

УДК 577.15

РАЗРАБОТКА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА С ТИРЕОИДОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2022 г. А. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач¹, Е. А. Фокина¹, В. Н. Сорокоумов^{1,2}, И. О. Захарова¹, Л. В. Баюнова¹, А. О. Шпаков^{1,*}

Представлено академиком РАН Л. П. Филаретовой

Поступило 15.11.2021 г.

После доработки 03.12.2021 г.

Принято к публикации 03.12.2021 г.

Для нормализации тиреоидного статуса при гипотиреозе, вызванном резистентностью к тиреотропному гормону (ТТГ), могут быть использованы низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ТТГ. Синтезировано новое соединение этил-2-(4-(4-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-4-ил)фенил)-*НН*-1,2,3-триазол-1-ил) ацетат (ТРУЗ_m), которое стимулировало продукцию тироксина при введении крысам (25 мг/кг, в/б), а также повышало экспрессию тиреоидогенных генов в культуре тироцитов FRTL-5 (30 мкМ) и в щитовидной железе крыс. Обработка ТРУЗ_m *in vitro* и *in vivo* не приводила к снижению экспрессии гена рецептора ТТГ в тироцитах, восстанавливая ее в условиях гиперактивации рецептора гормоном. Этим обусловлено сохранение, а в ряде случаев и потенцирование тиреоидогенных эффектов ТТГ (FRTL-5) или тиролиберина (крысы) при их совместном введении с ТРУЗ_m. ТРУЗ_m является прототипом препарата для коррекции функций тиреоидной системы при субклиническом гипотиреозе.

Ключевые слова: рецептор тиреотропного гормона, аллостерический агонист, гипотиреоз, щитовидная железа, тиреоидный гормон

DOI: 10.31857/S2686738922020032

Основным регулятором синтеза тиреоидных гормонов — тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) в тироцитах, специализированных клетках щитовидной железы (ЩЖ), является тиреотропный гормон (ТТГ), секретлируемый аденогипофизом в ответ на стимуляцию тиролиберинем, гипоталамическим ТТГ-рилизинг-гормоном (ТРГ) [1]. ТТГ специфически связывается с локализованным на поверхности тироцитов G-белок-сопряженным рецептором ТТГ, активируя аденилатциклазный и фосфолипазный пути и усиливая экспрессию и активность белков, ответственных за синтез Т4 (тиреоглобулин, тиреопероксидаза, Na⁺/I⁻котранспортер) и его конверсию в Т3 (D2-дейодиназа) [2]. В случае мутаций в эктодоме

рецептора ТТГ, препятствующих его связыванию с гормоном, а также при воздействии на рецептор ТТГ инактивирующих аутоантител развивается резистентность ЩЖ к ТТГ, что ведет к субклиническому гипотиреозу [3, 4].

Одним из подходов для стимуляции рецептора ТТГ может стать применение аллостерических регуляторов с активностью полных агонистов [5, 6]. Их особенностью является способность стимулировать рецепторы гипофизарных гликопротеиновых гормонов, которые имеют инактивирующие мутации в эктодоме и потому не чувствительны к гормонам [5]. Ранее нами были разработаны пептидные аллостерические агонисты рецептора ТТГ, способные взаимодействовать с аллостерическим сайтом, сформированным цитоплазматическими петлями [7]. Однако, несмотря на активность в условиях *in vitro*, они имели ограничения в условиях *in vivo*, что было обусловлено их деградацией. Более перспективным является разработка более устойчивых гетероциклических соединений, способных проникать в аллостерический сайт, расположенный в трансмембранном домене рецептора ТТГ [5]. Нами на основе структуры тиено[2,3-*d*]-пиримиди-

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

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

на было разработано соединение TP48 с активностью аллостерического антагониста рецептора ТТГ, которое может быть использовано для нормализации тиреоидного статуса при аутоиммунном гипертиреозе [8]. Целью настоящего исследования было создать лиганд аллостерического сайта рецептора ТТГ, который, как и TP48, имеет тиено[2,3-*d*]-пиримидиновую структуру, но в отличие от него активирует рецептор ТТГ. Была поставлена задача изучить его влияние на генную экспрессию тироидогенных белков и рецептора ТТГ в культуре тироцитов и в условиях *in vivo* исследовать его влияние на базовый и стимулированный ТРГ тироидогенез у крыс.

