

УДК 577.17

## ПРЕДОБРАБОТКА КРЫС АЛЛОСТЕРИЧЕСКИМ АГОНИСТОМ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА УСИЛИВАЕТ СТИМУЛЯЦИЮ ПРОДУКЦИИ ТЕСТОСТЕРОНА ХОРИОНИЧЕСКИМ ГОНАДОТРОПИНОМ

© 2019 г. А. О. Шпаков<sup>1,\*</sup>, А. А. Бахтюков<sup>1</sup>, Д. В. Дарьин<sup>2</sup>, К. В. Деркач<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: alex\_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 28.03.2019 г.

После доработки 19.04.2019 г.

Принята к публикации 26.04.2019 г.

В клинике лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин (ХГ) используют как активаторы рецептора ЛГ, что приводит к стимуляции стероидогенеза в гонадах. Однако применяемые в высоких дозах препараты гонадотропинов вызывают ряд побочных эффектов. Нами показано, что после предварительной обработки самцов крыс ТПОЗ, аллостерическим агонистом рецептора ЛГ (7.5–25 мг/кг), достоверно усиливался стимулирующий продукцию тестостерона эффект ХГ, взятого в дозе 50 МЕ/крысу, которая вдвое ниже дозы, вызывающей максимальный стероидогенный эффект. Это, как мы полагаем, обусловлено как аддитивностью эффектов ХГ и ТПОЗ, так и потенцирующим воздействием ТПОЗ на сигнальные пути ХГ. Через 3 ч после введения ХГ крысам с предобработкой ТПОЗ, паттерн активации генов стероидогенных ферментов и рецептора ЛГ менялся специфично, затрагивая в основном экспрессию гена  $3\beta$ -дегидрогеназы. Полученные данные указывают на перспективность совместного применения ТПОЗ и гонадотропинов, позволяющего снизить эффективную дозу гонадотропина.

**Ключевые слова:** гонадотропин, низкомолекулярный агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, тестостерон, потенцирующий эффект

**DOI:** 10.1134/S004445291906007X

Применение лютеинизирующего гормона (ЛГ) и хорионического гонадотропина (ХГ) для коррекции гипогонадотропных состояний и во вспомогательных репродуктивных технологиях сопряжено со многими побочными эффектами, среди которых развитие резистентности к ЛГ и ХГ, нарушение функций гипоталамических звеньев гонадной оси, синдром гиперстимуляции яичников [1, 2]. Эти эффекты обусловлены использованием высоких доз гонадотропинов, намного превосходящих их физиологические концентрации. Вследствие этого актуальной задачей является разработка подходов для снижения доз препаратов ЛГ и ХГ без снижения их эффективности. Наряду с гонадотропинами в последние годы разрабатываются низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ЛГ на основе тиенопиримидиновых производных (ТП) [3–5]. В отличие от ЛГ и ХГ, которые взаимодействуют со значительным по размеру эктодоменом рецептора, ТП проникают внутрь его трансмембранного канала и связываются с расположенным там аллостерическим сайтом [3]. По-

скольку сайты связывания гонадотропинов и ТП различаются, то при совместном воздействии на клетки-мишени они не конкурируют между собой за связывание с рецептором, и их эффекты характеризуются частичной аддитивностью, что продемонстрировано нами и другими авторами в условиях *in vitro* [3, 5]. Однако совместные эффекты гонадотропинов и ТП в условиях *in vivo* не изучены, и данные о возможности усиления стероидогенного эффекта ЛГ и ХГ в присутствии ТП отсутствуют. Цель работы состояла в изучении влияния предварительной обработки самцов крыс с помощью различных доз синтезированного и изученного нами ранее соединения ТПОЗ с активностью агониста рецептора ЛГ на стимулирующий продукцию тестостерона (Т) эффект ХГ.

Для исследований использовали половозрелых самцов крыс Wistar (три месяца, масса тела  $316 \pm 17$  г). ХГ человека (Московский эндокринологический завод, Россия) вводили подкожно в дозах 50 и 100 МЕ/крысу, в то время как ТПОЗ вводили внутривенно в дозах 7.5, 15 и 25 мг/кг. Синтез и

физико-химические характеристики ТПОЗ были описаны нами ранее [5]. Проводимые эксперименты удовлетворяли требованиям Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН и European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС). Животным сначала вводили ТПОЗ (в 10.00) и через 1 ч (в 11.00) проводили инъекцию ХГ. Концентрацию Т в крови оценивали непосредственно перед введением ТПОЗ (10.00) и ХГ (11.00) и далее через 1 (12.00) и 3 ч (14.00) после введения ХГ. Образцы крови для измерения уровня Т забирали из хвостовой вены крыс под местным наркозом, концентрацию Т определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (Алкор-Био, Россия). После последнего забора крови животных декапитировали и иссекали ткани семенников для оценки экспрессии в них целевых генов.

