

**РАННИЕ СТЕРОИДОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ГОНАДОТРОПИНА
И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ПРИ ВВЕДЕНИИ
ИХ СУБМАКСИМАЛЬНЫХ ДОЗ САМЦАМ КРЫС**

© 2020 г. А. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач¹, А. О. Шпаков¹, *

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

*E-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 06.11.2019 г.

После доработки 04.12.2019 г.

Принята к публикации 06.12.2019 г.

Рецепторы лютеинизирующего гормона (ЛГ) играют ключевую роль в регуляции стероидогенеза в семенниках. Они могут быть активированы гонадотропинами — ЛГ и хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ), и низкомолекулярными агонистами, в том числе производными тиено-[2,3-*d*]пиримидинов, которые связываются с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном канале рецептора ЛГ. Ранее были выявлены различия в стероидогенных эффектах гонадотропинов и тиено-[2,3-*d*]пиримидинов в экспериментах *in vitro* и при длительном введении самцам крыс, но их ранние стероидогенные эффекты в семенниках, в том числе при введении в субмаксимальных дозах, практически не изучены. Целью работы было изучить влияние однократного введения самцам крыс субмаксимальных доз ХГЧ и тиено-[2,3-*d*]пиримидинового производного ТР03 на уровень тестостерона (Т) в крови и на экспрессию генов стероидогенных белков и паттерн стероидных гормонов, прекурсоров Т, в семенниках в течение 5 ч после такой обработки. Показано, что ТР03 (15 мг/кг) и ХГЧ (50 МЕ/крысу) через 30 мин после введения крысам повышают интратестикулярные уровни Т и его прекурсоров — 17-гидроксипрогестерона и андростендиона, а также снижают уровень прегненолона, что указывает на его расходование для синтеза прогестерона. Экспрессия генов стероидогенных белков значительно менялась через 3 ч после введения препаратов — при введении ТР03 и ХГЧ повышалась экспрессия генов *Star* и *Cyp17a1*, кодирующих транспортный белок StAR и цитохром P450-17 α , ключевые компоненты системы стероидогенеза. При этом выявлены различия между уровнем экспрессии гена *Hsd17b*, кодирующего дегидрогеназу HSD17 β , содержание которой было выше в группе с обработкой ХГЧ в сравнении с группой, обработанной ТР03. Через 1 и 3 ч после обработки крыс ХГЧ прирост уровня Т в крови был выше, чем в группе с обработкой ТР03, но уже через 5 ч уровни Т в обеих группах крыс были сопоставимыми, что обусловлено ослаблением стероидогенного эффекта ХГЧ при сохранении такового ТР03. Таким образом, несмотря на сходство ранних стероидогенных эффектов ТР03 и ХГЧ, применяемых в субмаксимальных дозах, уже в первые часы после их введения крысам начинают выявляться особенности их влияния на тестикулярный стероидогенез, которые при длительном введении приводят к существенным различиям в их стероидогенной активности.

Ключевые слова: низкомолекулярный агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, стероидогенез, тестостерон, семенники, хорионический гонадотропин, белок StAR, цитохром P450-17 α

DOI: 10.31857/S0869813920020028

В настоящее время во вспомогательных репродуктивных технологиях и для коррекции гипогонадотропного гипогонадизма и других репродуктивных дисфункций, ассоциированных со снижением продукции половых стероидных гормонов, широко используют препараты гонадотропинов – рекомбинатного лютеинизирующего гормона (ЛГ) и рекомбинантных и мочевых форм хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Однако при использовании в медицине гонадотропины имеют ряд серьезных недостатков, среди которых сравнительно быстрое развитие к ним резистентности тканей семенников и яичников и, как следствие, ослабление стероидогенного ответа при продолжительном применении, необходимость исключительно парентерального применения и иммуногенность, особенно при использовании недостаточно очищенных препаратов ХГЧ [1]. Многие побочные эффекты гонадотропинов обусловлены низкой избирательностью ЛГ и ХГЧ в отношении определенных внутриклеточных сигнальных каскадов, поскольку в условиях длительного воздействия на рецепторы ЛГ они активируют не только цАМФ-зависимые пути, нацеленные в основном на стимуляцию стероидогенеза, но и β -аррестиновые пути, ведущие к десенситизации рецептора ЛГ и опосредующие снижение чувствительности клеток-мишеней к гонадотропинам [2].

Альтернативой гонадотропинам являются низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ, которые в отличие от ЛГ и ХГЧ взаимодействуют не с высокоаффинным ортостерическим сайтом, расположенным в значительном по размеру внеклеточном домене рецептора, а с его аллостерическим сайтом, локализованным внутри трансмембранного домена, сформированного семью трансмембранными спиралями рецептора [3, 4]. Наибольший интерес среди них представляют производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина, которые специфично активируют цАМФ-зависимые сигнальные пути в клетках-мишенях, характеризуются стероидогенной активностью при внутрибрюшинном и пероральном введении грызунам, а в условиях клиники способны вызывать овуляцию у женщин, не приводя при этом к развитию синдрома гиперстимуляции яичников – тяжелому осложнению, возникающему при проведении контролируемой индукции овуляции [3, 5–8].

