

Бахтюков Андрей Андреевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА ОСНОВЕ
ТИЕНОПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Шпаков Александр Олегович

Официальные оппоненты:

Кокряков Владимир Николаевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией общей патологии Отдела общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук.

Ордян Наталья Эдуардовна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта

Защита состоится «21» апреля 2020 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (194223, Санкт-Петербург, пр. Тореца, д. 44; тел. (812)-552-79-01, электронная почта office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореца, д. 44, и на сайте <http://www.iephb.ru/sovet.htm>.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор биологических наук



Парнова Римма Германовна

Введение

Актуальность исследования

Лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), действие которых осуществляется через рецептор ЛГ/ХГЧ, в настоящее время широко используются для коррекции дисфункций репродуктивной системы у мужчин и женщин, а также во вспомогательных репродуктивных технологиях (Ezcurra, Humaidan, 2014; Riccetti et al., 2017). Однако применение гонадотропинов в клинике сопряжено с рядом нежелательных эффектов, среди которых синдром гиперстимуляции яичников и быстрое развитие резистентности к ним тканей-мишеней (Van Drosselaer et al., 2011; Ezcurra, Humaidan, 2014). В клинике применяют гонадотропины, полученные из различных источников: 1) формы гонадотропинов, выделяемые из мочи, которые характеризуются высокой степенью гетерогенности; 2) рекомбинантные формы препаратов, которые существенно отличаются от природных гонадотропинов по степени N-гликозилирования, а, следовательно, и по спектру специфической активности. Кроме того, гонадотропины настолько сильно активируют рецептор ЛГ/ХГЧ, что их использование приводит к десенситизации рецептора ЛГ/ХГЧ и снижению чувствительности стероидогенных тканей как к фармакологическим препаратам гонадотропинов, так и к эндогенному ЛГ. Препараты гонадотропинов используются только парентерально, что существенно ограничивает сферу их применения (Ezcurra, Humaidan, 2014; Шпаков, 2018). Все вышесказанное свидетельствует о том, что одной из актуальных задач современной биохимии и молекулярной эндокринологии является разработка новых классов агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, лишенных этих недостатков и обладающих высокой избирательностью действия на эффекторные системы клеток-мишеней и зависимые от них физиологические и биохимические процессы.

Одним из направлений разработки агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ является создание его низкомолекулярных лигандов, способных специфично связываться с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ/ХГЧ, расположенным в трансмембранном канале, и, тем самым, активировать этот рецептор. Среди разработанных в настоящее время аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ наиболее активными являются тиенопиримидиновые производные (ТП). Они способны активировать рецептор ЛГ/ХГЧ в клетках теки яичников и в клетках Лейдига семенников (van de Lagemaat et al., 2008; Деркач и др., 2014, 2016). В отличие от гонадотропинов, тиенопиримидиновые производные активны при пероральном введении, а благодаря своей гидрофобной природе способны преодолевать гистогематические барьеры и проникать через плазматическую мембрану клеток, что дает им возможность активировать даже те рецепторы, которые еще не встроились в плазматическую мембрану (Newton et al., 2011). Активация рецептора ЛГ/ХГЧ с помощью гонадотропинов приводит к стимуляции сразу нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов. При этом наиболее важным для синтеза половых стероидных гормонов является цАМФ-зависимый сигнальных каскад, тогда как остальные, хотя и вовлечены в контроль стероидогенной функции клеток Лейдига и фолликулярных клеток, но в основном задействованы в регуляции других внутриклеточных процессов, таких как рост, пролиферация, а также интернализация рецептора ЛГ/ХГЧ. Связывание агонистов на основе ТП с аллостерическим сайтом приводит к стабилизации ряда промежуточных активных конформаций рецептора ЛГ/ХГЧ, что вызывает активацию, как правило, преимущественно одного из внутриклеточных сигнальных каскадов. Это позволяет снизить риск побочных эффектов от избыточной активации сигнальных путей, не ассоциированных с синтезом половых стероидных гормонов (Шпаков, 2009, 2015, 2017).

Список сокращений: АЦ – аденилатциклаза; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ТП – тиенопиримидиновое производное; ТТГ – тиреотропный гормон; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; 3 β HSD и 17 β HSD – 3 β - и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (*Hsd3b* и *Hsd17b*); StAR – (Steroidogenic acute regulatory protein) регуляторный белок стероидогенеза (*Star*); P450_{sc} – цитохром P450 side chain cleavage enzyme (*Cyp11a1*); P450_{c17} – цитохром P450_{c17} (*Cyp17a1*).

Цель и задачи исследования

Цель: Разработка и изучение специфической биологической активности новых тиенопиримидиновых производных с активностью селективных аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, а также расшифровка молекулярных механизмов их действия на стероидогенез в клетках Лейдига в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Задачи:

1. Показать способность серии тиенопиримидиновых производных специфично активировать рецептор ЛГ/ХГЧ и селективно стимулировать активность аденилатциклазной сигнальной системы в тестикулярных мембранах крыс.
2. Изучить регуляторное влияние наиболее активного аллостерического агониста рецептора ЛГ/ХГЧ на основе тиенопиримидиновой структуры ТП03 на уровень тестостерона и систему стероидогенеза в первичной культуре клеток Лейдига семенников крысы в сравнении с таковым ХГЧ.
3. Изучить стимулирующие эффекты ТП03 на уровень тестостерона и систему стероидогенеза в семенниках при их однократном и длительном введении самцам крыс и сопоставить эти эффекты с таковыми ХГЧ.
4. Изучить совместное воздействие ТП03 и ХГЧ на уровень тестостерона в крови и на активность системы стероидогенеза в семенниках крыс при их введении животным в различных дозах.
5. Изучить влияние ТП03 на уровень тестостерона и стероидогенную функцию семенников у стареющих самцов крыс и у самцов крыс с сахарным диабетом 1-го типа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Впервые разработанные на основе структуры тиенопиримидина соединения активируют рецептор ЛГ/ХГЧ, проявляя селективность в отношении цАМФ-зависимого сигнального каскада, и не влияют на активность рецептора ТТГ.
2. Тиенопиримидиновое производное ТП03, являющееся наиболее эффективным и специфичным среди разработанных нами аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, активирует систему стероидогенеза в первичной культуре клеток Лейдига семенников крыс.
3. ТП03 повышает уровень тестостерона при разных способах введения самцам крыс, не вызывая снижения чувствительности семенников к эндогенным гонадотропинам.
4. При совместном введении ТП03 и ХГЧ отмечается аддитивность их стероидогенных эффектов и изменение паттерна регуляции стероидогенных генов.
5. ТП03 демонстрирует высокую эффективность, как стимулятор стероидогенеза, при обработке им как стареющих самцов крыс, так и самцов крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом 1-го типа, что указывает на перспективы его применения для нормализации андрогенного дефицита при возрастном ослаблении стероидогенеза и при диабетической патологии.

Научная новизна работы

В ходе исследований разработаны семь новых аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на основе тиенопиримидиновой структуры и показана их специфическая биологическая активность в условиях *in vitro* и *in vivo*, а для наиболее активных соединений изучены молекулярные механизмы и мишени их действия. Впервые показано влияние этого класса соединений на уровень тестостерона в крови и экспрессию стероидогенных генов в семенниках крыс при разных способах их введения. Показано, что ТП03, наиболее активное из разработанных нами соединений, в отличие от ХГЧ, не вызывает сильно выраженного повышения экспрессии генов, кодирующих стероидогенные ферменты, но при этом устойчиво

повышает уровень тестостерона в крови животных. ТП03 сохраняет чувствительность стероидогенных тканей к действию эндогенных гонадотропинов, повышая экспрессию гена, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ, тем самым, обеспечивая высокую плотность рецепторов ЛГ/ХГЧ на мембране тестикулярных клеток. Впервые на примере наиболее активного производного ТП03 изучено совместное воздействие низкомолекулярных аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ и гонадотропинов (ХГЧ) на тестикулярный стероидогенез и показано, что ТП03 не только усиливает действие ХГЧ, но и предотвращает снижение чувствительности к нему тканей семенников при длительной обработке самцов крыс с помощью комбинации ТП03 и ХГЧ. Впервые изучено влияние ТП03 на стероидогенез в семенниках стареющих самцов крыс и у самцов крыс с экспериментальной моделью сахарного диабета 1-го типа (СД1) и показано, что, несмотря на снижение стероидогенной функции при старении и диабетической патологии, соединение ТП03 частично восстанавливает чувствительность семенников к гонадотропинам, а его стероидогенный эффект в условиях старения и сахарного диабета становится сопоставимым с таковым ХГЧ.

Теоретическое и практическое значение работы

Разработанные и изученные ТП, включая наиболее активное соединение ТП03, могут стать прототипами для создания лекарственных препаратов с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, предназначенных для коррекции репродуктивных дисфункций как у мужчин (гипогонадотропный гипогонадизм, различные формы андрогенной недостаточности, и др.), так и у женщин (первичная аменорея, поликистоз яичников, и др.). При этом ТП активны как при парентеральном, так и при пероральном способах введения. Поскольку они эффективны, как стимуляторы продукции половых стероидных гормонов у стареющих и диабетических крыс, то их можно использовать для коррекции как возрастного андрогенного дефицита, так и при недостаточности андрогенов в условиях метаболических расстройств. Аддитивность эффектов ТП и гонадотропинов при их совместном применении является основой для разработки стратегий, направленных на снижение эффективных доз препаратов гонадотропинов при их комбинированном использовании с ТП. Это позволит избежать характерных для применения даже умеренных доз гонадотропинов побочных эффектов, в том числе синдрома гиперстимуляции яичников при проведении вспомогательных репродуктивных технологий у женщин, и предупредить вызываемое ими развитие резистентности гонад к ЛГ и ХГЧ. Полученные экспериментальные результаты расширяют имеющиеся представления о природе и механизмах аллостерической регуляции функциональной активности G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR), а разработанные на их основе теоретические представления могут быть использованы в курсах лекций по общей биохимии, молекулярной биологии, молекулярной и клинической эндокринологии, фармакологии для студентов медицинских и биологических вузов.

Апробация работы

Основные результаты работы были доложены и обсуждались на XIX и XX Международных медико-биологических конференциях «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016, 2017), на III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016), на XV Всероссийском совещании с международным участием и VIII школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016), на XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии - 2017» (Санкт-Петербург, 2017), на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Москва, Пущино, 2017, 2019), на Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Всероссийском симпозиуме «белки и пептиды» (Москва, 2017), на VI молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2018), на International conference «Biomembranes-2018» (Москва, 2018), на Всероссийской конференции молодых ученых

«Современные аспекты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018, 2019), на XXV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2019» (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 33 работы, в том числе 10 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией РФ для размещения материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 21 тезис докладов всероссийских и международных конференций, 1 глава в книге и 1 монография.