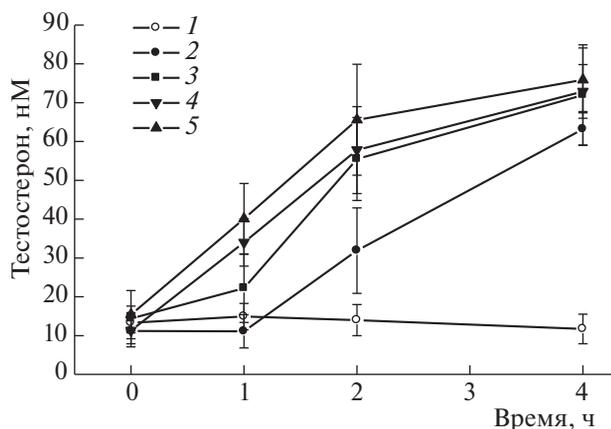
Экспрессию генов оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией, для чего из семенников с помощью “TRIzol Reagent” (Thermo Fisher Scientific Inc., США) выделяли тотальную РНК. Кодирующую ДНК получали обратной транскрипцией с использованием набора “MMLV RT Kit” (Евроген, Россия). Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 нг ПЦР-продукта, 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, используя 5 мкл реагента “qPCRmix-HS SYBR+LowROX” (Евроген, Россия). Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора “7500 Real-Time PCR System” (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ (*Lhr*), StAR-белок (*Star*), цитохрома P450<sub>sc</sub> (*Cyp11a1*) и P450-17 $\alpha$  (*Cyp17a1*), дегидрогеназы 3 $\beta$ -HSD (*Hsd3b*) и 17 $\beta$ -HSD (*Hsd17b*), определяли с помощью следующих праймеров: *Lhr* – CTGCGCTGTCCTGGCC (For) и CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA (Rev); *Star* – AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC (For) и CACCTGGCACACCTTACTT (Rev); *Cyp11a1* – TATTCCGCTTTGCTTTGAG (For) и CACGATCTCCTCCAAATCC (Rev); *Hsd3b* – AGGCCTGTGTCCAAGTAGTGT (For) и CTCGGCCATCTTTTGCTGTAT (Rev); *Cyp17a1* – CATCCCCACAAGGCTAAC (For) и TGTGTCTTTGGGGACAGTAAA (Rev); *Hsd17b* – CCTTTGGCTTTGCCATGAGA (For) и CAATCCATCCTGCTCCAACCT (Rev). В качестве рефересных использовали гены глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и  $\beta$ -актина (*Actb*). Анализ результатов проводили с использованием метода  $\Delta\Delta C_t$ . Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе.

Статистический анализ проводили с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007”. Данные представляли как среднее значение  $\pm$  SD. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и бо-

лее групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Данные, не удовлетворяющие критериям нормального распределения, обрабатывали с применением U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

На начальном этапе оценивали стероидогенные эффекты ХГ и ТПОЗ, которые были взяты в дозах 100 МЕ/крысу и 25 мг/кг, вызывающих, в соответствии с нашими ранними результатами [6], максимальный стероидогенный эффект. Через 3 ч после обработки ХГ и ТПОЗ приросты концентрации Т над его уровнем в контроле составили  $111 \pm 14$  и  $39 \pm 6$  нМ, что указывает на более высокую эффективность ХГ в сравнении с ТПОЗ. В то же время известно, что применение высоких доз ХГ снижает экспрессию рецептора ЛГ и провоцирует развитие резистентности клеток Лейдига к гонадотропинам, ослабляя в них стероидогенез [1]. Это свидетельствует о необходимости снижения доз ХГ, что, однако, снижает и стероидогенный эффект гонадотропина. Так, через 3 ч после обработки ХГ в дозе 50 МЕ/крысу прирост концентрации Т составил  $52 \pm 5$  нМ, что на 53% ниже, чем при использовании дозы 100 МЕ/крысу. Следует отметить, что снижение доз ТПОЗ также ослабляет его стероидогенный эффект. Так, при использовании дозы 15 мг/кг прирост концентрации Т через 3 ч снижался, в сравнении с дозой 25 мг/кг, на 20%, при использовании дозы 7.5 мг/кг – на 63%.

