

АКТИВАЦИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ ТИЕНОПИРИМИДИНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ В СЕМЕННИКАХ И ЯИЧНИКАХ КРЫС

© А. О. Шпаков,¹ К. В. Деркач,¹ Д. В. Дарьин,² П. С. Лобанов²

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

²С.-Петербургский государственный университет;

электронный адрес: alex_shpakov@list.ru

Важную роль в функционировании репродуктивных тканей играют сигнальные системы, регулируемые лютеинизирующим гормоном (ЛГ) и хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ) и включающие в себя в качестве сенсорного компонента рецепторы ЛГ. Применение ЛГ и ХГЧ в медицине для лечения заболеваний репродуктивной системы и решения задач вспомогательных репродуктивных технологий ограничено их высокой стоимостью, необходимостью парентерального введения, наличием побочных эффектов. В последние годы ведется разработка низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ, которые лишены этих недостатков и могут применяться перорально. Наиболее эффективными среди них являются тиенопиримидиновые производные, в частности соединение Org 43553. Цель исследования состояла в изучении влияния впервые синтезированных нами аналогов Org 43553 — 5-амино-N-(*трет*-бутил)-4-(3-(изоникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (соединение 1) и 5-амино-N-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)-4-(3-(тиофен-3-карбоксамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (соединение 2) — на базальную и стимулированную ЛГ активность аденилатциклазы (АЦ) во фракциях плазматических мембран, выделенных из семенников и яичников крыс. Показано, что соединения 1 и 2 дозозависимым способом стимулируют базальную активность АЦ в мембранах, выделенных из семенников и яичников, причем соединение 2 более эффективно в сравнении с соединением 1. Значения EC_{50} для эффектов соединений 1 и 2 на активность АЦ составили 1.05—1.12 и 0.28—0.37 мкМ соответственно. Стимулирующее влияние ХГЧ на активность АЦ в присутствии тиенопиримидиновых производных сохранялось, а при низких, ненасыщающих, концентрациях гормона наблюдалась аддитивность влияния ХГЧ и соединений 1 и 2 на активность АЦ. Это свидетельствует о том, что тиенопиримидиновые производные взаимодействуют с аллостерическим сайтом, который локализован в трансмембранном канале рецептора ЛГ и не перекрывается с сайтом связывания гонадотропинов, расположенным в N-конце эктодомена. Действие соединений 1 и 2 характеризовалось тканевой специфичностью и не выявлялось в тканях, где рецепторы ЛГ отсутствуют. Полученные нами данные указывают на то, что соединения 1 и 2 могут стать прототипами для создания лекарственных препаратов, регуляторов функций мужской и женской репродуктивных систем.

Ключевые слова: агонист, аденилатциклаза, аллостерический сайт, рецептор лютеинизирующего гормона, семенники, тиенопиримидин, хорионический гонадотропин, яичники.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, ГГГ ось — гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось, ДМСО — диметилсульфоксид, ЛГ — лютеинизирующий гормон, ТМ — трансмембранный участок, ТТГ — тиреотропный гормон, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, GPCR — G-белоксопряженный рецептор, EC_{50} — концентрация соединения, в которой оно вызывает эффект, равный половине максимально возможного эффекта этого соединения.

Контроль функций репродуктивной системы осуществляется через гипоталамо-гипофизарно-гонадную (ГГГ) ось, которая включает в себя гипоталамические нейроны, секретирующие люлиберин, рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (ЛГ), чувствительные к действию люлиберина гонадотрофы передней доли гипофиза, синтезирующие и секретирующие ЛГ, и чувствительные к ЛГ клетки репродуктивных тканей — вырабатывающие тестостерон интерстициальные клетки Лейдига у мужчин и продуцирующие эстрогены и прогестерон клетки яичников у женщин. Важнейшим звеном функционирования ГГГ оси является стимуляция репродуктив-

ных тканей ЛГ или его структурным и функциональным гомологом — хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ), который вырабатывается плацентой в первом триместре беременности. ЛГ и ХГЧ представляют собой $\alpha\beta$ -гетеродимеры с высококонсервативной α -субъединицей и вариабельной β -субъединицей, которая определяет специфичность связывания гонадотропинов с рецептором. Рецептор ЛГ относится к суперсемейству G-белоксопряженных рецепторов (GPCR), в которых присутствует трансмембранный домен, включающий в себя семь гидрофобных трансмембранных участков (ТМ). Однако в отличие от большинства других GPCR рецептор

ЛГ также имеет значительный по размеру внеклеточный N-концевой домен (эктодомен), который формирует сайт для высокоаффинного связывания гормона (Puett et al., 2007). Как правило, высокоаффинное связывание лиганда с GPCR осуществляется в ортостерическом сайте, который расположен в трансмембранном канале рецептора, сформированном семью ТМ. В случае рецептора ЛГ в трансмембранном канале расположен аллостерический сайт, который остается свободным при связывании рецептора с гонадотропином. Связывание ЛГ с эктодомом приводит к нарушению взаимодействия обращенной к мембране части эктодомена со второй внеклеточной петлей рецептора, соединяющей ТМ4 и ТМ5, и к изменению конформации трансмембранного домена и локализованного в нем аллостерического сайта, что в конечном итоге вызывает активацию сопряженных с рецептором ЛГ гетеротримерных G-белков, в том числе G_s-белков (Шпаков, 2009; Puett et al., 2010). Следует отметить, что вызываемая ЛГ стимуляция аденилатциклазы (АЦ) и зависимых от нее внутриклеточных цАМФ-зависимых транскрипционных факторов, осуществляемая через посредство G_s-белков, является одним из основных механизмов регуляции синтеза и секреции стероидных гормонов тканями репродуктивной системы (Puett et al., 2007; Шпаков и др., 2010).