Личный вклад автора

Все экспериментальные результаты, представленные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил все биохимические исследования, осуществлял эксперименты с животными, выполнял статистическую обработку полученных данных, осуществлял их анализ и обобщение, представлял результаты исследования на всероссийских и международных конференциях, участвовал в подготовке публикаций по материалам работы. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00126, 2016–2018 гг.) и Российского научного фонда (проект № 19-75-20122). При проведении экспериментальных исследований использовали оборудование центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 134 страницах и состоит из введения, обзора литературы в трех главах, описания материалов и методов, описания результатов исследования в пяти главах, обсуждения, заключения и выводов. Список литературы включает 32 отечественных и 178 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 32 рисунками и 6 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре обобщены сведения о функционировании гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси, а также способах ее регуляции на уровне гипоталамуса, гипофиза и семенников. Представлен обзор достижений в разработке низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецептора ЛГ/ХГЧ. Обобщены современные представления о функциональном состоянии системы стероидогенеза в семенниках и механизмах ее регуляции в норме, при сахарном диабете и старении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка и синтез серии тиенопиримидиновых производных. Ряд новых биологически активных ТП – 5-амино-*N*-*трет*-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП03), 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(1-метил-1*H*-пиразол-4-карбоксамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП04), 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(изоникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП01), 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)-4-(3-(тиофен-3-карбоксамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП02), 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(2-метоксиникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП21), 4-((3-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)фенил)карбамоилпиримидин 1-оксид (ТП22), 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(3-(2-хлорникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП23) были синтезированы и охарактеризованы на кафедре органической химии

Института химии Санкт-Петербургского государственного университета (Деркач и др., 2016, 2017).

Для экспериментов *in vivo* использовали самцов крыс Wistar. В экспериментах с разными схемами введения препаратов использовали трехмесячных самцов массой 250–280 г, в каждой экспериментальной группе $n=5$. Для исследования влияния ТПО3 и ХГЧ на стероидогенез в условиях старения изучали самцов крыс в возрасте 15 месяцев ($n=5$ в каждой группе). ТП, растворенные в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО), вводили внутривенно или перорально, а лиофилизированный ХГЧ (Московский эндокринный завод, Россия) – подкожно.

Моделирование сахарного диабета 1-го типа. Модель среднего по тяжести СД1 индуцировали однократным введением стрептозотоцина (в/б, 45 мг/кг) трехмесячным самцам крыс. Развитие СД1 оценивали через 10 дней по уровню глюкозы в крови, отбирая крыс с постпрандиальным уровнем глюкозы выше 12 мМ. Контрольным животным вместо стрептозотоцина в том же объеме и в те же сроки вводили его растворитель – 0.1 М цитратный буфер (рН 4.5). Через 5 недель диабетическим крысам в течение 5 дней вводили ХГЧ (100 МЕ/крысу/день, п/к) или ТПО3 (15 мг/кг/день, в/б).

Измерение активности аденилатциклазы. Определение активности аденилатциклазы (АЦ) (АТФ-пирофосфат-лиаза циклизующая, ЕС 4.6.1.1) проводили, как описано ранее в работе (Derkach et al., 2015). Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ АТФ, 0.1 мМ цАМФ, 1 мкКи $[\alpha\text{-}^{32}P]$ -АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 30–80 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 10–12 мин при 37°C, начиная ее добавлением фракции плазматических мембран, выделенных, как описано ранее (Деркач и др. 2016), и останавливая 100 мкл 0.5 М HCl. Пробы кипятили 6 мин и нейтрализовали HCl с помощью 100 мкл 1.5 М имидазола. Образовавшийся $[^{32}P]$ -цАМФ отделяли на колонках с оксидом алюминия (нейтральный, 2-я степень активности по Брокману), используя в качестве элюента 8 мл 10 мМ имидазол-HCl буфера (рН 7.4). Элюат собирали в сцинтилляционные флаконы и считали радиоактивность на сцинтилляционном счетчике Rack-Beta («ЛКВ», Швеция). Каждое измерение проводили в трех независимых экспериментах в трех параллельных пробах. Активность АЦ представляли в пмоль цАМФ/мин на мг мембранного белка.

АДФ-рибозилирование G-белков в мембранных фракциях с помощью бактериальных токсинов. Для специфического выключения гетеротримерных G-белков из сигнальной трансдукции проводили АДФ-рибозилирование тестикулярных мембран с помощью холерного (ХТ) и коклюшного токсинов (КТ), как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Фракции мембран (концентрация белка около 1 мг/мл) инкубировали с 100 мкг/мл ХТ или 10 мкг/мл КТ в 400 мкл 50 мМ Tris-HCl-буфера (рН 7.8), содержащего 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ, 0.1 мМ НАД, 1 мМ НАДФ, 0.1 мМ гуанилилимидодифосфата (GppNHp) (для ХТ) или ГТФ (для КТ), 1 мМ АТФ, 10 мМ тимидин и коктейль ингибиторов протеаз. Предварительно бактериальные АДФ-рибозилтрансферазы активировали (15 мин, 37 °C) с помощью 20 мМ ДТТ и 0.1 % SDS (для ХТ) или 1 мМ АТФ и 0.1 % Lubrol-PX (для КТ). Затем суспензию мембран разводили до объема 5 мл 50 мМ Tris-HCl-буфером (рН 7.5), содержащим 5 мМ $MgCl_2$, центрифугировали (37 000 g, 15 мин), осадок ресуспензировали в том же буфере и использовали для экспериментов. Сходным образом обрабатывали контрольные мембраны, но без токсинов.

Определение ГТФ-связывания G-белков. Для исследования специфичности ТП в отношении гетеротримерных G-белков проводили определение специфического ГТФ-связывания G-белков во фракциях плазматических мембран по методу (McIntire et al., 2001). В реакционную смесь (50 мМ Tris-HCl буфер (рН 8.0), 1 мМ ЭДТА, 50 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ДТТ, 1 мкМ (GppNHp), 100 мМ NaCl, 0.5–1 мкКи $[8\text{-}^3H]$ GppNHp). вносили 30–80 мкг белка. После инкубации в течение 45 мин при 37 °C реакцию связывания останавливали добавлением 100 мкл 0.1 % раствора Lubrol-PX в 20 мМ фосфатном буфере (рН 8.0). Пробы фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (тип HA, 0.45 мкм, «Millipore», США), фильтры дважды промывали 4 мл 20 мМ K/Na-фосфатного буфера (рН 8.0), высушивали и затем помещали в вials со сцинтилляционной

смесью, которая включала 0.4 % 2,5-дифенилоксазола и 0.02 % 1-4бис(2-5-фенилоксазолилбензола). Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике Rack-Beta («ЛКВ», Швеция). Специфическое ГТФ-связывание определяли как разность между связыванием [^3H]GppNHp в пробе в отсутствие ГТФ и таковым в присутствии 10 мМ ГТФ.

Иммуноферментный анализ. Определение уровня гормонов проводили в плазме крови и в гомогенате тканей семенников. Кровь забирали из хвостовой вены крыс под местной анестезией. Ткани гомогенизировали на льду в лизирующем буфере, центрифугировали 10 мин, 120000 g. Уровень тестостерона определяли с помощью набора «Тестостерон-ИФА» (Алкор-Био, Россия). Уровень прогестерона и 17-гидроксипрогестерона определяли в гомогенате тканей семенников с помощью наборов «Прогестерон-ИФА» и «17-гидроксипрогестерон» (Хема, Россия). Уровень прегненолона и андростендиона определяли в гомогенате тканей семенников с помощью наборов «Pregnenolone direct ELISA» и «Androstendione ELISA» (DRG Gmb, Германия). Уровень свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и общего трийодтиронина (tT3) в плазме крови измеряли с помощью наборов «ИФА-СвТ4-1», «ИФА-ТТ4-1» и «ИФА-ТТ3-1» (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия). Все измерения проводили на спектрофотометре Anthos Absorbance Reader 2020 («Anthos Labtec Instruments», Австрия).

Выделение тотальной РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. Экспрессию генов оценивали с помощью количественной ПЦР, для чего из тканей семенников или из первичной культуры клеток Лейдига с помощью «TRIzolReagent» (США) выделяли тотальную РНК. Комплементарную ДНК получали с помощью реакции обратной транскрипции, используя набор «MMLV RT Kit» («Евроген», Россия). Для проведения реакции использовали смесь для амплификации, содержащую 10 нг ПЦР-продукта, прямой и обратный праймеры (0.4 мкМ), среду qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия). Измерение проводили с помощью прибора «7500 Real-Time PCR System» («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). В реакции использовали праймеры, описанные ранее (Бахтюков и др. 2018, 2019). В качестве референсных использовали гены *Gapdh* и *Actb*. Для расчета использовали метод 2deltaCt. Все данные были представлены как относительный уровень мРНК (RQ).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку проводили, используя пакет программ IBM SPSS (США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения нескольких выборок с нормальным распределением использовали t-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработанные нами тиенопиримидиновые производные селективно активируют аденилатциклазу через рецептор ЛГ/ХГЧ, но не влияют на рецептор ТТГ

Аллостерический сайт связывания рецептора ЛГ/ХГЧ имеет сходную структуру с подобным сайтом рецептора тиреотропного гормона (рецептор ТТГ). Способность аллостерического агониста рецептора ЛГ/ХГЧ активировать рецептор ТТГ может привести к развитию побочных эффектов со стороны тиреоидной системы. Поэтому первоочередной задачей было показать стимулирующее влияние ТП на аденилатциклазную систему и убедиться в отсутствии влияния аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на рецептор ТТГ. Активация рецептора ТТГ, как и в случае рецептора ЛГ/ХГЧ, приводит к активации гетеротримерного G_s -белка и сопряженной с ним АЦ, что вызывает повышение уровня цАМФ в клетке и стимулирует синтез тиреоидных гормонов. Поэтому нами было исследовано влияние ТП01, ТП02, ТП03, ТП04, ТП21, ТП22 и ТП23 на активность АЦ в мембранах, выделенных из семенников крыс, где расположены рецепторы ЛГ/ХГЧ, а также на активность АЦ в мембранах, выделенных из щитовидной железы животных, в условиях *in vitro*, а также на уровни тестостерона и тиреоидных гормонов в крови самцов крыс в условиях *in vivo* при внутрибрюшинном введении им ТП.

Показано, что все разработанные нами ТП повышают активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс, хотя и в меньшей степени, чем ХГЧ. При этом наиболее эффективными были соединения ТП03 и ТП23, которые повышали базальную активность АЦ на 295 и 246%, соответственно (Табл. 1).

Далее изучали специфичность ТП в отношении рецептора ЛГ/ХГЧ, для чего оценивали их возможное влияние на активность АЦ в мембранах, выделенных из тканей щитовидной железы самцов крыс, где рецепторы ЛГ/ХГЧ отсутствуют, но представлены рецепторы ТТГ. Показано, что в тироидальных мембранах ТП не влияли на активность АЦ, за исключением соединения ТП21 (Табл. 1).

