

Низкомолекулярный аллостерический агонист, хорионический гонадотропин и их комбинация как триггеры овуляции у неполовозрелых самок крыс

Деркач К., Лебедев И., Морина И., Бахтюков А., Кузнецова В., Романова И., Шпаков А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия

* derkatch_k@list.ru

Ключевые слова: низкомолекулярный агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, хорионический гонадотропин, индукция овуляции, металлопротеиназа ADAMTS-1, белок StAR

Мотивация и цель: Процесс овуляции, включающий разрыв фолликула и высвобождение яйцеклетки, реализуется путем мощного выброса гипофизом лютеинизирующего гормона (ЛГ), который воздействует на специфичные к нему рецепторы в фолликулярных клетках яичников. При проведении вспомогательных репродуктивных технологий в качестве индуктора овуляции обычно используют хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Однако он характеризуется рядом серьезных побочных эффектов, среди которых снижение чувствительности яичников к эндогенному ЛГ, высокие риски развития синдрома гиперстимуляции яичников [1,2]. В связи с этим ведется поиск альтернативных индукторов овуляции, и большой интерес здесь представляют низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ (ЛГР), которые связываются с аллостерическим сайтом, расположенным внутри трансмембранного домена, в то время как гонадотропины взаимодействуют с внеклеточным сайтом [3]. Нами разработаны агонисты ЛГР, производные тиено[2,3-d]-пиримидина, которые активируют ЛГР и его каскады. Наиболее активными среди них являются TR3 и TR4, которые повышают продукцию тестостерона у самцов крыс, а также усиливают синтез прогестерона и вызывают овуляцию у самок крыс [4]. Поскольку одной из возможных стратегий для индукции овуляции может служить комбинированное применение ХГЧ и низкомолекулярных агонистов ЛГР, то актуальной задачей является оценка их эффективности при совместном введении. Целью работы было сравнительное изучение эффектов ХГЧ и TR3 на продукцию прогестерона и индукцию овуляции у неполовозрелых самок крыс при раздельном и совместном введении.

Материалы и методы: В опытах использовали самок крыс Вистар возраста 22–24 дня, эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 4-1/2023 от 25 апреля 2023 г.). Для стимуляции фолликулогенеза использовали Фоллимаг (п/к, 15 МЕ/крысу) («Мосагроген», Россия). Через 48 ч после обработки Фоллимагом вводили индукторы овуляции – TR3 (в/б, 25 мг/кг), ХГЧ (п/к, 10 МЕ/крысу) и совместно TR3 и ХГЧ в тех же дозах. Через 8, 16 или 24 ч после введения TR3, ХГЧ или TR3+ХГЧ у крыс забирали влагалищные мазки для микроскопии. Через указанные временные интервалы крыс анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг), декапитировали, забирали

яичники, оценивали количество фолликулов и желтых тел и измеряли экспрессию целевых генов. Из шейных вен забирали кровь для определения уровня прогестерона. Исследовали 10 групп крыс (во всех $n = 5$): контроль (К), обработанный Фоллимагом и получавший растворители препаратов, и экспериментальные группы, которые через 48 ч после введения Фоллимага обрабатывали ТРЗ, ХГЧ или ТРЗ+ХГЧ и декапитировали через 8, 16 и 24 ч после введения ТРЗ (Т8, Т16, Т24), ХГЧ (Г8, Г16, Г24) или ТРЗ+ХГЧ (ТГ8, ТГ16, ТГ24). Морфологический анализ яичников осуществляли, как описано ранее [4]. На срезах подсчитывали количество предовуляторных фолликулов и желтых тел, по которым оценивали число овулировавших фолликулов. Уровень прогестерона в крови определяли с помощью набора «Прогестерон-ИФА» («ХЕМА», Россия). RT-ПЦР осуществляли с помощью Applied Biosystems 7500 RT-PCR System («Life Technologies», США). Экспрессию генов *Lhr*, *Star*, *Adamts-1* и *Mt-1*, кодирующих ЛГР, холестерин-транспортирующий белок StAR, металлопротеиназу ADAMTS-1 и металлотионеин-1, рассчитывали методом delta-delta- C_t , используя гены актина В (*Actb*) и 18S-rRNA, как референсные. Статистический анализ проводили, используя программу «Microsoft Office Excel 2007» (США), и представляли результаты, как $M \pm SEM$. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты: Через 8 ч после введения ХГЧ и ТРЗ отдельно и совместно в яичниках крыс отмечали повышение количества предовуляторных фолликулов и уровня прогестерона в крови, причем уровень прогестерона в группе ТГ8 был выше, чем в группах Г8 и Т8 (табл. 1).