Поскольку рецептор ЛГ является ключевым звеном в регуляции репродуктивных функций организма, поиск селективных и эффективных его регуляторов является одной из актуальных задач биохимии и фармакологии. Применение ЛГ и ХГЧ в клинике для лечения дисфункций репродуктивной системы и решения задач вспомогательных репродуктивных технологий ограничено необходимостью парентерального введения этих гормонов, быстрым снижением чувствительности к ним тканей-мишеней, целым рядом побочных эффектов, в том числе синдромом гиперстимуляции яичников, а также сравнительно высокой их стоимостью. Все это требует разработки новых регуляторов рецептора ЛГ, отличающихся по механизму действия от гонадотропинов. В 2002 г. в результате широкого скрининга низкомолекулярных органических соединений голландскими учеными были открыты тиенопиримидиновые производные с активностью агонистов рецептора ЛГ (Van Straten et al., 2002). Наиболее активными среди них были соединение Org 41841 — N-трет-бутил-5-амино-4-(3-метоксифенил)-2-(метилтио)тиено [2,3-D] пиримидин-6-карбоксамид — и его аналог Org 43553, которые в наномолярных концентрациях специфично активировали рецептор ЛГ и функционально сопряженные с ним цАМФ-зависимые сигнальные каскады (Van Straten et al., 2002; Van Koppen et al., 2008). Было показано, что соединения Org 41841 и Org 43553 с высокой аффинностью связываются с аллостерическим сайтом рецептора ЛГ и не конкурируют с ЛГ и ХГЧ за места связывания в эктодоме (Heitman et al., 2008). В дальнейшем было установлено, что соединение Org 43553 активно в условиях *in vivo*, причем не только при парентеральном, но и при пероральном способе введения (Van de Lagemaat et al., 2009, 2011; Gerrits et al., 2013).

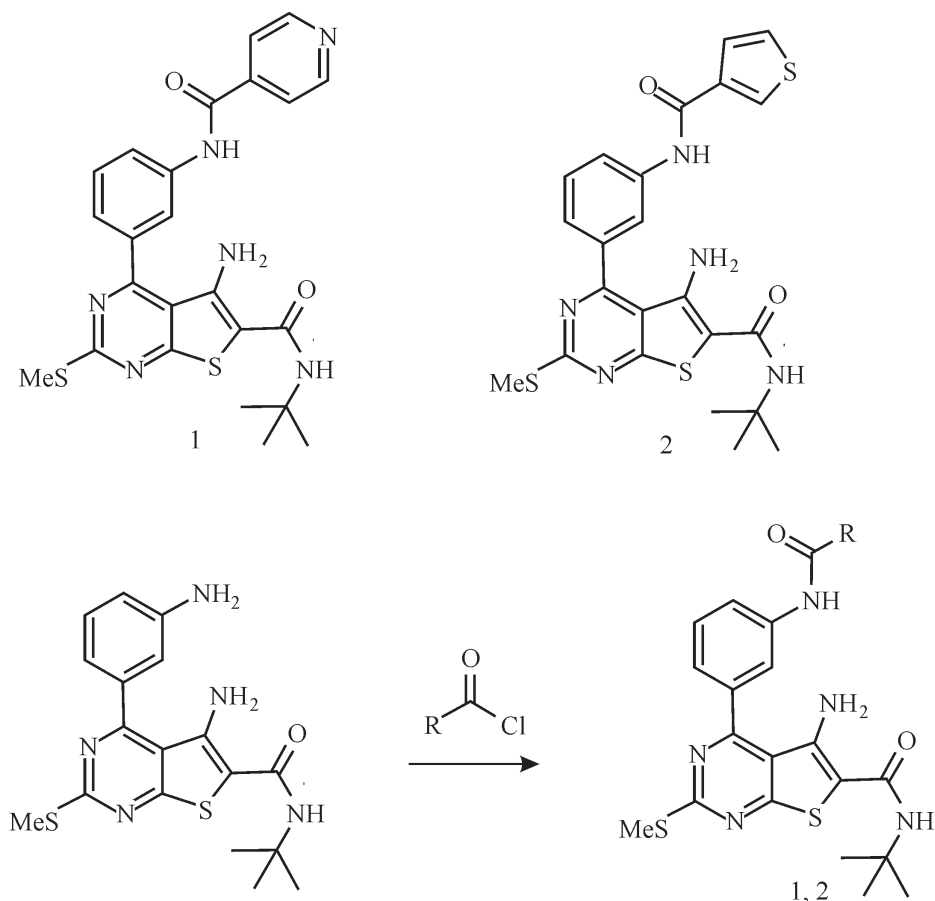
Цель работы состояла в изучении влияния впервые синтезированных нами аналогов Org 43553 — 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(3-(изоникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено [2,3-d] пиримидин-6-карбоксамида (соединение 1) и 5-амино-N-(трет-бутил)-2-(метилтио)-4-(3-(тиофен-3-карбоксамидо)фенил)тиено [2,3-d] пиримидин-6-

карбоксамида (соединение 2) (рис. 1) на базальную и стимулированную ЛГ активность аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС) во фракциях плазматических мембран, выделенных из семенников и яичников крыс. Выбор АЦСС в качестве объекта исследования был продиктован тем, что эта система является основной мишенью действия гонадотропинов и низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ (Van Koppen et al., 2008) и опосредует наиболее важные их биологические эффекты, включая синтез и секрецию стероидных гормонов клетками репродуктивной системы (Weedon-Fekjær, Taskén, 2012).