Табл. 1. Влияние тиенопиримидиновых производных и взятых для сравнения ХГЧ и ТТГ 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	
Базальная активность	23 ± 4	19 ± 3
ТП01, 10⁻⁴ М	48 ± 4*	22 ± 3
ТП02, 10⁻⁴ М	53 ± 6*	23 ± 3
ТП03, 10⁻⁴ М	76 ± 4*	24 ± 4
ТП04, 10⁻⁴ М	54 ± 2*	23 ± 2
ТП21, 10⁻⁴ М	44 ± 3*	28 ± 3*
ТП22, 10⁻⁴ М	41 ± 2*	17 ± 2
ТП23, 10⁻⁴ М	67 ± 5*	23 ± 3
ХГЧ, 10⁻⁹ М	137 ± 7*	24 ± 4
ТТГ, 10⁻⁹ М	25 ± 3	166 ± 8*

Примечание. * - различия между базальной и стимулированной ТП или гормонами активностью АЦ статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SD$, $n=5$.

Далее исследовали влияние ТП на продукцию тестостерона, контролируемую через активацию аденилатциклазной системы в клетках Лейдига, в условиях *in vivo*. Повышение уровня тестостерона отмечали через 1 ч после в/б введения ТП03, ТП04 и ТП23. Максимальный уровень тестостерона отмечали через 3 ч после введения ТП01, ТП03 и ТП04. При этом эффект ТП03 на уровень тестостерона был более выражен, чем у других ТП (Табл. 2).

Табл. 2. Влияние тиенопиримидиновых производных и ХГЧ на прирост уровня тестостерона через 1 и 3 ч после их внутривенного введения самцам крыс.

Соединение	Прирост уровня тестостерона, нмоль/л, $M \pm SD$, $n=5$	
	Через 1 ч	Через 3 ч
ТП01, 25 мг/кг	20.3 ± 6.7	33.6 ± 10.2
ТП03, 25 мг/кг	34.5 ± 9.2	101.8 ± 22.3
ТП04, 25 мг/кг	36.6 ± 10.5	71.9 ± 18.7
ТП21, 25 мг/кг	23.3 ± 7.4	19.7 ± 6.6
ТП22, 25 мг/кг	19.2 ± 6.8	14.0 ± 8.3
ТП23, 25 мг/кг	38.4 ± 10.3	26.7 ± 7.4
ХГЧ, 100 МЕ/крысу	87.4 ± 12.3	143.5 ± 29.2

На следующем этапе оценивали способность ТП03 оказывать активирующее или, что не менее важно, ингибирующее влияние на рецептор ТТГ и функции щитовидной железы, для чего животным вводили ТП03, а через 30 мин интраназально – тиролиберин, рилизинг-фактор ТТГ, в дозе 300 мкг/кг. Введение ТП03 не влияло на базальные и стимулированные

тиролиберином уровни тироксина и трийодтиронина, что доказывает отсутствие влияния ТП03 на рецептор ТТГ (Рис. 1).

Таким образом, показано, что впервые разработанные нами ТП стимулируют активность АЦ в тестикулярных мембранах и синтез тестостерона в семенниках крыс, но при этом не влияют на активность АЦ в тироидальных мембранах и на уровень тиреоидных гормонов, что указывает на их селективность в отношении рецептора ЛГ/ХГЧ. Наибольшей селективностью и эффективностью в отношении рецептора ЛГ/ХГЧ характеризуется ТП03, в связи с чем это соединение было выбрано для исследования молекулярных механизмов и мишеней действия аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на основе структуры тиенопиримидина.

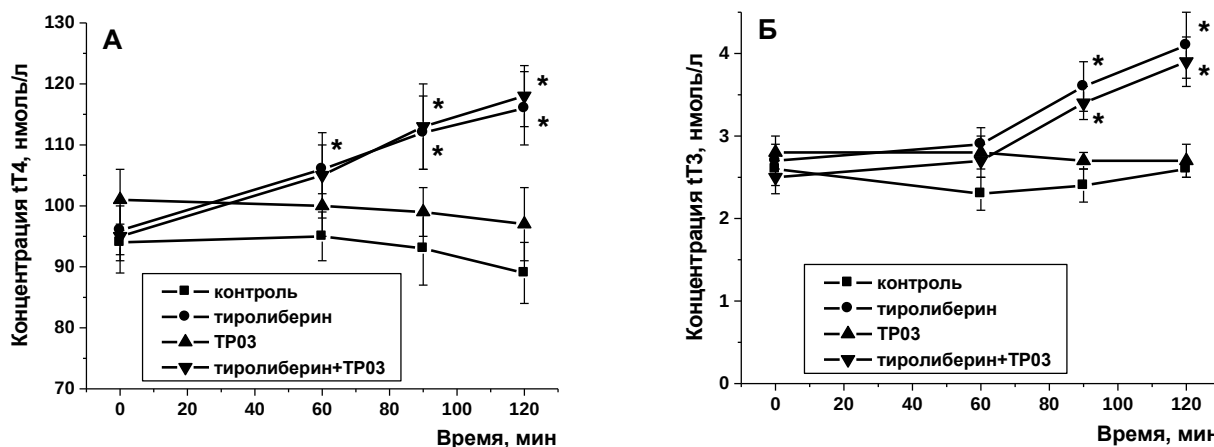


Рис. 1. Влияние ТП03 на базальные и стимулированные тиролиберином уровни общего тироксина (А) и общего трийодтиронина (Б) у самцов крыс.

ТП03 вводили внутривенно (25 мг/кг), тиролиберин – интраназально (300 мкг/кг). Введение тиролиберина осуществляли через 30 мин после введения ТП03. * - различия между контролем и группами, обработанными тиролиберином и ТП, статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SD$, $n=5$.

2. Тиенопиримидиновые производные селективно активируют G_s -белки в тестикулярных мембранах

Одной из особенностей аллостерических регуляторов GPCR является их селективность в отношении определенных внутриклеточных сигнальных каскадов. Разработка таких агонистов позволяет регулировать определенный сигнальный путь, избегая активации других внутриклеточных каскадов, что делает их использование в клинике более целенаправленным и безопасным.

Поскольку рецептор ЛГ/ХГЧ сопряжен в основном с G_s - и $G_{q/11}$ -белками и, в меньшей степени, с G_i -белками, то, используя бактериальные токсины и пептидную стратегию, нами было изучено влияние ТП03 на активность каждого из этих типов G-белков. Для этого оценивали влияние микромолярных концентраций ТП03 на базальную активность АЦ, а также на ГТФ-связывание G_s -, G_i - и $G_{q/11}$ -белков в тестикулярных мембранах, обработанных ХТ или КТ или синтетическим пептидом, соответствующим С-концевому сегменту $G\alpha_q$ -субъединицы крысы (Рис. 2). Для изучения эффектов ТП03 на стероидогенные клетки семенников оценивали активность АЦ и уровень ГТФ-связывания в тестикулярных мембранах.

В тестикулярных мембранах, обработанных ХТ, снижались стимулирующие эффекты ТП03 на базальную активность АЦ и ГТФ-связывание гетеротримерных G-белков. В случае стимуляции ГТФ-связывания отмечали почти полное блокирование эффекта ТП03 в концентрации 10^{-6} М, в то время как в концентрации 10^{-4} М этот эффект снижался на 71%. Эти данные означают, что ТП03 в концентрации 10^{-6} М в основном стимулирует активность АЦ через G_s -белки, в то время как в концентрации 10^{-4} М выявляется его стимулирующее влияние,

хотя и слабо выраженное, на G-белки, не чувствительные к ХГ. В случае ХГЧ в обработанных ХТ мембранах отмечали блокирование АЦ эффекта, в то время как прирост ГТФ-связывания снижался только на 46 %. Обработка КТ не влияла на эффекты ТПОЗ и ХГЧ. Таким образом, $G_{i/o}$ -белки не являются мишенями для ТП.

Влияние ТПОЗ и ХГЧ на стимуляцию ГТФ-связывания в тестикулярных мембранах, инкубированных с пептидом 349–359 G_{α_q} -субъединицы, значительно различалось (Рис. 2Б). Стимуляция ГТФ-связывания ХГЧ при этом снижалась на 31 %, а стимуляция ГТФ-связывания ТПОЗ существенно не менялась, и лишь немного снижалась при концентрации ТПОЗ, равной 10^{-4} М. Следовательно, в отличие от ХГЧ, мишенями которого в одинаковой степени являются G_s - и $G_{q/11}$ -белки, действие ТПОЗ специфично в отношении G_s -белков, что обуславливает его селективное влияние на активность АЦ и цАМФ-зависимые каскады, ответственные за стимуляцию стероидогенеза.

Таким образом, с помощью АДФ-рибозилирования бактериальными токсинами и пептидной стратегии установлена селективность воздействия ТПОЗ на G_s -белки, через которые реализуется стимулирующий эффект ТП на стероидогенез. Гонадотропины не обладают такой селективностью, так как они со сходной эффективностью активируют $G_{q/11}$ -белки, сопряженные с фосфолипазой $C\beta$, что может быть причиной характерных для них побочных эффектов.

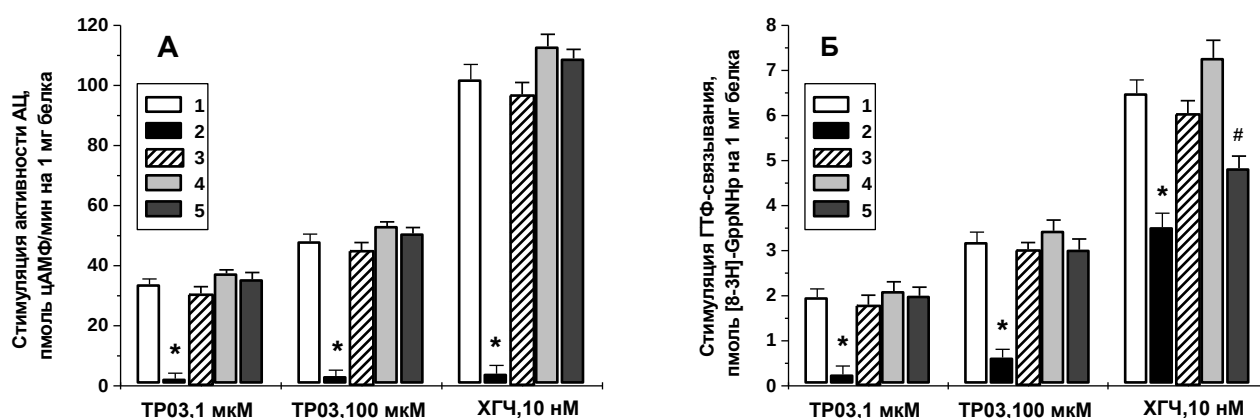


Рис. 2. Стимулирующий эффект ТПОЗ (10^{-6} и 10^{-4} М) и ХГЧ (10^{-8} М) на активность АЦ (А) и ГТФ-связывание (Б) в тестикулярных мембранах крыс, обработанных бактериальными токсинами или инкубированных с пептидом 349–359 G_{α_q} -субъединицы.

1 – контрольные мембраны (1), без обработки токсинами, 2 – мембраны с ХТ, 3 – мембраны с КТ, 4 – контрольные мембраны (2) без пептида, 5 – мембраны, инкубированные с пептидом 349–359, комплементарным $G_{\alpha_{q/11}}$ -субъединице. * – различия между эффектами ТПОЗ и ХГЧ на активность АЦ в контрольных мембранах (1) и в мембранах, обработанных токсинами, # – между соответствующими эффектами в контрольных мембранах (2) и в мембранах, инкубированных с пептидом, статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SD$, $n=5$.