На основе изучения специфической активности и биодоступности большого количества производных тиено-[2,3-*d*]пиримидинов нами было отобрано соединение ТР03, 5-амино-*N*-*m*peм-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил) тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, наделенное активностью аллостерического агониста рецептора ЛГ. В условиях *in vitro* ТР03 повышал активность аденилатциклазной системы в тестикулярных и овариальных мембранах, при этом слабо влияя на другие сигнальные каскады, стимулировал стероидогенез в культивируемых клетках Лейдига, а в условиях *in vivo* при однократном или на протяжении нескольких дней введении самцам крыс повышал у них продукцию тестостерона (Т) [9–12]. Были выявлены значительные различия механизмов стероидогенного действия ХГЧ и ТР03 при их длительном введении самцам крыс, а также при однократном введении животным ТР03 и ХГЧ в высокой дозе (100 МЕ/крысу). Следует, однако, отметить, что механизмы действия гонадотропинов сильно зависят от дозы, вследствие чего представляет интерес сравнить механизмы действия ХГЧ и ТР03 и динамику развития стероидогенного эффекта при однократном введении препаратов в субмаксимальных дозах. Использование более низких, субмаксимальных, доз ХГЧ позволяет, по крайней мере, частично предотвратить его мощное ингибирующее воздействие на систему стероидогенеза, которое при применении высоких доз гонадотропина начинает выявляться уже через несколько часов после обработки [12–14]. Изучение ранних стероидогенных эффектов различающихся по природе агонистов рецептора ЛГ позволяет оценить перспективы и преимущества использования таких препаратов для однократной стимуляции стероидогенной функции. Целью исследования было сравнительное изучение влияния однократного введения

самцам крыс ТР03 и ХГЧ, взятых в субмаксимальных дозах 15 мг/кг и 50 МЕ/крысу соответственно, на уровень Т в крови, на экспрессию генов стероидогенных белков и паттерн стероидных гормонов, прекурсоров Т, в семенниках крыс в течение 5 ч после такой обработки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов использовали самцов крыс Вистар (возраст 3 мес.), которых содержали в стандартных условиях и на стандартном рационе. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), и правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Препарат ХГЧ (Московский эндокринологический завод, Россия) вводили крысам однократно в дозе 50 МЕ/крысу (подкожно), соединение ТР03, которое синтезировали и характеризовали, как описано ранее [9] вводили однократно в дозе 15 мг/кг (внутрибрюшинно, в диметилсульфоксиде (ДМСО)). В каждой исследуемой группе было по шесть животных. Инъекции проводили в 11.00 ч, уровень Т оценивали до введения препаратов (10.00 ч) и через 1, 3 и 5 ч (12.00, 14.00, 16.00 ч) после их введения в образцах крови, полученных из хвостовой вены при использовании местного наркоза (2%-ный лидокаин, 2–4 мг/кг). Контрольным крысам в те же сроки вводили ДМСО. Концентрацию Т в крови животных определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (Алкор-Био, Россия).

Для исследования содержания стероидных гормонов и оценки экспрессии генов рецептора ЛГ и стероидогенных белков в семенниках крыс дополнительно использовали самцов крыс того же возраста (в каждой группе $n = 6$), которых декапитировали под наркозом через 30 мин (11.30 ч) и через 3 ч (14.00 ч) после введения препаратов или ДМСО (11.00 ч). Ткани семенников гомогенизировали на льду в лизирующем буфере (мМ): 20 Трис-НСI, рН 7.5, 150 NaCl, 1 EGTA, 1 EDTA, 0.1% Тритон X-100 в соотношении 1 : 20, гомогенат центрифугировали (10 мин, 12000 g), собирали супернатант, замораживали его при -18°C и использовали для определения уровня гормонов. Содержание Т в семенниках измеряли с помощью набора фирмы Алкор-Био (Россия), содержание прогестерона и 17-гидроксипрогестерона – с помощью наборов фирмы Хема (Россия), содержание прегненолона и андростендиона – с помощью наборов фирмы DRG Instruments GmbH (Германия).

Экспрессию мРНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, для чего из тканей семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия), количественную оценку экспрессии проводили с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Использовали следующие праймеры: *Lhr* (рецептор ЛГ) – CTGC-GCTGTCCTGGCC (For) и CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA (Rev); *Star* (StAR-белок) – AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC (For) и CACCTGGCACCACCTTACTT (Rev); *Cyp11a1* (цитохром P450_{scc}) – TATCCCGCTTTGCCTTTGAG (For) и CACGATCTCCTC-CAACATCC (Rev); *Hsd3b* (3 β -гидростероиддегидрогеназа, HSD3 β) – AGGCCTGT-GTCCAAGCTAGTGT (For) и CTCGGCCATCTTTTGCTGTAT (Rev); *Cyp17a1* (цитохром P450-17 α) – CATCCCCACAAGGCTAAC (For) и TGTGTCCTTGGGG-ACAGTAAA (Rev); *Hsd17b* (17 β -гидростероиддегидрогеназа, HSD17 β) – CCTTTG-GCTTTGCCATGAGA (For) и CAATCCATCCTGCTCCAACCT (Rev). Для исследования использовали референсные гены β -актина (*Actb*) и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*). Результаты анализировали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ и

