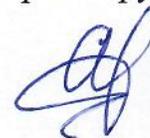


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



Поликарпова Анна Вадимовна

ПРОИЗВОДНЫЕ ПРОГЕСТЕРОНА, СЕЛЕКТИВНО ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С  
ЕГО МЕМБРАННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ, И ИХ ИЗБИРАТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Специальность – 03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Научный руководитель:** **Щелкунова Татьяна Анатольевна** – кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:** **Лопина Ольга Дмитриевна** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии, ведущий научный сотрудник

**Шимановский Николай Львович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, медико-биологический факультет, кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева, заведующий кафедрой

**Шевченко Марина Александровна** – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, лаборатория клеточных взаимодействий, научный сотрудник

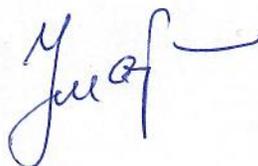
Защита диссертации состоится «21» октября 2019 года в 17<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/227415834/>.

Автореферат разослан «20» сентября 2019 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Стероидный гормон прогестерон абсолютно необходим для нормального функционирования репродуктивной системы, а также для сохранения беременности. Множество эффектов этого гормона в организме животных и человека опосредуется его рецепторами, относящимися к семейству ядерных рецепторов (nPRs) [Смирнов, 2005]. Однако исследования последних лет показывают, что немаловажную роль в регуляции многих физиологических процессов играет связывание прогестина с мембранными рецепторами прогестерона (mPRs) [Valadez-Cosmes et al., 2016]. Эффекты этих гормонов, опосредуемые разными типами рецепторов, существенно различаются. К настоящему времени пока не удалось обнаружить полных избирательных агонистов и антагонистов mPRs, поэтому актуальность создания селективных лигандов mPRs, имеющих агонистическую и антагонистическую активность, не вызывает сомнений. Знание лигандсвязывающих свойств этих рецепторов является необходимым условием для создания селективных аналогов прогестерона, которые могут найти практическое применение в таких областях медицины, как акушерство и гинекология, терапия гормонзависимых опухолей и иммунотерапия. Поиск селективных агонистов и антагонистов mPRs является стартовой точкой для изучения механизмов передачи сигнала через эти рецепторы, а также для выявления физиологических эффектов прогестерона, опосредуемых через mPRs, одним из которых является его иммуномодулирующее действие. Прогестерон выполняет ключевую роль в процессах овуляции, имплантации бластоцисты и поддержании беременности в женском организме. Падение уровня прогестерона у многих видов млекопитающих и изменение уровня экспрессии его рецепторов у человека определяет начало процесса родов [Pieber et al., 2001]. Важную роль во всех этих процессах играют иммунные клетки, рекрутируемые в репродуктивные органы и ткани женского организма, в том числе в яичник и плаценту - места синтеза прогестерона. Здесь они подвергаются действию высоких концентраций этого гормона, достигающих до уровня 125 мкМ. В связи с этим активно изучается действие прогестина на иммунные клетки, в том числе и в концентрациях, обнаруживаемых в местах синтеза прогестерона. Процессы овуляции, имплантации и родовой деятельности сравнивают с локальным воспалением [Beric et al., 2014; Vinketova et al., 2016]. Кроме того, во время беременности и в разные фазы менструального цикла меняется иммунный ответ на инфекции. В литературе существует множество противоречивых данных о влиянии прогестерона на разные типы иммунных клеток, а также о роли рецепторов, через которые осуществляет свое действие этот гормон. На настоящий момент нет единства в данных об экспрессии разных типов рецепторов в иммунных клетках, хотя большинство исследователей не находят ядерных рецепторов прогестерона в Т-лимфоцитах [Dosiou et al., 2008; Lissauer et al., 2015]. Кроме того, не существует общепринятого мнения о влиянии прогестина на экспрессию провоспалительных и противовоспалительных факторов, секретируемых этими клетками. Прогестерон и его синтетические аналоги, по-видимому, могут оказывать как провоспалительное, так и противовоспалительное действие в зависимости от концентрации гормона, типа иммунных клеток и их происхождения, ткани-мишени и уровня других про- и противовоспалительных факторов и требует дальнейшего изучения.

**Целью** данной работы был поиск производных прогестерона, селективно взаимодействующих с его мембранными рецепторами, и изучение их влияния на иммунную систему.

**Задачи исследования:**

1. Изучить возможность использования клеточной культуры VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека в качестве объекта для изучения лигандсвязывающих характеристик mPRs.

2. Исследовать сродство девяти новых производных прогестерона к mPRs в клетках линии VxPC3 и к nPRs из цитозольной фракции маток крыс и выбрать соединения, наиболее селективные к mPRs.

3. Проанализировать влияние прогестерона и выбранных соединений на экспрессию мРНК провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в некоторых иммунных клеточных линиях человека.

4. Сравнить эффекты прогестерона и селективных лигандов mPRs на экспрессию мРНК и секрецию белка провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в первичной культуре мононуклеарных клеток крови человека (PBMC).

**Научная новизна работы.** В настоящей работе была показана возможность использования клеточной культуры VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, для которой характерно отсутствие экспрессии мРНК nPR при наличии высокой экспрессии мРНК mPRs, в качестве объекта для изучения лигандсвязывающих характеристик mPRs. Было исследовано сродство девяти новых синтетических производных прогестерона к рецепторам прогестерона разных типов. По результатам работы были выбраны два наиболее селективных к mPRs аналога, их действие на иммунные клетки человека впервые было изучено в этой работе.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическое значение работы заключается в изучении структуры лигандсвязывающего кармана mPRs с помощью анализа связывания производных прогестерона с различными модификациями в структуре стероида. Это позволило выявить ряд особенностей взаимодействия прогестероидов с данным типом рецепторов, таких как незначимость 3-кетогруппы и важность заместителей в 6 и 19 положении стероидного скелета. Селективные агонисты и антагонисты мембранных рецепторов прогестерона необходимы для изучения физиологических эффектов прогестерона, опосредуемых через данные рецепторы. С использованием выбранных селективных к mPRs аналогов было показано, что действие прогестерона на иммунные клетки осуществляется через его мембранные рецепторы. Кроме того, обнаружено преимущественно провоспалительное действие прогестерона и его селективных к мембранным рецепторам аналогов на макрофаги и мононуклеарные клетки периферической крови, но противовоспалительное на Т-лимфоциты. Лиганды mPRs во всех случаях действовали однонаправленно с прогестероном, поэтому можно ожидать, что они будут оказывать и в целом организме аналогичное прогестерону действие, не оказывая при этом побочных эффектов в клетках, содержащих nPRs.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Среди новых производных прогестерона найдены два соединения (19-гидроксипрегн-4-ен-20-он и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он), не имеющие сродства к nPRs, но взаимодействующие с mPRs, а следовательно, являющиеся их селективными лигандами.
2. Новые селективные лиганды mPRs обладают иммуномодуляторным действием, аналогичным действию прогестерона на изучаемые иммунные клетки. Действие прогестерона на исследованные иммунные клетки (Т-лимфоциты, моноциты, мононуклеарные клетки крови) осуществляется через mPRs.
3. Все исследованные стероиды оказывали на иммунные клетки как провоспалительные, так и противовоспалительные эффекты.
4. Направленность действия прогестинов на экспрессию и секрецию цитокинов зависит от фенотипа данной иммунной клетки и может быть как стимулирующей, так и ингибирующей в отношении одного и того же фактора.

**Апробация результатов диссертации.** Основные результаты работы были представлены на Международной научной конференции «Ломоносов – 2013» (Москва, 2013), на Кластере конференций «Оргхим-2016» (Репино, Санкт-Петербург, 2016), на съезде федерации Европейских физиологических обществ (Вена, Австрия, 2017), на 43 съезде федерации Европейских биохимических обществ (Прага, Чехия, 2018).

Диссертация апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол от 2 апреля 2019 г.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ: 5 статей в периодических изданиях, индексируемых аналитическими базами Scopus и Web of Science и 4 тезиса в сборниках докладов научных конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 121 странице и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение результатов, заключение, список цитируемой литературы. Работа проиллюстрирована 8 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 186 источников.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

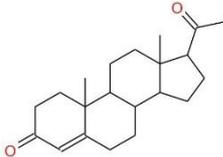
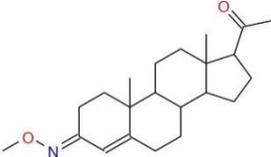
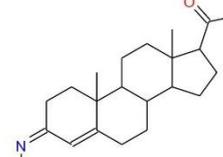
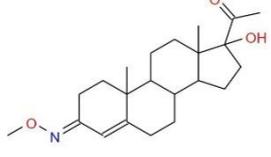
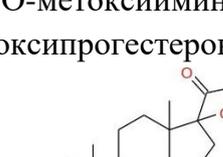
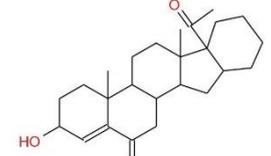
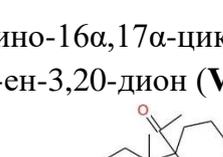
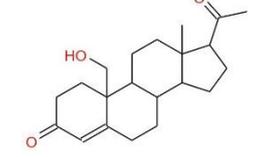
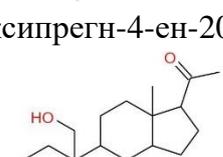
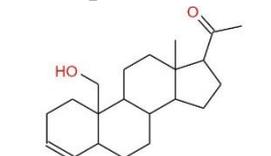
**Общий обзор и схема экспериментов.** На первом этапе работы исследовали сродство прогестерона и девяти его производных (соединения **I – IX**, таблица 1), имеющих различные модификации молекулы. Все исследуемые стероиды были синтезированы в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского и любезно предоставлены нам И.С. Левиной.

В качестве объекта для определения связывающих характеристик mPRs и сродства исследуемых соединений к этим рецепторам была выбрана клеточная линия ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, для которой ранее была показана высокая экспрессия мРНК mPRs, и полное отсутствие экспрессии nPRs [Goncharov et al., 2017]. Также, нами было доказано наличие белков, соответствующих mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  и mPR $\gamma$  в лизате клеток ВхРС3 с помощью иммуноблоттинга. Объектом для изучения сродства тестируемых соединений к nPRs была выбрана матка крысы, nPRs из цитозольной фракции которой имеют сходные с человеческими nPRs связывающие характеристики и аналогичное

строение лигандсвязывающего кармана [Смирнов и соавт., 2002; Федюшкина и соавт., 2013]. По результатам радиолигандного анализа были выбраны два аналога, обладающих наибольшей избирательностью в отношении mPRs.