3. Тиенопиримидиновое производное ТПОЗ с активностью агониста рецептора ЛГ/ХГЧ стимулирует повышение уровня тестостерона и влияет на экспрессию стероидогенных генов в первичной культуре клеток Лейдига семенников

Соединение ТПОЗ в микромолярных концентрациях повышало уровень тестостерона в первичной культуре клеток Лейдига. При воздействии ТПОЗ в концентрации 10^{-5} М уровень тестостерона в культуральной среде максимально увеличился через 3 ч с 25 ± 2 до 127 ± 21 нМ. За 6 ч инкубации прирост уровня тестостерона составил 68% от такового для ХГЧ в концентрации 1 МЕ/мл. При изучении влияния ТПОЗ и ХГЧ на уровень тестостерона в культуральной среде было определено значение EC_{50} , которое составило 310 ± 25 нМ для ТПОЗ против 0.57 ± 0.10 нМ для ХГЧ.

Для доказательства того, что основной мишенью ТП является стероидогенная система в клетках Лейдига семенников, изучали влияние ТП03 на экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ (*Lhr*), транспортный белок StAR – регуляторный белок стероидогенеза (*Star*), отвечающий за транспорт холестерина из цитоплазмы в матрикс митохондрий, ферменты синтеза тестостерона P450_{ssc} – цитохром P450 side chain cleavage enzyme (*Cyp11a1*); 3 β HSD – 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа (*Hsd3b*); 17 β HSD – 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа (*Hsd17b*); P450_{c17} – цитохром P450_{c17} (*Cyp17a1*) в первичной культуре клеток Лейдига крыс в сравнении с таковым ХГЧ.

Показано, что обработка ТП03 в концентрации 10^{-5} М вызывает повышение экспрессии гена *Lhr* на 45%, а экспрессия гена *Star* на 30% (Рис. 3). Сходный эффект на экспрессию генов *Star* и *Lhr* оказывал и ХГЧ. Инкубация с ТП03 оказывает влияние и на ряд генов, кодирующих ферменты синтеза тестостерона: *Cyp17a1* и *Hsd17b*, (цитохром P450_{c17} и 17- β HSD), которые катализируют превращение прогестерона в 17-ОН-прогестерон, андростендион и далее, в тестостерон – стадии синтеза тестостерона, реализуемые в цистернах эндоплазматической сети.

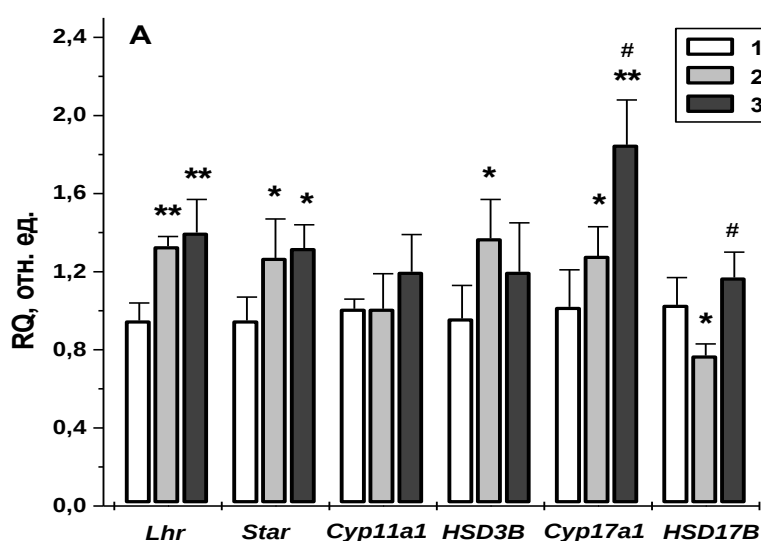


Рис. 3. Влияние ХГЧ и ТП03 на экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ, белок StAR и ферменты стероидогенеза, в клетках Лейдига крысы.

1 – контроль (ДМСО); 2 – ХГЧ, 1 МЕ/мл; 3 – ТП03, 10^{-5} М. *, ** - отличия от контрольной группы статистически значимы при $p < 0.05$ или $p < 0.001$. # - различия между группами, обработанными ХГЧ и ТП03, статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n = 5$.

4. Влияние однократного и длительного введения тиенопиримидиновых производных на уровень тестостерона и стероидогенез в семенниках крыс

ТП с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ обладают способностью повышать уровень половых стероидных гормонов не только при парентеральном, но и при пероральном способе введения, что выгодно отличает их от фармакологических препаратов гонадотропинов. Было показано, что ТП01, ТП03 и ТП04 при внутрибрюшинном (в/б) и пероральном (п/о) введении повышают уровень тестостерона в крови самцов крыс (Табл. 3). При всех способах введения ТП03 повышало уровень тестостерона в большей степени, чем ТП04 и ТП01. Максимальный эффект ТП03 при в/б и пероральном введении достигался через 3 ч. Уровень тестостерона при этом повышался соответственно в 14 и 4.6 раза от его уровня до введения. Таким образом, ТП03, ТП04 и ТП01 оказались активны не только при в/б, но и при пероральном, неинвазивном, способе введения, что делает их хорошей альтернативой препаратам гонадотропинов и в перспективе позволяет использовать в клинике в таблетированной форме.

Табл. 3. Уровень тестостерона в крови самцов крыс при однократном внутривбрюшинном и пероральном введении тиенопиримидиновых производных.

Время после введения, ч	Уровень тестостерона в крови крыс, нмоль/л			
	0	1	3	5
Внутривбрюшинное введение				
Контроль (ДМСО)	10.6 ± 5.2	20.6 ± 9.9	15.9 ± 7.5	13.2 ± 6.1
ТП03, 25 мг/кг	9.5 ± 4.9	51.9 ± 14.0*	132.9 ± 27.1**	63.1 ± 19.1**
ТП04, 25 мг/кг	13.0 ± 7.8	54.7 ± 17.6*	88.3 ± 32.3**	58.4 ± 22.0*
ТП01, 25 мг/кг	18.5 ± 6.1	38.8 ± 6.6	49.2 ± 10.5*	42.3 ± 10.5*
Пероральное введение				
Контроль (ДМСО)	15.5 ± 8.9	24.1 ± 10.4	17.8 ± 10.2	12.1 ± 3.9
ТП03, 50 мг/кг	12.0 ± 4.2	21.9 ± 8.4	55.6 ± 19.3*	53.3 ± 17.3**
ТП04, 50 мг/кг	11.8 ± 4.9	19.1 ± 7.8	27.3 ± 8.8	26.7 ± 13.0*
ТП01, 50 мг/кг	14.4 ± 5.0	28.7 ± 8.1	47.8 ± 12.0*	37.8 ± 9.1*

Примечание: *, ** - различия между контролем и группами крыс, которые обрабатывали ТП, достоверны при $p < 0.05$, $M \pm SD$, $n=5$.

Для изучения стероидогенной функции ТП и гонадотропинов в условиях *in vivo*, нами было изучено влияние ТП03 и ХГЧ на экспрессию генов *Lhr*, *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b*, *Cyp17a1*, *Hsd17b* в семенниках крыс. Для оценки активности стероидогенных ферментов были изучены концентрации тестостерона и его прекурсоров в семенниках крыс, обработанных ТП03 и ХГЧ.

Показано, что введение ТП03 и ХГЧ приводило к повышению экспрессии гена *Star* на 90 и 220%, соответственно (Рис. 4). Однократное введение ТП03 вызывало повышение экспрессии гена *Cyp17a1* на 167%, а введение ХГЧ – на 146%. При этом введение ХГЧ приводило к снижению экспрессии *Hsd3b* и *Hsd17b* на 71 и 43%, соответственно, а также к снижению экспрессии *Lhr* на 53%, что может быть одной из первопричин уменьшения чувствительности тестостерон-продуцирующих клеток семенников к действию эндогенных гонадотропинов, которое является частым осложнением при использовании ХГЧ и ЛГ в медицине.

Обработка ТП03 и ХГЧ привела не только к изменению генной экспрессии, но и к изменению активности ферментов, участвующих в синтезе тестостерона. Для того, чтобы изучить влияние ТП03 и ХГЧ на активность ферментов синтеза тестостерона, были измерены уровни стероидных гормонов в семенниках самцов крыс через 30 мин после введения ТП03 и ХГЧ, чтобы проследить изменения активности ферментов на ранний этапах клеточного ответа до изменения экспрессии генов, кодирующих стероидогенные белки. Далее в тканях семенников с помощью ИФА измеряли уровни прегненолона – продукта цитохрома P450_{scs}, прогестерона – продукта 3βHSD, 17-ОН-прогестерона и андростендиона, продуктов P450_{c17}, и тестостерона – продукта 17βHSD.

Однократное введение ТП03 и ХГЧ приводило к повышению уровня тестостерона в семенниках на 84 и 514%, соответственно (Табл. 4). На фоне повышения уровня тестостерона в крови и семенниках, уровень прегненолона в семенниках при обработке ТП03 и ХГЧ снижался на 40 и 62%, соответственно. Это можно объяснить быстрой конверсией прегненолона в прогестерон, и далее в 17-ОН-прогестерон и андростендион ферментами дегидрогеназой 3βHSD и цитохромом P450_{c17}. Как известно, 17-ОН-гидроксилазная активность цитохрома P450_{c17} приводит к образованию 17-ОН-прогестерона. Обработка ХГЧ и ТП03 вызывала повышение уровня 17-ОН-прогестерона на 590 и 40%, соответственно. Результатом 17,20-лиазной активности цитохрома P450_{c17} является образование андростендиона. Обработка ХГЧ и ТП03 приводила к повышению уровня андростендиона на 225 и 70%, соответственно. Обработка ХГЧ вызывала более выраженное повышение уровней 17-ОН-прогестерона и андростендиона, чем в случае ТП03 (Табл. 4.). Полученные данные хорошо соотносятся с данными по экспрессии гена *Cyp17a1*, кодирующего цитохром P450_{c17}, которая повышалась при однократной обработке ТП03 и ХГЧ.