Для синтеза этил-2-(4-(4-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-4-ил)фенил)-1*H*-1,2,3-триазол-1-ил) ацетата (TPY3m) использовали реакцию между 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(4-этинилфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-6-карбоксамидом и этил-2-азидоуксусной кислотой в присутствии медь-содержащих катализаторов. После очистки с помощью ВЭЖХ полученный продукт ($T_{пл}$ 218.1–218.6°C) был охарактеризован с помощью ¹H-ЯМР (“Bruker Avance III 400”, Германия) и масс-спектрометрии (“Bruker micrOTOF”, Германия). Спектр ¹H-ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*): δ 8.09–8.03 (m, 3H Ar phenyl + Ar triazol), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H Ar phenyl), 5.32 (s, 2H CArCH₂C(O)), 5.26 (m, 3H NH₂ + NH), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H CH₂ C(O)OEt), 2.69 (s, 3H MeS), 1.48 (s, 9H tBu), 1.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H CH₃ C(O)OEt). Масс-спектр (ESI+, 100 В, CH₃OH): найдено – 526.1695 [M+H]; рассчитано для C₂₄H₂₈N₇O₃S₂⁺ – 526.1690.

В экспериментах использовали 3–4-месячных крыс Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму и воде. Клеточную линию тироцитов FRTL-5 получали из “European Collection of Authenticated Cell Cultures”. Культивирование проводили в среде F-12 с добавлением 6 гормонов и ростовых факторов (F-12+6H): 1 мЕД/мл ТТГ (“Elabscience”, США) 10 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл рогового фактора печени, 10 нМ гидрокортизона (“Sigma”, США), 10 нг/мл соматостатина (“Tocris Bioscience”, Великобритания), 5 мкг/мл трансферрина (“Биолот”, Россия) [9]. Перед экспериментом клетки снимали с подложки, используя раствор трипсина-версена (1: 1), пересевали в полную ростовую среду F-12+6H (4.3 × 10⁴ клеток/0.25 мл среды/лунку), через 48 ч переводили в среду F-12+5H без ТТГ. Через 24 ч клетки инкубировали с 30 мкМ TPY3m, 6 мЕД/мл ТТГ или TPY3m+ТТГ. Через 6 ч оценивали экспрессию целевых генов.

В экспериментах *in vivo* TPY3m вводили крысам (25 мг/кг, в/в, в 200 мкл ДМСО). ТРГ (“Sigma”,

США) вводили интраназально в дозе 100 мкг/крысу, как описано ранее [10]. Контрольным крысам вместо TPY3m вводили ДМСО и вместо ТРГ физиологический раствор. ТРГ вводили через 30 мин после TPY3m. Формировали 4 группы (во всех *n* = 5) – контроль, группы с обработкой TPY3m, ТРГ и TPY3m+ТРГ. Образцы крови получали из хвостовой вены, используя анестезию 2%-ным раствором лидокаина, до введения и через 1.5 и 3 ч после введения ТРГ. Для определения уровней свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина использовали наборы фирмы “Иммунотех” (Россия).

Экспрессию генов в клетках FRTL-5 и ткани ЩЖ оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, для чего с помощью набора “Extract RNA” выделяли тотальную РНК, а обратную транскрипцию проводили с помощью набора “MMLV RT Kit” (“Евроген”, Россия). Смесь для амплификации содержала 10 нг ПЦР-продукта, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, а также реагент qPCRmix-HS SYBR+LowROX (“Евроген”, Россия). Детекцию сигнала осуществляли с помощью амплификатора “7500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Данные рассчитывали методом delta-delta C_t, используя в качестве референсных генов *18S rRNA* (18S-pРНК) и *Actb* (β-актин). Анализировали экспрессию тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*TPO*), Na⁺/I⁻ котранспортера (*Nis*), D2-дейодиназы (*Dio2*) и рецептора ТТГ (*TshR*).

Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007”, нормальность распределения проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения 4 групп – дисперсионный анализ с поправкой Тьюки. Данные представляли как $M \pm SEM$, значимыми считали различия при *p* < 0.05.

Добавление ТТГ и TPY3m в инкубационную среду после 24-часовой ТТГ-депривации приводило к повышению экспрессии гена *Nis* в клетках FRTL-5, причем эффект ТТГ был более выражен (рис. 1). ТТГ также повышал экспрессию гена *Tg* (рис. 1). При совместном воздействии отмечали усиление стимулирующего эффекта ТТГ на экспрессию гена *Tg* и сохранение эффекта гормона на экспрессию гена *Nis* (рис. 1). Тем самым TPY3m проявляет свойства агониста рецептора ТТГ и не препятствует эффектам ТТГ. Последнее обусловлено различной локализацией ортостерического сайта, с которым связывается ТТГ (эктодомен), и аллостерического сайта, с которым связываются низкомолекулярные регуляторы рецептора (трансмембранный домен) [11]. TPY3m слабо влиял на экспрессию *TshR*. ТТГ ее снижал,

что является результатом компенсаторного ответа клеток на ТТГ-индуцированную гиперактивацию рецептора и ранее было показано Saji M. et al. [12]. При совместном воздействии отмечали частичное восстановление экспрессии гена рецептора ТТГ (рис. 1).

