-й день беременности
	2	1a	Беременность	На 9-й день	С 9-го дня прогестерон и эстрон	22-й день беременности
		2a	Беременность	На 9-й день	С 9-го дня LS-01 и эстрон	22-й день беременности
		3a	Беременность	На 9-й день	С 9-го дня эстрон	22-й день беременности
		4a	Беременность	На 9-й день	С 9-го дня растворитель	22-й день беременности
	III	16	Беременность	Нет	С 17-го дня LS-01	После родов
		26	Беременность	Нет	С 17-го дня растворитель	После родов
		36	Беременность	Нет	С 17-го дня прогестерон	26–28-й день беременности

*Иммуноферментный анализ содержания прогестерона и эстрадиола
в сыворотке крови*

Использовали готовые медицинские наборы для человека “ИФА-Прогестерон” и “ИФА-Эстрадиол” (НВО “Иммунотех”). Определение производили в соответствии с рекомендациями производителя по прилагаемому протоколу. В наборе использовался одностадийный конкурентный иммуноферментный анализ, основанный на конкуренции исследуемого в пробе стероида и стероида, конъюгированного с пероксидазой, за связывание со специфичными к нему антителами. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм в приборе Bio-Rad microplate reader, model 550 (Bio-Rad, США). Концентрации гормона в сыворотке рассчитывали по калибровочной кривой.

Выделение РНК и синтез комплементарной ДНК

РНК выделяли с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, США). Ткань измельчали и гомогенизировали с использованием гомогенизатора тефлон/стекло. Затем выделение производили согласно рекомендациям производителя (Invitrogen, США). Полученную РНК обрабатывали RQ1 RNase-Free DNase (Promega, США), следуя прилагаемому протоколу, освобождались от белка фенол-хлороформной экстракцией с последующим осаждением в спирте с солями. Очищенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза комплементарной ДНК (кДНК). Синтез кДНК производили с помощью набора для синтеза кДНК ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, США) по прилагаемому производителем протоколу. В качестве затравки использовали смесь случайных праймеров – гексамеров. Для приготовления негативного контроля в смесь не добавляли ревертазу.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

При проведении ПЦР использовали набор с интеркалирующим красителем SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Использованные в работе праймеры представлены в табл. 2. Работа проводилась на приборе Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Температурный режим ПЦР был следующим: 95 °C – 3 мин; далее 40 циклов со сменой температур 95 °C – 10 с, 58 °C – 20 с, 72 °C – 40 с. Для получения кривых плавления от 72 до 95 °C устанавливали инкремент 0.5 °C за 5 с. Расчет относительного количества мРНК производился с нормировкой на среднее геометрическое уровня транскриптов референсных генов – GAPDH и SDHA, с последующим пересчетом на калибратор по методу $\Delta\Delta C_t$. Калибратором служила кДНК одного препарата матки крысы. Она регулярно использовалась в качестве матрицы в ПЦР со всеми праймерами, рассчитывался относительный уровень мРНК целевых генов по отношению к среднему геометрическому уровню мРНК референсных генов для этого образца. Эти значения использовались для нормирования результатов, полученных на остальных образцах кДНК тканей матки.

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программе GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., США). Использовался тест Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по Данну; для парных сравнений использовался *t*-test Манна–Уитни; для корреляционного анализа применялся критерий Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Изменения экспрессии рецепторов прогестерона и PGRMC1 в матке крыс при
беременности. Корреляции с уровнем прогестерона и эстрадиола*

На рис. 2 показано изменение концентраций гормонов до беременности (в фазе эструса), на 9-й и 22-й дни беременности и сразу после родов. Максимальная концентрация прогестерона, по литературным данным, должна быть на 17–18-е дни

Таблица 2. Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

Название праймеров и рецепторов	Нуклеотидная последовательность праймера	Номер последовательности мПНК в GenBank
COX2 for COX2 rev	5'-GGGTGTGAAAGGAAATAAGGAAC-3' 5'-CGTAAACATGATTTAAGTCCACTC-3'	NM_017232.4
CCND1 for CCND1 rev	5'-AATGGAAGCTGCTTCTGGTGAAC-3' 5'-ATGGAGGGTGGGTTGGAAATG-3'	NM_171992.6
Hsd11b1 for Hsd11c1 rev	5'-TCACATCACACAGACCACTATG-3' 5'-CAGAGTAGGAAGCAATCAGAGG-3'	NM_017080.2
GADPH for GADPH rev	5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' 5'-CCTGTTGCTGTAGCCATATTC-3'	NM_017008.4
PAQR5 for PAQR5 rev mPR γ	5'-ACTATGGTGCGGTCAATCTC-3' 5'-TGGAGTTCAGAAACCTGGAG-3'	NM_001014092.2
PAQR6 for PAQR6 rev mPR δ	5'-GTCTCAAGCTGCCTCAACTC-3' 5'-CGTCTCGTTAGTCATCTGGAAG-3'	NM_001191077.1
PAQR7 for PAQR7 rev mPR α	5'-TTCTTGGACTATGTGGGTGTG-3' 5'-CTTCTGGCTGTACTTGTGTAG-3'	NM_001034081.1
PAQR8 for PAQR8 rev mPR β	5'-AGTGGCGTTACTACTTCTTCAG-3' 5'-TGAGGTAAGTGATTGACGACAG-3'	NM_001014099.2
PAQR9 for PAQR9 rev mPR ϵ	5'-TTCTACCGCCGCTACTTCTG-3' 5'-CATAGATGCTGAGGAAGGTGAAG-3'	NM_001271152.3
Pgr for Pgr rev nPRs	5'-GGAGGTCGTAAGTTTAAGAAAGTTC-3' 5'-ATGAGCAGGTTGATGAGTGG-3'	NM_022847.2
PGRMC1 for PGRMC1 rev	5'-CTAAGGCGATACGATGGAGTC-3' 5'-GCAGGAGTGAGGTCAGAAAG-3'	NM_021766.2
Sdha for Sdha rev	5'-TACACCGAATAAGAGCAAAGAAC-3' 5'-CAGCCAGCACCATAGATACC-3'	NM_130428.1