Второй этап работы заключался в исследовании влияния прогестерона и выбранных нами наиболее селективных в отношении mPRs аналогов на профиль цитокинов, секретируемых иммунными клетками. Эту часть работы проводили на гомогенных клеточных линиях Jurkat острого Т-клеточного лейкоза (Т-лимфоциты) и ТНР-1 острого моноцитарного лейкоза (моноциты), а также на гетерогенной первичной культуре мононуклеарных клеток, полученных из периферической крови доноров разного пола (РВМС).

Таблица 1. Производные прогестерона, исследуемые в данной работе

Название соединения и химическая формула	
Прогестерон (P4)	(E)3-О-метоксииминопрогестерон (I)
	
(Z)3-О-метоксииминопрогестерон (II)	(E)3-О-метоксиимино-17-гидроксипрогестерон (III)
	
(Z)3-О-метоксиимино-17-гидроксипрогестерон (IV)	6(E)-Метоксиимино-16α,17α-циклогексанопрегн-4-ен-3β-ол-20-он (V)
	
6(E)-метоксиимино-16α,17α-циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион (VI)	19-гидроксипрогестерон (VII)
	
19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (VIII)	19-гидроксипрегн-3-ен-20-он (IX)
	

**1) Поиск аналогов прогестерона, селективно взаимодействующих с его мембранными рецепторами, с использованием радиолигандного анализа**

**Культивирование клеточной линии VxPC3, измерение и анализ связывания [<sup>3</sup>H]прогестерона с целыми клетками этой линии.** Клетки линии VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека выращивали в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в среде RPMI-1640 с феноловым красным, обогащенной 10% FBS (эмбриональная телячья сыворотка) (Gibco). После третьего пассажа клетки переводили в среду RPMI-1640 без фенолового красного, обогащенную 10% DFBS (эмбриональная телячья сыворотка, обработанная покрытым декстраном углем) и проводили три пассажа в указанной среде. Для подготовки клеток линии VxPC3 к радиолигандному анализу клетки снимали с чашки с помощью растворов Версена и трипсин-ЭДТА, осаждали центрифугированием при 500 g в течение 7 минут, осадок клеток ресуспендировали в фосфатном буферном растворе DPBS (ПанЭко), подсчитывали их количество в камере Горяева и использовали для анализа связывания с [<sup>3</sup>H]прогестероном.

Приготовленную суспензию клеток VxPC3 (100-120 тысяч клеток в 100 мкл), инкубировали в стеклянных пробирках при комнатной температуре в течение двух часов при постоянном перемешивании со 100 мкл смеси стероидов в буфере DPBS. Смесь стероидов состояла из 10 мкл [<sup>3</sup>H]прогестерона (конечная концентрация 3 – 5 нМ) и 90 мкл немеченого стероида (концентрации от 0 до 6320 нМ). После инкубации клетки осаждали центрифугированием при 500 g в течение 7 минут при комнатной температуре. Осадок клеток отмывали в 700 мкл DPBS и центрифугировали снова при аналогичных условиях. К осадку клеток добавляли 250 мкл дистиллированной воды и переносили во флакон для счета. Радиоактивность измеряли в 6 мл диоксанового сцинтиллятора «Bray» на жидкостном сцинтилляционном счетчике RackBeta 1217 (LKB WALLAC).

**Иммуноблоттинг.** Клетки VxPC3 лизировали в RIPA-буфере (Santa Cruz). Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и β-меркаптоэтанола, после чего производили электрофоретический перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм (Sigma) в приборе Hoefer Scientific Instruments (Hoefer Inc). После переноса блокировали неспецифические связывания с помощью ECL Advance Blocking Agent (GE Healthcare Life Sciences). Детекцию проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител против mPRα (ab75508), mPRβ (ab123693), mPRγ (ab79517), первичных кроличьих моноклональных антител против nPR (ab32085), конъюгата вторичных антител и пероксидазы хрена (1706515) и субстрата Clarity Western ECL Substrate на ChemiDoc MP System Clarity Western ECL Substrate на приборе ChemiDoc MP System (Bio-Rad).

**Измерение и анализ связывания [<sup>3</sup>H]прогестерона с цитозольной фракцией матки.** Матки от 3 – 4 взрослых самок белых крыс помещали на лед, измельчали и гомогенизировали с использованием стеклянного гомогенизатора в 10 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,5), содержащем 30% глицерин, 1 мМ DTT и 0,5 мМ PMSF при соотношении ткань/буфер 1:6. После центрифугирования при 14000 g в течение 30 мин при 4°C супернатант (цитозоль) собирали, измеряли в нем количество белка по методу Бредфорд и немедленно использовали. Для измерения сродства цитозольную фракцию матки (100 мкл) инкубировали при 4°C в течение 20 часов со 100 мкл смеси стероидов, содержащей 10 мкл

[<sup>3</sup>H]прогестерона (конечная концентрация 3 – 5 нМ) и 90 мкл немеченого конкурента (конечные концентрации от 0 до 6320 нМ). Несвязанный с белком [<sup>3</sup>H]прогестерон удаляли обработкой инкубационной смеси 100 мкл 2%-ной суспензии активированного угля, покрытого 0,4% декстраном в течение 5 мин при 4°C и осаждением угля центрифугированием при 400 g в течение 5 мин при 4°C. Аликвоты надосадочной фракции (200 мкл) переносили во флакон для счета и измеряли содержание радиоактивности аналогично описанному выше для ВхРСЗ.

**Анализ результатов радиолигандного анализа.** Для каждой экспериментальной точки величину неспецифически связанного [<sup>3</sup>H]прогестерона, измеренную в присутствии избытка немеченого прогестерона (6320 нМ), вычитали из величины суммарного связывания [<sup>3</sup>H]прогестерона. Статистическая обработка, расчет величин  $K_d$  и  $B_{max}$  и построение графиков конкурентного ингибирования были выполнены с помощью программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc). Величины относительной конкурентной активности производных прогестерона (ОКА) рассчитывали по формуле:

$$\text{ОКА} = \frac{K_d (\text{прогестерона})}{K_d (\text{исследуемого лиганда})} \times 100\%$$

ОКА прогестерона принималась за 100%.

**Определение антагонистической и агонистической активности соединений к nPRs в клетках дрожжей.** Определение транскрипционной активности выбранных соединений производили по методике, описанной ранее [Мичурина и соавт., 2018]. В работе использовали пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (штамм CRY), трансформированные экспрессионно-репортерной плазмидой pRR-PR-5Z. Транскрипционная активность рецептора (nPR-B) после взаимодействия с лигандом оценивалась по уровню экспрессии репортерного гена  $\beta$ -галактозидазы с гормончувствительным элементом в промоторе.

## 2) Оценка влияния выбранных селективных аналогов на продукцию цитокинов иммунными клетками разных типов

**Культивирование клеточных линий Jurkat и THP-1.** При пассажировании суспензионных культур Jurkat и THP-1 отбирали небольшое количество суспензии клеток и переносили в новую чашку, добавляя свежую среду. Через три пассажа в среде без фенолового красного количество клеток подсчитывали в камере Горяева и использовали полученную суспензию клеток для инкубации с гормонами в исследовании влияния производных прогестерона на уровень цитокинов.

**Выделение РВМС из периферической крови доноров.** Выделение мононуклеарных клеток РВМС производили из периферической (венозной) крови доноров по методике, описанной Вöyum [Вöyum, 1968], основанной на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ). Донорами крови для нашего исследования стали 8 мужчин и 8 женщин в возрасте 25 – 35 лет. Забор венозной крови производился в пробирки Vacuette, покрытые КЗ ЭДТА (4,1 – 6,8 мкМ) для предотвращения свертывания. От каждого донора получали 10 мл цельной крови. Работа проводилась в стерильном ламинарном боксе. На 3 мл фиколла наслаивали 9 мл цельной крови разведенной раствором DPBS в 3 раза. Пробирки центрифугировали при 400 g в течение 30 мин при 18°C с

медленным разгоном и торможением. После центрифугирования на границе раздела фаз собирали слой моноклеарных клеток. Полученные моноклеарные клетки дважды отмывали от фиколла в растворе DPBS и суспендировали в полной ростовой среде RPMI-1640 без фенолового красного. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и использовали для инкубации с гормонами в исследовании влияния производных прогестерона на уровень цитокинов.

**Инкубация клеток с гормонами.** В 96-луночный круглодонный планшет для клеточных культур вносили суспензию клеток РВМС, Jurkat или ТНР-1 из расчета 150 тыс. клеток в лунку. К клеткам РВМС и ТНР-1 добавляли 100 нг/мл липополисахарида (ЛПС) и растворы гормонов в концентрациях 20 мкМ или 50 мкМ, которые определяют локально в местах синтеза прогестерона. К клеткам Jurkat добавляли смесь 81 нМ 12-миристанат 13-ацетата и 1,34 мкМ иономицина и растворы гормонов в концентрациях 20 мкМ или 50 мкМ. Контрольные лунки содержали стимулятор (ЛПС либо смесь 12-миристанат 13-ацетата и иономицина в зависимости от исследуемой культуры) и спирт. Инкубацию проводили в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в течение 48 часов, после чего отбирали культуральную среду для определения в ней концентрации цитокинов методом иммуноферментного анализа (ИФА), а осадок клеток собирали в TRIzol реагент (Invitrogen) для выделения РНК и определения экспрессии мРНК цитокинов методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

**Определение экспрессии мРНК рецепторов и цитокинов методом ПЦР-РВ.** Методом ПЦР-РВ сначала определяли уровень экспрессии мРНК mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ , mPR $\gamma$  и nPR в культурах ТНР-1 и РВМС. В обработанных гормонами клетках РВМС, Jurkat и ТНР-1 определяли содержание мРНК следующих генов: интерлейкинов 1 $\beta$ , 2, 4, 6, 10 (IL), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерферона  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), хемокина CCL18, толл-подобного рецептора 4 (TLR4).

Выделение РНК производили с помощью реагента TRIzol. Выделенную мРНК обрабатывали ДНКазой I (Promega), проводили синтез комплементарной цепи ДНК (кДНК) с помощью готового набора для обратной транскрипции ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения количественной ПЦР в реальном времени на амплификаторе Rotor-Gene 3000 (Qiagen). Уровень экспрессии мРНК рецепторов и цитокинов рассчитывали с использованием референсного гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Для цитокинов нормализованный на GAPDH уровень каждого цитокина рассчитывали методом  $\Delta\Delta C_t$  относительно калибратора (контроль для каждого донора), который принимали за 100%.