Материал и методика

Для экспериментов использовали самцов и самок крыс породы Wistar в возрасте 5 мес, которых содержали в стандартных условиях и на стандартном рационе. Животных декапитировали в условиях анестезии и удаляли у них семенники, миокард, мозг (самцы) и яичники (самки). Выделение тестикулярных мембран из семенников проводили, как описано ранее (Деркач и др., 2013). Измельченную ткань гомогенизировали на холоде в 40 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 5 мМ MgCl₂, 10%-ную (w/v) сахарозу и ингибиторы протеаз — 500 мкМ O-фенантролина, 2 мкМ пепстатина и 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (буфер А). Гомогенат центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин, после чего супернатант центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин. Выделение фракций плазматических мембран из яичников самок крыс проводили, как описано ранее (Шпаков и др., 2010). Промытые охлажденным буфером А измельченные ткани яичников гомогенизировали с помощью Polytron в 20 объемах того же буфера. Гомогенат центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин, осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин, полученный осадок ресуспендировали в 10 объемах буфера А без сахарозы и повторно центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин (4 °С). Выделение фракций плазматических мембран из тканей мозга и миокарда самцов крыс проводили, как описано ранее (Шпаков и др., 2011; Shpakov et al., 2012). Полученные фракции плазматических мембран ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.4, так чтобы содержание белка в них составило 1—2 мг/мл, и хранили при –70 °С.

Для синтеза тиенопиримидиновых производных 1 и 2 проводили реакцию 5-амино-4-(3-аминофенил)-N-(трет-бутил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамида, который получали по методу (Hanssen, Timmers, 2003), с изоникотиноилхлоридом и тиофен-3-карбонилхлоридом соответственно, как показано на схеме (рис. 1). Целевой продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии в системе этилацетат—гексан 3 : 1 с выходом 56 % для соединения 1 и 28 % для соединения 2. Полученные соединения характеризовали по температуре плавления, спектру ЯМР ¹H и с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. Соединение 1 (C₂₄H₂₄N₆O₂S₂): т.пл. 154—157 °С; спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м. д. (J, Гц) : 1.45 (9H, c); 2.66 (3H, c); 5.30 (1H, c); 5.96 (2H, c); 7.37 (1H, д, J = 7.8); 7.54 (1H, т, J = 7.8); 7.70 (1H, c); 7.77 (2H, д, J = 5.6); 8.06 (1H, д, J = 7.8); 8.65 (1H, c); 8.79 (2H, д, J = 5.6); по данным HRMS (ESI-TOF), мол. масса соединения 1 составила 493.1477 (вычислено для [M+H⁺] — 493.1475). Соедине-



2-Амино-4-(3-аминофенил)-*N*-(*трет*-бутил)-
2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Рис. 1. Структура соединений 1 и 2 и схема их синтеза из предшественника — 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-(*трет*-бутил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид.

R = 4-пиридил (соединение 1) или 3-тиенил (соединение 2).

ние 2 (C₂₃H₂₃N₅O₂S₃): т. пл. 146—148 °С, спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м. д. (*J*, Гц): 1.46 (9H, с); 2.67 (3H, с); 5.29 (1H, с); 5.99 (2H, с); 7.33 (1H, д, *J* = 7.8); 7.39 (1H, д, д, *J* = 3.0 и 5.0); 7.51 (1H, т, *J* = 7.8); 7.56 (1H, д, *J* = 5.0); 7.66 (1H, с); 8.04 (1H, д, *J* = 7.8); 8.08 (1H, д, *J* = 3.0); 8.20 (1H, с); по данным HRMS (ESI-TOF), мол. масса соединения 2 составила 498.1065 (вычислено для [M+H⁺] — 498.1087).

Активность аденилатциклазы (EC 4.6.1.1) определяли, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 1 мкК и [α-³²P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 25—50 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °С, начинали добавлением фракции плазматических мембран и останавливали добавлением 100 мкл 0.5 М HCl. Пробу кипятили в течение 6 мин для разрушения комплексов между мечеными адениновыми нуклеотидами и мембранными белками, затем кислоту нейтрализовали с помощью 100 мкл 1.5 М имидазола. Образовавшийся в результате реакции [³²P]-цАМФ отделяли от других меченых нуклеотидов на колонках с оксидом алюминия, используя в качестве элюента 12 мл 10 мМ имидазол-HCl-буфера, pH 7.4. Элюат собирали в сцинтилляционные флаконы и

считали радиоактивность по методу Черенкова на сцинтилляционном счетчике LKB 1209/1215 RackBeta (Швеция). Каждое измерение было проведено в трех независимых экспериментах в трех или четырех параллельных пробах. Результаты представлены в пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. Соединения 1 и 2 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), в соответствующих разведениях преинкубировали с фракциями плазматических мембран (4 °С, 10 мин), после чего добавлением инкубационной смеси начинали реакцию образования цАМФ. Контрольные пробы преинкубировали с ДМСО без добавления тиенопиримидиновых производных.