Внутрибрюшинное введение крысам ТРУЗм через 2 ч повышало уровень тТ4, в то время как через 3.5 ч повышались уровни обеих форм Т4 (табл. 1). ТРГ был активнее и через 3 ч повышал уровни всех тиреоидных гормонов (табл. 1).

При совместном введении ТРГ и ТРУЗм стимуляция продукции тиреоидных гормонов повышалась. Через 3.5 ч повышение уровня обеих форм Т3 было большим, чем сумма приростов при введении ТРГ или ТРУЗм, что может указывать на потенцирующий эффект ТРУЗм на ТРГ-индуцированную стимуляцию продукции тТ3 и тТ3 (табл. 1). Содержание общего и свободного Т4 при совместном введении ТРГ или ТРУЗм было выше, чем при их раздельном введении, но потенцирующего эффекта в этом случае выявлено не было (табл. 1). Таким образом, по способности стимулировать продукцию тиреоидных гормонов у крыс ТРУЗм может быть отнесен к аллостерическим агонистам рецептора ТТГ.

Исследование генной экспрессии в ЩЖ показало, что ТРГ повышает экспрессию генов *Tg*, *TPO* и *Dio2* и снижает экспрессию гена рецептора ТТГ (рис. 2). ТРУЗм повышал экспрессию генов *TPO* и *Dio2*. При этом экспрессия гена *TshR* в группе с обработкой ТРУЗм не только не снижалась, но даже повышалась, хотя различия с контролем не были значимыми (рис. 2). Необходимо отметить, что тиено[2,3-d]-пиримидины с актив-

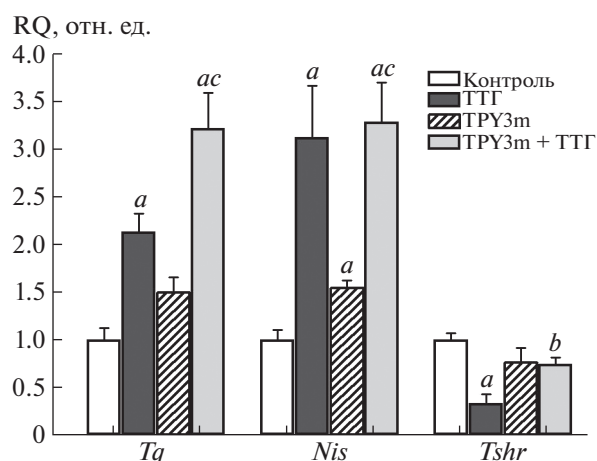


Рис. 1. Эффекты ТТГ и ТРУЗм на экспрессию генов тиреоглобулина (*Tg*), Na⁺/I⁻-котранспортера (*Nis*) и рецептора ТТГ (*Tshr*) в культуре тироцитов FRTL-5, предварительно инкубированных в среде без ТТГ. К – контроль, ТТГ, ТРУЗм и ТРУЗм+ТТГ – клетки, инкубированные с ТТГ (6 мЕД/мл), ТРУЗм (30 мкМ) и совместно ТТГ и ТРУЗм. Различия с К (a), с ТТГ (b) и между ТРУЗм и ТРУЗм+ТТГ (c) статистически значимы при *p* < 0.05. *M* ± *SEM*, *n* = 5.

ностью агонистов рецептора лютеинизирующего гормона, родственного рецептору ТТГ, также слабо влияют на экспрессию своего рецептора [13]. В условиях совместного воздействия стимулирующие эффекты ТРГ на экспрессию тиреоидогенных генов сохранялись, а в случае гена *Nis* эффект ТРГ усиливался (рис. 2). Наряду с этим исчезал ингибирующий эффект ТРГ на экспрессию гена *Tshr* (рис. 2). Мы полагаем, что восстановление экспрессии *Tshr* в группе ТРУЗм+ТРГ

Таблица 1. Стимулирующие эффекты тиролиберина и ТРУЗм совместно и по раздельности на уровни тиреоидных гормонов в крови крыс