Таблица 1. Количество третичных и предовуляторных фолликулов и желтых тел в яичниках и концентрация прогестерона в крови у самок крыс, обработанных Фоллимагом и через 48 ч индукторами овуляции – ХГЧ, ТРЗ или ХГЧ+ТРЗ

Группа крыс	Третичные фолликулы, шт.	Предовуляторные фолликулы, шт.	Желтое тело, шт.	Прогестерон, нмоль/л
К	33.5 (27.5; 54.8)	2.0 (1.8; 3.2)	0.0 (0.0; 0.0)	9.1 (5.4; 15.3)
Г8	31.5 (27.0; 40.8)	14.0 (8.5; 20.2) ^a	0.0 (0.0; 0.0)	47.7 (32.3; 66.4) ^{ab}
Г16	25.0 (19.8; 34.5)	1.5 (0.8; 3.0)	2.5 (2.0; 3.3) ^a	18.4 (14.2; 27.2)
Г24	37.5 (24.8; 44.2)	0.0 (0.0; 1.2)	5.5 (3.0; 6.3) ^a	6.7 (6.0; 9.9) ^b
Т8	30.5 (25.8; 45.0)	11.5 (10.5; 13.5) ^a	0.0 (0.0; 0.0)	25.2 (15.4; 29.6) ^b
Т16	23.0 (21.2; 25.8)	1.5 (0.8; 3.0)	3.0 (2.0; 3.5) ^a	18.7 (13.0; 27.1)
Т24	35.0 (27.2; 44.0)	0.0 (0.0; 1.0) ^{ab}	4.5 (2.8; 6.3) ^a	6.2 (4.0; 9.5) ^b
ТГ8	18.0 (14.8; 26.8)	8.5 (5.8; 12.2) ^a	0.0 (0.0; 0.0)	84.3 (63.5; 88.6) ^a
ТГ16	15.5 (12.5; 20.0) ^a	2.0 (1.0; 2.2)	5.0 (3.8; 7.0) ^a	25.8 (18.9; 28.6)
ТГ24	25.5 (19.2; 47.5)	3.0 (1.0; 4.5)	5.5 (3.5; 6.3) ^a	19.2 (17.2; 28.9)

Примечание. Различия значимы: ^a – по сравнению с К, ^b – при сравнении групп Г8 или Т8 с группой ТГ8, Г16 или Т16 с ТГ16, Г24 или Т24 с ТГ24 при $p < 0.05$.

Через 16 и 24 ч в группах, обработанных ХГЧ и ТРЗ отдельно и совместно, число предовуляторных фолликулов снижалось, что сопровождалось снижением уровня прогестерона (табл. 1). Оценка экспрессии овариальных генов показала, что через 8 ч после обработки ХГЧ или ТРЗ уровень мРНК ЛГР повышался, в то время как в группе ТГ8 этого не происходило (табл. 2). Через 16 ч в группах Г16 и ТГ16

экспрессия гена *Lhr* снижалась ниже ее уровня в контроле, в группе T16 она от контроля не отличалась. Через 24 ч экспрессия гена *Lhr* восстанавливалась, наиболее отчетливо в группе TГ24. Экспрессия гена *Star*, кодирующего ключевой стероидогенный белок StAR, и гена металлопротеиназы ADAMTS-1, важнейшего маркера начальных стадий индукции овуляции, была максимальной через 8 ч, причем в группе TГ8 она была выше, чем в группах Г8 и Т8, а затем с различной интенсивностью снижалась (табл. 2). Обратная картина отмечалась для экспрессии гена металлотионеина-1, маркера формирования желтых тел, которая была максимальна через 24 ч после обработки.

Таблица 2. Экспрессия генов, кодирующих ЛГР (*Lhr*), белок StAR (*Star*), металлопротеиназу ADAMTS-1 (*Adamts-1*) и металлотионеин-1 (*Mt-1*) в яичниках самок крыс, обработанных Фоллимагом и индукторами овуляции

