

УДК 577.17

ТИЕНОПИРИМИДИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СПЕЦИФИЧНО АКТИВИРУЮТ СТЕРОИДОГЕНЕЗ В СЕМЕННИКАХ, НО НЕ ВЛИЯЮТ НА ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2019 г. А. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач¹, Д. В. Дарьин², А. О. Шпаков^{1,*}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 27.02.2018 г.

После доработки 07.08.2018 г.

Принята к публикации 15.08.2018 г.

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), специфически связываясь с внеклеточным доменом рецептора ЛГ/ХГЧ, стимулируют продукцию тестостерона (Т) клетками Лейдига. Рецептор ЛГ/ХГЧ может быть также активирован низкомолекулярными агонистами (НМА), которые связываются с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном канале рецептора. Аллостерические сайты в рецепторах ЛГ/ХГЧ и тиреотропного гормона (ТТГ) сходны по структуре, вследствие чего НМА рецептора ЛГ/ХГЧ могут влиять на активность рецептора ТТГ и зависимый от него синтез тиреоидных гормонов. При разработке селективных активаторов стероидогенеза необходимо исключить такую возможность. Цель работы состояла в изучении влияния семи ранее синтезированных тиенопиримидиновых производных (ТП), НМА рецептора ЛГ/ХГЧ, на базальную и стимулированную ХГЧ и ТТГ активность аденилатциклазы (АЦ) в плазматических мембранах, выделенных из семенников и щитовидной железы крыс, а также на базальные и стимулированные люлиберин- и тиролиберин-ом уровни Т и тиреоидных гормонов при внутрибрюшинном введении ТП самцам крыс. Все ТП (10^{-4} М) повышали базальную активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс, а при совместном действии ТП и ХГЧ их стимулирующие эффекты были аддитивными. ТП не влияли на базальную и стимулированную ТТГ активность АЦ в тироидальных мембранах. При введении самцам крыс ТП (25 мг/кг, внутрибрюшинно) повышали уровень Т. Эффект ТР03, наиболее активного НМА рецептора ЛГ/ХГЧ, сохранялся в условиях активации гонадной оси люлиберин-ом. При этом ТП не влияли на базальные и стимулированные тиролиберин-ом уровни тироксина и трийодтиронина. Исключение составило соединение ТР21, которое влияло, хотя и в небольшой степени, на активность рецептора ТТГ и уровни тиреоидных гормонов. В никотинамидной части ТР21, в отличие от структурно близкого ТР03, имеется дополнительная метоксигруппа, что и меняет его рецепторную специфичность. Таким образом, за исключением ТР21, все ТП с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ в условиях *in vitro* и *in vivo* не влияют на рецептор ТТГ, что указывает на селективность их действия в отношении гонадной оси.

Ключевые слова: тиенопиримидин, рецептор лютеинизирующего гормона, рецептор тиреотропного гормона, тиреоидные гормоны, тестостерон

DOI: 10.1134/S0044452919010030

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшими регуляторами функций репродуктивной системы являются лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его структурный и функциональный гомолог хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), которые специфично связываются с рецепторами ЛГ/ХГЧ. Вызываемая ЛГ и ХГЧ активация этих рецепторов в клетках Лейдига приводит к стимуляции стероидогенеза и продукции тестостерона (Т), что обеспечивает нормальный уровень андрогенов в организме мужчин. У женщин ЛГ и ХГЧ через посредство рецепторов ЛГ/ХГЧ стимулируют

стероидогенез в клетках теки и гранулезы яичников, повышая продукцию андростендиона и прогестерона, а также индуцируют овуляцию и формирование желтого тела. ЛГ и ХГЧ применяются у мужчин для нормализации уровня Т при андрогенной недостаточности и у женщин для контролируемой индукции овуляции при ослаблении функций яичников [1, 2]. Однако применение гонадотропинов сопряжено с рядом побочных эффектов, которые обусловлены гиперактивацией рецепторов ЛГ/ХГЧ и нижележащих сигнальных каскадов и быстрым развитием резистентности к ним тка-

ней-мишеней. Необходимо также отметить, что природные формы ЛГ и ХГЧ гетерогенны по составу, а используемые в клинике рекомбинантные формы сильно отличаются от природных гормонов по N-гликозилированию, что приводит к изменению их активности и селективности действия [3, 4]. Вследствие этого ведется поиск новых агонистов рецепторов ЛГ/ХГЧ, среди которых наибольший интерес представляют низкомолекулярные соединения со структурой тиенопиримидиновых производных (ТП). Нами и другими авторами показано, что ТП дозозависимо стимулируют стероидогенез в клетках яичников и семенников, действуя как агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ [5–11]. Однако в отличие от гонадотропинов, которые с высоким сродством связываются со значительным по размеру внеклеточным доменом рецептора ЛГ/ХГЧ, ТП проникают внутрь трансмембранного канала, образованного семью трансмембранными участками рецептора, и специфично связываются с расположенным там аллостерическим сайтом. Следует отметить, что при активации рецептора ЛГ/ХГЧ гонадотропином аллостерический сайт остается свободным.