беременности у крыс. В нашем эксперименте, поскольку мы не брали кровь в эти дни, самый высокий уровень прогестерона наблюдался на 9-й день беременности, к началу родов на 22-й день он снижался и оставался на том же уровне после родов. Уровень эстрадиола, наоборот, был максимальным к 22-му дню.

На рис. 3 представлены результаты по относительному уровню мПНК разных типов рецепторов прогестерона до беременности (в фазе эструса), на 9-й и 22-й дни беременности и через 1–2 ч после родов. Экспрессия гена nPRs возрастает во время беременности и падает к началу родового процесса. Такая же закономерность наблюдалась и в отношении экспрессии гена mPR γ . Как видно на рис. 4а, наблюдалась положительная корреляция между уровнями мПНК этих рецепторов. Практически неизменной во время беременности остается экспрессия генов рецепторов mPR α , mPR δ и PGRMC1.

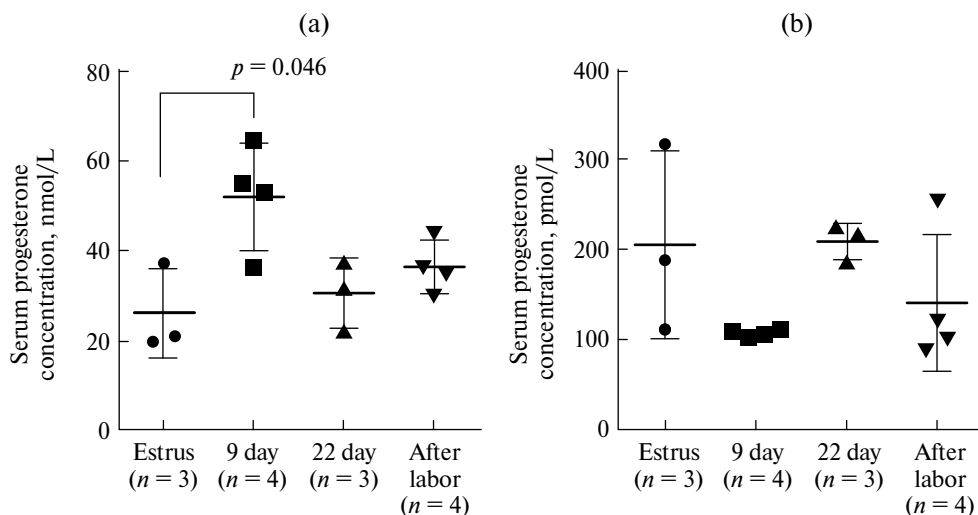


Рис. 2. Изменение концентрации прогестерона (слева) и эстрадиола (справа) в сыворотке крови у крыс в фазе эструса и в течение беременности. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

А вот уровень мРНК $mPR\beta$ к 9-му дню беременности значительно снижался по сравнению с его уровнем до беременности, но к 22-му дню он возрастал, а после родов опять снижался. На рис. 4б показана отрицательная корреляция между содержанием транскриптов рецепторов $nPRs$ и $mPR\beta$. Экспрессия гена $mPR\epsilon$ в матке в нашем исследовании не обнаруживалась.

Выявлена значимая положительная корреляция ($p = 0.02$) между уровнем прогестерона в сыворотке и величиной экспрессии $mPR\gamma$ (рис. 5а) и отрицательная корреляция на уровне тенденции ($p = 0.05$) между уровнем прогестерона в сыворотке и величиной экспрессии $mPR\beta$ (рис. 5б).

Положительная корреляция наблюдалась между концентрацией эстрадиола и уровнем экспрессии генов двух подтипов $mPRs/mPR\beta$ ($p = 0.0006$) и $mPR\delta$ ($p = 0.03$) (рис. 6).

Изменение в матке крыс уровня маркеров пролиферативной и сократительной активности миометрия

Помимо уровня экспрессии генов рецепторов прогестерона в матке крыс, в подгруппах до беременности (в фазе эструса), на 9-й и 22-й дни беременности и после родов изучалось содержание мРНК циклооксигеназы 2-го типа ($COX2$), циклина D1 (ген $CCND1$) и 11-бетагидроксистероиддегидрогеназы 1-го типа (ген $HSD11B1$). Результаты показаны на рис. 7. Максимальный уровень экспрессии $COX2$ наблюдался в матке на 9-й день беременности в нашем эксперименте (рис. 7а). Также на 9-й день беременности наблюдался максимальный уровень экспрессии гена циклина D1, к 22-му дню происходило снижение его экспрессии (рис. 7б). Повышение экспрессии гена $HSD11B1$ наблюдалось перед началом родового процесса (рис. 7с).