Группа крыс	<i>Lhr</i> , отн ед.	<i>Star</i> , отн ед.	<i>Adamts-1</i> , отн ед.	<i>Mt-1</i> , отн ед.
К	0.96 (0.86; 1.21)	1.17 (0.84; 1.22)	1.01 (0.76; 1.28)	0.98 (0.82; 1.27)
Г8	3.62 (2.52; 4.54) ^{ab}	13.63 (10.82; 15.41) ^{ab}	7.83 (5.42; 10.58) ^{ab}	1.48 (0.99; 2.41)
Г16	0.28 (0.15; 0.40) ^a	12.05 (10.86; 14.86) ^a	2.81 (1.97; 3.98) ^a	5.10 (4.12; 6.70) ^a
Г24	0.45 (0.36; 0.68)	9.75 (7.82; 11.39) ^a	2.55 (2.38; 3.52) ^a	7.99 (6.54; 8.55) ^a
Т8	3.15 (2.27; 3.80) ^{ab}	11.46 (9.18; 14.68) ^{ab}	6.73 (5.02; 7.66) ^{ab}	1.53 (1.16; 2.55)
Т16	0.84 (0.42; 1.45)	5.86 (2.39; 9.00) ^a	2.42 (2.30; 2.89) ^a	3.71 (2.52; 4.55) ^a
Т24	1.29 (0.85; 2.68)	3.19 (2.38; 4.42) ^{ab}	3.14 (2.00; 3.37)	4.97 (3.40; 5.99) ^a
ТГ8	1.40 (1.17; 1.48)	20.23 (19.26; 22.42) ^a	16.34 (12.63; 29.97) ^a	1.84 (1.28; 2.95)
ТГ16	0.40 (0.14; 0.61) ^a	11.57 (10.16; 13.62) ^a	1.98 (1.78; 3.06) ^a	5.86 (3.81; 7.02) ^a
ТГ24	1.31 (0.86; 1.56)	7.18 (5.59; 8.68) ^a	3.68 (2.81; 4.13) ^a	7.54 (5.08; 9.41) ^a

Примечание. Обозначения значимости различий те же, что и в табл. 1.

Выводы: ХГЧ и разработанный нами низкомолекулярный аллостерический ЛГР-агонист ТРЗ как по отдельности, так и совместно вызывали овуляцию у неполовозрелых самок крыс, стимулировали у них продукцию прогестерона, повышали экспрессию генов, вовлеченных в овариальный стероидогенез и индукцию овуляции. При этом комбинация препаратов была более эффективной в отношении стимуляции синтеза прогестерона и экспрессии генов стероидогенного белка StAR и металлопротеиназы ADAMTS-1, маркера овуляции, что было ассоциировано с более быстрым образованием желтых тел. Тем самым, при совместном введении ХГЧ и ТРЗ их активность, как индукторов овуляции, повышается, и этот феномен нуждается в дальнейшем изучении.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда (проект № 19-75-20122).

Low-molecular-weight allosteric agonist, human chorionic gonadotropin and their combination as triggers of ovulation in immature female rats

Derkach K., Lebedev I., Morina I., Bakhtyukov A., Kuznetsova V., Romanova I., Shpakov A.

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

* derkach_k@list.ru

Key words: low molecular weight agonist, luteinizing hormone receptor, human chorionic gonadotropin, ovulation induction, ADAMTS-1 metalloproteinase, StAR protein

Motivation and Purpose: The process of ovulation, which includes rupture of the follicle and release of the egg, is realized by the significant release of luteinizing hormone (LH) by the pituitary, which acts on its specific receptors in the follicular cells of the ovaries. When carrying out assisted reproductive technologies, human chorionic gonadotropin (hCG) is usually used as ovulation inducers. However, it is characterized by a number of serious side effects, including a decrease in the sensitivity of the ovaries to endogenous LH and a high risk of ovarian hyperstimulation syndrome [1,2]. In this regard, the search for alternative ovulation inducers is underway, and much interest is focused on low-molecular-weight LH receptor (LHR) agonists, which bind to an allosteric site located within the transmembrane domain, while gonadotropins interact with the extracellular site [3]. We have developed LHR agonists, thieno[2,3-d]-pyrimidine derivatives, which activate LHR and its cascades. The most active among them are TP3 and TP4, which increase testosterone production in male rats, and enhance progesterone synthesis and induce ovulation in female rats [4]. Since one of the possible strategies for inducing ovulation may be the combined use of hCG and low-molecular-weight LHR agonists, an urgent task is to assess their effectiveness when administered together. The purpose of the work was a comparative study of the effects of hCG and TP3 on progesterone production and ovulation induction in immature female rats when administered separately and together.