Молекулярное моделирование рецепторов гипофизарных гликопротеиновых гормонов показало, что аллостерический сайт, расположенный в трансмембранном канале рецептора ЛГ/ХГЧ, структурно близок таковому в рецепторе тиреотропного гормона (ТТГ) [12, 13]. Активность рецепторов ТТГ, расположенных в тироцитах щитовидной железы (ЩЖ), стимулируется при их связывании с ТТГ, следствием чего является повышение продукции тиреоидных гормонов — тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). Поиск регуляторов рецептора ТТГ привел к разработке его низкомолекулярных агонистов и антагонистов, причем, как и в случае рецептора ЛГ/ХГЧ, наибольшую активность продемонстрировали ТП [14–16]. Это, как полагают, обусловлено сходством аллостерических сайтов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ. Но имеется одно существенное различие. Вход в трансмембранный канал рецептора ТТГ обогащен гидрофобными аминокислотными остатками, в то время как вход в трансмембранный канал рецептора ЛГ/ХГЧ более гидрофилен и содержит отрицательно заряженные аминокислотные остатки. Вследствие этого ТП, лиганды рецептора ТТГ характеризуются большей гидрофобностью в сравнении с ТП, лигандами рецептора ЛГ/ХГЧ [13]. Сходство структур аллостерических сайтов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ ставит задачу оценить способность ТП, агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, влиять на тиреоидную ось и на активность рецепторов ТТГ [17].

Нами ранее были синтезированы и изучены семь ТП — ТР01, ТР02, ТР03, ТР04, ТР21, ТР22 и ТР23, которые в условиях *in vitro* в клетках Лейдига стимулировали аденилатциклазу (АЦ), ответственную за активацию стероидогенеза, и при различ-

ных способах введения самцам крыс повышали у них продукцию Т [9–11, 18, 19]. Однако влияние ТП на рецептор ТТГ и продукцию тиреоидных гормонов не изучалось. Не были сопоставлены эффекты ТП на активность гонадной и тиреоидной осей, что совершенно необходимо для оценки селективности их действия. Цель работы состояла в изучении влияния ТП на базальную и стимулированную гормонами (ХГЧ, ТТГ) активность АЦ в плазматических мембранах, выделенных из семенников и ЩЖ крыс, а также на базальные и стимулированные рилизинг-факторами (люлиберин и тиролиберин) уровни Т и тиреоидных гормонов при внутрибрюшинном (в/б) введении ТП самцам крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Синтез ТП — 5-амино-N-(*m*pet-бутил)-4-(3-(изоникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено-[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР01), 5-амино-N-(*m*pet-бутил)-2-(метилтио)-4-(3-(тиофен-3-карбоксамидо)фенил)-тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР02), 5-амино-N-*m*pet-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР03), 5-амино-N-*m*pet-бутил-4-(3-(1-метил-1*H*-пиразол-4-карбоксамидо)фенил)-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР04), 5-амино-N-(*m*pet-бутил)-4-(3-(2-метоксиникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР21), 4-((3-(5-амино-6-(*m*pet-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)фенил)карбамоил)пиримидин-1-оксида (ТР22) и 5-амино-N-(*m*pet-бутил)-4-(3-(2-хлорникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР23) проводили, как описано ранее [9–11, 20], осуществляя взаимодействие 5-амино-4-(3-аминофенил)-N-*m*pet-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида с ацилирующими агентами, несущими целевой заместитель. Реакцию проводили в присутствии 1-[бис(диметиламино)метил]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксид гексафторфосфата (HATU) и *N,N*-диизопропилэтиламина в *N,N*-диметилформамиде. Все реагенты, используемые при синтезе ТП, были получены из фирмы “Sigma” (США). Структуру ТП подтверждали с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии (спектрометр Bruker Avance III 400, “Bruker”, Германия) и масс-спектрометрии высокого разрешения (electrospray ionization — time of flight, ESI-TOF, спектрометр micrOTOF, “Bruker”, Германия). ХГЧ был произведен Московским эндокринологическим заводом (Россия). Люлиберин, тиролиберин, ТТГ из гипофиза быка, креатинфосфат, кретинфосфокиназа из мышц кролика, цАМФ, АТФ были получены из фирмы “Sigma” (США).

Для экспериментов использовали трехмесячных самцов крыс Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Этическим Комитетом ИЭФБ РАН, и правилами и требованиями, изложенными в документах "European Communities Council Directive 1986" (86/609/EEC) и "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". ТП растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вводили крысам (в/б, 25 мг/кг). Контрольным животным вводили ДМСО в том же объеме. Уровни Т и тиреоидных гормонов измеряли через 1 и 3 ч после введения препаратов. Кровь для определения гормонов получали из хвостовой вены, используя местный наркоз с помощью анестезии 2%-ным лидокаином (2–4 мг/кг). Уровень Т определяли, используя наборы "Тестостерон-ИФА" ("Алкор-Био", Россия). Определение концентрации свободного тироксина (tT_4), общего тироксина (tT_4) и общего трийодтиронина (tT_3) проводили с помощью наборов "ИФА-СвТ₄-1", "ИФА-ТТ₄-1" и "ИФА-ТТ₃-1" (ЗАО "НВО Иммунотех", Россия), как описано ранее [21]. Все измерения проводили на спектрофотометре Anthos Absorbance Reader 2020 ("Anthos Labtec Instruments", Австрия).

Люлибериновый и тиролибериновый тесты использовали для оценки влияния ТР03, наиболее активного ТП, на продукцию Т и тиреоидных гормонов. Люлибериновый тест проводили путем интраназального (и/н) введения самцам крыс люлиберина в дозе 10 пг/крысу в 20 мкл физиологического раствора. При проведении тиролиберинового теста тиролиберин вводили интраназально в дозе 300 мкг/кг в 20 мкл физиологического раствора, как описано ранее [22]. Соединение ТР03 (в ДМСО) вводили (в/б, 25 мг/кг) за 30 мин до тиролиберина. Изучали 4 группы животных (в каждой $n = 4$): контроль (вводили ДМСО, в/б, и физиологический раствор, и/н), "Тир" (вводили ДМСО, в/б, и тиролиберин, и/н), "ТР03" (вводили ТР03, в/б, и физиологический раствор, и/н) и "Тир + ТР03" (вводили последовательно ТР03, в/б, и тиролиберин, и/н). Образцы крови отбирали через определенные промежутки времени после введения ТР03 и измеряли в них уровень гормонов.