**Определение концентрации цитокинов в культуральной среде методом ИФА.** Содержание цитокинов в культуральной среде, полученной после инкубации клеток РВМС с липополисахаридом и гормонами, определяли с помощью готовых наборов реактивов для измерения концентраций IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 и TNF $\alpha$  (Цитокин). В данных наборах для определения концентраций указанных цитокинов используется «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Измерение оптической плотности производили при длине волны 450 нм на спектрофотометре Bio-Rad microplate reader, model 550 (Bio-Rad). Концентрацию указанных цитокинов в пробах определяли в пг/мкл. Контроль без гормонов для каждого донора принимали за 100% и рассчитывали уровень цитокина в РВМС, обработанных гормонами, относительно своего контроля.

**Статистическая обработка данных.** Статистический анализ результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc). Для определения достоверности различий использовали критерий Краскела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по Данну. Статистически значимыми считали различия, для которых уровень значимости по соответствующему критерию был меньше 0,05 ( $p < 0,05$ ). Данные в тексте, таблицах и графиках представлены в виде среднего и стандартного отклонения, в скобках представлено количество независимых измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1) Поиск производных прогестерона, селективно взаимодействующих с его мембранными рецепторами

#### 1.1. Выбор объекта для изучения лиганд-связывающих характеристик mPRs.

Ранее было показано [Goncharov et al., 2017], что для клеток линии VxPC3 характерна высокая экспрессия мРНК mPRs, и полное отсутствие экспрессии мРНК pPRs. В связи с этим, важной задачей стало определить возможность использования этой линии в качестве объекта для исследования лигандсвязывающих характеристик mPRs. Иммуноблоттинг с использованием специфичных поликлональных антител к mPR $\alpha$ , mPR $\beta$ , mPR $\gamma$  показал наличие всех трех изотипов мембранных рецепторов в лизате клеток VxPC3 с молекулярной массой 40 кДа (рисунок 1 А). Использование моноклональных антител к pPRs показало отсутствие этого ядерного рецептора прогестерона в клетках линии VxPC3. Чтобы также исключить действие прогестинов через другие рецепторы, мы изучили сродство стероидов основных классов к белку на мембране VxPC3 (рисунок 1 Б). В качестве конкурирующих лигандов были выбраны стероиды основных классов (тестостерон, эстрадиол и кортизол), а также синтетический антагонист pPRs мифепристон. Радиолигандный анализ показал низкое сродство эстрадиола (ОКА =  $1,6 \pm 0,7\%$ ) и кортизола (ОКА =  $0,5 \pm 0,4\%$ ), что свидетельствует в пользу того, что белком, специфически связывающим [ $^3$ H]прогестерон, является именно mPRs. Умеренное сродство тестостерона (ОКА =  $10,2 \pm 1,7\%$ ) и низкое сродство мифепристона также характерно для mPRs. Здесь имеется соответствие с литературными данными, полученными для клеток линии MDA-MB-231 аденокарциномы молочной железы после трансфекции вектором с геном mPR $\alpha$  [Thomas et al., 2007].

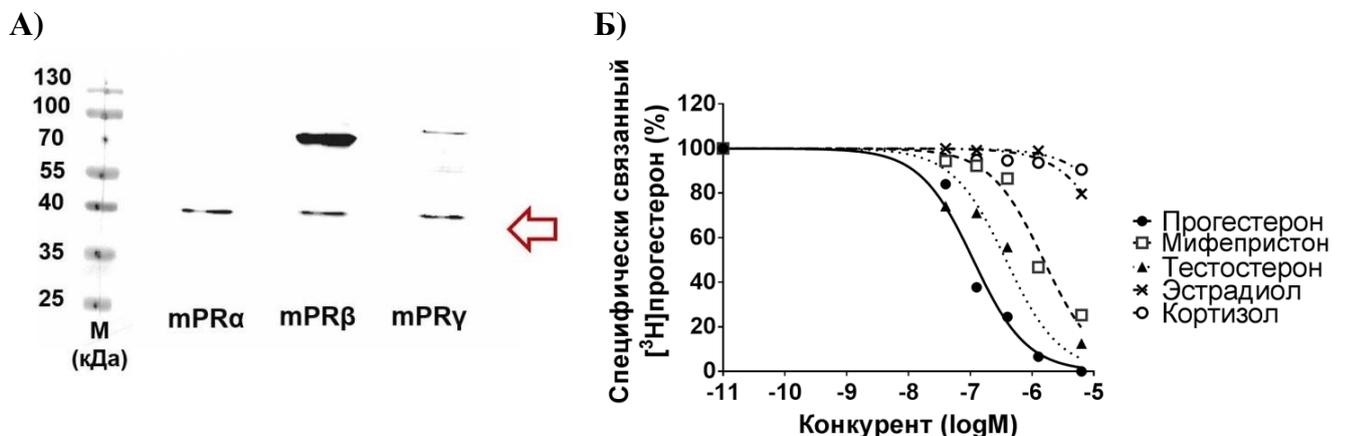


Рисунок 1. А) Экспрессия белков mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  и mPR $\gamma$  в клетках линии VxPC3. кДа – молекулярная масса маркеров, стрелкой отмечены белки, соответствующие mPRs; Б) Пример конкурентного связывания стероидов основных классов с mPRs в клетках VxPC3.

По результатам 14 измерений равновесная константа диссоциации  $K_d$  прогестерона с mPRs в клетках линии VxPC3 составила  $141,6 \pm 43,5$  нМ, а концентрация связывающих участков  $B_{max}$  составила  $6,1 \pm 3,9$  нМ на 120 – 150 тысяч клеток. Определенные нами связывающие характеристики находятся в соответствии с данными литературы [Ashley et al.; Cai and Stocco, 2005; Лисанова и соавт., 2013].

**1.2. Конкурентная активность производных прогестерона при связывании с мембранными рецепторами прогестерона.** Далее мы изучили сродство девяти синтетических производных к mPRs и вычислили их относительные конкурентные активности. На рисунке 2 представлены кривые конкуренции между [ $^3H$ ]прогестероном и немечеными прогестероном и его аналогами, относительные конкурентные активности исследуемых соединений приведены в таблице 2. Наиболее перспективными оказались соединения VIII и IX с удаленной 3-кетогруппой. Однако, чтобы доказать возможность их использования в качестве селективных к mPRs лигандов, необходимо проверить их сродство к pPRs.

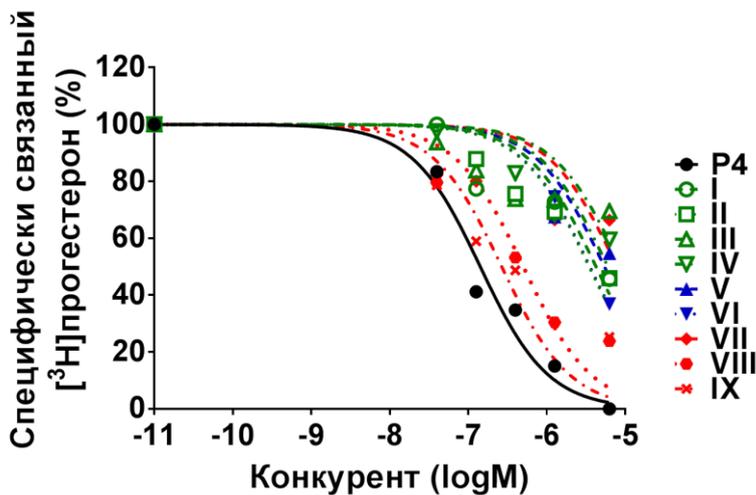


Рисунок 2. Пример анализа конкурентной активности прогестерона и его синтетических аналогов по вытеснению [ $^3H$ ]прогестерона из комплексов с mPRs в клетках линии VxPC3

Таблица 2. ОКА стероидов к mPRs в клетках линии VxPC3

Стероид	ОКА (%)
Прогестерон	100
I	$2,5 \pm 1,4$
II	$2,4 \pm 1,2$
III	$1,1 \pm 0,9$
IV	$1,4 \pm 0,5$
V	$3,5 \pm 0,5$
VI	$2,2 \pm 0,9$
VII	$4,0 \pm 2,5$
VIII	$10,3 \pm 6,6$
IX	$23,9 \pm 14,3$

(по результатам 3-5 измерений)

**1.3. Конкурентная активность производных прогестерона при связывании с ядерными рецепторами прогестерона и регуляция транскрипционной активности pPR-B.** По результатам 9 измерений равновесная константа диссоциации  $K_d$  прогестерона с pPRs из цитозольной фракции матки крысы составила  $30,7 \pm 7,9$  нМ, а концентрация связывающих участков составила  $3,6 \pm 2,1$  нМ на мкг белка. ОКА восьми соединений (I – VI, VIII, IX) не превышала 0,5%, т.е. для них характерно практически полное отсутствие сродства к pPRs. Соединение VII связывалось с pPRs, но с умеренно низким сродством, ОКА этого аналога составила  $1,1 \pm 0,2\%$  (рисунок 3 А).

Перед началом исследования влияния выбранных нами селективных лигандов mPRs (соединения VIII и IX) на физиологические параметры целесообразно проверить, обладают ли данные аналоги агонистической, либо антагонистической активностью в отношении

nPRs. Для этого использовали описанную ранее модельную дрожжевую систему *Saccharomyces cerevisiae*. Тестируемые соединения VIII и IX продемонстрировали полное отсутствие как агонистической, так и антагонистической активности в отношении nPR-B, не влияя на его транскрипционную активность, что подтверждает возможность их использования в качестве селективных лигандов mPRs (рисунок 3 Б).