Верификация теста на сохранение беременности у овариэктомированных самок крыс при введении прогестерона

Самки были овариэктомированы на 9-й день беременности. Пяти самкам вводили прогестерон с эстроном (группа 1), пяти – растворитель с эстроном (группа 2). На рис. 8а

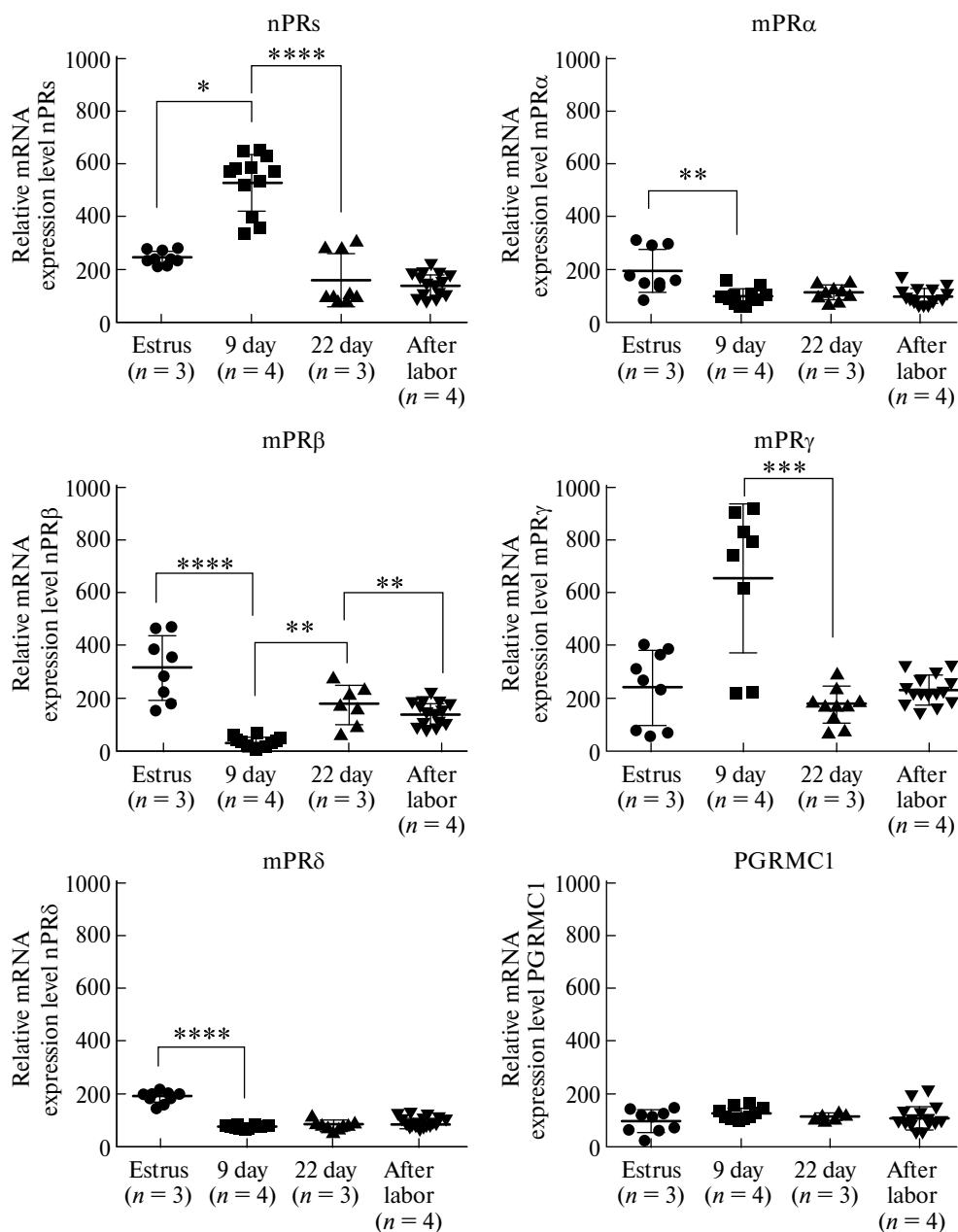


Рис. 3. Изменение уровня мРНК mPRs, nPRs и PGRMC1 в матке крыс в фазе эструса и в течение беременности. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

приведены концентрации прогестерона на 22-й день от начала беременности, определенные в сыворотке крови этих животных. К 22-му дню все пять самок из первой группы были беременны, суммарное количество живых плодов – 47, мертвых – 1. Из второй группы не была беременна ни одна самка, ни живых, ни мертвых плодов обнаружено не было.