Таблица 1. Уровни тестостерона в крови при однократном введении самцам крыс ХГЧ в дозе 50 МЕ/животное и соединения ТР03 в дозе 15 мг/кг

Table 1. The plasma levels of testosterone in a single administration of hCG at a dose of 50 IU/animal and TP03 at a dose of 15 mg/kg in male rats

	До введения, 10.00 ч Before administration, 10.00 h*	Через 1 ч, 12.00 After 1 h, 12.00	Через 3 ч, 14.00 After 3 hs, 14.00	Через 5 ч, 16.00 After 5 hs, 16.00	AUC _{12.00–16.00} , усл. ед. AUC _{12.00–16.00} , arb.un.
Контроль Control	15.6 ± 2.6	16.0 ± 2.5	14.8 ± 2.0	14.4 ± 4.5	59.9 ± 7.6
ХГЧ, 50 МЕ/крысу hCG, 50 IU/rat	13.9 ± 2.0	71.2 ± 8.6 ^a	111.5 ± 10.4 ^a	86.1 ± 8.9 ^a	380.3 ± 21.6 ^b
ТР03, 15 мг/кг TP03, 15 mg/kg	14.3 ± 1.8	36.8 ± 5.0 ^{a,c}	62.3 ± 5.4 ^{a,c}	59.4 ± 5.2 ^a	220.8 ± 17.6 ^{b,c}

* – препараты вводили в 11.00 ч. ^a – различия по сравнению с базовым уровнем Т статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия значений AUC_{12.00–16.00} по сравнению с таковыми в контроле статистически значимы при $p < 0.05$; ^c – различия уровней Т и значений AUC_{12.00–16.00} между группами, обработанными ХГЧ и ТР03, статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

* – the drugs were administered at 11.00 h. ^a – the differences in comparison with the baseline T level are significant at $p < 0.05$; ^b – the differences of the AUC_{12.00–16.00} values as compared with those in the control are significant at $p < 0.05$; ^c – the differences in the T levels and the AUC_{12.00–16.00} values between the groups treated with hCG and TP03 are significant at $p < 0.05$. The values are presented as $M \pm SEM$, $n = 6$.

программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3, значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0.05$. Данные представляли как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение самцам крыс ХГЧ и ТР03 через 1 ч приводило к достоверному повышению у них уровня Т с максимумом стероидогенного эффекта через 3 ч, причем ХГЧ был более активным в сравнении с ТР03 (табл. 1). На это указывает более высокое значение AUC_{12.00–16.00} для его стероидогенного эффекта, которое на 72% выше, чем в случае ТР03 (табл. 1). Стимулирующий продукцию Т эффект гонадотропина нарастал быстрее, но затем ослабевал, в то время как соответствующий эффект ТР03 повышался более плавно и сохранялся на одном уровне через 3 и 5 ч. Так, через 3 ч после введения ХГЧ прирост уровня Т был выше прироста, вызываемого ТР03, на 104%, в то время как через 5 ч – на 60%. Полученные данные демонстрируют различия во временной динамике стероидогенных эффектов различающихся по природе и механизмам действия агонистов рецептора ЛГ. Причинами этого могут быть различия в биодоступности ХГЧ и ТР03, поскольку гонадотропины легче

Таблица 2. Влияние ХГЧ и ТР03 на уровни стероидных гормонов – тестостерона и его прекурсоров, в семенниках самцов крыс через 30 мин после введения препаратов
Table 2. The effect of hCG and TP03 on the levels of steroid hormones, testosterone and its precursors, in the testes of male rats 30 minutes after drug administration

Стероидный гормон Steroid hormone	Контроль Control	ХГЧ, 50 МЕ/крысу hCG, 50 IU/rat	ТР03, 15 мг/кг TP03, 15 mg/kg
	Концентрация стероидного гормона, нмоль/г ткани The concentration of steroid hormone, nmol/g of the tissue		
Прегненолон Pregnenolone	1.27 ± 0.07	0.76 ± 0.06 ^a	0.88 ± 0.05 ^a
Прогестерон Progesterone	0.41 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.45 ± 0.03
17-Гидрокси-прогестерон 17-Hydroxypregesterone	0.044 ± 0.010	0.317 ± 0.026 ^a	0.064 ± 0.004 ^b
Андростендион Androstenedione	0.045 ± 0.003	0.137 ± 0.015 ^a	0.074 ± 0.010 ^{a,b}
Тестостерон Testosterone	0.49 ± 0.12	2.85 ± 0.22 ^a	0.99 ± 0.07 ^{a,b}

^a – различия по сравнению с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия по сравнению с группой, обработанной ХГЧ, статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

^a – the differences in comparison with the control are significant at $p < 0.05$; ^b – the differences in the comparison with the hCG-treated group are significant at $p < 0.05$. The values are presented as $M \pm SEM$, $n = 6$.