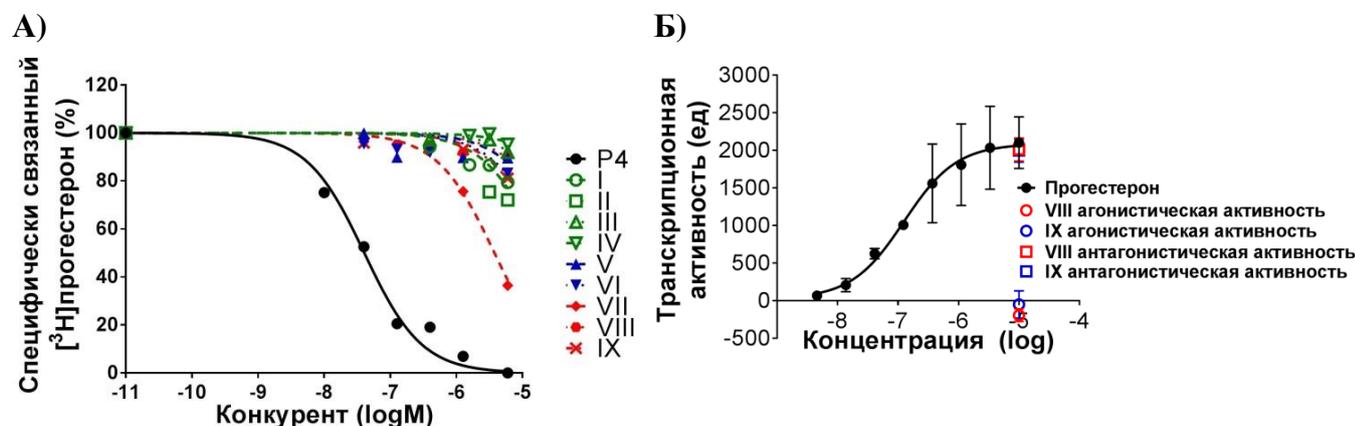


Рисунок 3. А) Пример анализа конкурентной активности прогестерона и его синтетических аналогов по вытеснению [<sup>3</sup>H]прогестерона из комплексов с nPRs в цитозольной фракции матки крысы, Б) Влияние выбранных соединений на транскрипционную активность nPR-B, экспрессированного в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* (по результатам 3 измерений)

Как известно,  $\Delta^4$ -3-кетогруппа является важным определяющим фактором взаимодействия прогестина с nPRs, формируя водородные связи с аминокислотными остатками лигандсвязывающего кармана рецептора [Williams and Sigler, 1998]. Подобные данные для mPRs отсутствуют. В то же время в данной работе, а также в работах других исследователей [Thomas, 2008] было установлено, что стероидсвязывающие характеристики nPRs и mPRs различаются, что указывает на структурные различия в лигандсвязывающих карманах этих белков. Ранее было показано, что увеличение размера заместителя около третьего углеродного атома стероидной молекулы прогестерона снижает сродство лиганда к nPRs [Levina et al., 2008]. В связи с этим ожидалось, что 3-*O*-метоксииминопроизводные прогестерона (соединения I – IV), имеющие объемный заместитель около C3, будут обладать высокими индексами дискриминации mPRs/nPRs [Лисанова и соавт., 2013]. В нашей работе данные соединения (I – IV) демонстрировали невысокое сродство к mPRs при полном отсутствии такового к nPRs. Благоприятными модификациями молекулы прогестерона оказались введение в 19-положение метиленовой или гидроксильной группы, элиминирование 3-кетогруппы с сохранением двойной связи в кольце А, введение в 6-положение метоксиимино группы вместе с дополнительным 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -шестичленным кольцом. Наибольшей селективностью по отношению к mPRs обладали два соединения (VIII – 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он и IX – 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он), не содержащие 3-кетогруппы. Именно эти соединения, как потенциальные селективные аналоги прогестерона по отношению к mPRs, были выбраны для изучения влияния прогестинов на иммунную функцию через мембранные рецепторы.

## 2) Влияние прогестерона и выбранных аналогов, селективных в отношении mPRs, на продукцию цитокинов иммунными клетками

На втором этапе работы мы исследовали влияния выбранных соединений и прогестерона на экспрессию мРНК и белка провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в разных линиях иммунных клеток человека. Для этого использовали три культуры иммунных клеток: гомогенные иммортализованные культуры Jurkat (Т-лимфоциты) и ТНР-1 (моноциты), а также гетерогенную первичную культуру мононуклеарных клеток (РВМС), полученных из крови здоровых доноров разного пола. Среди исследованных концентраций стероидов наиболее эффективными оказались 20 мкМ и 50 мкМ. Такие концентрации наблюдаются обычно в местах синтеза прогестерона – яичниках и плаценте, где особенно важно действие этого гормона на иммунные клетки, участвующие в процессах овуляции, имплантации, родов и сохранения беременности.

**2.1. Изучение экспрессии разных типов рецепторов прогестерона в исследуемых культурах иммунных клеток.** Перед изучением действия выбранных аналогов на экспрессию мРНК цитокинов в клеточных культурах человека были определены уровни мРНК рецепторов прогестерона в клетках ТНР-1 и РВМС. По результатам 3 измерений уровни мРНК рецепторов mPRs, mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  и mPR $\gamma$  в моноцитах ТНР-1 составили соответственно  $47,5 \pm 3,3\%$ ,  $7,3 \pm 0,9\%$ ,  $672,8 \pm 110,2\%$  и  $3,5 \pm 1,1\%$ . В мононуклеарных клетках РВМС, выделенных из пула крови, собранной у 8 здоровых доноров разного пола, по результатам 4 измерений уровни мРНК рецепторов mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  и mPR $\gamma$  составили соответственно  $22,7 \pm 2,2\%$ ,  $51,1 \pm 3,6\%$  и  $0,12 \pm 0,06\%$ . Экспрессии мРНК mPRs в клетках РВМС обнаружено не было. Состав рецепторов прогестерона в клетках линии Jurkat был изучен ранее [Goncharov et al., 2017]. Показано, что клетки этой линии экспрессируют мРНК mPR $\alpha$  и mPR $\beta$ , а экспрессии мРНК mPRs не наблюдается.

**2.2. Влияние прогестерона и его селективных к mPRs аналогов на уровень экспрессии цитокинов в Т-лимфоцитах линии Jurkat.** Было изучено действие прогестерона и выбранных нами соединений VIII и IX на экспрессию мРНК IL-2, IL-10, TGF $\beta$  и TNF $\alpha$  в клеточной культуре Т-лимфоцитов Jurkat (рисунок 4). Другие изучаемые нами цитокины в клетках данной культуры не детектировались.

Прогестерон в концентрации 20 мкМ достоверно понижал уровень мРНК TNF $\alpha$  примерно на 30% в сравнении с контролем, а в концентрации 50 мкМ – почти на 80%. Соединения VIII и IX в концентрации 20 мкМ не оказывали влияния на уровень TNF $\alpha$ , тогда как более высокая концентрация 50 мкМ этих прогестинов вызывала достоверное снижение уровня экспрессии TNF $\alpha$  примерно на 40%. Уровень мРНК IL-2 снижался достоверно только при действии на клетки Jurkat прогестерона и соединения VIII в обеих концентрациях, но не соединения IX. Уровень экспрессии IL-10 достоверно повышался в несколько раз только под действием самой высокой концентрации (50 мкМ) прогестерона и соединения IX. Изменений в уровне экспрессии TGF $\beta$  под действием гормонов не наблюдалось.

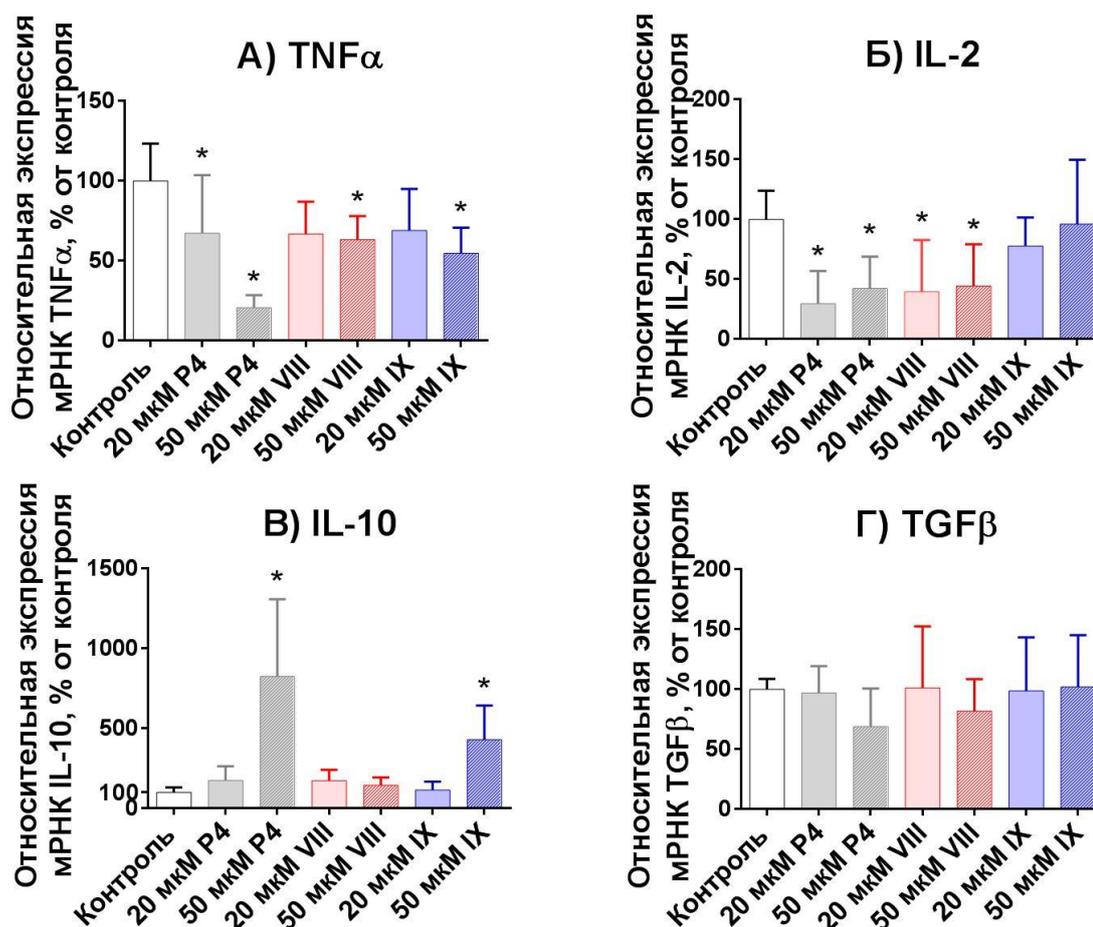


Рисунок 4. Влияние прогестерона и соединений VIII и IX на уровень экспрессии мРНК TNF $\alpha$  (А), IL-2 (Б), IL-10 (В) и TGF $\beta$  (Г) в стимулированных клетках линии Jurkat (по результатам 4 измерений). \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (100%) по критерию Краскела-Уоллиса

**2.3. Влияние прогестерона и его селективных к mPRs аналогов на уровень экспрессии цитокинов в моноцитах линии THP-1.** Далее было изучено влияние прогестерона и соединений VIII и IX на экспрессию мРНК IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF $\beta$  и TNF $\alpha$  в клеточной культуре THP-1 (рисунок 5). Другие изучаемые цитокины в клетках данной культуры не детектировались.