Реактивы. Для проведения биохимических исследований использовали ХГЧ, креатинфосфат, креатинфосфокиназу из мышц кролика, цАМФ, АТФ и другие реактивы фирмы Sigma (США). Для определения активности АЦ использовали меченый субстрат — [α-³²P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (Всерегionalное объединение «Изотоп», Россия), для разделения смеси меченых адениновых нуклеотидов проводили адсорбционную хроматографию на нейтральной окиси алюминия (Sigma, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием метода ANOVA (Manugistics Inc., США). Каждый эксперимент выполняли трехкратно.

Данные представлены в виде средних величин и их среднестатистических ошибок из нескольких независимых экспериментов. Различия между пробами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

Базальная активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из семенников и яичников крыс, составила 23.2 ± 1.9 и 34.7 ± 1.7 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка. При добавлении к фракциям мембран растворенных в ДМСО соединений 1 и 2 (10^{-7} — 10^{-3} М) наблюдали повышение базальной активности АЦ (рис. 2). В тестикулярных мембранах значения EC_{50} для стимулирующих эффектов соединений 1 и 2 на активность АЦ составили 1.12 и 0.28 мкМ, в мембранах, выделенных из тканей яичников, — 1.05 и 0.37 мкМ соответственно. В семенниках максимальное стимулирующее влияние соединения 2 (+178 %) на активность АЦ было в 1.5 раза выше соответствующего влияния соединения 1 (+113 %), а значение $AUC_{10(-7)-10(-3)}$ (площадь под кривой доза—эффект) для эффекта соединения 2 на 83 % превосходило значение $AUC_{10(-7)-10(-3)}$ для соединения 1. В яичниках максимальное стимулирующее влияние соединений 1 и 2 на активность АЦ различалось не столь значительно и составляло 80 и 94 % (рис. 2). Близкими были и значения $AUC_{10(-7)-10(-3)}$ для этих эффектов. Эти данные указывают на стимулирующее влияние соединений 1 и 2 на базальную активность АЦ в семенниках и яичниках крыс, причем соединение 2 по эффективности превосходит соединение 1, что в наибольшей степени проявляется в тестикулярных мембранах.

Далее исследовали совместное влияние ХГЧ и тиенопиримидиновых производных 1 и 2 на активность АЦСС в семенниках и яичниках крыс. Показано, что во фракциях плазматических мембран, выделенных из семенников, ХГЧ в концентрациях 10^{-10} — 10^{-7} М повышает базальную активность АЦ, причем в концентрации 10^{-8} М его стимулирующий эффект достигал насыщения и составил 558 %, что по величине соответствует ранее выявленному эффекту этого гормона на активность АЦ (Деркач и др., 2013). В присутствии соединений 1 и 2 в концентрации 10^5 М, в которой они отчетливо стимулируют базальную активность АЦ, стимулирующий эффект ХГЧ полностью сохранялся. Более того, при совместном действии тиенопиримидиновых производных и ХГЧ, взятого в концентрации 10^{-10} М, в которой влияние гормона на активность АЦ составило 27 % от его максимального эффекта, отмечалась отчетливо выраженная аддитивность стимулирующих эффектов ХГЧ и исследуемых нами соединений (см. таблицу). При более высоких концентрациях ХГЧ аддитивность была выражена слабее. Стимулирующее влияние ХГЧ (10^{-8} М) на активность АЦ во фракции мембран, выделенных из яичников, составило 263 %, что согласуется с ранее полученными результатами (Шпаков и др., 2013). В присутствии соединений 1 и 2 (10^{-5} М) этот эффект сохранялся. Прирост активности фермента, вызванный тиенопиримидиновыми производными 1 и 2, за вычетом эффекта ХГЧ (10^{-8} М) составил 13 и 14 пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка соответственно. Выявленная нами аддитивность стимулирующего влияния тиенопиримидиновых производных и ХГЧ на активность АЦ, особенно при низких, ненасыщающих, концен-