Выделение фракций тестикулярных и тироидальных мембран из семенников и ЩЖ крыс для определения активности АЦ проводили, как описано ранее [10, 23]. Животных ($n = 6$) декапитировали в условиях анестезии и удаляли у них семенники и ЩЖ. Ткани промывали охлажденным до 4°C 40 mM Tris-HCl-буфером (pH 7.4), содержащим 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) сахарозу и ингибиторы протеаз — 500 мкМ *O*-фенантролина, 2 мкМ пепстатина и 1 mM фенилметилсульфонилфторида (буфер А), затем измельчали и гомогенизировали с помощью Политрона в 10 объемах буфера А. Гомогенат

ткани семенников центрифугировали при $1500 \times g$ в течение 10 мин, после чего супернатант центрифугировали при $20000 \times g$ в течение 30 мин. Гомогенат ткани ЩЖ центрифугировали при 500 g в течение 15 мин, осадок отбрасывали, а полученный супернатант центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Активность АЦ определяли, как описано ранее [24]. Инкубацию мембран с реакционной смесью проводили при 37°C в течение 12 мин. Инкубационная смесь содержала 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM цАМФ, 1 mM АТФ, 37 КБк [α -³²P]-АТФ, 20 mM креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 50–100 мкг мембранного белка. Для определения активности АЦ использовали [α -³²P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (Всероссийское объединение "Изотоп", Россия). Активность АЦ оценивали по количеству цАМФ, который получался в ходе ферментативной реакции, и выражали в пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка. Базальная активность фермента измерялась в отсутствие гормонов и ТП.

Для статистического анализа использовали дисперсионный анализ ANOVA, данные обрабатывали с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics. Каждый эксперимент выполняли не менее трех раз. Данные представлены в виде средних величин и их среднестатистических ошибок из нескольких независимых экспериментов. Различия оценивали как достоверные при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все изученные ТП в концентрации 10^{-4} М повышали базальную активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс, хотя по эффективности и уступали ХГЧ, демонстрирующего сходный эффект уже в концентрации 10^{-9} М (табл. 1). Наиболее эффективными были ТР03 и ТР23. Вызываемые ими приросты активности АЦ над базальной активностью фермента составили 53 и 44 пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка соответственно. В мембранах, выделенных из ЩЖ крыс, где рецепторы ЛГ/ХГЧ отсутствуют, все ТП, за исключением ТР21, не влияли на активность АЦ. Следует, однако, отметить, что эффект ТР21 был выражен в незначительной степени и составил всего 6% от стимулирующего эффекта ТТГ (10^{-9} М). На следующем этапе для оценки возможного ингибирующего эффекта ТП на рецепторы ЛГ/ХГЧ и ТТГ изучали влияние ТП на активность АЦ, стимулированную гипофизарными гормонами. В тестикулярных мембранах, преинкубированных в течение 5 мин с ТП, отмечали повышение стимулирующего АЦ эффекта ХГЧ, добавленного в концентрации 10^{-9} М. Это указывает на аддитивность эффектов ТП и ХГЧ, что обусловлено различиями в сайтах их связывания с рецептором ЛГ/ХГЧ. Во всех случаях, кроме ТР21 и ТР22, вли-

Таблица 1. Влияние тиенопиримидиновых производных и гипофизарных гликопротеиновых гормонов на базальную активность аденилатциклазы в мембранах, выделенных из семенников и щитовидной железы крыс

Соединение	Тестикулярные мембраны	Тироидальные мембраны
	Активность АЦ, пмоль цАМФ/мин/мг мембранного белка, $M \pm SD$	
Базальная активность	23 ± 4	19 ± 3
ТР01, 10^{-4} М	$48 \pm 4^*$	22 ± 3
ТР02, 10^{-4} М	$53 \pm 6^*$	23 ± 3
ТР03, 10^{-4} М	$76 \pm 4^*$	24 ± 4
ТР04, 10^{-4} М	$54 \pm 2^*$	23 ± 2
ТР21, 10^{-4} М	$44 \pm 3^*$	$28 \pm 3^*$
ТР22, 10^{-4} М	$41 \pm 2^*$	17 ± 2
ТР23, 10^{-4} М	$67 \pm 5^*$	23 ± 3
ХГЧ, 10^{-9} М	$137 \pm 7^*$	24 ± 4
ТТГ, 10^{-9} М	25 ± 3	$166 \pm 8^*$

Примечание. * — различия между базальной и стимулированной ТП или гормонами активностью АЦ статистически значимы при $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние тиенопиримидиновых производных и ХГЧ на уровень тестостерона через 1 и 3 ч после их введения крысам

Соединение	Прирост уровня тестостерона, нмоль/л, $M \pm SD$	
	Через 1 ч	Через 3 ч
ТР01, 25 мг/кг	20.3 ± 6.7	33.6 ± 10.2
ТР03, 25 мг/кг	34.5 ± 9.2	101.8 ± 22.3
ТР04, 25 мг/кг	36.6 ± 10.5	71.9 ± 18.7
ТР21, 25 мг/кг	23.3 ± 7.4	19.7 ± 6.6
ТР22, 25 мг/кг	19.2 ± 6.8	14.0 ± 8.3
ТР23, 25 мг/кг	38.4 ± 10.3	26.7 ± 7.4
ХГЧ, 100 МЕ/крысу	87.4 ± 12.3	143.5 ± 29.2