Materials and methods: Female Wistar rats aged 22–24 days were used in the experiments. The experiments were carried out in accordance with the requirements of the Ethics Committee of the IEPHB RAS (protocol No. 4-1/2023 of April 25, 2023). To stimulate folliculogenesis, Follimag (s.c., 15 IU/rat) (“Mosagrogen”, Russia) was used. 48 hours after treatment with Follimag, ovulation inducers were administered: TP3 (i.p., 25 mg/kg), hCG (s.c., 10 IU/rat) and together TP3 and hCG in the same doses. At 8, 16, or 24 h after administration of TP3, hCG, or TP3+hCG, vaginal smears were collected from rats for microscopy. At the indicated time intervals, rats were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg), decapitated, ovaries were harvested, follicles and corpus luteum numbers were assessed, and the expression of target genes was measured. Blood samples were collected from the neck veins to determine progesterone levels. We studied 10 groups of rats (all $n = 5$): control (C), treated with Follimag and receiving drug solvents, and the experimental groups, which 48 h after administration of Follimag were treated with TP3, hCG or TP3+hCG and decapitated after 8, 16 and 24 h after administration of TP3 (T8, T16, T24), hCG (G8, G16, G24) or TP3+hCG (TG8, TG16,

TG24). Morphological analysis of the ovaries was carried out as described previously [4]. On the sections, the number of preovulatory follicles and corpus luteum was counted, from which the number of ovulated follicles was estimated. The level of progesterone in the blood was determined using the Progesterone-ELISA kit (“CHEMA”, Russia). RT-PCR was performed using an Applied Biosystems 7500 RT-PCR System (“Life Technologies”, USA). The expression of the *Lhr*, *Star*, *Adamts-1* and *Mt-1* genes encoding LHR, cholesterol transporting protein StAR, metalloproteinase ADAMTS-1 and metallothionein-1 was calculated by the delta-delta-Ct method, using actin B (*Actb*) and 18S-rRNA genes as reference genes. Statistical analysis was carried out using “Microsoft Office Excel 2007” (USA), and the results were presented as $M \pm SEM$. Normality of distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Differences were considered as significant at $p < 0.05$.

Results: 8 hours after the administration of hCG and TP3 separately and together, an increase in the number of preovulatory follicles and the level of progesterone in the blood was shown in the ovaries of rats, and the level of progesterone in the TG8 group was higher than in the G8 and T8 groups (Table 1). After 16 and 24 hours, in the groups treated with hCG and TP3 separately and together, the number of preovulatory follicles decreased, which was accompanied by a decrease in progesterone levels (Table 1).

Table 1. The number of tertiary and preovulatory follicles and corpus luteum in the ovaries and the concentration of progesterone in the blood in female rats treated with Follimag and after 48 hours with ovulation inducers - hCG, TP3 or hCG+TP3

Rat group	Tertiary follicles, units	Preovulatory follicles, units	Corpus luteum, units	Progesterone, nmol/l
C	33.5 (27.5; 54.8)	2.0 (1.8; 3.2)	0.0 (0.0; 0.0)	9.1 (5.4; 15.3)
G8	31.5 (27.0; 40.8)	14.0 (8.5; 20.2) ^a	0.0 (0.0; 0.0)	47.7 (32.3; 66.4) ^{ab}
G16	25.0 (19.8; 34.5)	1.5 (0.8; 3.0)	2.5 (2.0; 3.3) ^a	18.4 (14.2; 27.2)
G24	37.5 (24.8; 44.2)	0.0 (0.0; 1.2)	5.5 (3.0; 6.3) ^a	6.7 (6.0; 9.9) ^b
T8	30.5 (25.8; 45.0)	11.5 (10.5; 13.5) ^a	0.0 (0.0; 0.0)	25.2 (15.4; 29.6) ^b
T16	23.0 (21.2; 25.8)	1.5 (0.8; 3.0)	3.0 (2.0; 3.5) ^a	18.7 (13.0; 27.1)
T24	35.0 (27.2; 44.0)	0.0 (0.0; 1.0) ^{ab}	4.5 (2.8; 6.3) ^a	6.2 (4.0; 9.5) ^b
TG8	18.0 (14.8; 26.8)	8.5 (5.8; 12.2) ^a	0.0 (0.0; 0.0)	84.3 (63.5; 88.6) ^a
TG16	15.5 (12.5; 20.0) ^a	2.0 (1.0; 2.2)	5.0 (3.8; 7.0) ^a	25.8 (18.9; 28.6)
TG24	25.5 (19.2; 47.5)	3.0 (1.0; 4.5)	5.5 (3.5; 6.3) ^a	19.2 (17.2; 28.9)

Note. The differences are significant: ^a – compared with C, ^b – when comparing groups G8 or T8 with group TG8, G16 or T16 with TG16, and G24 or T24 with TG24 at $p < 0.05$.