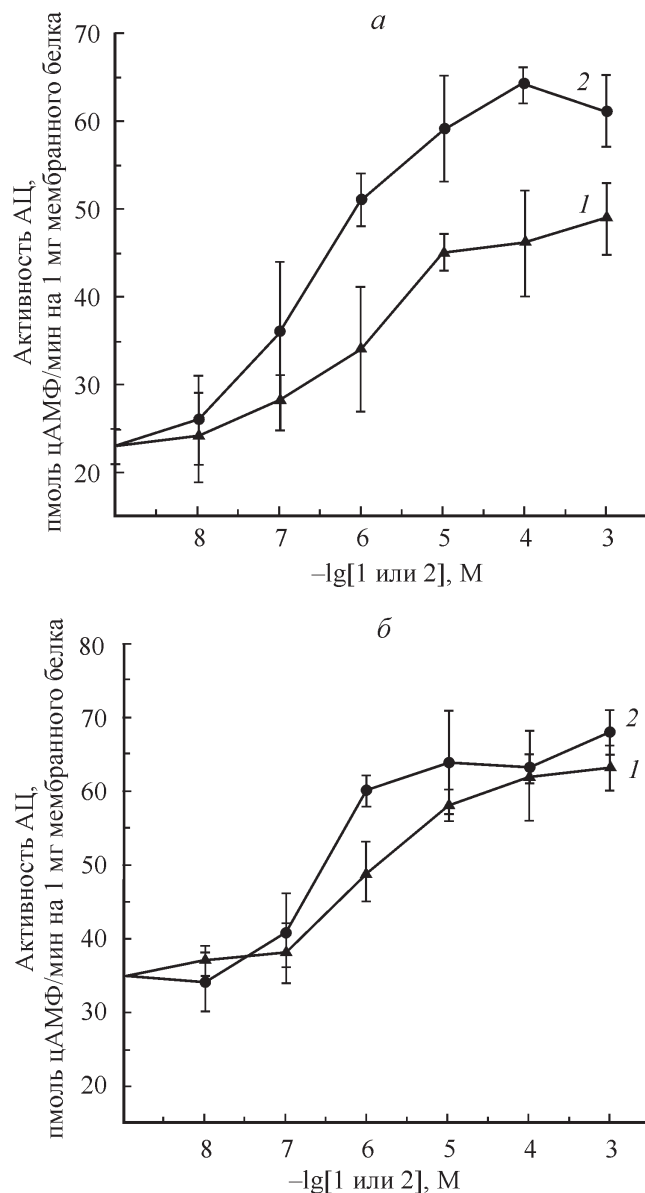


Рис. 2. Стимулирующее влияние тиенопиримидиновых производных 1 и 2 на базальную активность фермента АЦ во фракциях плазматических мембран семенников (а) и яичников (б) крыс.

1 — соединение 1, 2 — соединение 2.

трациях последнего, указывает на отсутствие перекрывания между участками рецептора ЛГ, ответственными за связывание гонадотропина, и изученных нами низкомолекулярных агонистов.

Для выяснения тканевой специфичности действия соединений 1 и 2 на АЦСС изучали их влияние на базальную активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из миокарда и мозга — тканей, где рецепторы ЛГ либо отсутствуют (миокард), либо экспрессируются в незначительной степени (мозг) (Lei et al., 1993; Ziecik et al., 2007). Показано, что в присутствии этих соединений в концентрации 10^{-4} М, в которой они эффективны в отношении АЦСС в репродуктивных тканях, базальная активность АЦ во фракциях миокардиальных и синаптосомальных мембран существенно не меняется (данные не представлены). Полученные результаты

**Прирост базальной активности АЦ в тестикулярных мембранах,
вызываемый совместным действием соединения 1 или 2 (10^{-5} М) и ХГЧ
в различных концентрациях**

Добавка	Прирост активности АЦ, пмоль цАМФ/мин на 1 мг мембранного белка при концентрации ХГЧ, М				
	0	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}
Нет	0	35 ± 4	98 ± 4	129 ± 6	131 ± 9
Соединение 1, 10^{-5} М	22 ± 2	53 ± 3 (18)	113 ± 6 (15)	142 ± 8 (13)	140 ± 3 (9)
Соединение 2, 10^{-5} М	36 ± 4	63 ± 7 (28)	121 ± 5 (23)	148 ± 5 (19)	150 ± 8 (19)

Примечание. В скобках приведены приросты активности АЦ, вызванные соединением 1 или 2, за вычетом стимулирующего эффекта ХГЧ.

свидетельствуют о необходимости рецептора ЛГ для реализации стимулирующего влияния синтезированных нами тиенопиримидиновых производных на активность АЦ и указывают на тканевую специфичность их действия на АЦСС.

Обсуждение

Разработка низкомолекулярных лигандов рецепторов ЛГ и других гипофизарных гликопротеиновых гормонов — фолликулостимулирующего (ФСГ) и тиреотропного (ТТГ) — является одним из перспективных направлений создания новых лекарственных препаратов, регулирующих функции ГГГ оси и других эндокринных систем организма (Шпаков, Шпакова, 2010). В настоящее время наиболее перспективными среди созданных низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ являются производные тиенопиримидинов, в частности соединение Org 43553 (Van Straten et al., 2002; Heitman et al., 2008; Van Koppen et al., 2008; Van de Lagemaat et al., 2009, 2011; Gerrits et al., 2013). Имеются данные о высокой эффективности производных 1,3,5-пиазола и терфенила, которые также обладают активностью агонистов рецептора ЛГ (Jogand-Lebrun et al., 2007; Heitman et al., 2009). В отличие от препаратов, содержащих ЛГ и ХГЧ, низкомолекулярные агонисты активны не только при парентеральном, но и при пероральном введении (Van de Lagemaat et al., 2009, 2011; Gerrits et al., 2013). Результаты клинических испытаний свидетельствуют об отсутствии у них токсичности и ряда побочных эффектов, характерных для ЛГ и ХГЧ, таких как быстрое снижение чувствительности тканей-мишеней к регуляторному действию гонадотропина и развитие синдрома гиперстимуляции яичников (Gerrits et al., 2013). Необходимо отметить, что синдром гиперстимуляции яичников является наиболее грозным осложнением применения ХГЧ и рекомбинантного ЛГ при экстракорпоральном оплодотворении и других вспомогательных репродуктивных технологиях.