Группа	тТ4, пМ	тТ4, нМ	тТ3, пМ	тТ3, нМ
<i>Через 2 ч после введения ТРУЗм и через 1.5 ч после введения ТРГ</i>				
Контроль	24.32 ± 1.51	47.86 ± 1.64	2.37 ± 0.13	2.59 ± 0.15
ТРГ	37.04 ± 0.75 ^a	68.66 ± 3.16 ^a	3.77 ± 0.21 ^a	3.23 ± 0.35
ТРУЗм	28.26 ± 1.54 ^b	55.54 ± 1.39 ^{a,b}	2.78 ± 0.14 ^b	2.89 ± 0.10
ТРУЗм+ТРГ	38.02 ± 0.97 ^{a,c}	75.48 ± 1.72 ^{a,c}	4.02 ± 0.16 ^{a,c}	3.34 ± 0.21
<i>Через 3.5 ч после введения ТРУЗм и через 3 ч после введения ТРГ</i>				
Контроль	23.00 ± 0.55	46.30 ± 1.04	2.28 ± 0.12	2.35 ± 0.11
ТРГ	33.06 ± 1.30 ^a	69.02 ± 1.29 ^a	3.30 ± 0.19 ^a	3.02 ± 0.13 ^a
ТРУЗм	28.76 ± 0.67 ^{a,b}	57.50 ± 3.08 ^{a,b}	2.82 ± 0.13	2.75 ± 0.17
ТРУЗм+ТРГ	39.04 ± 0.67 ^{a,b,c}	81.10 ± 1.31 ^{a,b,c}	4.94 ± 0.24 ^{a,b,c}	3.69 ± 0.13 ^{a,b,c}

Примечание. ТРУЗм (группы ТРУЗм и ТРУЗм+ТРГ) вводили в дозе 25 мг/кг (в/б), ТРГ (группы ТРГ и ТРУЗм+ТРГ) вводили на 30 мин позднее в дозе 100 мкг/крысу (интраназально). Различия с контролем (a), группой ТРГ (b) и между группами ТРУЗм и ТРУЗм+ТРГ (c) статистически значимы при *p* < 0.05. *M* ± *SEM*, *n* = 5.

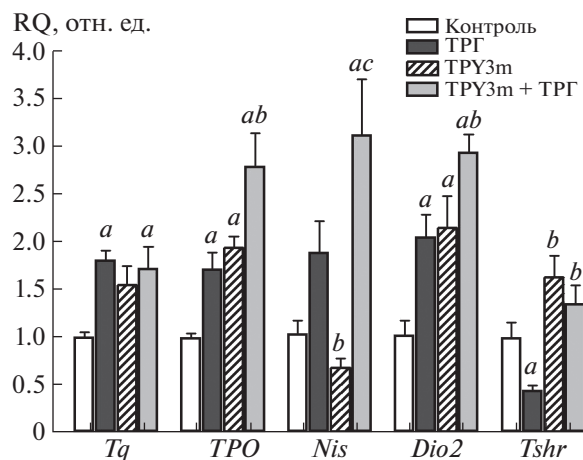


Рис. 2. Эффекты тиролиберина и ТРУ3м на экспрессию генов тиреоидогенных белков и рецептора ТТГ в щитовидной железе крыс. К – контроль; ТРГ, ТРУ3м и ТРУ3м+ТРГ – группы крыс, обработанные ТРГ (100 мкг/крысу, интраназально), ТРУ3м (25 мг/кг, в/б) и совместно ТРГ и ТРУ3м. Различия с контролем (a), группой ТРГ (b) и между группами ТРУ3м и ТРУ3м+ТРГ (c) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 5$.

по сравнению с группой ТРГ обеспечивает нормализацию чувствительности тироцитов к агонистам рецептора ТТГ. Частичное восстановление экспрессии *Tshr* в присутствии ТРУ3м было обнаружено нами и в культуре тироцитов (рис. 1). Тем самым потенцирующий эффект ТРУ3м на экспрессию *Tg* в культуре тироцитов FRTL-5 и на продукцию ТЗ и экспрессию *Nis* в ЩЖ крыс группы ТРУ3м+ТРГ может быть, по крайней мере, частично, обусловлен нормализацией экспрессии рецептора ТТГ и сохранением активности ТТГ-зависимых каскадов в условиях их гиперактивации ТТГ. Однако нельзя исключить того, что ТРУ3м может быть наделен не только активностью агониста, но и функционировать как положительный аллостерический модулятор (РАМ). Такую активность проявляет ряд лигандов аллостерического сайта G-белок-сопряженных рецепторов, обозначаемых как аго-РАМ [14, 15].