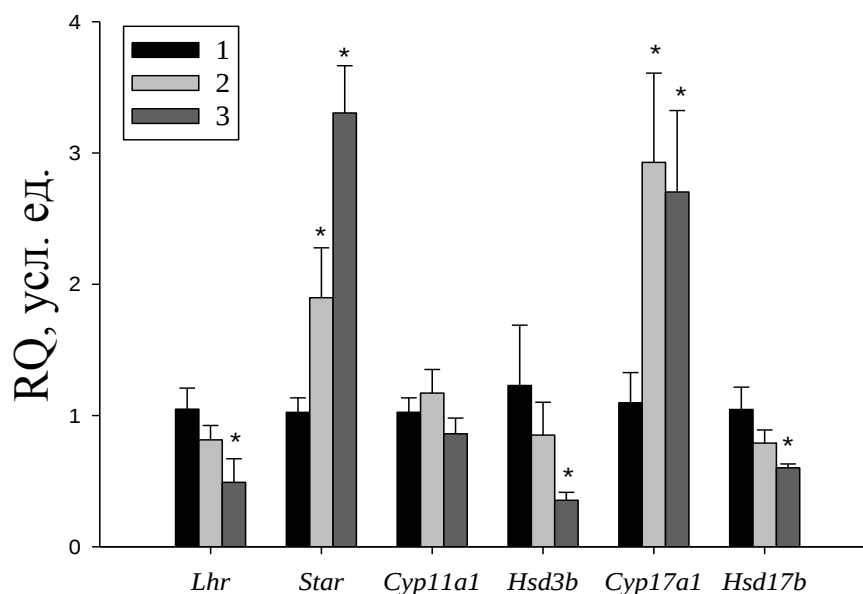


Рис. 4. Влияние однократного введения ХГЧ и ТПОЗ на экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ, белок StAR и ферменты синтеза тестостерона, в семенниках крыс.

1 – Контроль (ДМСО); 2 – ТПОЗ, 15 мг/кг; 3 – ХГЧ, 100 МЕ/крысу. Значения RQ рассчитаны по отношению к контролю. * - различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n=5$.

Табл. 4. Влияние однократного введения ТПОЗ и ХГЧ на уровень стероидных гормонов в семенниках крыс.

	Контроль	ХГЧ, 100 МЕ/крысу	ТПОЗ, 15мг/кг
Прегненолон, нмоль/г ткани	1.25±0.08	0.77±0.09*	0.89±0.06*
Прогестерон, нмоль/г ткани	0.41±0.05	0.46±0.08	0.45±0.05
17-ОН-прогестерон, мкмоль/г ткани	43.83±9.79	302.15±36.39*	61.33±5.76*#
Андростендион, мкмоль/г ткани	44.27±3.48	143.48±22.17*	75.20±14.56*#
Тестостерон, нмоль/г ткани	0.49±0.12	3.01±0.28*	0.90±0.07*#

*-отличие между животными, обработанными ТПОЗ и ХГЧ и контролем достоверно, $p < 0.05$, #- отличие между животными, обработанными ТПОЗ и ХГЧ, достоверно $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n=5$.

Соотношение 17-ОН-гидроксилазной и 17,20-лиазной активности цитохрома P450c17 используется для оценки эффективности процесса синтеза тестостерона. При этом увеличение отношения 17-ОН-прогестерон/андростендион в сторону повышения уровня 17-ОН-прогестерона означает преобладание 17-ОН-гидроксилазной активности над 17,20-лиазной активностью, что говорит о дисбалансе уровня предшественников тестостерона, который в дальнейшем вызывает ослабление стероидогенеза. Отношение 17-ОН-прогестерон/андростендион при обработке ХГЧ составляет 2.1, а при обработке ТПОЗ – 0.8. Это может указывать на более высокую эффективность синтеза тестостерона без необходимости значительного повышения экспрессии белка StAR и уровней стероидных метаболитов 17-ОН-прогестерона и андростендиона при обработке самцов крыс низкомолекулярным агонистом.

Таким образом, однократная обработка самцов крыс ТПОЗ вызывает повышение уровня тестостерона, которое обусловлено усилением стероидогенеза в семенниках, что выражается в повышении экспрессии гена транспортного белка StAR и фермента P450c17, а также его продуктов 17-ОН-прогестерона и андростендиона. При этом не происходит снижения экспрессии гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ, и повышения отношения 17-ОН-прогестерон/андростендион, которое отмечается при обработке животных с помощью ХГЧ.

Одним из побочных эффектов гонадотропинов является снижение чувствительности к ним стероидогенных тканей и, как следствие, нарушение синтеза половых стероидных гормонов при длительной терапии. Это может быть связано с гиперактивацией рецептора ЛГ/ХГЧ и

зависимых от него каскадов, а также со значительным временем полужизни гонадотропинов в кровотоке. Поэтому далее изучали эффекты длительного введения ТПОЗ и ХГЧ на уровень тестостерона в крови и на стероидогенез в семенниках крыс.

При введении ТПОЗ самцам крыс в течение 7 дней уровень тестостерона в крови постепенно повышался. При введении 100 МЕ/крысу ХГЧ в течение того же периода времени было показано значительное повышение уровня тестостерона, превосходившее таковое при введении ТПОЗ, в первый, 4-й и 5-й дни, но в остальные дни эффект ХГЧ был менее выражен (Рис. 5). Несмотря на то, что в первый день под действием ХГЧ уровень тестостерона на 240% превосходил таковой при введении ТПОЗ, к седьмому дню картина менялась. При обработке ХГЧ уровень тестостерона в первый день был на 140% выше, чем в седьмой день. Под действием ТПОЗ уровень тестостерона в первый день был на 40% ниже, чем на седьмой день (Рис. 5). Таким образом, длительное введение ХГЧ приводило к ослаблению стероидогенного ответа, в то время как в случае введения ТПОЗ уровень тестостерона постепенно повышался в течение всего времени эксперимента, что говорит о сохранении чувствительности тканей семенников к действию ТП.

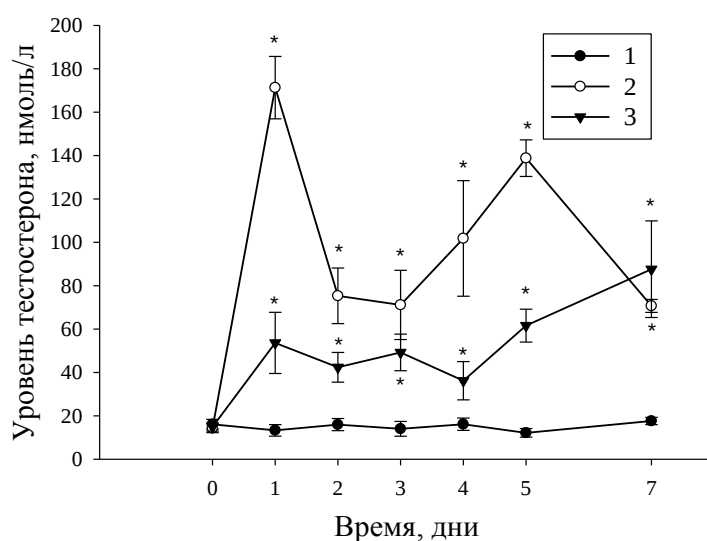


Рис. 5. Влияние семидневной обработки самцов крыс с помощью ХГЧ или ТПОЗ на уровень тестостерона в крови животных.

1 – контроль, 2 – ХГЧ, 100 МЕ/крысу, 3 – ТПОЗ, 15 мг/кг. * – различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$. $n=5$.

Далее изучали эффекты ТПОЗ и ХГЧ на экспрессию генов *Lhr*, *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b* и *Hsd17b* в семенниках крыс после трех- и семидневого их введения самцам крыс. Однократное введение ТПОЗ привело к повышению экспрессии *Star* и *Cyp17a1*. При более длительном введении, в течение 3 и 7 дней, экспрессия генов увеличивалась на 220 и 212%, соответственно (Рис. 6). Экспрессия гена *Cyp17a1*, через 3 дня увеличилась на 172%, а к седьмому дню на 190%. Отмечали значительное повышение экспрессии гена *Lhr* на 3-й и 7-й день эксперимента. Таким образом, при длительном введении соединение ТПОЗ не вызывало значительного изменения экспрессии генов, вовлеченных в синтез тестостерона, кроме генов *Lhr*, *Star* и *Cyp17a1* (Рис. 6).

Длительная обработка ХГЧ привела к более выраженным изменениям. Экспрессия гена *Star* увеличилась на 3-й и 7-й дни и достигла 400% от контрольных значений. Экспрессия гена *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450_{ssc}, значительно увеличилась через 3 и 7 дней введения ХГЧ, в отличие от его однократного введения. Экспрессия гена *Cyp17a1* была повышена после однократного введения ХГЧ, и постепенно повышалась через 3 и 7 дней после обработки гонадотропином – на 250 и 550 % от контроля, соответственно. Экспрессия генов *Hsd3b* и *Hsd17b* незначительно повышались только на седьмой день. При однократном введении было показано снижение экспрессии гена *Lhr*, и сходная картина отмечалась через 3 дня введения, только к седьмому дню экспрессия гена *Lhr* переставала достоверно отличаться от контрольных значений.

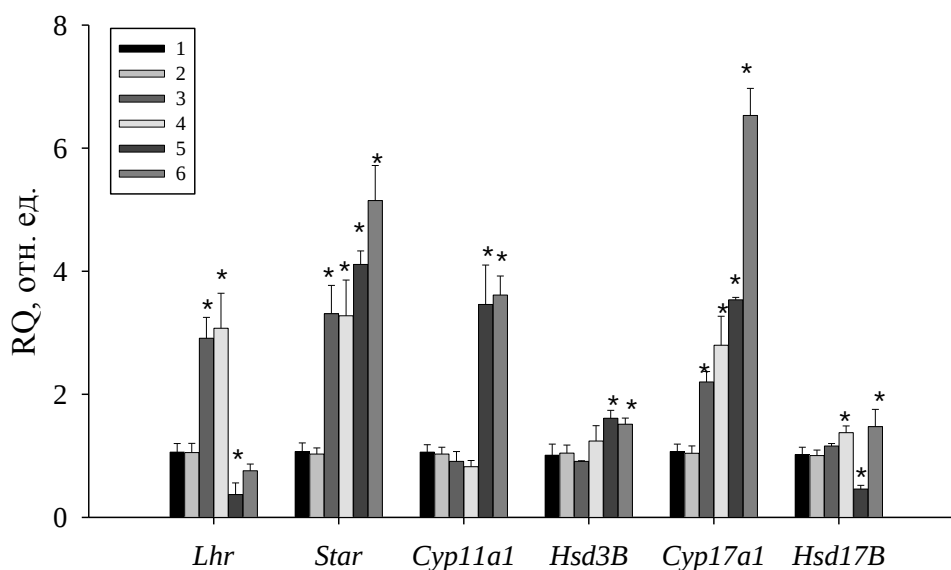


Рис. 6. Влияние трехдневной и семидневной обработки самцов крыс с помощью ХГЧ и ТПО3 на экспрессию стероидогенных генов в семенниках животных.

1 – Контроль, 3 дня (ДМСО); 2 – Контроль, 7 дней (ДМСО); 3 – ТПО3, 15 мг/кг, 3 дня; 4 – ТПО3, 15 мг/кг, 7 дней; 5 – ХГЧ, 100 МЕ/крысу, 3 дня; 6 – ХГЧ, 100 МЕ/крысу, 7 дней. * – различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n=5$.