достигают семенников и преодолевают гематотестикулярный барьер в сравнении с гидрофобными тиено-[2,3-*d*]пиримидинами, а также в индукции гонадотропинами десенситизации рецепторов ЛГ, что ведет к постепенному ослаблению их стероидогенного эффекта [2].

Нами показано, что уже через 30 мин после введения ХГЧ и ТР03 содержание Т и ряда его прекурсоров в семенниках крыс в сравнении с контролем менялось. Так, содержание прегненолона, синтез которого из холестерина осуществляется в митохондриях и катализируется цитохромом P450_{sc}, при обработке крыс ХГЧ и ТР03 снижалось ниже контрольного уровня (табл. 2). Это обусловлено тем, что накопленный в клетках Лейдига прегненолон после активации рецепторов ЛГ с помощью ХГЧ или ТР03 превращается в прогестерон, что говорит о значительной стимуляции ферментов, катализирующих начальные, митохондриальные, стадии стероидогенеза. Уровень прогестерона, синтез которого из прегненолона катализируется дегидрогеназой HSD3β, во всех исследуемых группах не различался. Это указывает на быструю конверсию прогестерона с помощью цитохрома P450-17α сначала в 17-гидроксипрогестерон, а затем уже в андростендион. В свою очередь, уровни 17-гидроксипрогестерона, андростендиона и Т, синтезируемого из андростендиона с помощью дегидрогеназы HSD17β, у самцов крыс, обработанных ХГЧ и ТР03, были повышены, в наибольшей степени при обработке гонадотропином (табл. 2). Так, в сравнении с контролем ХГЧ повышал уровень 17-гидроксипрогестерона, андростендиона и Т в семенниках крыс на 620, 204 и 492%, в то время как ТР03 – на 45, 64 и 90%. Следует отметить положительную корреляцию между интратестикулярным уровнем Т через 30 мин после введения крысам ХГЧ и ТР03 и подъемом концентрации Т в крови животных через 1 ч после введения. Соотношение между приростами уровня интратестикулярного Т в группах с обработкой ХГЧ и ТР03 составило 4.72 и было сопоставимым с соотношением уровней Т в крови, которое составило 2.65.

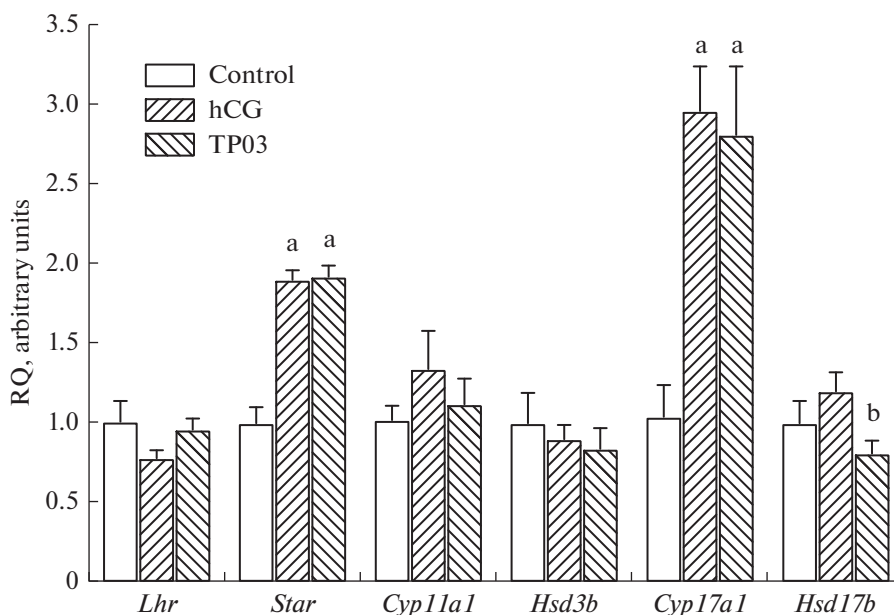


Рис. 1. Влияние ХГЧ и TP03 на экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ и стероидогенные белки, в семенниках самцов крыс через 3 ч после введения препаратов.

^a – различия по сравнению с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия по сравнению с группой, обработанной ХГЧ, статистически значимы при $p < 0.05$. Значения представлены, как $M \pm SEM$, $n = 6$.

Fig. 1. The effect of hCG and TP03 on the expression of the genes encoding LH/hCG receptor and the steroidogenic proteins in the testes of male rats three hours after drug administration.

^a – the differences in comparison with the control are significant at $p < 0.05$; ^b – the differences in comparison with the hCG-treated group are significant at $p < 0.05$. The values are presented as $M \pm SEM$, $n = 6$.