Таким образом, на основе тиено[2,3-d]-пиримидиновой структуры нами разработан новый аллостерический агонист рецептора ТТГ – ТРУ3м, который стимулировал продукцию тироксина при его в/б введении крысам, а также стимулировал экспрессию тиреоидогенных генов в клеточной культуре тироцитов FRTL-5 и ЩЖ крыс. ТРУ3м не вызывал снижения экспрессии гена рецептора ТТГ, а при совместном введении с ТТГ (FRTL-5) или ТРГ (ЩЖ) ее восстанавливал. Это, как мы полагаем, обуславливает сохранение, а в ряде случаев потенцирование эффектов ТТГ (FRTL-5) или ТРГ (крысы) на тиреоидогенез. ТРУ3м может рассматриваться как прототип препарата для коррекции тиреоидогенной функции

ЩЖ при субклиническом гипотиреозе, в том числе обусловленном резистентностью к ТТГ, а также для ускорения поглощения радиоактивного йода тироцитами при диагностике и радиотерапии рака ЩЖ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 19-75-20122). ЯМР и масс-спектрометрию осуществляли в ресурсных центрах СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования” и “Методы анализа состава веществ”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными соблюдали требования Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол № 9–1/2020 г.), Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ortiga-Carvalho T.M., Chiamolera M.I., Pazos-Moura C.C., Wondisford F.E. // *Compr. Physiol.* 2016. V. 6. P. 1387–1428.
2. Kleinau G., Worth C.L., Kreuchwig A. et al. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2017. V. 8. P. 86.
3. Persani L., Calebiro D., Cordella D. et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010. V. 322. P. 72–82.
4. Kahaly G.J., Diana T., Olivo P.D. // *Endocr. Pract.* 2020. V. 26. P. 97–106.
5. Neumann S., Gershengorn M.C. // *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 2011. V. 72. P. 74–76.
6. Krause G., Eckstein A., Schüle R. // *Eur. Thyroid J.* 2020. V. 9. P. 66–77.
7. Derkach K.V., Shpakova E.A., Titov A.M., Shpakov A.O. // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2015. V. 21. P. 249–260.
8. Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Sorokoumov V.N., Shpakov A.O. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 491. P. 77–80.
9. Kogai T., Endo T., Saito T. et al. // *Endocrinology*. 1997. V. 138. P. 2227–2232.
10. Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. // *Horm. Metab. Res.* 2015. V. 47. P. 916–924.
11. Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2015. V. 6. P. 142.
12. Saji M., Akamizu T., Sanchez M. et al. // *Endocrinology*. 1992. V. 130. P. 520–533.
13. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 7493.
14. Felder C.C. // *Adv. Pharmacol.* 2019. V. 86. P. 1–20.
15. Wu Y., Tong J., Ding K. et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019. V. 1163. P. 225–251.

DEVELOPMENT OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT ALLOSTERIC AGONIST OF THYROID-STIMULATING HORMONE RECEPTOR WITH THYROIDOGENIC ACTIVITY

A. A. Bakhtuykov^a, K. V. Derkach^a, E. A. Fokina^a, V. N. Sorokoumov^{a,b},
I. O. Zakharova^a, L. V. Bayunova^a, and A. O. Shpakov^{a,#}

^a*I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russian Federation*

^b*Institute of Chemistry, Saint Petersburg State University, St.-Petersburg, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS L.P. Filaretova

To normalize the thyroid status in hypothyroidism caused by resistance to thyroid-stimulating hormone (TSH), low-molecular-weight allosteric agonists of TSH receptor can be used. A new compound ethyl-2-(4-(4-(5-amino-6-(*tert*-butylcarbamoyl)-2-(methylthio)thieno[2,3-*d*]-pyrimidine-4-yl)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl) acetate (TPY3m), which stimulated the production of thyroxine when administered to rats (25 mg/kg, i.p.), and also increased the expression of thyroidogenic genes in the cultured FRTL-5 thyrocytes (30 μM) and the rat thyroid gland. The *in vitro* and *in vivo* treatment with TPY3m did not lead to a decrease in the expression of the TSH receptor gene in thyrocytes, restoring it under the conditions of receptor hyperactivation by the hormone. This is due to the preservation and, in some cases, the potentiation of the thyroidogenic effects of TSH (FRTL-5) or thyroliberin (rats) when they are co-administered with TPY3m. TPY3m is a prototype drug for correcting thyroid system functions in subclinical hypothyroidism.

Keywords: receptor of thyroid stimulating hormone, allosteric agonist, hypothyroidism, thyroid gland, thyroid hormone