Нами проведен синтез аналогов соединения Org 43553, ранее неизвестных химических соединений, в которых остаток морфолиноуксусной кислоты при аминокетильной фенильного кольца Org 43553 заменен остатком изоникотиновой (соединение 1) или тиофен-3-карбонной (соединение 2) кислоты. Несмотря на то что оба синтезированных вещества нерастворимы в воде, они хорошо растворяются в ДМСО, что позволяет использовать их не только в экспериментах *in vitro*, но и в дальнейшем при тестировании в условиях *in vivo*.

В качестве тест-системы была выбрана АЦСС семенников и яичников крыс, поскольку эта система опосредует регуляторное влияние ЛГ и ХГЧ на стероидогенез и другие биохимические и физиологические процессы в репродуктивных органах. Нами показано, что в микромолярных концентрациях оба вещества дозозависимым способом стимулируют базальную активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из семенников и яичников, и по своей эффективности сопоставимы с соединениями Org 41841 и Org 43553 (Van Straten et al., 2002; Van Koppen et al., 2008). Как было установлено ранее голландскими учеными, соединения Org 41841 и Org 43553 стимулируют АЦ и цАМФ-зависимые сигнальные каскады в клетках репродуктивной системы, а также в культурах клеток с экспрессированными в них рецепторами ЛГ. Наиболее важно то, что соединение Org 43553 активно в условиях *in vivo*, в том числе при пероральном способе применения. Так, однократное пероральное введение Org 43553 в дозе 50 мг/кг вызывает овуляцию у мышей и крыс, причем овулировавшие яйцеклетки характеризуются высокой фертильностью и при имплантации дают нормальные эмбрионы. Пероральное введение Org 43553 в той же дозе самцам крыс приводит к значительному повышению у них уровня тестостерона (Van de Lagemaat et al., 2009). Соединение Org 43553 при пероральном приеме в дозе 300 мг вызывает овуляцию у 83 % женщин репродуктивного возраста, не оказывая при этом никаких побочных эффектов, в том числе не вызывая синдрома гиперстимуляции яичников (Gerrits et al., 2013).

Нами показано, что стимулирующее влияние ХГЧ на активность АЦ во фракциях мембран, выделенных из семенников и яичников, сохраняется в присутствии соединений 1 и 2. Более того, при сравнительно низких, ненасыщающих, концентрациях гонадотропина наблюдается отчетливо выраженная аддитивность стимулирующих эффектов ХГЧ и тиенопиримидиновых производных. Это хорошо согласуется с двухсайтовой моделью связывания агонистов с рецептором ЛГ (Puett et al., 2007). В соответствии с этой моделью высокоаффинный сайт связывания с гонадотропином локализован в эктодомене, который в свободном от лиганда состоянии образует прочный комплекс с внеклеточными петлями и блокирует переход трансмембранного домена рецептора, в котором локализован его аллостерический сайт, в активное состояние. Связывание с гонадотропином приводит к изменению конформации эктодомена и снятию его ингибирующего влияния на трансмембранный домен. Сходная ситуация наблюдается и в случае рецепторов ФСГ и ТТГ. Более того, рецептор ТТГ при удалении эктодомена переходит

в перманентно активированное состояние (Zhang et al., 2000). Низкомолекулярные агонисты минуя эктодомен и непосредственно проникают в трансмембранный канал рецептора ЛГ, где специфически связываются с его аллостерическим сайтом и вызывают активацию трансмембранного домена без участия эктодомена. Таким образом, при одновременном действии гонадотропина и низкомолекулярного агониста конкуренция между ними за места связывания на молекуле рецептора ЛГ не происходит, вследствие чего нами наблюдалась аддитивность их стимулирующего действия на АЦСС. Следует отметить, что на основе данных по изучению взаимоотношений структура—активность для большого числа низкомолекулярных агонистов рецептора ЛГ с привлечением сайтнаправленного мутагенеза была установлена конфигурация аллостерического сайта и определены молекулярные механизмы, лежащие в основе активации рецептора ЛГ (Heitman, Ijzerman, 2008; Heitman et al., 2012). Показано, что в рецепторе ЛГ ключевую роль для связывания сравнительно гидрофобных низкомолекулярных агонистов играют остатки, локализованные в ТМ3, ТМ4, ТМ5 и ТМ6, в том числе отрицательно заряженный остаток Glu⁵⁰⁶, локализованный в ТМ3 и высококонсервативный во многих GPCR, в том числе в рецепторах ТТГ и ФСГ (Heitman et al., 2012). Предполагается, что боковая карбоксильная группа этого остатка образует водородную связь с аминогруппой тиенопиримидинового производного и обеспечивает его эффективное связывание (Jäschke et al., 2006; Moore et al., 2006). Вследствие этого в структуре соединений 1 и 2 аминогруппа в пятом положении тиенопиримидина и контактирующая с ней N-трет-бутилкарбоксамидная группа были сохранены.