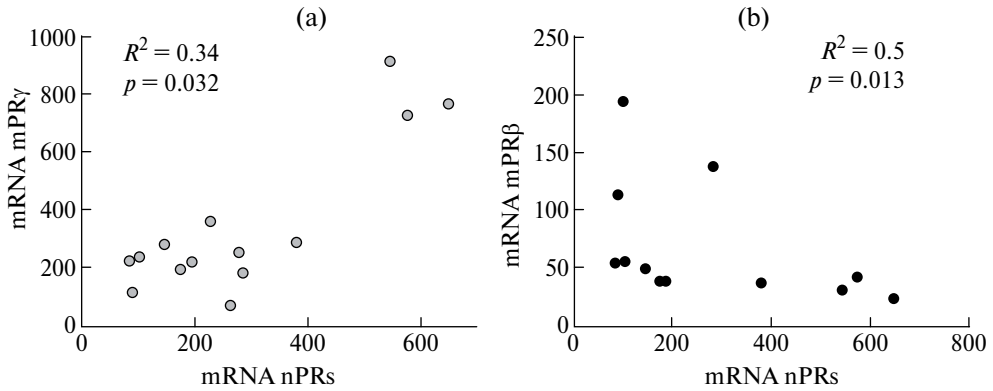


Рис. 4. (а) – Корреляция между экспрессией mPR γ и nPRs в фазе эструса и в течение беременности. (б) – Корреляция между экспрессией mPR β и nPRs в фазе эструса и в течение беременности. Данные представлены в виде средних значений уровней мРНК в относительных единицах в пересчете на калибратор.

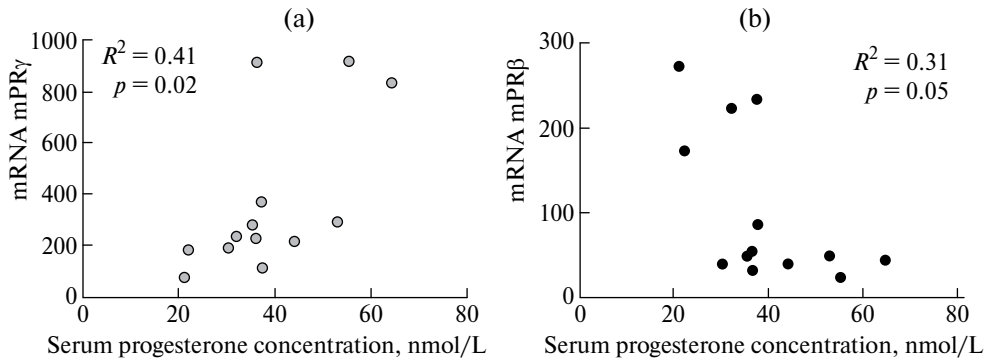


Рис. 5. Корреляция между уровнем прогестерона в сыворотке крови и экспрессией mPR γ (а) и mPR β (б) в матке крыс в фазе эструса и в течение беременности. Данные экспрессии рецепторов представлены в виде средних значений уровней мРНК в относительных единицах в пересчете на калибратор.

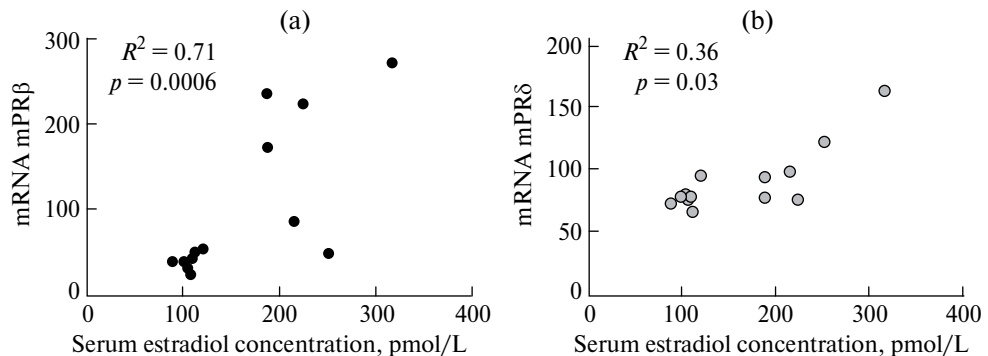


Рис. 6. Корреляция между уровнем эстрадиола в сыворотке крови и экспрессией mPR β (а) и mPR δ (б) в матке крыс в фазе эструса и в течение беременности. Данные экспрессии рецепторов представлены в виде средних значений уровней мРНК в относительных единицах в пересчете на калибратор.