Для оценки возможности усиления стероидогенного эффекта ХГ, взятого в дозе 50 МЕ/крысу, изучали влияние на него предварительной обработки самцов крыс с помощью ТПОЗ в дозах 7.5, 15 и 25 мг/кг. ТПОЗ вводили за 1 ч до гонадотропина, чтобы обеспечить достижение этим гидрофобным соединением клеток Лейдига и его эффективное связывание с локализованными в них рецепторами ЛГ. Установлено, что на фоне обработки крыс всеми исследованными дозами ТПОЗ стимулирующий эффект ХГ на продукцию Т усиливался. При этом через 1 ч после введения ХГ потенцирующий эффект ТПОЗ на стероидогенную активность гонадотропина был выражен в большей степени, чем через 3 ч (рис. 1). Это указывает на то, что ТПОЗ меняет динамику развития стимулирующего эффекта ХГ, но в меньшей степени влияет на его максимальный стероидогенный эффект. Несмотря на значительные различия в эффективности доз 7.5 и 15 мг/кг ТПОЗ на уровень Т, обе дозы демонстрировали сходную эффективность в отношении усиления стероидогенного эффекта ХГ (рис. 1). Это может быть обусловлено тем, что в основе усиливающего действия ТПОЗ лежит не только независимая активация рецепторов ЛГ гонадотропином и ТП, но и потенцирующий эффект ТПОЗ на сигнальные пути ХГ, что отчетливо прослеживается при использовании низкой дозы ТПОЗ.



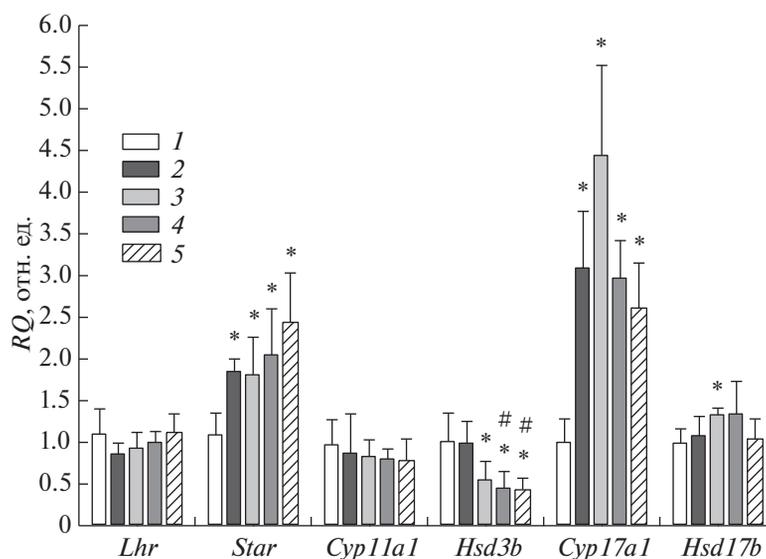
**Рис. 1.** Стимулирующий эффект ХГ на уровень тестостерона в крови крыс и влияние на него предварительной обработки животных ТПОЗ, низкомолекулярным агонистом рецептора ЛГ.

1 – контроль; 2 – ХГ, 50 МЕ/крысу; 3 – ХГ + ТПОЗ, 7.5 мг/кг; 4 – ХГ + ТПОЗ, 15 мг/кг; 5 – ХГ + ТПОЗ, 25 мг/кг. Время указано с момента введения ТПОЗ или его растворителя (контроль), ХГ вводили через 1 ч после ТПОЗ. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n = 5$ .

В семенниках крыс, обработанных последовательно ТПОЗ и ХГ, экспрессия гена *Hsd3b*, кодирующего 3 $\beta$ -дегидрогеназу, которая катализирует синтез прогестерона, снижалась в среднем в два раза по сравнению с этим показателем у крыс без обработки ТПОЗ (рис. 2). Экспрессия генов *Star* и *Cyp17a1*, кодирующих белок StAR, транспортирующий холестерин в митохондрии, и цитохром P450-