Экспрессия стероидогенных генов в семенниках крыс через 30 мин после их обработки ХГЧ и TP03 существенно не отличалась от таковой в контроле (данные не представлены), что, как можно полагать, обусловлено недостаточностью времени, прошедшего с момента воздействия ХГЧ и TP03 на клетки Лейдига, для изменения в них транскрипционной активности генов. Полученные данные согласуются с выявленным нами соотношением стероидных гормонов в семенниках, которое указывает на быструю “перекачку” прегненолона и прогестерона в конечные продукты стероидогенеза без заметного их синтеза *de novo*. В этой связи следует отметить, что ключевую роль в интенсификации синтеза прегненолона и прогестерона играет белок StAR, который отвечает за активный транспорт холестерина через митохондриальную мембрану внутрь митохондрий, где осуществляются начальные стадии стероидогенеза [15].

Через 3 ч после введения крысам ХГЧ и TP03 отмечали значимые изменения экспрессии гена *Star*, кодирующего белок StAR, которая в обеих группах повышалась в среднем в два раза, и экспрессии гена *Cyp17a1*, кодирующего цитохром P450-17 α , которая повышалась в тех же группах крыс в среднем в три раза (рис. 1). Как отмечалось выше, транспортный белок StAR катализирует транспорт холестерина в митохондрии, что является скоростью-лимитирующей стадией тестикулярного стероидогене-

неза, и повышение экспрессии белка StAR положительно коррелирует с продукцией Т в семенниках. Наши данные согласуются с результатами других авторов о повышении экспрессии гена *Star* при обработке ХГЧ культуры клеток Лейдига крысы [16, 17]. Этот эффект гонадотропина обусловлен стимуляцией активности ERK1/2-киназ, осуществляемой как через цАМФ-зависимый, так и через фосфоинозитидный пути. Необходимо отметить, что активация ERK1/2-киназ в клетках Лейдига не только повышает экспрессию гена *Star*, но и стимулирует активность белка StAR, что, в конечном итоге, стимулирует синтез прогестерона, основного субстрата цитохрома P450-17 α [15, 18].

Цитохром P450-17 α , фермент с двойной специфичностью, катализирует сразу две стадии стероидогенеза – превращение прогестерона в 17-гидроксипрогестерон (17 α -гидроксилазная активность) и конверсию 17-гидроксипрогестерона в андростендион (C_{17–20}-лиазная активность) [19, 20]. Показанное нами повышение экспрессии гена *Cyp17a1* в сочетании со значительным повышением уровня Т в крови крыс через 3 ч после введения им TP03 и ХГЧ указывает на то, что повышение экспрессии и активности цитохрома P450-17 α также вносит значительный вклад в стероидогенный эффект тиено-[2,3-*d*]пиримидинов, сходно с тем, как это происходит при действии ХГЧ. Стимуляция гонадотропинами с ЛГ-активностью экспрессии и активности цитохрома P450-17 α ранее была показана при обработке ими культуры клеток Лейдига семенников [21, 22] и клеток теки яичников [23, 24]. Следует, однако, отметить, что данные по влиянию гонадотропинов на цитохром P450-17 α в клеточных культурах отличаются от результатов, полученных в условиях *in vivo*, что обусловлено особенностями временной динамики развития стероидогенного эффекта и различиями паттерна регуляторных влияний в изолированных клетках и в репродуктивных тканях. Однократное введение высоких доз ХГЧ пациентам и экспериментальным животным уже в первые часы повышало у них активность цитохрома P450-17 α [13, 25], но через 6 ч, как было продемонстрировано в опытах с самцами крыс, этот эффект затухал [25]. При введении гонадотропинов с ЛГ-активностью в течение нескольких дней отмечали подавление экспрессии гена *Cyp17a1* и активности цитохрома P450-17 α , что показано в семенниках, яичниках и плаценте [13, 26–30]. Необходимо обратить внимание на тот факт, что соединения, ингибирующие экспрессию и активность цитохрома P450-17 α , характеризуются сильно выраженным антиандрогенным эффектом, и это позволяет использовать их для лечения ЛГ-зависимых опухолей [31]. Следует также отметить, что трехдневное введение TP03 самцам крыс, в отличие от ХГЧ, вызывало повышение, а не снижение экспрессии гена *Cyp17a1* в семенниках животных, что коррелировало с сохранением у TP03 стероидогенного эффекта [29].