Оба аналога прогестерона как в концентрации 20 мкМ, так и в концентрации 50 мкМ достоверно повышали уровень мРНК TNF $\alpha$  как минимум в два раза по сравнению с контролем, тогда как прогестерон вызывал повышение экспрессии этого цитокина только в концентрации 50 мкМ. Все три гормона в концентрации 50 мкМ достоверно повышали уровень мРНК IL-1 $\beta$ . Кроме того, для обоих аналогов в высокой концентрации показано достоверное повышение уровня мРНК IL-10 в несколько раз. Достоверных различий в уровне мРНК TGF $\beta$  не было обнаружено под действием всех трех стероидов. Предположительно, прогестины, действуя на моноциты THP-1 через mPRs, могут оказывать разнонаправленное действие, влияя как на провоспалительные, так и на противовоспалительные факторы. Важно заметить, что в моноцитах линии THP-1 наиболее активно действовали синтетические аналоги прогестерона, особенно соединение IX.

Возможно, это связано с очень высоким уровнем mPR $\beta$ , через который, как можно ожидать, действуют на эти клетки выбранные нами производные.

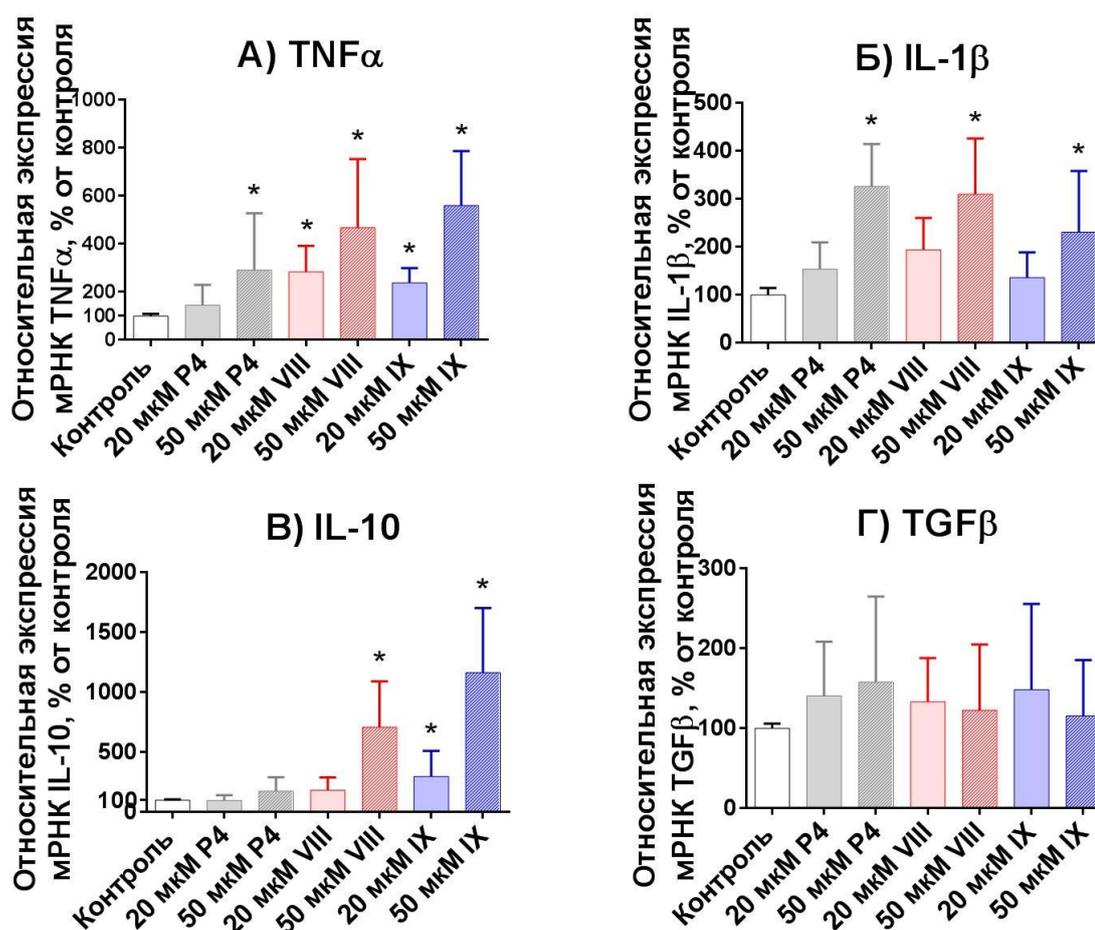


Рисунок 5. Влияние прогестерона и соединений VIII и IX на экспрессию мРНК TNF $\alpha$  (А), IL-1 $\beta$  (Б), IL-10 (В) и TGF $\beta$  (Г) в стимулированных клетках линии THP-1 (по результатам 4 измерений). \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (100%) по критерию Краскела-Уоллиса

**2.4. Влияние прогестерона и его селективных к mPRs аналогов на уровень экспрессии цитокинов в мононуклеарных клетках крови РВМС.** Перед представлением результатов проводили сравнительный анализ относительных уровней экспрессии мРНК каждого цитокина у мужчин и у женщин для выявления половых различий. Методом множественных сравнений не было обнаружено различий в уровнях мРНК цитокинов между донорами разного пола. Кроме того, проведенный анализ влияния прогестерона и его аналогов на экспрессию цитокинов (см. далее) показал однонаправленные изменения в уровнях мРНК цитокинов у доноров разного пола. Вследствие этого, возможно объединение выборки мужчин и женщин. Однако было выявлено, что на некоторые параметры прогестина могут оказывать разнонаправленное действие у разных людей. Индивидуальные различия в уровнях мРНК цитокинов в контрольных и обработанных прогестероном (50 мкМ) образцах показаны на рисунке 6. Селективные аналоги оказывали аналогичное влияние.

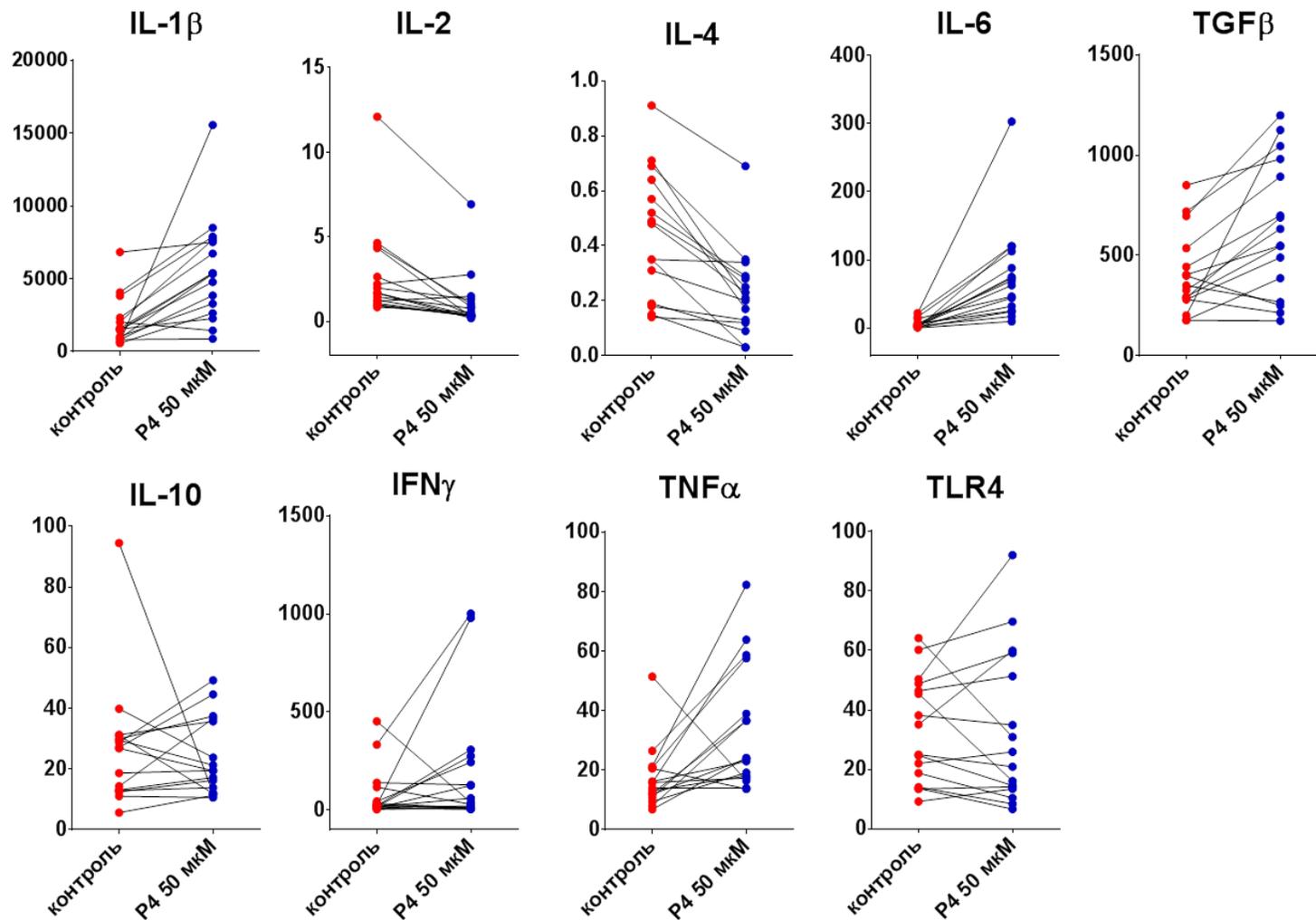


Рисунок 6. Индивидуальные различия в уровнях экспрессии мРНК цитокинов у разных доноров в контроле и под действием прогестерона. Данные представлены в виде нормированных на GAPDH относительных уровней экспрессии мРНК для каждого донора (по оси ординат).