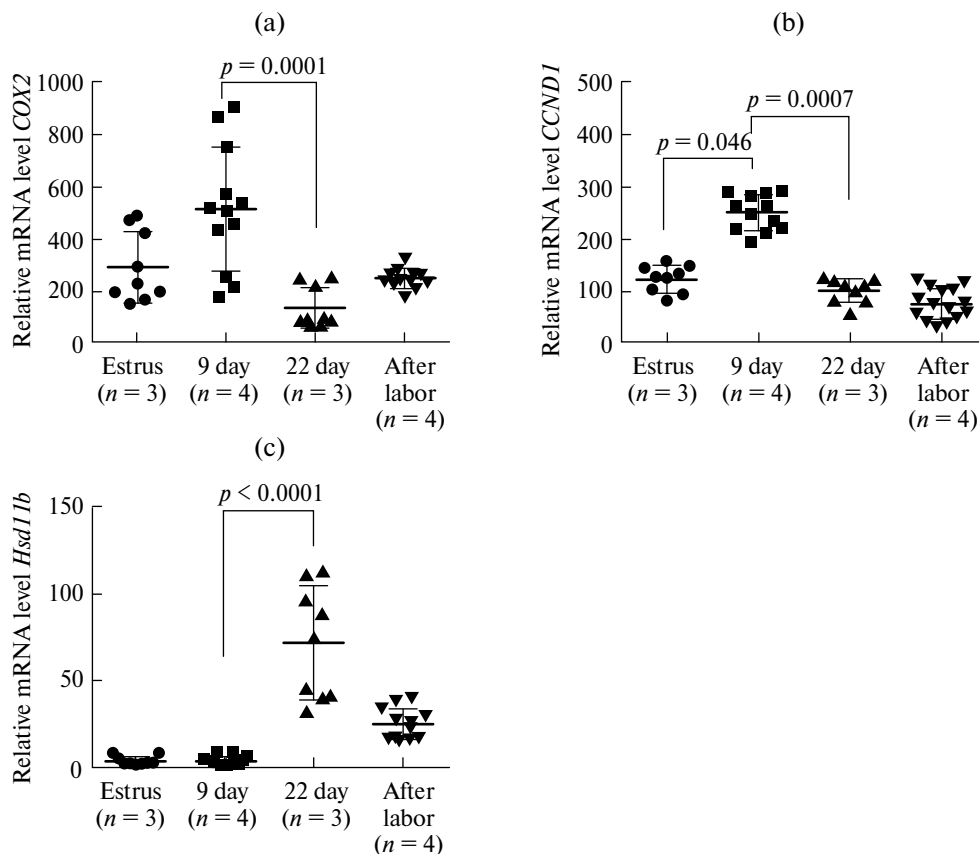


Рис. 7. Профиль экспрессии генов *COX2* (a), *CCND1* (b), *HSD11B1* (c) в матке крыс в фазе эструса и в течение беременности. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

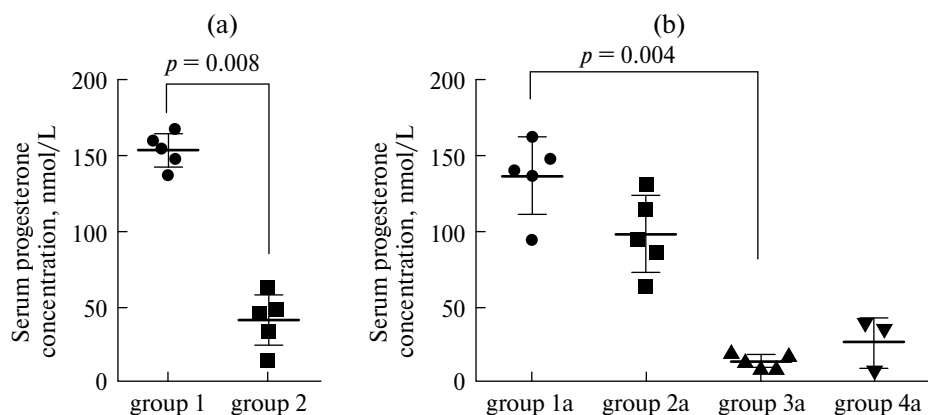


Рис. 8. Концентрация прогестерона в сыворотке овариэктомированных самок в первом (a) и во втором эксперименте (b) с изучением действия прогестерона и LS-01 на сохранение беременности. Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом.

Изучение действия селективного лиганда LS-01 на сохранение беременности в сравнении с прогестероном

У овариэктомированных на 9-й день беременности самок количество сохранившихся плодов проверяли на 22-й день. На рис. 8b приведены концентрации прогестерона в сыворотках животных четырех групп, определенные методом иммуноферментного анализа. В норме у крыс уровень прогестерона во время беременности составляет 120–250 нмоль/л [21]. В группе животных 1а (введение прогестерона и эстрогена) содержание прогестерона соответствует норме. В группе 2а (введение LS-01 и эстрогена) значения оптической плотности иммунного окрашивания не соответствуют контрольным уровням, наблюдаемым в группах 3а и 4а. Это может объясняться частичным взаимодействием с LS-01 поликлональных антител к прогестерону, что связано со значительным сходством их структуры. Как видно из табл. 3, только у самок с введением прогестерона и эстрогена плоды сохранились, во всех остальных группах плодов не было.

Таблица 3. Количество сохранившихся плодов к 22-му дню беременности у овариэктомированных самок после введения гормонов

Группа крыс	Количество животных	Плоды живые	Плоды мертвые
Группа 1а (введение прогестерона и эстрогена)	6	34	2
Группа 2а (введение LS-01 и эстрогена)	5	0	0
Группа 3а (введение эстрогена)	5	0	0
Группа 4а (введение одного растворителя)	3	0	0

Таким образом, введение селективного лиганда mPRs LS-01 не сохраняло беременность.