яние которых на базальную активность АЦ было выражено слабо, различие стимулирующих эффектов ХГЧ и его комбинации с ТП было статистически значимым (рис. 1). В тироидальных мембранах, преинкубированных с ТП, стимулирующий эффект ТТГ (10^{-9} М) не отличался от такового в контроле, за исключением небольшого его снижения в случае ТР02 и ТР21 (рис. 1). Таким образом, за исключением ТР02 и ТР21, все выбранные для исследования ТП в концентрации, в которой достигался их максимальный стимулирующий эффект на активность АЦ в тестикулярных мембранах, практически не влияли на базальную и стимулированную ТТГ активность АЦ в тироидальных мембранах.

Введение ТП самцам крыс (в/б, 25 мг/кг) уже через 1 ч приводило к достоверному повышению уровня Т, причем в дальнейшем, через 3 ч, этот эффект для ТР01, ТР03 и ТР04 усиливался, подобно тому, как это происходило при введении ХГЧ (табл. 2). Показано, что при введении соединений ТР03 и ТР04 через 3 ч прирост уровня Т был сопоставим с таковым ХГЧ. В то же время стимулирующий эффект ТР23 на уровень Т через 3 ч снижался на 30%, что, как можно полагать, обусловлено его деградацией в кровотоке. Необходимо отметить, что активное в условиях *in vitro* соединение ТР02 не влияло на уровень Т при внутрибрюшинном введении и было исключено из дальнейшего исследования.

С целью показать аддитивность эффектов ТП и гонадотропинов в условиях *in vivo* использовали люлибериновый тест, для чего самцам крыс интраназально вводили люлиберин (10 пг/крысу), рилизинг-фактор ЛГ. Через 30 мин после введения люлиберина прирост уровня Т в крови крыс составил 41 нмоль/л, но в дальнейшем снижался и через 150 мин составил 19 нмоль/л (рис. 2). При обработке крыс соединением ТР03 (в/б, 25 мг/кг) уровень Т нарастал во времени — через 3 ч прирост концентрации Т составил 85 нмоль/л и был в три раза выше такового через 1 ч после введения ТР03. У крыс, которым сначала вводили ТР03 и через 30 мин люлиберин, отмечали аддитивность эффектов ТП и эндогенного ЛГ, секретируемого гонадотрофами гипофиза в ответ на введение люлиберина. Аддитивность, которая в интервале от 30 до 150 мин составила 86–89%, рассчитывали как отношение прироста Т при совместном введении ТР03 и люлиберина к сумме приростов Т, вызванных ТР03 и люлиберином по отдельности (все расчеты проводили относительно концентрации Т в контроле). При этом как стимулирующий продукцию Т эффект люлиберина, так и его эффект на фоне стимуляции ТР03 со временем снижались, что, вероятно, связано с десенситизацией части рецепторов ЛГ/ХГЧ при действии на них эндогенного ЛГ.

Все изученные ТП, за исключением ТР21, не влияли на уровни fT4, tT4 и tT3 как через 1 ч, так и через 3 ч после введения крысам (данные не представлены). Соединение ТР21 повышало уровни тиреоидных гормонов в очень небольшой степени (рис. 3). Интраназальное введение крысам тиролиберина (300 мкг/кг), рилизинг-фактора ТТГ, вызывало повышение уровня тиреоидных гормонов. В случае тироксина (fT4 и tT4) достоверное повышение уровня гормона отмечали через 1 ч, в то время как повышение уровня трийодтиронина (tT3) запаздывало, что связано с необходимостью конвер-