Наши данные показывают, что длительная обработка самцов крыс с помощью ТПО3 приводит к постепенному повышению уровня тестостерона в крови, при этом изменения экспрессии генов, вовлеченных в процесс стероидогенеза, незначительны и связаны в основном с увеличением экспрессии *Star* и *Cyp17a1*, тогда как экспрессия остальных исследованных генов осталась без изменений. Это указывает на сбалансированное состояние стероидогенной системы в условиях обработки ТП. Более того, на фоне повышения уровня тестостерона на 7-й день повышалась экспрессия гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ. Это может объяснить прирост уровня тестостерона на 7-й день, так как увеличение уровня мРНК *Lhr* может свидетельствовать в пользу увеличения чувствительности клеток Лейдига к ТПО3 и эндогенным гонадотропинам. Обработка ХГЧ приводит к значительному повышению экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза тестостерона, но при этом снижается экспрессия гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ. Эти данные могут объяснить постепенное снижение прироста уровня тестостерона при обработке ХГЧ вследствие развития резистентности тканей семенников к гонадотропинам. Таким образом, эффективность ТПО3 при длительном введении самцам крыс повышается, в основе чего лежит сохранение чувствительности тканей семенников к действию аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ.

5. Влияние совместного введения ТПО3 и ХГЧ на активность АЦ, уровень тестостерона и стероидогенез в семенниках крыс.

ТПО3 и ХГЧ имеют разные сайты связывания в рецепторе ЛГ/ХГЧ, вследствие чего использование их комбинации возможно усилит их регуляторные эффекты на стероидогенез. Поэтому далее изучали эффекты комбинированного введения низких или субмаксимальных доз ТПО3 и ХГЧ.

Для изучения влияния ХГЧ и ТП на рецептор ЛГ/ХГЧ выделяли фракции плазматических мембран из тканей семенников, которые содержали рецептор ЛГ/ХГЧ, гетеротримерные G-белки и АЦ. При обработке тестикулярных мембран с помощью ХГЧ в концентрации 10^{-8} М и соединениями ТПО3 и ТПО4 в концентрации 10^{-4} М было показано, что эффект ХГЧ на активность АЦ сохраняется, но не усиливается (Рис. 7). При использовании ХГЧ в более низкой концентрации, 10^{-10} М, отмечали аддитивный АЦ эффект гонадотропина с таковым ТПО3 и ТПО4. Таким образом, совместное использование ТП и ХГЧ не приводит к их конкуренции, что

объясняется разной локализацией сайтов их связывания, и характеризуется аддитивностью их эффектов на аденилатциклазную сигнальную систему.

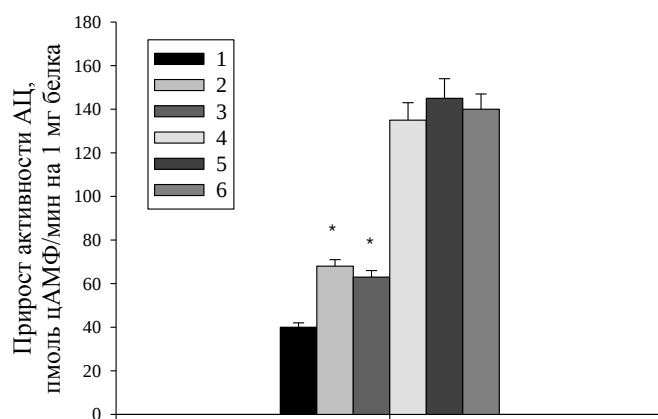


Рис. 7. Аддитивность стимулирующих эффектов ХГЧ и тиенопиримидиновых производных на активность АЦ в тестикулярных мембранах крыс.

1 – ХГЧ, 10^{-10} М; 2 – ХГЧ, 10^{-10} М + ТП03; 3 – ХГЧ, 10^{-10} М + ТП04; 4 – ХГЧ, 10^{-8} М; 5 – ХГЧ, 10^{-8} М + ТП03; 6 – ХГЧ, 10^{-8} М + ТП04. Концентрация ТП03 и ТП04 – 10^{-4} М. Ордината – прирост активности над базальным уровнем, пмоль сАМФ/мин на 1 мг белка. * – различия между стимулирующими АЦ эффектами, вызванными одним ХГЧ и его комбинацией с ТП, достоверны при $p < 0.05$, $M \pm SD$.

Однократное введение ХГЧ в дозе 50 МЕ/крысу после обработки самцов крыс ТП03 в разных дозах приводит к повышению уровня тестостерона (Рис. 8). Предобработка ТП03 приводит к более быстрому подъему концентрации тестостерона в сравнении с введением ХГЧ крысам без такой предобработки, причем усиливающий стероидогенез эффект ТП03 на уровень тестостерона является дозозависимым.

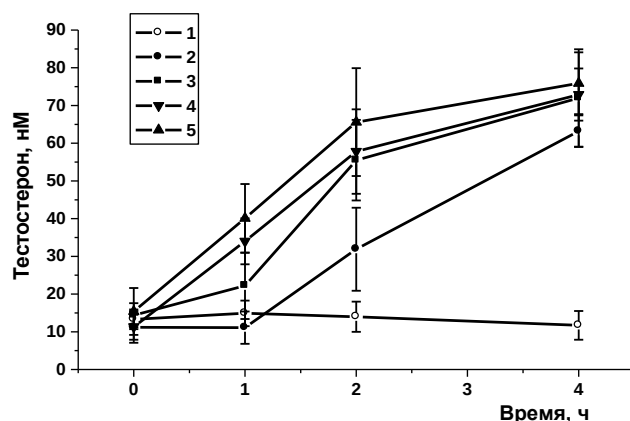


Рис. 8. Стимулирующий эффект ХГЧ на уровень тестостерона в крови крыс и влияние на него предварительной обработки животных ТП03, низкомолекулярным агонистом рецептора ЛГ/ХГЧ.

1 – контроль; 2 – ХГЧ, 50 МЕ/крысу; 3 – ХГЧ + ТП03, 7.5 мг/кг; 4 – ХГЧ + ТП03, 15 мг/кг; 5 – ХГЧ + ТП03, 25 мг/кг. Время указано с момента введения ТП03 или его растворителя (контроль), ХГЧ вводили через 1 ч после ТП03. Данные представлены как $M \pm SD$, $n=5$.

Экспрессия гена *Star* в этих группах также усиливалась дозозависимо (Рис. 9). Экспрессия гена *Cyp17a1* увеличивалась в среднем в 3-5 раз. Таким образом, имеются основания считать, что ТП03 усиливает эффект гонадотропина на стероидогенез в семенниках при их совместном введении.

6. Тестикулярный стероидогенез у стареющих крыс и крыс с сахарным диабетом 1-го типа и влияние на него обработки ТП03 и ХГЧ

Для изучения дисфункций репродуктивной системы, возникающих при старении, исследовали 15-тимесячных самцов крыс Wistar. Уже в этом возрасте наблюдалось снижение значений AUC, соответствующих содержанию тестостерона в крови в течение 6 ч, на 38% с 82 ± 9 до 51 ± 7 усл. ед. Одной из основных причин снижения уровня тестостерона является ослабление стероидогенеза в семенниках. Экспрессия гена *Star* снижалась на 25%, тогда как экспрессия генов *Cyp11a1* и *Cyp17a1*, кодирующих цитохромы P450_{scc} и P450_{c17}, снижалась в еще большей степени – на 51 и 58%, соответственно.

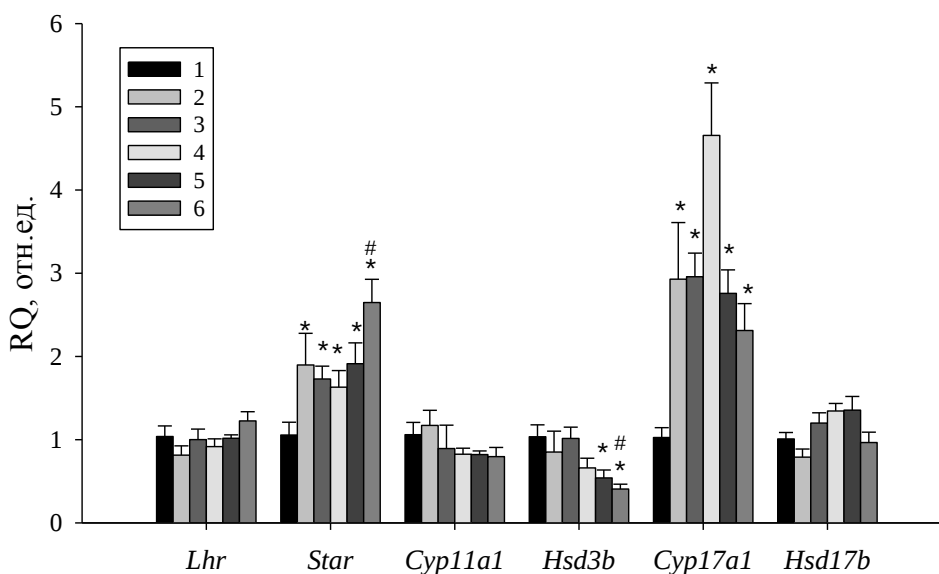


Рис. 9. Влияние однократной обработки самцов крыс с помощью ХГЧ, ТПОЗ и их комбинаций в разных дозах на экспрессию стероидогенных генов в семенниках животных.

1 – Контроль; 2 – ТПОЗ, 15 мг/кг; 3 – ХГЧ, 50 МЕ/крысу; 4 – ТПОЗ, 7.5 мг/кг+ ХГЧ, 50 МЕ/крысу; 5 – ТПОЗ, 15 мг/кг+ ХГЧ, 50 МЕ/крысу; 6 – ТПОЗ, 25 мг/кг+ ХГЧ, 50 МЕ/крысу. * - различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$, # - различия с группой ХГЧ статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n=5$.

Еще одной, возможно, наиболее важной причиной нарушения стероидогенеза у самцов крыс при старении является снижение чувствительности клеток Лейдига к действию эндогенного ЛГ. Для подтверждения этого, нами было изучено влияние ХГЧ на активность АЦ в мембранах, выделенных из семенников молодых и стареющих крыс. Показано, что стимулирующий эффект ХГЧ (10^{-7} М) у стареющих самцов крыс снижен на 26 % в сравнении с молодыми животными – 108 ± 5 vs. 145 ± 7 пмоль цАМФ/мин/мг белка. Это может быть связано с нарушением сопряжения рецептора ЛГ/ХГЧ с G_s -белками, вследствие нарушения процессинга рецепторов при старении. Таким образом, у стареющих 15-тимесячных самцов крыс нарушены процессы стероидогенеза, причинами чего могут быть ослабление чувствительности к гонадотропинам и снижение экспрессии генов, ответственных за стероидогенез.

Для изучения влияния ТПОЗ на уровень тестостерона и стероидогенез в семенниках стареющих крыс им вводили ТПОЗ или ХГЧ в течение трех дней (Табл. 5). Обработка ТПОЗ и ХГЧ приводила к повышению уровня тестостерона в крови как у молодых, так и у стареющих животных (Табл. 5). При этом стимуляция продукции тестостерона у стареющих животных была менее выражена по сравнению с молодыми крысами как при введении ТПОЗ, так и ХГЧ.