На большинство факторов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, TGF $\beta$ ) прогестерон и его аналоги действовали аналогично у всех доноров. На такие же факторы как IL-10, IFN $\gamma$ , TLR4 прогестины оказывали разное влияние. Причинами противоположной реакции на прогестины клеток отдельных доноров могут служить преобладание иммунных клеток разного фенотипа, клеток, на разном уровне экспрессирующих на своей поверхности CD-маркеры, а также разная активность дендритных клеток [Schumacher et al., 2014].

Для удобства предоставления дальнейших результатов все определяемые цитокины были поделены на две группы: провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ), противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-10, CCL18 и TGF $\beta$ ), а также факторы клеточного иммунитета, прямо не относящиеся к какому-либо классу (IL-6 и TLR4). Учитывая значительные индивидуальные различия между донорами, контроль для каждого донора принимался за 100%, а влияние исследуемых гормонов на экспрессию мРНК и уровень белка определялось в % от своего контроля.

**2.4.1. Влияние прогестерона и его селективных к mPRs аналогов на экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов в клетках РВМС.** В данном разделе изучали действие прогестерона и соединений VIII и IX в концентрациях 20 и 50 мкМ на уровни экспрессии мРНК IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  в объединенной выборке из 16 доноров разного пола (рисунок 7).

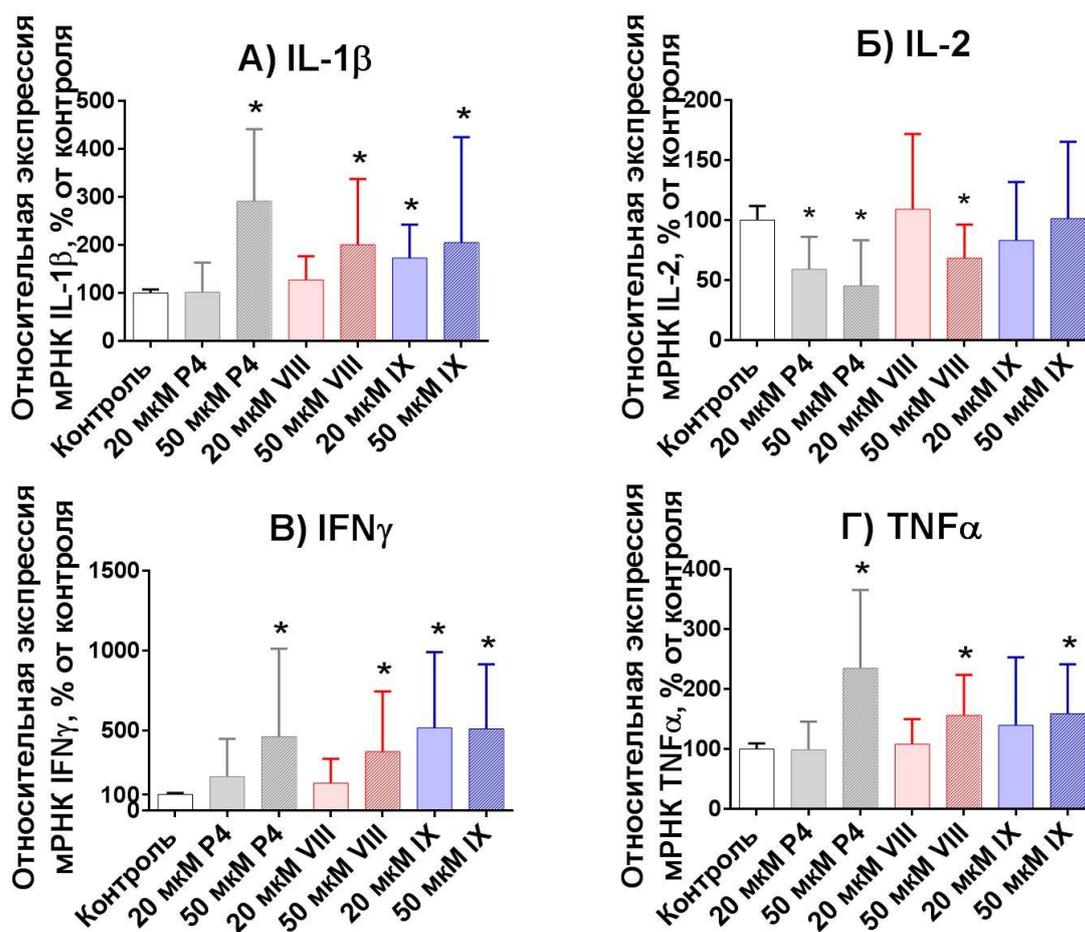


Рисунок 7. Влияние прогестерона и соединений VIII и IX на экспрессию мРНК IL-1 $\beta$  (А), IL-2 (Б), IFN $\gamma$  (В) и TNF $\alpha$  (Г) в стимулированных клетках РВМС. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (100%) по критерию Краскела-Уоллиса

Прогестерон и оба аналога в максимальной концентрации 50 мкМ повышали уровень экспрессии мРНК основных провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в клетках РВМС. Причем, действующая концентрация соединения IX оказалась меньше таковой для прогестерона, на уровень экспрессии цитокина IL-1 $\beta$  данный аналог действовал уже в концентрации 20 мкМ. Данный эффект согласовался с действием на моноциты THP-1, где гормоны также повышали уровень экспрессии TNF $\alpha$ , однако, оказался обратным тому, что мы наблюдали в клетках Jurkat, где прогестерон и аналоги понижали уровень экспрессии TNF $\alpha$ . Наиболее вероятным объяснением такого разнонаправленного действия можно считать, что влияние прогестина на продукцию TNF $\alpha$  в РВМС опосредовано разными типами иммунных клеток (моноцитами, В-клетками, НК-клетками, дендритными клетками), но не Т-лимфоцитами. Все три исследуемых прогестина приводили к достоверному повышению экспрессии провоспалительного цитокина IFN $\gamma$ , причем прогестерон и соединение VIII действовали только в максимальной концентрации 50 мкМ, тогда как соединение IX оказывало влияние в обеих тестируемых концентрациях 20 и 50 мкМ. Известно, что IFN $\gamma$  играет ключевую роль в фето-плацентарном взаимодействии. Было показано, что IFN $\gamma$  экспрессируется в плаценте человека в первом триместре беременности и обнаруживается в амниотической жидкости. Специфические рецепторы к IFN $\gamma$  имеются также в ткани трофобласта. IFN $\gamma$  может обеспечивать необходимую противовирусную активность, защищая внезародышевые ткани во время беременности [Ingman et al., 2008; Vince and Johnson, 1996]. Прогестерон в обеих концентрациях и соединение VIII в концентрации 50 мкМ вызывали почти двукратное снижение уровня экспрессии IL-2. Влияние исследуемых прогестина на провоспалительный цитокин IL-2 было сходным в РВМС и Т-клетках Jurkat. В работах с РВМС, выделенных из крови здоровых женщин, наблюдалось аналогичное снижение продукции IL-2 под действием прогестерона [Irvin and Herold, 2015]. Снижение уровня секреции IL-2 является значимым фактором сохранения беременности, тогда как повышение уровня этого цитокина наблюдается при спонтанных абортах [Chen et al., 2016]. Поэтому важно, чтобы децидуальная и плацентарная среда ингибировали продукцию IL-2.

#### ***2.4.2. Влияние прогестерона и его селективных к mPRs аналогов на экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов в клетках РВМС.***

Было изучено влияние прогестерона и двух его аналогов в концентрациях 20 и 50 мкМ на экспрессию мРНК IL-4, IL-10, CCL18, TGF $\beta$  (рисунок 8).

Прогестерон и его аналоги не оказывали практически никакого влияния на уровень экспрессии мРНК основного противовоспалительного цитокина IL-10 в клетках РВМС. Таким образом, регуляция экспрессии IL-10 прогестинами различна в гетерогенной популяции РВМС и гомогенных клеточных культурах Jurkat и THP-1. По нашему предположению, здесь основной вклад вносят входящие в состав РВМС В-клетки, которые и опосредуют ингибирование экспрессии мРНК и секреции белка IL-10 [Shen and Fillatreau, 2015]. Прогестерон и соединение VIII вызывали снижение уровня экспрессии мРНК еще одного противовоспалительного цитокина IL-4 в мононуклеарных клетках. Второй селективный лиганд не оказывал никакого влияния на этот фактор. Известно, что IL-4, как и IL-10, ассоциирован с Th2 иммунным ответом и ингибированием активности макрофагов [Mills et al., 2000]. Таким образом, снижение уровня этого цитокина и, соответственно,

усиление клеточного ответа, может быть благоприятным для удаления потенциальной инфекции во время беременности. В клетках РВМС также наблюдалась экспрессия хемокина CCL18, ассоциированного с Th2 ответом. Прогестерон в обеих концентрациях и соединение IX в максимальной концентрации снижали уровень экспрессии этого фактора более чем на 50%. Прогестерон в обеих концентрациях и оба аналога в максимальной концентрации также вызывали повышение уровня экспрессии TGF $\beta$ , важного для поддержания нормального функционирования яичников [Ingman et al., 2006].