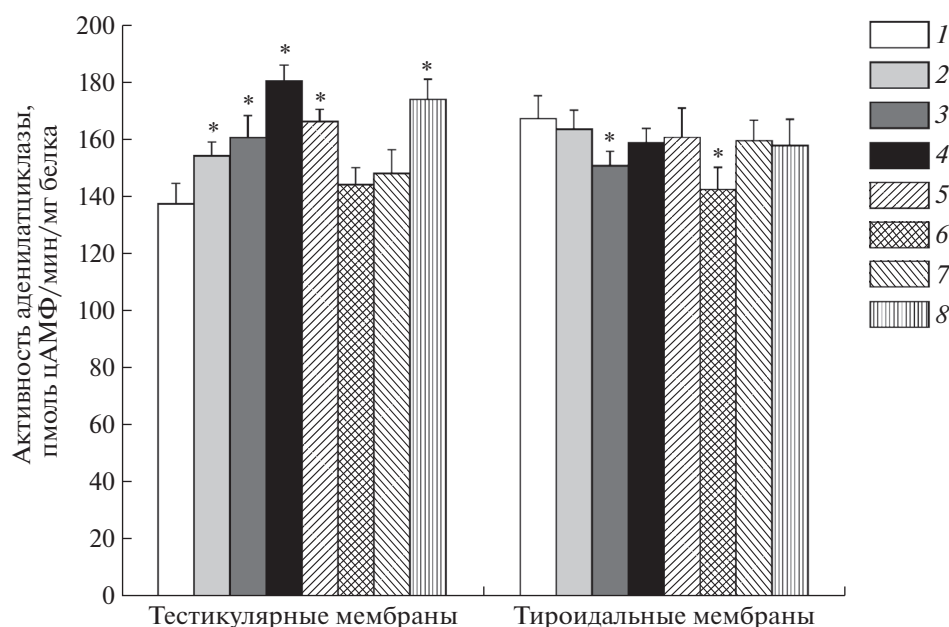


Рис. 1. Влияние тиенопиримидиновых производных на стимулирующие аденилатциклазу эффекты ХГЧ в тестикулярных мембранах и ТТГ в мембранах, выделенных из щитовидной железы крыс. 1 – ХГЧ или ТТГ (10^{-9} М), 2 – гормон + TP01, 3 – гормон + TP02, 4 – гормон + TP03, 5 – гормон + TP04, 6 – гормон + TP21, 7 – гормон + TP22, 8 – гормон + TP23. Мембраны преинкубировали с ТП (10^{-4} М) в течение 5 мин ($+4^{\circ}\text{C}$) перед добавлением ХГЧ или ТТГ (10^{-9} М). Данные представлены, как $M \pm SD$, $n = 6$. * – различия между активностью АЦ, стимулированной гормоном в отсутствие ТП, и активностью АЦ, стимулированной гормоном в мембранах, преинкубированных с ТП, статистически значимы при $p < 0.05$.

сии Т4 в Т3 (рис. 3). Для оценки способности ТП подавлять стимулирующие эффекты эндогенного ТТГ на продукцию тиреоидных гормонов, было изучено совместное действие TP03 и тиролиберина. Стимулирующий эффект тиролиберина на уровне тиреоидных гормонов у крыс, предварительно обработанных TP03, не менялся (рис. 4). Это исключает возможность ингибирующего влияния TP03 на рецептор ТТГ в ЩЖ, что согласуется с данными экспериментов *in vitro*. Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что в условиях *in vivo*, за исключением TP21, все изученные ТП с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ не влияют на рецептор ТТГ и продукцию тиреоидных гормонов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на существенные различия внеклеточных доменов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ, их аллостерические сайты, локализованные в трансмембранных каналах, характеризуются значительным сходством структуры. Это обуславливает возможность активации аллостерического сайта рецептора ТТГ низкомолекулярным агонистом рецептора ЛГ/ХГЧ. Доказательства в пользу структурного сходства аллостерических сайтов рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ были получены при исследовании соединения Org 41841, агониста рецептора ЛГ/ХГЧ, относящегося к ТП. Было показано, что Org 41841, а также некоторые его аналоги способны

активировать, хотя и с очень низкой эффективностью, рецептор ТТГ [6, 14]. В дальнейшем на основе анализа данных по связыванию низкомолеку-

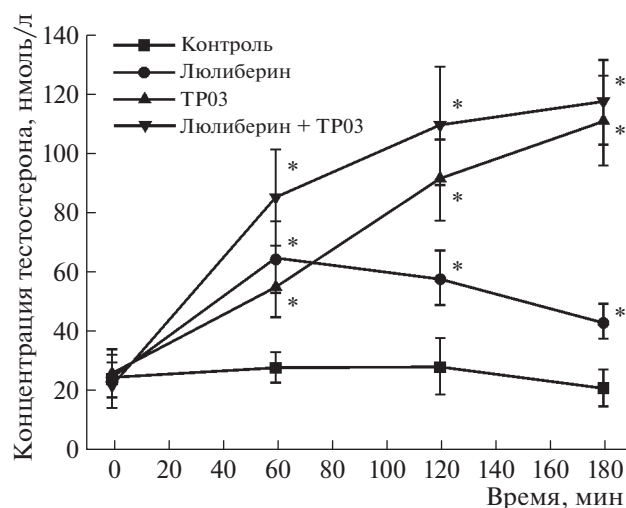


Рис. 2. Стимулирующее влияние TP03 и люлиберина на уровень тестостерона при их введении самцам крыс по отдельности и совместно. Соединение TP03 вводили внутривенно в дозе 25 мг/кг (в ДМСО), люлиберин – интраназально в дозе 10 пг/крысу в физиологическом растворе. Введение люлиберина осуществляли через 30 мин после введения TP03. Время отсчитывали с момента введения TP03. Во всех экспериментах $n = 4$. Данные представлены, как $M \pm SD$. * – различия между контролем и группами, обработанными люлиберином и ТП, статистически значимы при $p < 0.05$.

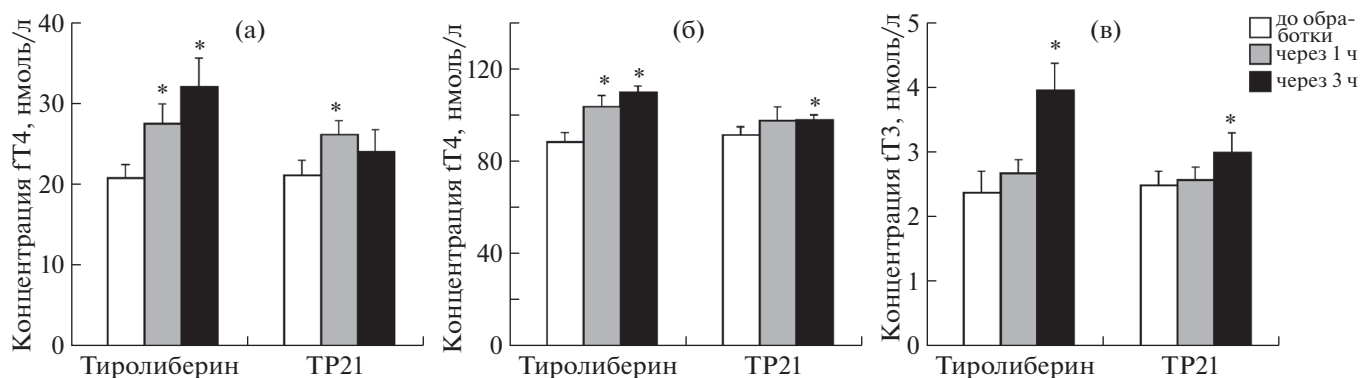


Рис. 3. Влияние тиролиберина и TP21 на уровни свободного (а) и общего тироксина (б) и на уровень общего трийодтиронина (в) через 1 и 3 ч после их введения крысам. 1 – тиролиберин, 2 – TP21. Тиролиберин вводили интраназально в дозе 300 мкг/кг (в физиологическом растворе), TP21 – внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг (в ДМСО). Во всех экспериментах $n = 4$. Данные представлены, как $M \pm SD$. * – различия между уровнями тиреоидных гормонов до и через 1 и 3 ч после обработки статистически значимы при $p < 0.05$.