Assessment of ovarian gene expression showed that 8 hours after treatment with hCG or TP3, the level of LHR mRNA increased, while this did not happen in the TG8 group (Table 2). After 16 hours, in the T16 and TG16 groups, the expression of the *Lhr* gene decreased below its level in the control, and in the T16 group it did not differ from the control. After 24 hours, *Lhr* gene expression was restored, most pronounced in the TG24 group. Expression of the *Star* gene, encoding the key steroidogenic protein StAR, and the metalloproteinase gene ADAMTS-1, the most important marker of the initial stages of ovulation induction, was maximum after 8 hours, and in the TG8 group it was higher than in the G8 and T8 groups, and then with varying intensity decreased (Table 2). The opposite pattern was observed for the expression of the metallothionein-1 gene, a marker of corpus luteum formation, which was maximum 24 hours after treatment.

Table 2. Expression of genes encoding LHR (*Lhr*), StAR protein (*Star*), metalloproteinase ADAMTS-1 (*Adamts-1*) and metallothionein-1 (*Mt-1*) in the ovaries of female rats treated with Follimag and ovulation inducers

Rat group	<i>Lhr</i> , arb.units	<i>Star</i> , arb.units	<i>Adamts-1</i> , arb.units	<i>Mt-1</i> , arb.units
C	0.96 (0.86; 1.21)	1.17 (0.84;1.22)	1.01 (0.76; 1.28)	0.98 (0.82; 1.27)
G8	3.62 (2.52; 4.54) ^{ab}	13.63 (10.82; 15.41) ^{ab}	7.83 (5.42; 10.58) ^{ab}	1.48 (0.99; 2.41)
G16	0.28 (0.15; 0.40) ^a	12.05 (10.86; 14.86) ^a	2.81 (1.97; 3.98) ^a	5.10 (4.12; 6.70) ^a
G24	0.45 (0.36; 0.68)	9.75 (7.82; 11.39) ^a	2.55 (2.38; 3.52) ^a	7.99 (6.54; 8.55) ^a
T8	3.15 (2.27; 3.80) ^{ab}	11.46 (9.18; 14.68) ^{ab}	6.73 (5.02; 7.66) ^{ab}	1.53 (1.16; 2.55)
T16	0.84 (0.42; 1.45)	5.86 (2.39; 9.00) ^a	2.42 (2.30; 2.89) ^a	3.71 (2.52; 4.55) ^a
T24	1.29 (0.85; 2.68)	3.19 (2.38; 4.42) ^{ab}	3.14 (2.00; 3.37)	4.97 (3.40; 5.99) ^a
TG8	1.40 (1.17; 1.48)	20.23 (19.26; 22.42) ^a	16.34 (12.63; 29.97) ^a	1.84 (1.28; 2.95)
TG16	0.40 (0.14; 0.61) ^a	11.57 (10.16; 13.62) ^a	1.98 (1.78; 3.06) ^a	5.86 (3.81; 7.02) ^a
TG24	1.31 (0.86; 1.56)	7.18 (5.59; 8.68) ^a	3.68 (2.81; 4.13) ^a	7.54 (5.08; 9.41) ^a

Note. The designations for the significance of differences are the same as in Table 1.

Conclusion: hCG and the low-molecular-weight allosteric LHR agonist TP3, which we developed, both individually and together, induced ovulation in immature female rats, stimulated progesterone production, and increased the expression of genes involved in ovarian steroidogenesis and ovulation induction. Moreover, the combination of drugs was more effective in stimulating the synthesis of progesterone and the expression of the genes for the steroidogenic protein StAR and metalloproteinase ADAMTS-1, an ovulation marker, which was associated with more rapid formation of the corpus luteum. Thus, with the joint administration of hCG and TP3, their activity as ovulation inducers increases, and this phenomenon requires further study.

Funding: The study is supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 19-75-20122).

Список литературы/References

1. Riccetti L. et al. Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin Display Biased Agonism at the LH and LH/CG Receptors. *Sci. Rep.* 2017;7(1):940. doi: 10.1038/s41598-017-01078-8
2. Singh R. et al. Gonadotropins as pharmacological agents in assisted reproductive technology and polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 2023;34(4):194-215. doi: 10.1016/j.tem.2023.02.002
3. Lazzaretti C. et al. Allosteric modulation of gonadotropin receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2023;14:1179079. doi: 10.3389/fendo.2023.1179079
4. Derkach K.V. et al. Comparison of Steroidogenic and Ovulation-Inducing Effects of Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor in Immature Female Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(23):16618. doi: 10.3390/ijms242316618