17 $\alpha$ , катализирующий превращение прогестерона в андростендион, повышалась под влиянием ХГ, хотя и в различной степени, как у крыс, предварительно обработанных ТПОЗ, так и без такой обработки (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что после предварительной обработки крыс с помощью различных доз ТПОЗ паттерн ХГ-индуцированной регуляции экспрессии генов стероидогенеза в семенниках животных менялся избирательно и в основном затрагивал экспрессию гена 3 $\beta$ -дегидрогеназы. Известно, что при длительном введении высоких доз ХГ экспрессия гена рецептора ЛГ снижается [1]. В нашем случае, через 3 ч после обработки 50 МЕ/крысу ХГ крыс, которым предварительно вводили ТПОЗ, экспрессия гена *Lhr* существенно не менялась, что указывает на сохранение чувствительности тканей семенников к гонадотропинам с ЛГ-активностью (рис. 2).

Таким образом, при введении 50 МЕ/крысу ХГ самцам крыс, которых предварительно обрабатывали ТПОЗ с активностью агониста рецептора ЛГ, стимулирующий продукцию Т эффект гонадотропина усиливается, что может быть обусловлено как аддитивностью эффектов ХГ и низкомолекулярного агониста, так и потенцирующим действием последнего на сигнальные пути гонадотропина. Одним из предполагаемых механизмов потенцирующего действия ТПОЗ может являться его функционирование как низкомолекулярного шаперона рецептора ЛГ. Известно, что гидрофобные по природе низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ способны преодолевать плазматическую мембрану и связываться с еще “незрелыми” фор-



**Рис. 2.** Влияние обработки крыс ХГ и совместно ХГ и ТПОЗ на экспрессию генов *Lhr*, *Star*, *Cyp11a*, *Hsd3b*, *Cyp17a* и *Hsd7b* в семенниках крыс.

1 – контроль; 2 – ХГ, 50 МЕ/крысу; 3 – ХГ + ТПОЗ, 7.5 мг/кг; 4 – ХГ + ТПОЗ, 15 мг/кг; 5 – ХГ + ТПОЗ, 25 мг/кг. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем. Данные представлены как  $M \pm SD$ ,  $n = 5$ .

мами рецептора ЛГ, расположенными внутри клетки [7]. Это не только приводит к стабилизации структуры рецептора, но и способствует его транслокации в мембрану, что повышает чувствительность клеток Лейдига к гонадотропинам. Обнаружение способности соединения ТПОЗ усиливать стимулирующий эффект ХГ, что характерно для положительных аллостерических модуляторов (ПАМ), при наличии у него собственной агонистической активности позволяет по фармакологическим свойствам отнести ТПОЗ к классу аго-ПАМ. Необходимо отметить, что аго-ПАМ представляют большой интерес для фармакологии, поскольку способны сравнительно мягко и избирательно активировать внутриклеточные сигнальные каскады, и при этом усиливать стимулирующие эффекты ортостерических лигандов [8]. Полученные данные важны для разработки новых подходов, направленных на усиление стероидогенного эффекта ЛГ и ХГ, и указывают на перспективность совместного применения гонадотропинов с ЛГ-активностью и низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ тиенопиримидиновой природы.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-75-20122).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *van de Lagemaat R., Raafs B.C., van Koppen C., Timmers C.M., Mulders S.M., Hanssen R.G.* Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH. *Endocrinology*. 152 (11):4350–4357. 2011. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>
2. *Шпак А. О.* Гонадотропины – от теории к клинической практике. Санкт-Петербург: Издательство Политехнического университета. 2018. ISBN 978-5-7422-6330-2 [*Shpakov A. O.* Gonadotropiny – ot teorii k klinicheskoy praktike [Gonadotropins – from the theory to clinical practice]. Sankt-Peterburg: Izdatel'stvo Politehnicheskogo universiteta [Saint Petersburg. Polytechnic University Publishing House] 2018 (in Russ)].
3. *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>
4. *Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S.* Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6: 142. 2015. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
5. *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: Membrane and Cell Biology*. 10 (4): 294–300. 2016. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
6. *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>
7. *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>
8. *van der Westhuizen E.T., Valant C., Sexton P.M., Christopoulos A.* Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353: 246–260. 2015. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.221606>

## Pretreatment of Rats with an Allosteric Luteinizing Hormone Receptor Agonist Enhances Chorionic Gonadotropin-Induced Stimulation of Testosterone Production

A. O. Shpakov<sup>a,#</sup>, A. A. Bakhtyukov<sup>a</sup>, D. V. Dar'in<sup>a</sup>, and K. V. Derkach<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: alex\_shpakov@list.ru*