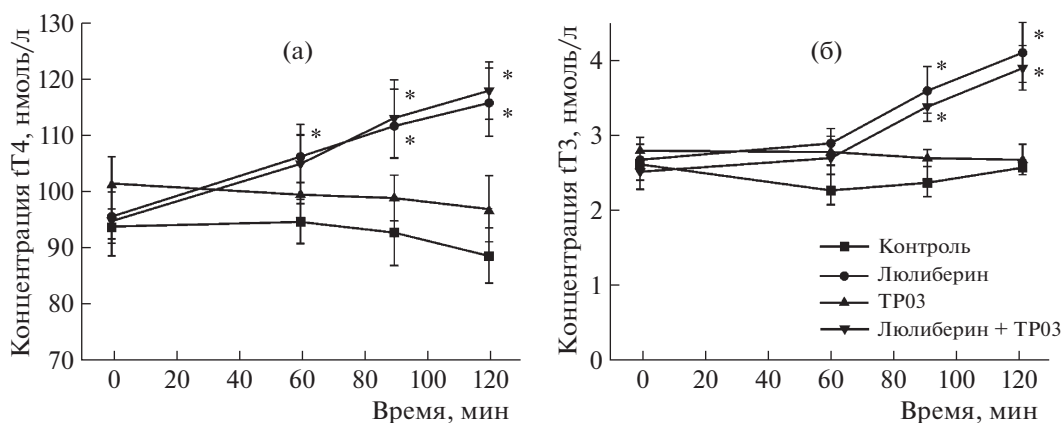


Рис. 4. Влияние TP03 на стимулированные тиролиберином уровни общего тироксина (а) и общего трийодтиронина (б) у самцов крыс. TP03 вводили внутрибрюшинно (25 мг/кг), тиролиберин – интраназально (300 мкг/кг). Введение тиролиберина осуществляли через 30 мин после введения TP03. Данные представлены, как $M \pm SD$, $n = 4$. * – различия между контролем и группами, обработанными тиролиберином и ТП, статистически значимы при $p < 0.05$.

лярных лигандов с аллостерическим сайтом рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ и данных по активности химерных рецепторов, трансмембранные каналы которых включали комбинации трансмембранных участков рецепторов ЛГ/ХГЧ и ТТГ, с помощью молекулярного докинга была установлена структура аллостерического сайта рецептора ТТГ [12, 13].

“Капсула” аллостерического сайта рецептора ТТГ сформирована внутренней поверхностью трансмембранных участков III–VII и сверху прикрыта сегментами второй и третьей внеклеточных петель. В отличие от рецептора ЛГ/ХГЧ, внешний вход в аллостерический сайт рецептора ТТГ более узкий и гидрофобный. Это обусловлено тем, что в его формировании принимают участие аминокислотные остатки со значительными по объему гидрофобными радикалами, которые расположены в интерфейсах между внеклеточными петлями и

трансмембранными участками IV–VI [12]. После установления структуры аллостерического сайта рецептора ТТГ были разработаны различные по химической природе его агонисты и антагонисты, в том числе на основе гетероциклов тиенопиридинового ряда [14–16, 25]. В отличие от агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, ТП с активностью агонистов и антагонистов рецептора ТТГ имеют в структуре менее объемные, гидрофобные заместители, что обеспечивает им эффективное проникновение в трансмембранный канал рецептора ТТГ. Так присоединение метоксипропиленовой группы в *пара*-положение фенильного радикала приводит к более гидрофобному ТП – *N*-*трет*-бутил-5-амино-4-(4-(3-метокси-проп-1-енил)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксимида (NIDDK/CEB-52), который является селективным антагонистом рецептора ТТГ и теряет способность связываться с рецептором ЛГ/ХГЧ [14].

Все синтезированные нами ТП имеют значительные по размеру заместители в *мета*-положении фенильного радикала, которые характеризуются наличием полярных групп, что важно для эффективного взаимодействия с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ/ХГЧ и наряду с этим снижает возможность их взаимодействия с рецептором ТТГ. В задачи работы входило провести сравнительное изучение регуляторных эффектов разработанных нами ТП в условиях *in vitro* и *in vivo* на рецепторы ЛГ/ХГЧ и систему стероидогенеза, а также исследовать возможное их влияние на рецепторы ТТГ и синтез тиреоидных гормонов. В экспериментах *in vitro* было показано, что в тех концентрациях, в которых ТП стимулируют базальную активность АЦ в тестикулярных мембранах, действуя на рецепторы ЛГ/ХГЧ, они практически не влияют на активность АЦ в тироидальных мембранах, что указывает на отсутствие их стимулирующего эффекта на рецепторы ТТГ. В условиях *in vivo* ТП в дозах, в которых они повышали уровень Т при введении самцам крыс, практически не влияли на уровни тиреоидных гормонов, что указывает на отсутствие их стимулирующего влияния на тиреоидную систему. ТП почти не влияли на стимулированную ТТГ активность фермента в мембранах ЩЖ в условиях *in vitro*, и на уровни тиреоидных гормонов в условиях стимуляции тиролиберинном тиреоидной оси у крыс в условиях *in vivo*, что указывает на отсутствие у ТП антагонистической активности по отношению к рецептору ТТГ. Полученные данные позволяют прийти к выводу, что разработанные нами высокоактивные агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ на основе ТП не взаимодействуют с аллостерическим сайтом рецептора ТТГ.