В семенниках стареющих крыс в сравнении с молодыми животными отмечали снижение экспрессии генов *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1*, кодирующих StAR, P450_{scc} и P450_{c17}. В небольшой степени снижалась экспрессия гена *Hsd17b*, кодирующего 17 β -HSD, а экспрессия гена *Hsd3b*, кодирующего 3 β HSD, не менялась (Рис. 10). Трехдневная обработка молодых крыс ХГЧ повышала экспрессию генов *Star*, *Cyp11a1* и *Hsd3b*, в то время как экспрессия генов *Cyp17a1* и *Hsd17b* снижалась. У стареющих крыс стимулирующий эффект ХГЧ на экспрессию генов *Star*, *Cyp11a1* и *Hsd3b* сохранялся, а экспрессия генов *Cyp17a1* и *Hsd17b* восстанавливалась. Трехдневная обработка молодых и стареющих крыс ТПОЗ повышала экспрессию гена *Star*, но не влияла на экспрессию генов *Cyp11a1* и *Hsd3b*. При этом у молодых крыс при обработке ТПОЗ экспрессия гена *Hsd17b* не отличалась от контроля, но была выше таковой при обработке животных ХГЧ. В то же время у стареющих крыс, обработанных ТПОЗ, экспрессия гена *Hsd17b* была повышена в сравнении с контролем и сходна по величине с таковой у крыс, обработанных ХГЧ (рис. 10). У молодых крыс, обработанных ТПОЗ, отмечали парадоксальное повышение в сравнении с контролем экспрессии гена *Cyp17a1*, которая в 10 раз превышала таковую у

молодых крыс с обработкой ХГЧ. У стареющих крыс этот эффект не выявлялся (рис. 10). Экспрессия гена *Cyp17a1* зависит от механизмов активации внутриклеточных каскадов агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ. Поскольку в отличие от ТПОЗ, ХГЧ активирует цАМФ-независимые пути, то они могут быть вовлечены в регуляцию экспрессии цитохрома P450c17 и ответственны за различия эффектов ХГЧ и ТПОЗ на экспрессию генов стероидогенеза.

Экспрессия гена *Lhr* у молодых и стареющих крыс не различалась, и почти в 3 раза снижалась при обработке ХГЧ (рис. 10). При воздействии ТПОЗ у молодых крыс отмечали повышение экспрессии гена *Lhr*, у стареющих – ее сохранение (рис. 10). Эти различия в эффекте ТПОЗ на экспрессию *Lhr*, как мы полагаем, связаны либо с ослаблением стимулирующего эффекта ТПОЗ на цАМФ-зависимые пути в условиях старения, либо с возрастными изменениями молекулярно-генетических механизмов регуляции транскрипции в клетках Лейдига. Таким образом, трехдневная обработка ТПОЗ, в отличие от ХГЧ, не снижает уровень рецепторов ЛГ/ХГЧ в семенниках крыс, а у молодых крыс даже ее увеличивает.

Табл. 5. Уровень тестостерона у стареющих крыс после обработки ТПОЗ или ХГЧ в течение трех дней и у животных с СД1 после обработки ТПОЗ или ХГЧ в течение пяти дней в сравнении с контрольными животными.

Группа	Уровень тестостерона, нмоль/л	Группа	Уровень тестостерона, нмоль/л
К	18.0±2.1	К	19.8±1.5
К+ТПОЗ	102.3±25.6*	К+ТПОЗ	58.8±9.1#
К+ХГЧ	52.0±6.3*	К+ХГЧ	124.0±14.3#
Стареющие крысы	9.6±1.5*	СД1	6.3±0.9#
С+ТПОЗ	19.7±1.9 *,**	СД1+ТПОЗ	57.8±2.7#
С+ХГЧ	19.9±2.1*,**	СД1+ХГЧ	59.7±2.9#, ##

Примечание: Уровень тестостерона измеряли через 3 ч после трехдневного и пятидневного введения, соответственно. * – отличия от контроля достоверны; ** – отличия от группы К+ТПОЗ или К+ХГЧ достоверны; # – отличия от контроля достоверны; ## – отличия от группы СД1+ТПОЗ или СД1+ХГЧ достоверны, $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n = 5$.

СД1 характеризуется комплексным нарушением обмена веществ, дисфункциями сердечно-сосудистой и эндокринной систем, в том числе ослаблением активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Диабетическая патология сопровождается снижением уровня тестостерона, ЛГ и ФСГ в плазме крови, уменьшением массы семенников, уровня цАМФ в тестикулярных клетках, снижением активности ферментов синтеза тестостерона, а также экспрессии их генов.

Для оценки эффективности ТП для коррекции андрогенного дефицита при СД1 изучали самцов крыс Wistar с моделью среднетяжелого СД1. У крыс с СД1 достоверно снижался уровень тестостерона по сравнению с контролем (Табл. 5). У животных с СД1 в 5-й день эксперимента, через 3 ч после обработки ХГЧ, его стимулирующий эффект на продукцию тестостерона снижался в сравнении с контрольными животными, обработанными гонадотропином, а соответствующий эффект ТПОЗ не менялся (Табл. 5).

В семенниках крыс с СД1 экспрессия генов *Lhr* и *Star* в сравнении с контрольными животными снижалась, в то время как экспрессия генов стероидогенных ферментов не менялась (рис. 11). После 5 дней обработки ХГЧ и ТПОЗ оценивали экспрессию стероидогенных генов. В условиях СД1 стимулирующий эффект ХГЧ на экспрессию генов *Star*, *Cyp11a* и *Cyp17a* сохранялся, но был выражен в меньшей степени в сравнении с контролем, в то время как эффект ХГЧ на экспрессию гена *Hsd3b* усиливался с 62 до 240%. У крыс с СД1 не выявлялся ингибирующий эффект ХГЧ на экспрессию гена *Hsd17b*, но в значительной степени подавлялась экспрессия гена *Lhr* (рис. 11). У крыс с СД1 стимулирующие эффекты ТПОЗ на экспрессию генов *Star* и *Cyp17a* ослаблялись в сравнении с контролем, хотя статистически значимые различия отмечали только для гена *Star*, а также повышалась экспрессия гена *Hsd3b*.

В отличие от контрольной группы ТПОЗ не вызывал повышения экспрессии гена *Lhr*, но и не снижал ее, как ХГЧ (рис. 11). Таким образом, изменения экспрессии генов стероидогенеза при обработке контрольных и диабетических крыс ХГЧ и ТПОЗ в значительной степени зависят от природы агониста рецептора ЛГ/ХГЧ.

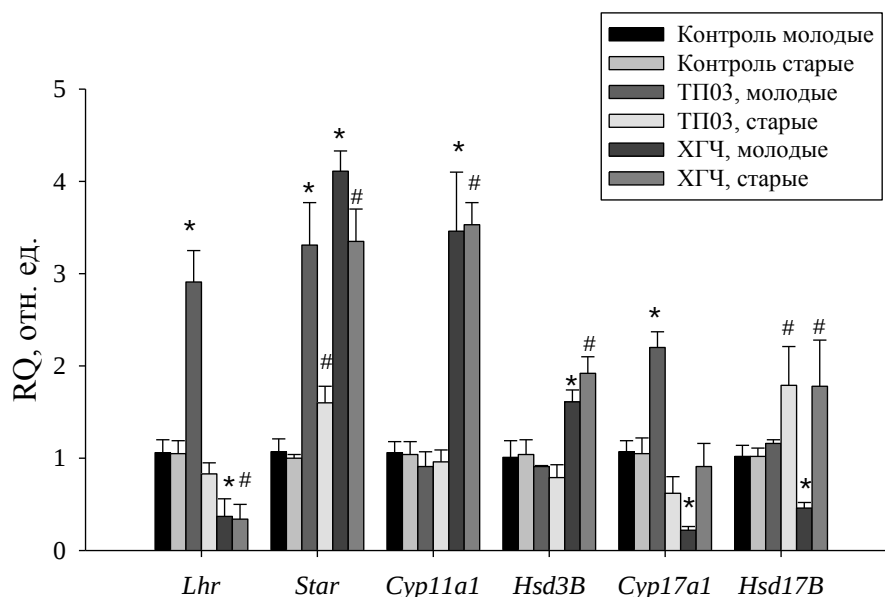


Рис. 10. Влияние трехдневного введения ТПОЗ и ХГЧ на экспрессию генов *Lhr*, *Star* и ферментов синтеза тестостерона в семенниках молодых и стареющих крыс.

* – отличие групп молодых животных, обработанных ХГЧ и ТПОЗ, от контроля достоверно; # – отличие групп стареющих животных, обработанных ХГЧ и ТПОЗ, от контроля достоверно, $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n = 5$.

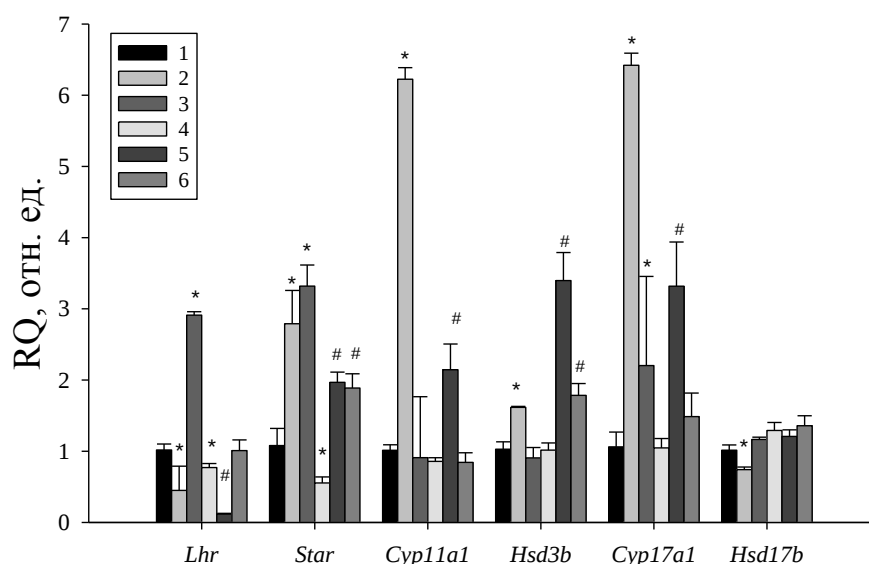


Рис. 11. Влияние пятидневной обработки самцов крыс с сахарным диабетом 1-го типа ХГЧ и ТПОЗ на экспрессию генов стероидогенеза в семенниках животных.

1 – контроль (К); 2 – К + ХГЧ, 100 МЕ/крысу; 3 – К + ТПОЗ, 15 мг/кг; 4 – СД1; 5 – СД1 + ХГЧ, 100 МЕ/крысу; 6 – СД1 + ТПОЗ, 15 мг/кг. Различия между группами (*) - К и СД1, К и К + ХГЧ или К + ТПОЗ, (#) - между СД1 и СД1+ХГЧ или СД1+ТПОЗ достоверны при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 5$.