Изучение действия селективного лиганда LS-01 на стимуляцию родового процесса в сравнении с контролем

В трех группах самок с ежедневным введением прогестерона, LS-01 или растворителя, начиная с 17-го дня беременности, сравнивали день начала родового процесса. У самок, которым вводили прогестерон, родовый процесс не мог начаться, их подвергали гуманной эвтаназии на 26–28-й день. На рис. 9 представлены результаты эксперимента, из которых можно сделать вывод, что день родов в группе 1б с введением LS-01 не отличался от контрольной группы 2б с введением растворителя ($p > 0.9999$).

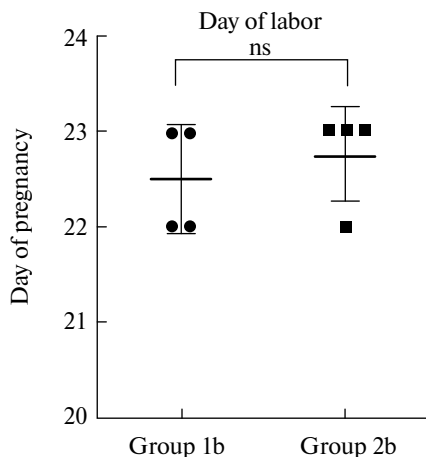


Рис. 9. День родов в эксперименте по стимуляции родового процесса в группе с введением селективного лиганда и в контрольной группе. Данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В первой серии исследования была изучена экспрессия рецепторов прогестерона и PGRMC1 в матке крыс при беременности и корреляции ее с уровнем прогестерона и эстрадиола. Корреляционный анализ показал наличие взаимосвязи уровня мРНК mPRs подтипов β и γ с концентрацией прогестерона и подтипов β и δ с концентрацией эстрадиола. На основании этих данных может быть сделано предположение о регулирующем влиянии стероидов на экспрессию генов мембранных рецепторов mPR β , mPR γ и mPR δ . Экспрессия mPR β подавлялась прогестероном, но стимулировалась эстрадиолом. Экспрессия mPR γ , наоборот, повышалась под действием прогестерона, а mPR δ – стимулировалась эстрадиолом. Наши данные подтверждаются результатами анализа *in silico* промоторов mPR α , mPR β и mPR γ , которые показали наличие в них нескольких гормоночувствительных элементов, отвечающих на действие прогестерона и эстрогенов [22]. Изменения в матке крыс уровня экспрессии рецепторов прогестерона в отсутствие беременности и на разных ее стадиях позволяют предположить различный вклад этих рецепторов в процесс сохранения беременности и начала родов. Параллельное изменение профиля экспрессии генов nPRs и mPR γ может быть связано с кооперативным действием этих рецепторов в поддержании беременности и регуляцией nPRs экспрессии гена mPR γ . Наоборот, экспрессия гена mPR β отрицательно коррелирует с уровнем nPRs, возрастает перед началом родового процесса, когда уровень прогестерона падает, а концентрация эстрогенов максимальна, что предполагает участие этого рецептора в индукции родов.

Изучение в матке крыс уровня экспрессии маркеров пролиферативной и сократительной активности миометрия показало максимальное повышение экспрессии COX2 на 9-й день беременности. COX2 – ключевой фермент биосинтеза простагландинов. По литературным данным известно, что COX2 участвует в регрессии децидуальной оболочки за счет продукции PGE2 и PGF2 α , ее уровень повышался у крыс с 8-го дня беременности, достигая максимума на 12-й день. На 22-й день беременности уровень COX2 по сравнению с 12-м днем снижался [23]. Сходные данные по экспрессии гена COX2 наблюдались и в нашем эксперименте. Циклин D1 является регуляторной субъединицей циклин-зависимых киназ 4 и 6, его уровень показывает пролиферативную активность ткани. В нашей работе максимальный уровень экспрессии гена

этого белка наблюдался на 9-й день беременности, к 22-му происходило снижение экспрессии гена, поскольку пролиферативные процессы в матке перед родами завершены. 11-бетагидроксистероиддегидрогеназа 1-го типа (ген *HSD11B1*) катализирует превращение 11-дезоксикортикостерона в активную форму гормона – кортикостерона. Повышение экспрессии гена *HSD11B1*, наблюдаемое перед началом родового процесса, свидетельствует об активации кортикотропной оси, необходимой для индукции родов и высокой сократимости миометрия.