Экспрессия генов, кодирующих дегидрогеназы HSD3 β и HSD17 β , в семенниках крыс, обработанных TP03 и ХГЧ, существенно не отличалась от таковой в контрольной группе. При этом экспрессия гена *Hsd17b* в группе, обработанной TP03, была достоверно ниже, чем в группе с введением ХГЧ (рис. 1), что указывает на разнонаправленное влияние на нее тиено-[2,3-*d*]пиримидинов и гонадотропинов. Дегидрогеназа HSD17 β катализирует заключительную стадию тестикулярного стероидогенеза, осуществляя конверсию андростендиона в Т [19, 20]. Другими авторами было показано, что при однократном введении ХГЧ самцам крыс на первом этапе экспрессия и активность дегидрогеназы HSD17 β существенно не отличалась от контроля, как и в нашем случае, но в дальнейшем заметно снижалась [14, 32]. Так, при воздействии ХГЧ экспрессия гена *Hsd17b* снижалась, достигая минимума через 24 ч, и восстанавливалась до контрольного уровня только на девятые сутки после инъекции гонадотропина [14]. Нами ранее было показано, что при трехдневном введении самцам крыс ХГЧ экспрессия гена *Hsd17b* снижалась в два раза, в то

время как в группе с длительной обработкой TP03 экспрессия гена дегидрогеназы HSD17 β сохранялась на контрольном уровне [29].

Суммируя результаты, полученные ранее и в рамках настоящего исследования, можно заключить, что в течение первых часов после введения ХГЧ и TP03 самцам крыс их эффекты на экспрессию стероидогенных ферментов различаются в небольшой степени, но в дальнейшем различия становятся значительными. Среди причин этого изменение экспрессии рецепторов ЛГ. Так, через 3 ч после введения ХГЧ и TP03 экспрессия гена *Lhr* в семенниках самцов крыс практически не менялась (рис. 1). В то же время, как показано нами ранее, при длительном введении ХГЧ она снижалась в три раза и, напротив, парадоксальным образом возрастала при обработке TP03 [29]. Мы полагаем, что TP03 как при краткосрочном, так и при длительном его введении самцам крыс не способен в достаточной степени стимулировать β -аррестинный и фосфоинозитидный пути в клетках Лейдига, контролирующие процесс эндоцитоза и экспрессию гена *Lhr*, что обусловлено специфичностью TP03 в отношении цАМФ-зависимых каскадов, ответственных за активацию стероидогенеза [6, 10]. В то же время ХГЧ, будучи низкоселективным в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирует β -аррестинный и фосфоинозитидный пути, причем при повышении силы и продолжительности воздействия эти его эффекты только усиливаются, что и приводит к снижению экспрессии рецептора ЛГ и ослаблению стероидогенного ответа.

Таким образом, тиено-[2,3-*d*]пиримидиновое производное TP03, аллостерический агонист рецептора ЛГ, через 30 мин после введения самцам крыс стимулирует стероидогенез, причем, его стероидогенный эффект на начальном этапе воздействия на клетки Лейдига сходен с таковым ХГЧ. Так, TP03 и ХГЧ через 30 мин повышают в семенниках уровни Т и его прекурсоров – 17-гидроксипрогестерона и андростендиона, а также снижают уровень прегненолона, что указывает на расхождение последнего для синтеза прогестерона и других предшественников Т. Изменение экспрессии генов стероидогенных белков через 30 мин после введения препаратов отсутствовало, но выявлялось через 3 ч. При введении TP03 и ХГЧ значимо повышалась экспрессия генов *Star* и *Cyp17a1*, кодирующих белок StAR и цитохром P450-17 α , ключевые компоненты тестикулярного стероидогенеза. В то же время в группе, обработанной TP03, уровень экспрессии гена *Hsd17b*, кодирующего дегидрогеназу HSD17 β , был достоверно ниже, чем в группе с обработкой ХГЧ. Поскольку продукция Т, индуцированная гонадотропином через 5 ч заметно снижалась, то стероидогенный эффект ХГЧ становился сопоставимым с таковым TP03, несмотря на то что еще через 1 и 3 ч он в значительной степени его превосходил. Эти изменения стероидогенного эффекта ХГЧ и тиено-[2,3-*d*]пиримидина предшествуют значимым различиям, которые выявляются позднее, при более длительной обработке крыс тиено-[2,3-*d*]пиримидинами и ХГЧ и обусловлены различиями их механизмов действия на внутриклеточные сигнальные каскады в клетках Лейдига.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шпаков А.О.* Гонадотропины – от теории к клинической практике. Санкт-Петербург. ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2018. ISBN 978-5-7422-6330-2. [*Shpakov A.O.* Gonadotropiny – ot teorii k klinicheskoy praktike]. St-Petersburg. POLYTECH-PRESS. 2018. ISBN 978-5-7422-6330-2. (In Russ)].
2. *Riccetti L., Yvines R., Klett D., Gallay N., Combarous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M.A.* Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin display biased agonism at the LH and LH/CG receptors. *Sci. Rep.* 7(1): 940. 2017.
3. *van Straten N.C., Timmers C.M.* Non-Peptide ligands for the gonadotropin receptors. *Annu. Rep. Med. Chem.* 44: 171–188. 2009.
[https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(09\)04408-X](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(09)04408-X)
4. *Шпаков А.О.* Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов. *Цитология.* 57(3): 167–176. 2015. [*Shpakov A.O.* Novye dostizheniya v razrabotke i izuchenii mekhanizmov dejstviya nizkomolekulyarnyh agonistov receptorov tireotropnogo i lyuteiniziruyushchego gormonov [New achievements in the development and study of the mechanisms of action of low-molecular-weight agonists of the receptors of the thyroid-stimulating and luteinizing hormones]. *Tsitologiya.* 57(3): 167–176. 2015. (In Russ)].
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: Thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chem. BioChem.* 3(10): 1023–1026. 2002.
6. *van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G.* A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 378(5): 503–514. 2008.
<https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
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.* 24(3): 640–648. 2009.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den412>
8. *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.* 108(17): 7172–7176. 2011.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>
9. *Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O.* *In vitro* and *in vivo* studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell Biol.* 10(4): 294–300. 2016.
<https://doi.org/10.1134/S19907478116030132>
10. *Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Shpakov A.A., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Specificity of heterotrimeric G protein regulation by human chorionic gonadotropin and low-molecular agonist of luteinizing hormone receptor. *Cell Tissue Biol.* 11(6): 475–482. 2017.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17060037>
11. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Stepankina A.M., Shpakov A.O.* A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenylyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell Biol.* 13(4): 301–309. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
12. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Conservation of steroidogenic effect of the low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its long-term administration to male rats. *Dokl. Biochem. Biophys.* 484(1): 78–81. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S1607672919>
13. *Forest M.G., Roulier R.* Kinetics of the steroidogenic response of the testis to stimulation by hCG. V. Blockade of 17–20 lyase induced by hCG is an age-dependent phenomenon inducible by pre-treatment with hCG. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 45: 281–290. 1984.
14. *Tsai-Morris C.H., Khanum A., Tang P.Z., Dufau M.L.* The rat 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type III: molecular cloning and gonadotropin regulation. *Endocrinology.* 140(8): 3534–3542. 1999.
15. *Castillo A.F., Orlando U., Helfenberger K.E., Poderoso C., Podesta E.J.* The role of mitochondrial fusion and StAR phosphorylation in the regulation of StAR activity and steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 408: 73–79. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.011>