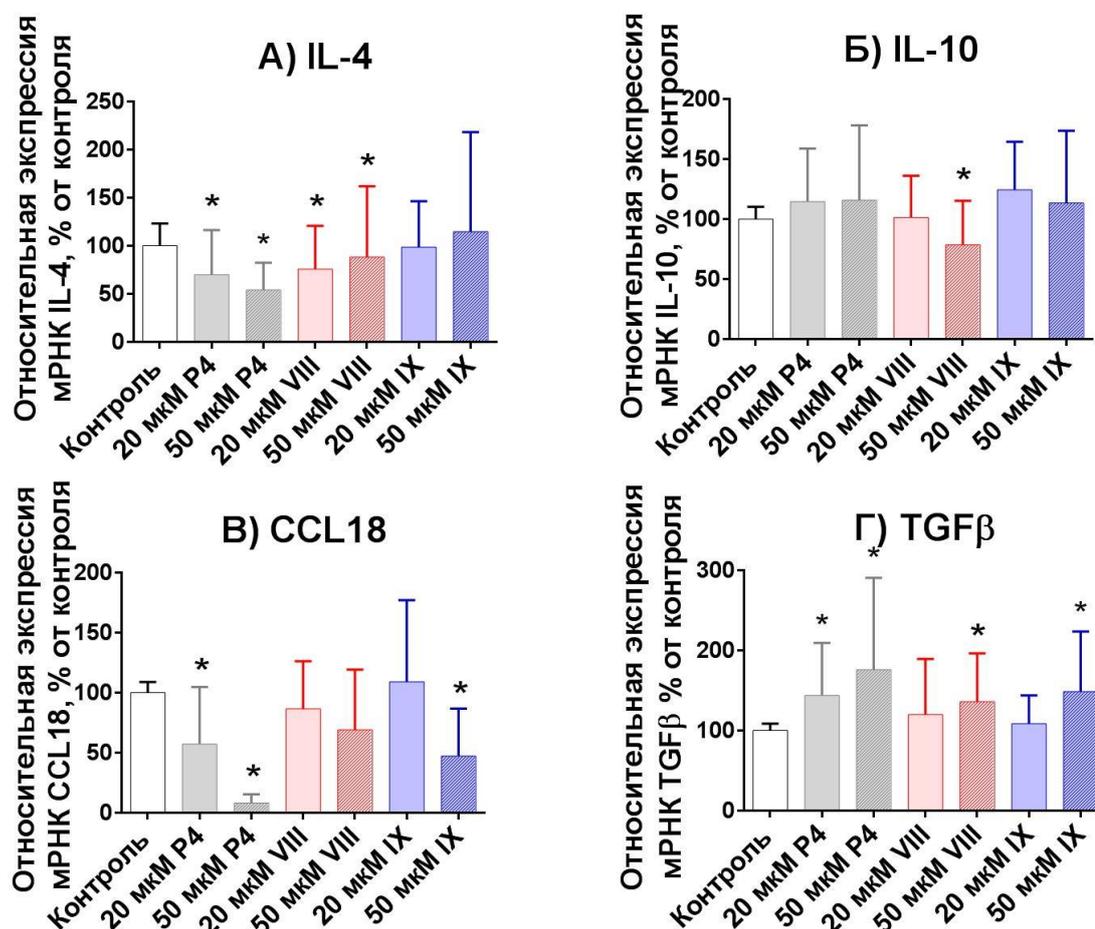


Рисунок 8. Влияние прогестерона и соединений VIII и IX на экспрессию мРНК IL-4 (А), IL-10 (Б), CCL18(В), TGF $\beta$  (Г) в стимулированных клетках РВМС. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (100%) по критерию Краскела-Уоллиса

#### 2.4.3. Влияние прогестерона и его селективных к mPRs аналогов на экспрессию мРНК факторов клеточного иммунного ответа в клетках РВМС.

Кроме провоспалительных и противовоспалительных факторов были также исследованы IL-6 и TLR4 (рисунок 9).

В клетках РВМС всех доноров прогестерон и оба аналога в максимальных концентрациях 50 мкМ вызывали значительное повышение экспрессии мРНК IL-6, причем в данном случае прогестерон действовал более эффективно, повышая уровень мРНК IL-6 в 15 раз, тогда как его аналоги – в 5 – 7 раз. Уровень экспрессии мРНК рецептора TLR4 повышался после обработки РВМС клеток всеми тремя прогестинами в концентрации 20 мкМ и снижался под действием 50 мкМ до контрольных значений в случае прогестерона и соединения VIII, либо ниже в случае соединения IX. Объяснением такой двухфазной

реакции РВМС на обработку исследуемыми нами стероидами может служить стимуляция прогестинами экспрессии TLR4 во всех клетках при параллельном ингибировании высокими концентрациями секреции фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), который является положительным регулятором экспрессии TLR4. Фактор MIF продуцируется моноцитами, макрофагами и лимфоцитами в ответ на бактериальные токсины [Calandra, 2003]. Если, при действии более высоких концентраций прогестинов, второй эффект перекрывает первый, уровень экспрессии мРНК TLR4 будет снижаться.

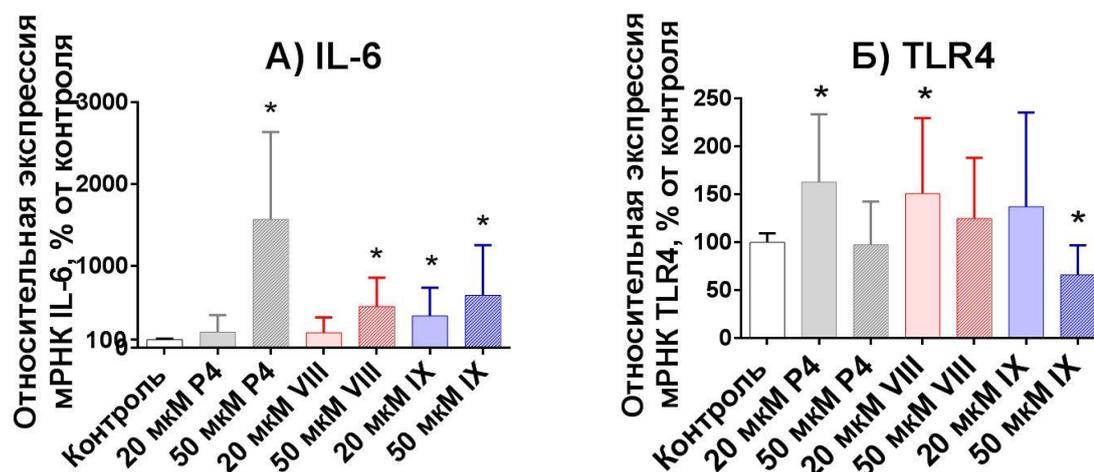


Рисунок 9. Влияние прогестерона и соединений VIII и IX на экспрессию мРНК IL-6 (А) и TLR4 (Б) в стимулированных клетках РВМС. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (100%) по критерию Краскела-Уоллиса

#### 2.4.4. Соответствие изменений в экспрессии мРНК изменениям в уровне секретируемого белка цитокинов в мононуклеарных клетках РВМС

Для оценки того, соответствуют ли изменения в экспрессии мРНК изменениям в уровне секретируемого белка, были измерены концентрации некоторых цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10) в культуральной среде (рисунок 10).

Сравнение экспрессии гена по уровню мРНК и концентрации соответствующего белка показало, что у трех проанализированных параметров (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6) изменения в уровне белка полностью соответствуют изменениям экспрессии мРНК. Под воздействием прогестерона и его аналогов экспрессия мРНК и концентрация данных цитокинов в культуральной среде достоверно повышаются. В случае цитокина IL-10 уровень экспрессии мРНК практически не менялся под действием прогестерона и выбранных нами аналогов. Однако прогестерон и выбранные аналоги в обеих концентрациях 20 и 50 мкМ вызывали достоверное и значительное (от 70 до 20% от контроля) снижение концентрации секретируемого клетками в культуральную среду белка IL-10. Возможно, в этом случае, регуляция происходит на пост-транскрипционном уровне. Такие изменения на пост-транскрипционном уровне могут включать регуляцию синтеза, изменение микроРНК, подавляющей трансляцию мРНК цитокина, или влияние на секрецию белка [Salzman et al., 2000].

Данные по влиянию прогестинов на экспрессию мРНК цитокинов в разных иммунных клетках суммированы в таблице 3.

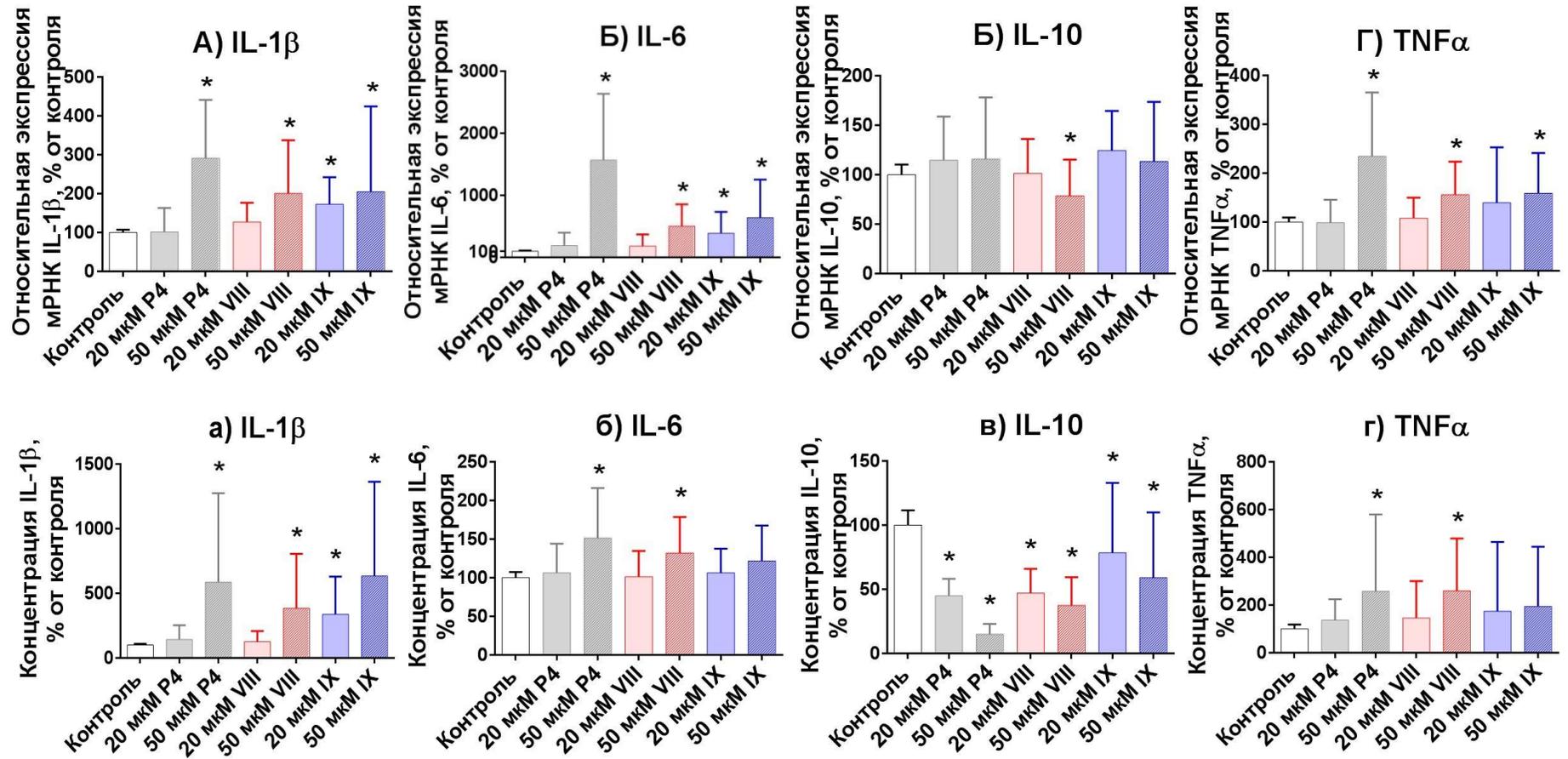


Рисунок 10. Влияние прогестерона и соединений VIII и IX на экспрессию мРНК (верхний ряд - А, Б, В, Г) и уровень белка (нижний ряд - а, б, в, г) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  соответственно в стимулированных клетках PBMC. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (100%) по критерию Краскела-Уоллиса

Таблица 3. Сводные данные по влиянию прогестинов на экспрессию мРНК цитокинов в клетках PBMC, Jurkat, THP-1.