Некоторая активность по отношению к рецептору ТТГ была присуща только соединению ТР21, которое в тироидальных мембранах повышало, хотя и в небольшой степени, базальную активность АЦ и снижало ТТГ-стимулированную активность фермента. Мы полагаем, что это связано с присутствием метоксигруппы во втором положении пиридинового кольца никотинамидного остатка, который присоединен к фенильному кольцу ТР21 [20]. В молекуле соединения ТР03 такая группа отсутствует, и он не влияет на рецептор ТТГ и продукцию тиреоидных гормонов.

При совместном применении ТП и гонадотропинов отмечали аддитивность их стимулирующего эффекта на стероидогенез, что было продемонстрировано как в условиях *in vitro*, когда стимулирующий эффект ХГЧ на активность АЦ в тестикулярных мембранах повышался в присутствии ТП, так и в условиях *in vivo*, когда на фоне активации гонадной оси люлиберинном, стероидогенный эффект ТР03 сохранялся. Полученные данные являются первым доказательством того, что при совместном действии гонадотропинов и

низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ их стероидогенные эффекты не только сохраняются, но и частично суммируются. Причиной такой аддитивности является то, что гонадотропины не конкурируют с ТП за места связывания с рецепторами ЛГ/ХГЧ, расположенными на клетках Лейдига.

Необходимо отметить, что при повышении длительности активации люлиберинном гонадной оси как в присутствии, так и в отсутствие ТР03 стимулирующий продукцию Т эффект люлиберина снижался, что, как мы полагаем, обусловлено снижением числа функционально активных рецепторов ЛГ/ХГЧ. Действительно, при гиперактивации рецепторов ЛГ/ХГЧ эндогенными гонадотропинами в условиях стимуляции их секреции люлиберинном в клетках Лейдига запускаются β -аррестиновые сигнальные пути, что ведет к эндоцитозу и деградации рецепторных молекул и неизбежно снижает чувствительность клеток Лейдига к агонистам рецепторов ЛГ/ХГЧ [26, 27]. В этой связи необходимо отметить, что ТР03-индуцируемая стимуляция стероидогенеза, напротив, возрастала, хотя мишенью в этом случае также были рецепторы ЛГ/ХГЧ. Одним из объяснений этого может быть способность ТП проникать через плазматическую мембрану и взаимодействовать с расположенными там молекулами рецепторов, вызывая их внутриклеточную активацию [28]. Однако этот механизм требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