16. *Martinelle N., Holst M., Söder O., Svechnikov K.* Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 145(10): 4629–4634. 2004.
17. *Manna P.R., Jo Y., Stocco D.M.* Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J. Endocrinol.* 193(1): 53–63. 2007.
18. *Poderoso C., Maloberti P., Duarte A., Neuman I., Paz C., Cornejo Maciel F., Podesta E.J.* Hormonal activation of a kinase cascade localized at the mitochondria is required for StAR protein activity. *Mol. Cell Endocrinol.* 300(1–2): 37–42. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.009>
19. *Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Labrie C., Simard J., Breton R., Bélanger A.* The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*. 62(1): 148–158. 1997.
20. *Marchais-Oberwinkler S., Henn C., Möller G., Klein T., Negri M., Oster A., Spadaro A., Werth R., Weizel M., Xu K., Frotscher M., Hartmann R.W., Adamski J.* 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 125(1–2): 66–82. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.12.013>
21. *Clark A.M., Chuzel F., Sanchez P., Saez J.M.* Regulation by gonadotropins of the messenger ribonucleic acid for P450 side-chain cleavage, P450₁₇ alpha-hydroxylase/C17,20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cultured pig Leydig cells. *Biol. Reprod.* 55(2): 347–354. 1996.
22. *Бахтукоев А.А., Соколова Т.В., Дар'ин Д.В., Деркач К.В., Шпаков А.О.* Сравнительное изучение стимулирующего эффекта низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона и хорионического гонадотропина на стероидогенез в клетках Лейдига крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 103(10): 1181–1192. 2017. [*Bakhtuykov A.A., Sokolova T.V., Dar'in D.V., Derkach K.V., Shpakov A.O.* A comparative study of the stimulating effect of a low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor and chorionic gonadotropin on the steroidogenesis in the rat Leydig cells]. *Russ. J. Physiol.* 103(10): 1181–1192. 2017. (In Russ)].
23. *Magoffin D.A.* Evidence that luteinizing hormone-stimulated differentiation of purified ovarian thecal-interstitial cells is mediated by both type I and type II adenosine 3',5' monophosphate-dependent protein kinases. *Endocrinology*. 125: 1464–1473. 1987.
24. *Wang X., Zou P., He Y., Meng K., Quan F., Zhang Y.* Effect of luteinizing hormone on goat theca cell apoptosis and steroidogenesis through activation of the PI3K/AKT pathway. *Anim. Reprod. Sci.* 190: 108–118. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.014>
25. *Chasalow F., Marr H., Haour F., Saez J.M.* Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization in rats. *J. Biol. Chem.* 254(13): 5613–5617. 1979.
26. *Suzuki K., Tamaoki B.* Acute decrease by human chorionic gonadotropin of the activity of pre-ovulatory ovarian 17 alpha-hydroxylase and C-17-C-20 lyase is due to decrease of microsomal cytochrome P-450 through *de novo* synthesis of ribonucleic acid and protein. *Endocrinology*. 113(6): 1985–1991. 1983.
27. *Johnson D.C., Griswold T.* Relationship between *in vivo* and *in vitro* 17 alpha-hydroxylase and C17,20-lyase activity in ovaries of immature hypophysectomized rats treated chronically with human chorionic gonadotropin. *J. Steroid. Biochem.* 24(2): 637–643. 1986.
28. *Durkee T.J., McLean M.P., Hales D.B., Payne A.H., Waterman M.R., Khan I., Gibori G.* P450(17 alpha) and P450SCC gene expression and regulation in the rat placenta. *Endocrinology*. 130(3): 1309–1317. 1992.
29. *Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Sharova T.S., Shpakov A.O.* Decrease in the basal and luteinizing hormone receptor agonist-stimulated testosterone production in aging male rats. *Adv. Gerontol.* 9(2): 179–185. 2019.
<https://doi.org/10.1134/S2079057019020036>
30. *Kakuta H., Iguchi T., Sato T.* The Involvement of Granulosa Cells in the Regulation by Gonadotropins of Cyp17a1 in Theca Cells. *In Vivo*. 32(6): 1387–1401. 2018.
<https://doi.org/10.21873/invivo.11391>
31. *Ye L., Chen X., Li X., Zhu Q., Yu L., Guo J., Chen B., Akingbemi B.T., Ge R.S., Li H.* Effects of methoxychlor and its metabolite 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane on human and rat 17 α -hydroxylase/17,20-lyase activity. *Toxicol. Lett.* 225(3): 407–412. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.011>
32. *Marín-Juez R., Castellana B., Manchado M., Planas J.V.* Molecular identification of genes involved in testicular steroid synthesis and characterization of the response to gonadotropic stimulation in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172(1): 130–139. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.02.003>