Таким образом, впервые синтезированные нами тиенопиримидиновые производные — 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(3-(изоникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид и 5-амино-N-(трет-бутил)-2-(метилтио)-4-(3-(тиофен-3-карбоксамидо)фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид — стимулируют базальную активность АЦ во фракциях плазматических мембран семенников и яичников крыс, причем их стимулирующее влияние на АЦСС является аддитивным по отношению к эффекту ХГЧ, эндогенного лиганда рецептора ЛГ, и характеризуется тканевой специфичностью. Поскольку цАМФ-зависимые каскады в тканях репродуктивной системы играют ключевую роль в контроле стероидогенеза и в регуляции сперматогенеза у мужчин и овуляции у женщин, разработанные нами тиенопиримидиновые производные в дальнейшем могут быть использованы для создания на их основе регуляторов репродуктивных функций.

Список литературы

Деркач К. В., Мойсеюк И. В., Чистякова О. В., Шпаков А. О. 2013. Андрогенная недостаточность у самцов крыс с долгосрочным неонатальным стрептозоточиновым диабетом. Бюл. эксперим. биол. мед. 155 (3) : 315—318. (Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Chistyakova O. V., Shpakov A. O. 2013. Androgen deficiency in male rats with prolonged neonatal streptozotocin diabetes. Bull. Exp. Biol. Med. 155 (3) : 339—342.)

Шпаков А. О. 2009. Структурно-функциональная организация рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LRR-повторы, и их взаимодействие с гетеротримерными G-белками. Цитология. 51 (8) : 637—649. (Shpakov A. O. 2009. Structural-functional organization of polypeptide hormones recep-

tors containing LRR-repeats and their interaction with heterotrimeric G proteins. Tsitologiya. 51 (8) : 637—649.)

Шпаков А. О., Бондарева В. М., Чистякова О. В. 2010. Функциональное состояние аденилатциклазной сигнальной системы в репродуктивных тканях крыс с экспериментальным диабетом 1-го типа. Цитология. 52 (2) : 177—183. (Shpakov A. O., Bondareva V. M., Chistyakova O. V. 2010. Functional state of adenylyl cyclase signaling system in reproductive tissues of rats with experimental type-1 diabetes. Cell Tissue Biol. 4 (2) : 208—214.)

Шпаков А. О., Деркач К. В., Чистякова О. В., Мойсеюк И. В., Сухов И. Б., Бондарева В. М. 2013. Влияние интраназального инсулина и серотонина на функциональную активность аденилатциклазной системы в миокарде, яичниках и матке крыс с пролонгированной неонатальной моделью сахарного диабета. Журн. эволюц. биохим. физиол. 49 (2) : 118—127. (Shpakov A. O., Derkach K. V., Chistyakova O. V., Moiseyuk I. V., Sukhov I. B., Bondareva V. M. 2013. Effect of intranasal insulin and serotonin on functional activity of the adenylyl cyclase system in myocardium, ovary, and uterus of rats with prolonged neonatal model of diabetes mellitus. J. Evol. Biochem. Physiol. 49 (2) : 153—164.)

Шпаков А. О., Шпакова Е. А. 2010. Низкомолекулярные регуляторы рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LGR-повторы. Биомед. химия. 56 (3) : 303—318. (Shpakov A. O., Shpakova E. A. 2010. Low-molecular regulators of polypeptide hormone receptors containing LGR-repeats. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B. Biomed. Chem. 3 (4) : 351—360.)

Шпаков А. О., Шпакова Е. А., Тарасенко И. И., Деркач К. В. 2011. Рецепторная и тканевая специфичность действия пептидов, производных цитоплазматических участков рецепторов серпантинного типа. Биол. мембраны. 28 (6) : 453—462. (Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V. 2011. Receptor and tissue specificity of the effect of peptides corresponding to intracellular regions of the serpentine type receptors. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A. Membrane and Cell Biol. 64 (1) : 16—25.)

Gerrits M., Mannaerts B., Kramer H., Addo S., Hanssen R. 2013. First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98 : 1558—1566.

Hanssen R. G. J. M., Timmers C. M. 2003. Thieno[2,3-d]pyrimidines with combined LH and FSH agonistic activity. WO2003020726.

Heitman L. H., Ijzerman A. P. 2008. G protein-coupled receptors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: a case for GnRH, LH, FSH, and GPR54 receptor ligands. Med. Res. Rev. 28 : 975—1011.

Heitman L. H., Kleinau G., Brussee J., Krause G., Ijzerman A. P. 2012. Determination of different putative allosteric binding pockets at the lutropin receptor by using diverse drug-like low molecular weight ligands. Mol. Cell. Endocrinol. 351 : 326—336.

Heitman L. H., Narlawar R., de Vries H., Willemsen M. N., Wolfram D., Brussee J., Ijzerman A. P. 2009. Substituted terphenyl compounds as the first class of low molecular weight allosteric inhibitors of the luteinizing hormone receptor. J. Med. Chem. 52 : 2036—2042.

Heitman L. H., Oosterom J., Bongers K. M., Timmers C. M., Wiegerinck P. H. G., Ijzerman A. P. 2008. [³H]Org 43553, the first low-molecular-weight agonistic and allosteric radioligand for the human luteinizing hormone receptor. Mol. Pharmacol. 73 : 518—524.