ЯМР и масс-спектрометрические исследования ТП проведены с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования” и “Методы анализа состава вещества”, изучение активности АЦ и определение уровня гормонов выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 16-04-00126) и частичной поддержке государственного задания АААА-А18-118012290427-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cole L.A. hCG, the wonder of today's science // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012. V. 10. P. 24.
2. La Vignera S., Condorelli R.A., Cimino L., Russo G.I., Morgia G., Calogero A.E. Late-onset hypogonadism: the advantages of treatment with human chorionic gonadotropin rather than testosterone // *Aging Male.* 2016. V. 19. P. 34–39.
3. Fournier T. Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production // *Ann. Endocrinol. (Paris).* 2016. V. 77. P. 75–81.
4. Шпаков А.О. Гликозилирование гонадотропинов, как важнейший механизм регуляции их активности // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2017. Т. 103. № 9. С. 1004–1021.
5. van Straten N.C., Schoonus-Gerritsma G.G., van Someren R.G., Draaijer J., Adang A.E., Timmers C.M., Hanssen R.G., van Boeckel C.A. The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: Thienopyrimidines with therapeutic potential for ovulation induction // *ChemBioChem.* 2002. V. 3. P. 1023–1026.
6. Moore S., Jaeschke H., Kleinau G., Neumann S., Costanzi S., Jiang J.K., Childress J., Raaka B.M., Colson A., Paschke R., Krause G., Thomas C.J., Gershengorn M.C. Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: structure-activity relationships and selective binding patterns // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 3888–3896.
7. van de Lagemaat R., Timmers C.M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R.G. Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor // *Hum. Reprod.* 2009. V. 24. P. 640–648.
8. Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., Addo S., Hanssen R. First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013. V. 98. P. 1558–1566.
9. Derkach K.V., Dar'in D.V., Lobanov P.S., Shpakov A.O. Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats // *Dokl. Biol. Sci.* 2014. V. 459. P. 326–329.
10. Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtuykov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O. *In vitro* and *in vivo* studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor // *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell Biol.* 2016. V. 10. P. 294–300.
11. Derkach K.V., Bakhtuykov A.A., Shpakov A.A., Dar'in D.V., Shpakov A.O. Specificity of heterotrimeric G protein regulation by human chorionic gonadotropin and low-molecular agonist of luteinizing hormone receptor // *Cell Tissue Biol.* 2017. V. 11. P. 475–482.
12. Hoyer I., Haas A.K., Kreuchwig A., Schüle R., Krause G. Molecular sampling of the allosteric binding pocket of the TSH receptor provides discriminative pharmacophores for antagonist and agonists // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. P. 213–217.
13. Kleinau G., Worth C.L., Kreuchwig A., Biebertmann H., Marcinkowski P., Scheerer P., Krause G. Structural-functional features of the thyrotropin receptor: A class A G-protein-coupled receptor at work // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2017. V. 8. P. 86.
14. Neumann S., Kleinau G., Costanzi S., Moore S., Jiang J.K., Raaka B.M., Thomas C.J., Krause G., Gershengorn M.C. A low-molecular-weight antagonist for the human thyrotropin receptor with therapeutic potential for hyperthyroidism // *Endocrinology.* 2008. V. 149. P. 5945–5950.
15. Neumann S., Gershengorn M.C. Small molecule TSHR agonists and antagonists // *Ann. Endocrinol. (Paris).* 2011. V. 72. P. 74–76.
16. Neumann S., Padia U., Cullen M.J., Eliseeva E., Nir E.A., Place R.F., Morgan S.J., Gershengorn M.C. An enantiomer of an oral small-molecule TSH receptor agonist exhibits improved pharmacologic properties // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2016. V. 7. P. 105.
17. Шпаков А.О. Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов // *Цитология.* 2015. Т. 57. № 3. С. 167–176.
18. Shpakov A.O., Dar'in D.V., Derkach K.V., Lobanov P.S. The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenyl cyclase systems in the rat testes // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2014. V. 456. P. 104–107.
19. Shpakov A.O., Derkach K.V., Dar'in D.V., Lobanov P.S. Activation of adenyl cyclase by thienopyrimidine derivatives in rat testes and ovaries // *Cell Tissue Biol.* 2014. V. 8. P. 400–406.
20. Derkach K.V., Legkodukh A.S., Dar'in D.V., Shpakov A.O. The stimulating effect of thienopyrimidines structurally similar to Org 43553 on adenylate cyclase activity in the testes and on testosterone production in male rats // *Cell Tissue Biol.* 2017. V. 11. P. 73–80.
21. Derkach K.V., Bogush I.V., Bernstein L.M., Shpakov A.O. The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats // *Horm. Metab. Res.* 2015. V. 47. P. 916–924.
22. Derkach K.V., Shpakova E.A., Titov A.M., Shpakov A.O. Intranasal and intramuscular administration of lysine-palmitoylated peptide 612–627 of thyroid-stimulating hormone receptor increases the level of thyroid hormones in rats // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2015. V. 21. P. 249–260.
23. Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Derkach K.V. Peptide 612–627 of thyrotropin receptor and its modified analogs as regulators of adenyl cyclase in rat thyroid gland // *Cell Tissue Biol.* 2014. V. 8. P. 488–498.
24. Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Derkach K.V., Vlasov G.P. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and re-

- ceptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2010. V. 16. P. 95–105.
25. Latif R., Realubit R.B., Karan C., Mezei M., Davies T.F. TSH Receptor Signaling Abrogation by a Novel Small Molecule // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2016. V. 7. P. 130.
 26. Casarini L., Reiter E., Simoni M. β -Arrestins regulate gonadotropin receptor-mediated cell proliferation and apoptosis by controlling different FSHR or LHCGR intracellular signaling in the hGL5 cell line // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016. V. 437. P. 11–21.
 27. Riccetti L., Yvinec R., Klett D., Gallay N., Combarnous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M.A. Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin display biased agonism at the LH and LH/CG receptors // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 940.
 28. Newton C.L., Whay A.M., McArdle C.A., Zhang M., van Koppen C.J., van de Lagemaat R., Segaloff D.L., Millar R.P. Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 7172–7176.

Thienopyrimidine Derivatives Specifically Activate Testicular Steroidogenesis but Do Not Affect Thyroid Functions

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

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

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

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

The luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (hCG) stimulate the testosterone (T) production in Leydig cells via specific binding to the LH/hCG receptor extracellular domain. The LH/hCG receptor can also be activated by lowmolecularweight (LMW) agonists that bind to the allosteric site located inside the transmembrane receptor channel. Since the allosteric sites in the LH/hCG and thyroidstimulating hormone (TSH) receptors share a similar structure, LMW agonists of the LH/hCG receptor can affect activity of the TSH receptor and the synthesis of thyroid hormones which depend on this receptor. When designing selective activators of steroidogenesis, it is necessary to rule out this possibility. The aim of this study was to explore the effect of the seven previously synthesized thienopyrimidines (TPs), LMW agonists of the LH/hCG receptor, on the basal and hCG and TSHstimulated adenylyl cyclase (AC) activity in plasma membranes isolated from the rat testes and thyroid as well as on the basal and luliberin and thyroliberin stimulated levels of T and thyroid hormones following intraperitoneal (i.p.) TP administration to male rats. All seven TPs (10^{-4} M) increased the AC basal activity in rat testicular membranes, and in the case of combined action of TPs and hCG their stimulatory effects were additive. TPs did not affect the basal and TSHstimulated AC activity in thyroid membranes. When administered to male rats, TPs (i.p., 25 mg/kg) increased the T level. The effect of TP03, a most active LH/hCG receptor LMW agonist, persisted under luliberininduced activation of the gonadal axis. The nicotinamide moiety of TP21, in contrast to the structurally similar TP03, contains an additional methoxy group which alters receptor specificity of this compound. Thus, with the exception of TP21, all TPs sharing LH/hCG receptor agonistic activity, both under *in vitro* and *in vivo* conditions, do not affect the TSH receptor, indicative of their selectivity toward the gonadal axis.

Key words: thienopyrimidine, luteinizing hormone receptor, thyroid-stimulating hormone receptor, thyroid hormones, testosterone