Пятидневное лечение животных с СД1 с помощью ТПОЗ и ХГЧ показало, что эффекты ТПОЗ и ХГЧ на уровень тестостерона, которые у контрольных животных значительно отличаются, в случае диабетических животных становятся сопоставимыми. При этом при СД1

меняются эффекты ХГЧ на экспрессию генов, кодирующих StAR и ферменты синтеза тестостерона. Важно, что при обработке ТП03 как в контроле, так и при СД1 сохраняется экспрессия гена *Lhr*, в отличие от ее снижения при обработке ХГЧ. Таким образом, полученные данные показывают, что использование ТП03 для коррекции андрогенного дефицита у самцов крыс со среднетяжелым СД1 приводит к повышению уровня тестостерона, но при этом не вызывает снижения чувствительности клеток Лейдига к эндогенным гонадотропинам. При этом не наблюдается значительных изменений экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза тестостерона, что свидетельствует о сбалансированной работе этих ферментов при их стимуляции низкомолекулярными аллостерическими агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ.

Заключение

Нами впервые показано, что новые низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ на основе структуры тиенопиримидина являются селективными стимуляторами стероидогенной функции клеток Лейдига как в условиях *in vitro*, так и при различных способах их введения самцам крыс. Повышение уровня тестостерона при введении изучаемых ТП самцам крыс не сопровождается снижением чувствительности тканей семенников к эндогенным гонадотропинам, а при совместном применении ТП и ХГЧ отмечается аддитивный эффект и повышается эффективность их действия, что важно для разработки новых технологий применения гонадотропинов в клинической практике. Показана эффективность ТП как стимуляторов стероидогенеза не только у здоровых самцов крыс, но и у стареющих самцов крыс и у крыс с сахарным диабетом 1-го типа, что указывает на мощный терапевтический потенциал ТП при лечении андрогенной недостаточности различной этиологии. Установлено, что ТП не влияют на функции рецептора ТТГ и функциональную активность щитовидной железы, что исключает нежелательные эффекты этих низкомолекулярных агонистов на тиреоидную систему.

Выводы

1. Разработаны пять новых тиенопиримидиновых производных (ТП) и показана их способность стимулировать активность аденилатциклазы и сопряженных с ней гетеротримерных G_s -белков в тестикулярных мембранах крыс, а также повышать продукцию тестостерона при внутривнутрибрюшинном и пероральном способах введения самцам крыс, что указывает на их функциональную активность, как низкомолекулярных агонистов рецептора лютеинизирующего гормона/хорионического гонадотропина человека (ЛГ/ХГЧ). Изученные ТП не влияли на чувствительную к тиреотропному гормону (ТТГ) аденилатциклазную систему в мембранах щитовидной железы крыс и, в условиях *in vivo*, не влияли на базальную и стимулированную тиролиберином продукцию тиреоидных гормонов.
2. С помощью бактериальных токсинов и пептидной стратегии показано, что ТП03, наиболее активное соединение из разработанных ТП, действуя через рецептор ЛГ/ХГЧ и G_s -белок, стимулирует аденилатциклазную систему в тестикулярных мембранах крыс, не оказывая заметного влияния на ГТФ-связывание $G_{q/11}$ -белков, сопряженных с фосфолипазой $C\beta$, и G_i -белков, опосредующих ингибирование аденилатциклазы. Это указывает на специфичность действия ТП03 в отношении цАМФ-зависимых каскадов в клетках-мишенях.
3. Соединение ТП03, действуя в микромолярных концентрациях, усиливает продукцию тестостерона в первичной культуре клеток Лейдига крысы, вызывая повышение экспрессии генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ, транспортирующий холестерин белок StAR и цитохром P450c17, ответственный за синтез андростендиона, предшественника тестостерона. Таким образом, ТП03 является стимулятором стероидогенеза в клетках Лейдига, а его эффекты включают влияние на экспрессию генов стероидогенных белков.
4. Соединение ТП03 при однократном и длительном внутривнутрибрюшинном введении самцам крыс повышает уровень тестостерона в крови, усиливает синтез тестостерона и его прекурсоров в семенниках и стимулирует экспрессию генов рецептора ЛГ/ХГЧ, белка StAR и цитохрома P450c17, причем его действие на систему стероидогенеза является более мягким и устойчивым во времени в сравнении с таковым ХГЧ. В отличие от ХГЧ он не снижает экспрессию гена

рецептора ЛГ/ХГЧ, что может указывать на сохранение чувствительности семенников к гонадотропинам.

5. Совместное воздействие низких доз ТПОЗ и ХГЧ на активность аденилатциклазы характеризуется аддитивностью, что обусловлено различиями в сайтах их связывания в рецепторе ЛГ/ХГЧ: ТПОЗ связывается с аллостерическим сайтом, расположенном в трансмембранном домене, ХГЧ – с высокоаффинным ортостерическим сайтом, расположенном в эктодоме. В условиях *in vivo* при совместном введении ТПОЗ и ХГЧ самцам крыс их стероидогенный эффект сохраняется и даже усиливается. При этом предотвращается снижение экспрессии гена рецептора ЛГ/ХГЧ, что указывает на сохранение чувствительности семенников к гормональной стимуляции.

6. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что у стареющих крыс и у животных с сахарным диабетом 1 типа уровень тестостерона в крови снижается, а чувствительность аденилатцикласной системы в тестикулярных клетках к гонадотропинам ослабевает. ТПОЗ в значительной степени восстанавливает уровень тестостерона у стареющих и диабетических крыс, не уступая по стероидогенному эффекту ХГЧ, но, в отличие от ХГЧ, оказывает более мягкое воздействие на экспрессию генов стероидогенных белков и рецептора ЛГ/ХГЧ.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Деркач К.В., Дарьин Д.В., Бахтюков А.А., Лобанов П.С., Шпаков А.О. Изучение функциональной активности новых низкомолекулярных агонистов рецептора лютеинизирующего гормона *in vitro* и *in vivo* // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. № 4. С. 263–271.
2. Бахтюков А.А., Шпаков А.О. Молекулярные механизмы регуляции стероидогенеза в клетках Лейдига // Цитология. 2016. Т. 58. № 9. С. 666 – 678.
3. Деркач К.В., Бахтюков А.А., Шпаков А.А. Дарьин Д.В., Шпаков А.О. Особенности регуляции гетеротримерных G-белков хорионическим гонадотропином и низкомолекулярным агонистом рецептора лютеинизирующего гормона // Цитология. 2017. Т. 59. № 7. С. 474 – 481.
4. Бахтюков А.А., Соколова Т.В., Дарьин 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. журнал им. И.М. Сеченова. 2017. Т. 103. № 10. С. 1181 – 1192.
5. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шарова Т.С., Шпаков А.О. Ослабление базальной и стимулированной агонистами рецептора лютеинизирующего гормона продукции тестостерона у стареющих самцов крыс // Успехи геронтологии. 2018. Т. 31. № 5. С. 654 – 661.
6. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шпаков А.О. Тиенопиримидиновые производные специфично активируют стероидогенез в семенниках, но не влияют на функции щитовидной железы // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2019. Т. 55. № 1. С. 26 – 34.
7. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шпаков А.О. Стероидогенный эффект низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона при его введении крысам-самцам // Доклады академии наук. 2019. Т. 484. № 6. С. 103 – 106.
8. Бахтюков А.А., Шпаков А.О. Низкомолекулярные аллостерические регуляторы G-белок сопряженных рецепторов полипептидных гормонов // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 03. С. 269—283.
9. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Степочкина А.М., Шпаков А.О. Низкомолекулярный агонист рецептора лютеинизирующего гормона эффективно стимулирует аденилатциклазу в тестикулярных мембранах и стероидогенез в семенниках крыс с диабетом 1-го типа // Биологические мембраны. 2019. Т. 36. № 5. С. 322 – 331.
10. Шпаков А.О., Бахтюков А.А., Дарьин Д.В., Деркач К.В. Предобработка крыс аллостерическим агонистом рецептора лютеинизирующего гормона усиливает стимуляцию продукции тестостерона хорионическим гонадотропином // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2019. Т. 55. № 6. С. 459–462.

Главы в книгах и монографии

1. Shpakov A.O., Derkach K.V., **Bakhtyukov A.A.**, Dar'in D.V. The low-molecular-weight ligands of the gonadotropin receptors as the new generation of the regulators of the reproductive functions and steroidogenesis // *Innovations in assisted reproductive technology* (Ed. By N. Sharma and S. Chakrabarti). Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 2019. DOI: 10.5772/intechopen.88498.
2. Шпаков А.О., Деркач К.В., **Бахтюков А.А.**, Шпакова Е.А. Сопряженные с G-белками рецепторы и их аллостерические регуляторы // СПб: Политех-Пресс. 2019. 446 с. ISBN: 978-5-7422-6719-5.

Тезисы

1. Бахтюков А.А. Влияние новых низкомолекулярных агонистов рецептора лютеинизирующего гормона на активность аденилатциклазы *in vitro* и *in vivo* // *Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: Тезисы XIX международной медико-биологической конференции (с международным участием)*. 23 апреля 2016 г. СПб.: Изд. СПбГУ. С. 66.
2. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шарова Т.С., Шпаков А.О. Изучение влияния низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона на стероидогенез и уровень тестостерона у крыс // *Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»*. 22 – 25 мая 2017 г. Пущино. С. 669 – 674.
3. Бахтюков А.А. Стимуляция стероидогенеза в клетках Лейдига крыс низкомолекулярным агонистом на основе тиенопиримидина // *XXIII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии - 2017»*. 13 – 14 апреля 2017 г., Санкт-Петербург. С. 32 – 33.
8. Бахтюков А. А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шарова Т.С., Рыжов Ю.Р., Шпаков А.О. Регуляторное влияние нового тиенопиримидинового производного с активностью агониста рецептора лютеинизирующего гормона на стероидогенез и уровень тестостерона у самцов крыс // *Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII российский симпозиум «белки и пептиды»*. 18–22 сентября 2017 г. Москва, ИБХ РАН. С. 44.
9. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шарова Т.С., Шпаков А.О. Разработка тиенопиримидиновых производных, которые селективно активируют рецептор лютеинизирующего гормона, но не влияют на рецептор тиреотропного гормона // *Международная конференция «психофизиология и психонейроэндокринология»*. 23 – 26 мая 2018. г. Ставрополь. С. 24 – 25.
10. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Shpakov A.O. The mechanisms of the reduced basal and stimulated by the agonists of luteinizing hormone receptor production of testosterone in aging male rats // *International conference “Biomembranes-2018”*. Oct. 1 – 5. 2018. MIPT. Moscow. P. 164.
11. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Степочкина А.М., Шпаков А.О. Сравнительное изучение стимулирующего влияния гонадотропина и низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона на стероидогенез у самцов крыс с диабетом 1-го типа // *Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»* 20 – 24 мая 2019 г., Пущино. С. 746 – 751.
12. Бахтюков А.А., Деркач К.В., Дарьин Д.В., Шпаков А.О. Возможные механизмы потенцирующего влияния тиенопиримидиновых производных на стимуляцию стероидогенеза хорионическим гонадотропином у самцов крыс // *Сб. тез. Всероссийской конференции с межд. участием «Интегративная физиология», посв. 170-летию со дня рождения И.П. Павлова*, 24–26 сентября 2019 г., Санкт-Петербург. С. 32–33.