Jäschke H., Neumann S., Moore S., Thomas C. J., Colson A. O., Costanzi S., Kleinau G., Jiang J. K., Paschke R., Raaka B. M., Krause G., Gershengorn M. C. 2006. A low molecular weight agonist signals by binding to the transmembrane domain of thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR). J. Biol. Chem. 281 : 9841—9844.

Jorand-Lebrun C., Brondyk B., Lin J., Magar S., Murray R., Reddy A., Schroff H., Wands G., Weiser W., Xu Q., McKenna S., Brugger N. 2007. Identification, synthesis, and biological evaluation

on of novel pyrazoles as low molecular weight luteinizing hormone receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 : 2080—2085.

Lei Z. M., Rao C. V., Kornyei J. L., Light P., Hiatt E. S. 1993. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology.* 132 : 2262—2270.

Moore S., Jaeschke H., Kleinau G., Neumann S., Costanzi S., Jiang J. K., Childress J., Raaka B. M., Colson A., Paschke R., Krause G., Thomas C. J., Gershengorn M. C. 2006. Evaluation of small-molecule modulators of the luteinizing hormone/choriogonadotropin and thyroid stimulating hormone receptors: structure-activity relationships and selective binding patterns. *J. Med. Chem.* 49 : 3888—3896.

Puett D., Angelova K., da Costa M. R., Warrenfeltz S. W., Fanelli F. 2010. The luteinizing hormone receptor: insights into structure-function relationships and hormone-receptor-mediated changes in gene expression in ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 329 : 47—55.

Puett D., Li Y., DeMars G., Angelova K., Fanelli F. 2007. A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260 : 126—136.

Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. 2012. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 7 : 33—47.

Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 16 : 95—105.

Van de Lagemaat R., Raafs B. C., van Koppen C., Timmers C. M., Mulders S. M., Hanssen R. G. 2011. 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 : 4350—4357.

Van de Lagemaat R., Timmers C. M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R. G. 2009. Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor. *Hum. Reprod.* 24 : 640—648.

Van Koppen C. J., Zaman G. J., Timmers C. M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M. J., Hanssen R. G. 2008. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 378 : 503—514.

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. 2002. The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: thienopyrimidines with therapeutic potential for ovulation induction. *ChemBioChem.* 3 : 1023—1026.

Weedon-Fekjær M. S., Taskén K. 2012. Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta.* 33 : S87—S91.

Zhang M., Tong K. P., Fremont V., Chen J., Narayan P., Puett D., Weintraub B. D., Szudlinski M. W. 2000. The extracellular domain suppresses constitutive activity of the transmembrane domain of the human TSH receptor: implications for hormone-receptor interaction and antagonist design. *Endocrinology.* 141 : 3514—3517.

Ziecik A. J., Kaczmarek M. M., Blitek A., Kowalczyk A. E., Li X., Rahman N. A. 2007. Novel biological and possible applicable roles of LH/hCG receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 269 : 51—60.

Поступила 4 II 2014

ACTIVATION OF ADENYLYL CYCLASE IN RATS TESTES AND OVARIES USING THIENOPYRIMIDINE DERIVATIVES

A. O. Shpakov,¹ K. V. Derkach,¹ D. V. Dar'in,² P. S. Lobanov²

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, and

² St. Petersburg State University;

e-mail: alex_shpakov@list.ru

Signaling systems regulated by luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (hCG) and having LH receptor as a sensor component play an important role in the functioning of the reproductive tissues. The use of LH and hCG in medicine for the treatment of diseases of the reproductive system and in auxiliary reproductive technologies is limited by their high cost, the need to use parenteral administration, and side effects. In recent years there has been the development of low molecular weight agonists of LH receptor that are devoid of these disadvantages and can be administered orally. The most effective among them are thienopyrimidine derivatives, in particular compound Org 43553. The purpose of this study was to investigate the influence of newly synthesized analogs of Org 43553, 5-amino-N-(*tert*-butyl)-4-(3-(isonicotinamide)phenyl)-2-(methylthio)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (compound 1) and 5-amino-N-(*tert*-butyl)-2-(methylthio)-4-(3-(thiophene-3-carboxamido)phenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (compound 2), on the basal and LH-stimulated adenylyl cyclase (AC) activity in plasma membranes fractions isolated from rat testes and ovaries. Compounds 1 and 2 have been shown to stimulate the basal AC activity in membranes isolated from the testes and ovaries in a dose dependent manner, and compound 2 was more effective in comparison with compound 1. EC₅₀ values for the effects of the compounds 1 and 2 on the AC activity were 1.05—1.12 and 0.28—0.37 μM, respectively. Stimulating effect of hCG on the AC activity retained in the presence of the thienopyrimidine derivatives, and at low, non-saturating, concentrations of the hormone the additivity of the effects of hCG and compounds 1 and 2 on AC activity was observed. This indicates that the thienopyrimidine derivatives interact with allosteric site localized in the transmembrane channel of LH receptor, and do not overlap with the binding site of gonadotropins, located in the N-terminal ectodomain. Effect of compounds 1 and 2 was tissue specific, and was not found in tissues where no LH receptors. Our data indicate that compounds 1 and 2 may be a prototype for drugs that regulate the function of male and female reproductive systems.

Key words: agonist, adenylyl cyclase, allosteric site, luteinizing hormone receptor, testes, thienopyrimidine, chorionic gonadotropin, ovaries.