Early Steroidogenic Effects of Gonadotropin and a Low-Molecular-Weight Agonist of Luteinizing Hormone Receptor when Administered to Male Rats at Submaximal Doses

A. A. Bakhtyukov^a, K. V. Derkach^a, and A. O. Shpakov^{a, *}

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

**e-mail: alex_shpakov@list.ru*

The receptors of luteinizing hormone (LH) play a key role in the regulation of testicular steroidogenesis. They can be activated by gonadotropins, LH and human chorionic gonadotropin (hCG), and by the low-molecular-weight agonists, including the derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidines, which bind to an allosteric site located in the transmembrane channel of LH receptor. The differences in the steroidogenic effects of gonadotropins and thieno[2,3-*d*]pyrimidines in the *in vitro* experiments and in a long-term administration to male rats were previously identified, but their early steroidogenic effects in the testes when administered at submaximal doses, have not been studied. The aim of the work was to study the effect of a single administration of hCG and TP03, a thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivative, in submaximal doses on testosterone (T) plasma levels and on the expression of steroidogenic protein genes of, as well as the pattern of steroid hormones, the precursors of T, in the testes for 5 hours after the treatment of male rats. We demonstrate that TP03 (15 mg/kg) and hCG (50 IU/rat) 30 minutes after their administration to rats cause an increase in the intratesticular levels of T and its precursors, such as 17-hydroxyprogesterone and androstenedione, and also reduce the level of pregnenolone, which indicates its expenditure for progesterone synthesis. The gene expression of steroidogenic proteins significantly changed 3 hours after drug administration. The administration of TP03 and hCG led to an increase in the expression of the *Star* and *Cyp17a1* genes encoding the transport protein StAR and the cytochrome P450-17 α , the key components of the steroidogenesis system. At the same time, the difference between the expressions of the *Hsd17b* gene encoding the dehydrogenase HSD17 β , which were higher in the hCG-treated group as compared to the TP03-treated group, is shown. An increase in the plasma T levels one and three hours after treatment of rats with hCG was higher than in the TP03-treated group, but after 5 hours the T levels in both groups of rats were comparable, which was due to the weakening of the steroidogenic effect of hCG while maintaining the corresponding effect of TP03. Thus, despite the similarity of the early steroidogenic effects of TP03 and hCG used at the submaximal doses, even in the first hours after their administration to rats, the peculiarities of their effect on testicular steroidogenesis begin to appear, which, after a long-term administration, lead to significant differences in their steroidogenic activity.

Keywords: low-molecular-weight agonist, luteinizing hormone receptor, steroidogenesis, testosterone, testes, chorionic gonadotropin, StAR protein, cytochrome P450-17 α

ЦИТИРОВАТЬ:

Бахтюков А.А., Деркач К.В., Шпаков А.О. Ранние стероидогенные эффекты гонадотропина и низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона при введении их субмаксимальных доз самцам крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(2): 254–264.

DOI: 10.31857/S0869813920020028

TO CITE THIS ARTICLE:

Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Shpakov A.O. Early Steroidogenic Effects of Gonadotropin and a Low-Molecular-Weight Agonist of Luteinizing Hormone Receptor when Administered to Male Rats at Submaximal Doses. Russian Journal of Physiology. 106(2): 254–264.

DOI: 10.31857/S0869813920020028