Во второй серии исследования было показано, что введение селективного лиганда mPRs LS-01 не сохраняло беременность у овариэктомированных крыс в отличие от прогестерона. На основании этого можно сделать два предположения, одно из которых не исключает другое. Первое вероятное объяснение состоит в необходимости участия nPRs для сохранения беременности и релаксации миометрия. Второе заключается в предположительно разной роли β - и γ -подтипов mPRs в матке во время беременности и изменении уровня их экспрессии в эксперименте в связи с разным содержанием прогестерона. LS-01 активирует как mPR β , так и mPR γ . Как было показано в первом эксперименте, снижение концентрации прогестерона связано с повышением уровня мПНК mPR β и снижением мПНК mPR γ . Сниженные в результате овариэктомии концентрации прогестерона в трех группах (без его введения) изменяют соотношение mPR β /mPR γ в пользу первого подтипа β . Поскольку данные позволяют предположить кооперативное взаимодействие mPR γ с nPRs для сохранения беременности и стимуляцию родов через mPR β , изменение соотношения mPR β /mPR γ будет способствовать сократительной активности миометрия и выкидышам в присутствии LS-01, который активирует оба подтипа рецепторов. Для подтверждения разнонаправленного влияния подтипов β и γ мембранных рецепторов на сохранение беременности необходимо выявление еще более селективных лигандов, взаимодействующих только с определенным подтипом mPRs. Но они пока не обнаружены. Предположение об участии mPR β в индукции сократительной активности миометрия на 21-й день беременности у крыс подтверждается также другими исследователями, которые показали, что у небеременных крыс прогестерон не вызывал в полосках миометрия ритмических сокращений, а на 21-й день беременности стимулировал ритмические сокращения миометрия. Эти сокращения снижались после родов и прекращались через 7 дней после родов. Изучение экспрессии генов mPRs в процессе беременности показало значительное увеличение мПНК mPR β , а уровни мПНК mPR α , mPR γ , mPR δ и mPR ϵ оставались неизменными. Отсюда был сделан вывод, что стимулирующий эффект прогестерона на сократительную активность миометрия был индуцибельным, зависел от mPR β и принимал участие в родах. Ингибиторный эффект прогестерона на сокращения миометрия был конститутивным, зависел от других mPRs и принимал участие в поддержании беременности [9]. В отношении сократительной активности миометрия человека получены более противоречивые результаты: в одном случае показано, что при родах экспрессия гена mPR β повышалась по сравнению с уровнями в ткани до родов [2], в другом – начало родов приводило к достоверному снижению мПНК mPR α и β [24].

В третьей серии исследования мы не выявили влияния селективного лиганда mPRs LS-01 на стимуляцию родового процесса в сравнении с контролем. В этом случае также результат может быть обусловлен активацией селективным лигандом разнонаправленно действующих mPR β и mPR γ . У самок в этом эксперименте не удалялись яичники, уровень эндогенных половых гормонов (прогестерона и эстрогенов) в контрольной и экспериментальной группах не различался, соотношение mPR β /mPR γ сохранялось постоянным. Взаимодействие LS-01 с обоими подтипами рецепторов могло помешать стимулирующему роды действию его через mPR β .

У крыс в отличие от человека не наблюдается функционального выключения прогестерона перед родами, необходимо падение уровня самого гормона, что и было подтверждено в третьей серии исследования. У крыс с введением прогестерона родовой процесс не мог начаться из-за релаксирующего действия этого гормона на миометрий. Определенную роль в этом мог играть тот факт, что высокие концентрации прогестерона в данном случае меняли соотношение $mPR\beta/mPR\gamma$ в пользу подтипа γ , что может также служить причиной подавления сократительной активности миометрия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение профиля экспрессии разных типов рецепторов прогестерона в матке до, в течение и после беременности у крыс позволяет предположить разную направленность функций подтипов рецепторов $mPR\beta$ и $mPR\gamma$ в процессе сохранения беременности и инициации родового процесса. Действия селективного лиганда $mPRs$ LS-01, взаимодействующего с обоими типами мембранных рецепторов, на процесс беременности у крыс выявлено не было в нашей работе. К сожалению, в настоящее время отсутствуют данные о селективных лигандах, взаимодействующих с каким-либо одним подтипом из пяти $mPRs$. Дальнейшие поиски таких соединений являются перспективными для тонкой модуляции процессов, регулируемых прогестероном. Результаты нашей работы не исключают, что некоторые эффекты прогестерона в матке при беременности и родах могут быть опосредованы $mPRs$.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть оборудования, использованного в экспериментах, предоставлена МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках реализации «Программы развития федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова” до 2030 года» (Соглашения № 289 и № 359).

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (Т. А. Щ.), планирование эксперимента (И. А. М., П. М. Р., О. В. С., Т. А. Щ.), сбор данных (М. А. В., Н. Д. Д., И. С. Л.), обработка данных (М. А. В., Н. Д. Д., И. А. М., Т. А. Щ.), написание (Т. А. Щ.), редактирование манускрипта (И. А. М., П. М. Р., О. В. С., Т. А. Щ.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23–25–00071, <https://rscf.ru/project/23-25-00071/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все действия с животными в данном исследовании проводились в соответствии с международными руководствами и были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ (заявление № 134-ж, утверждено на заседании Комиссии по биоэтике 134-д, состоявшемся 19.08.2021 г.; заявление № 134-ж-2, утверждено на заседании Комиссии по биоэтике № 151-д, состоявшемся 20.04.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali S, Balachandran K, O'Malley B (2020) Ninety years of progesterone: The 'other' ovarian hormone. *J Mol Endocrinol* 65: E1–E4.
<https://doi.org/10.1530/jme-20-0145>
2. 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>
3. Brown AG, Leite RS, Strauss JF (2004). Mechanisms underlying “functional” progesterone withdrawal at parturition. *Ann N Y Acad Sci* 1034: 36–49.
<https://doi.org/10.1196/annals.1335.004>
4. Langmia IM, Apalasamy YD, Omar SZ, Mohamed Z (2015) Progesterone Receptor (PGR) gene polymorphism is associated with susceptibility to preterm birth. *BMC Med Genet* 16: 63.
<https://doi.org/10.1186/s12881-015-0202-1>
5. Amini P, Michniuk D, Kuo K, Yi L, Skomorovska-Prokvolit Y, Peters GA, Tan H, Wang J, Malemud CJ, Mesiano S (2016) Human Parturition Involves Phosphorylation of Progesterone Receptor-A at Serine-345 in Myometrial Cells. *Endocrinology* 157: 4434–4445.
<https://doi.org/10.1210/en.2016-1654>
6. Mesiano S, Wang Y, Norwitz ER (2011) Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: Do they hold the key to birth timing? *Reprod Sci* 18: 6–19.
<https://doi.org/10.1177/1933719110382922>
7. Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Wilson JW, Mendelson CR (2003) A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9518–9523.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1633616100>
8. Williams KC, Renthal NE, Condon JC, Gerard RD, Mendelson CR (2012) MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7529–7534.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1200650109>
9. 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>
10. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5: 266–271.
<https://doi.org/10.1038/nri1037>
11. Raghupathy R, Al-Mutawa E, Al-Azemi M, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J (2009) Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J Reprod Immunol* 80: 91–99.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.01.004>
12. Lim MK, Ku CW, Tan TC, Lee YHJ, Allen JC, Tan NS (2020) Characterisation of serum progesterone and progesterone-induced blocking factor (PIBF) levels across trimesters in healthy pregnant women. *Sci Rep* 10: 3840.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59452-y>
13. Lu J, Reese J, Zhou Y, Hirsch E (2015) Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells. *J. Endocrinol* 224: 183–194.
<https://doi.org/10.1530/joe-14-0470>
14. 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>
15. 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>
16. 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 (Mosc)* 88: 1920–1932.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923110202>

17. *Levina IS, Kuznetsov YV, Schelkunova 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>
18. *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>
19. *Kumar N, Koide SS, Tsong Y-Y, Sundaram K* (2000) Nestoronet: A progestin with a unique pharmacological profile. *Steroids* 65: 629–636.
[https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00119-7)
20. *Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille BL, Lye SJ* (2004) Progesterone and gravity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 70: 986–992.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023648>
21. *Chao T-C, Van Alten PJ, Greager JA, Walter RJ* (1995) Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cell Immunol* 160: 43–49.
[https://doi.org/10.1016/0008-8749\(95\)80007-6](https://doi.org/10.1016/0008-8749(95)80007-6)
22. *Valadez-Cosmes P, Germán-Castelán L, González-Arenas A, Velasco-Velázquez M, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I* (2015) Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 154: 176–185.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.08.006>
23. *St-Louis I, Singh M, Brasseur K, Leblanc V, Parent S, Asselin E* (2010) Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. *Reprod Biol Endocrinol* 8: 103.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-103>
24. *Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, Astle S, Thornton S, Peltoketo H, Lam EW-F, Gellersen B, Huhtaniemi I, Allen J, Brosens JJ.* (2005) Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J Endocrinol* 187: 89–101.
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06242>

A Study of the Role of Membrane Progesterone Receptors During Pregnancy and Labor in Rats

M. A. Vodopetova^a, A. D. Dmitrieva^a, I. S. Levina^b, I. A. Morozov^c, P. M. Rubtsov^c,
O. V. Smirnova^a, and T. A. Shchelkunova^{a,*}

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

^b*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^c*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: *Schelkunova-t@mail.ru*

Progesterone plays a major role in preparing the female body for and maintaining pregnancy. Classical nuclear progesterone receptors (nPRs) have been found in the female reproductive organs, through interaction with which progesterone exerts multiple effects in these tissues. Recently, membrane progesterone receptors (mPRs) have also been found in the uterus, placenta, ovaries, and mammary glands of humans and animals. It is assumed that these receptors fulfil important functions in the maintenance of pregnancy, in the initiation of labour. However, their role in these processes has not been studied. Earlier in our work, we identified two compounds that have affinity for mPRs of different subtypes but do not interact with nPRs. Their actions have been demonstrated in various cells but have not been studied *in vivo*. In this work, the main aim was to study the action of one of these steroids (LS-01) in a classical test for pregnancy maintenance in ovariectomised female rats and for stimulation of the labour process to identify the role of mPRs. To analyse the main targets of mPRs selective ligand action in utero, we examined the expression of all five mPRs subtypes as well as nPRs and the membrane component of the progesterone receptor (PGRMC1) before, during and after pregnancy termination. From this study, we did not detect an effect of LS-01 on either pregnancy maintenance or labour induction in rats. However, the study of progesterone receptor expression profile and correlations of this profile with serum sex steroid concentrations suggests a different role of membrane receptor subtypes: progesterone acting through mPR γ and nPRs may promote pregnancy maintenance, while acting through mPR β may promote labour initiation. To identify the functions of different subtypes of mPRs in reproduction and the fine regulation of this process, the search for ligands selective for each membrane receptor is necessary.

Keywords: nuclear progesterone receptors, membrane progesterone receptors, expression, regulation, pregnancy, labor, selective ligand