мРНК	Клеточные линии	20 мкМ Р4	50 мкМ Р4	20мкМ VIII	50 мкМ VIII	20 мкМ XI	50 мкМ XI
IL – 1 $\beta$	PBMC	=	↑	=	↑	↑	↑
	THP-1	=	↑	=	↑	=	↑
TNF $\alpha$	PBMC	=	↑	=	↑	=	↑
	THP-1	=	↑	↑	↑	↑	↑
	Jurkat	↓	↓	=	↓	=	↓
IL-6	PBMC	=	↑	=	↑	↑	↑
IL-10	PBMC	=	=	=	↓	=	=
	THP-1	=	=	=	↑	↑	↑
	Jurkat	=	↑	=	=	=	↑
IL-2	PBMC	↓	↓	=	↓	=	=
	Jurkat	↓	↓	↓	↓	=	=
IL-4	PBMC	↓	↓	↓	↓	=	=
CCL18	PBMC	↓	↓	=	=	=	↓
IFN $\gamma$	PBMC	=	↑	=	↑	↑	↑
TGF $\beta$	PBMC	↑	↑	=	↑	=	↑
	THP-1	=	=	=	=	=	=
	Jurkat	=	=	=	=	=	=
TLR4	PBMC	↑	=	↑	=	=	↓

Экспрессия не изменяется (=), снижается (↓), повышается (↑) под действием прогестина.

На основании полученных нами результатов и изучения литературных данных можно сделать вывод, что прогестерон оказывает более выраженное провоспалительное действие в иммунных клетках. Выбранные нами в качестве селективных к mPRs аналогов прогестерона соединения VIII и IX на все исследованные параметры действуют однонаправленно с природным гормоном. В некоторых случаях действующие концентрации этих соединений оказываются ниже, чем для прогестерона. Разница в действующих концентрациях трех исследованных стероидов, по-видимому, определяется эффективностью активации разных субтипов mPRs. Данные, полученные ранее в нашей лаборатории, показали, что более низкие действующие концентрации часто указывают на более выраженное влияние соединения на организм. Чем ниже полумаксимальная эффективная концентрация EC50, определенная в тестах *in vitro*, тем выше физиологическая активность соединения [Мичурина и соавт., 2018]. Поскольку селективные лиганды mPRs действуют на иммунные клетки аналогично прогестерону, они могут заменять его во всех иммуномодуляторных процессах. Селективные лиганды могут действовать на иммунные клетки *in vivo*, не оказывая побочных эффектов через pPRs, на клетки женских репродуктивных тканей и мозга, а также другие органы, где экспрессируются классические рецепторы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения механизмов действия и физиологических эффектов прогестинов важно создание аналогов прогестерона, селективных в отношении mPRs. В данной работе были изучены девять новых синтетических аналогов прогестерона, имеющих заместители в разных положениях стероидной молекулы, на предмет избирательного связывания с mPRs. Синтез исследуемых соединений был основан на предположении о разном участии некоторых функциональных групп стероидной молекулы прогестерона в связывании с лигандсвязывающими карманами обоих типов рецепторов (nPRs и mPRs). Основываясь на полученных результатах, были выбраны два аналога 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он, не имеющие важной для связывания с nPRs  $\Delta^4$ -3-кетогруппы. Эти прогестины показали наибольшее сродство к mPRs при отсутствии такового к nPRs. В исследовании влияния выбранных соединений на профиль цитокинов данные соединения показали однонаправленное с прогестероном действие на иммунные клетки человека, для большинства из которых не показано наличие nPRs. Однако в ТНР-1 моноцитах, где ядерные рецепторы экспрессируются на значительном уровне, селективные лиганды mPRs действовали даже эффективнее прогестерона. В связи с чем, имеется основание полагать, что эффекты прогестинов на иммунные клетки опосредованы mPRs. Под воздействием исследуемых гормонов изменялся профиль цитокинов, секретируемых иммунными клетками разного типа (моноциты, Т-лимфоциты, мононуклеарные клетки периферической крови). Исследуемые стероиды вызвали достоверное изменение в уровнях экспрессии таких цитокинов, как TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , IL-2. Кроме того, действующие концентрации выбранных прогестинов в некоторых случаях были ниже, чем концентрация природного гормона, что может говорить о более выраженном влиянии соединения на организм. Суммируя результаты нашей работы можно заключить, что прогестерон и его избирательные в отношении mPRs аналоги имеют выраженный иммуномодулирующий эффект и, в зависимости от типа клеток, могут оказывать либо более провоспалительное действие (мононуклеарные клетки, моноциты), либо противовоспалительное действие (Т-лимфоциты) в иммунных клетках. Выявленные эффекты прогестерона и его синтетических производных могут иметь также важное практическое значение, например, в акушерстве и гинекологии, а также в иммунотерапии. Селективные лиганды mPRs могут иметь потенциальное практическое применение в коррекции процессов физиологического воспаления, не оказывая побочных эффектов в клетках, экспрессирующих nPRs.

## ВЫВОДЫ

1. Клеточная линия ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека является подходящим объектом для исследования лигандсвязывающих характеристик mPRs.
2. Среди девяти протестированных синтетических производных прогестерона выявлено два соединения, связывающихся с mPRs, но не обладающих сродством к nPRs, которые могут считаться селективными лигандами этих рецепторов.

3. В Т-лимфоцитах линии Jurkat прогестерон и два селективных лиганда mPRs оказывают преимущественно противовоспалительное действие, снижая экспрессию мРНК TNF $\alpha$  и IL-2 и повышая экспрессию мРНК IL-10.

4. В моноцитах линии THP-1 прогестерон и его селективные аналоги вызывают повышение экспрессии мРНК IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , т.е. оказывают преимущественно провоспалительное действие.

5. В мононуклеарных клетках РВМС прогестерон и его селективные по отношению к mPRs аналоги вызывают повышение экспрессии генов и секреции белков IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , экспрессии гена IFN $\gamma$ , а также снижение секреции IL-10 и экспрессии генов IL-2 и IL-4, что свидетельствует о разнонаправленном действии прогестина на эти клетки с преобладанием провоспалительного компонента.

6. Прогестины, выбранные в качестве селективных лигандов mPRs, действуют на все исследованные параметры однонаправленно с прогестероном. Эффективность действия этих соединений сравнима с таковой для прогестерона.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, WoS и RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности физиология 03.03.01

1. **Поликарпова АВ**, Левина ИС, Смирнов АН. 3-О-метоксииминогруппа подавляет взаимодействие прогестина с транскортином крови // Биохимия (Москва). – 2013. – Т.78. – №10. – С.1448-1451. (Scopus, WoS, IF = 1.724)

2. **Поликарпова АВ**, Маслакова АА, Левина ИС, Куликова ЛЕ, Кузнецов ЮВ, Гусева АА, Щелкунова ТА, Заварзин ИВ, Смирнова ОВ. Поиск производных прогестерона селективно взаимодействующих с его мембранными рецепторами // Биохимия (Москва). – 2017. – Т.82. – №2. – С.247-257. (Scopus, WoS, IF= 1.724)

3. Goncharov AI, Maslakova AA, **Polikarpova AV**, Bulanova EA, Guseva AA, Morozov IA, Rubtsov PM, Smirnova OV, Shchelkunova TA. Progesterone inhibits proliferation and modulates expression of proliferation-Related genes in classical progesterone receptor-negative human BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells // Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 2017. – V.165. – № PtB. – P.293-304. (Scopus, WoS, IF = 4.095)

4. Мичурина АО, **Поликарпова АВ**, Левина ИС, Куликова ЛЕ, Заварзин ИВ, Гусева АА, Морозов ИА, Рубцов ПМ, Смирнова ОВ, Щелкунова ТА. Изучение агонистического и антагонистического действия производных прогестерона в регуляции транскрипционной активности ядерного рецептора В прогестерона человека в дрожжевой модельной системе // Биохимия (Москва). – 2018. – Т.83. – №5. – С.749-762. (Scopus, WoS, IF = 1.724)

5. **Polikarpova AV**, Levina IS, Sigai NV, Zavarzin IV, Morozov IA, Rubtsov PM, Guseva AA, Smirnova OV, Shchelkunova TA. Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors // Steroids. – 2019. – V.145. – P.5-18. (Scopus, WoS, IF = 2.523)

### Тезисы докладов

1. **Поликарпова А.В.** Модификации молекулы прогестерона в 3 и 17 положениях обеспечивают избирательность взаимодействия с мембранным рецептором прогестерона // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, Россия, 8 – 12 апреля 2013)

2. Левина И.С., Кузнецов Ю.В., Куликова Л.Е., **Поликарпова А.В.**, Маслакова А.А., Щелкунова Т.А., Заварзин И.В. Селективные лиганды мембранных рецепторов прогестерона человека // Кластер конференций «Оргхим-2016» (Репино, Санкт-Петербург, Россия, 27 июня – 1 июля 2016)

3. **Polikarpova A**, Levina I, Kulikova L, Morozov I, Rubtsov P, Zavarzin I, Guseva A, Smirnova O, Shchelkunova T. Progesterone and selective membrane progesterone receptor ligands as immunomodulators in human T-lymphocytes // FEPS 2017 Vienna Congress (Вена, Австрия, 13 – 15 сентября 2017)

4. **Polikarpova A**, Levina I, Kulikova L, Morozov I, Rubtsov P, Zavarzin I, Guseva A, Smirnova O, Shchelkunova T. Selective ligands of membrane progesterone receptors and progesterone are predominantly proinflammatory immunomodulators in human peripheral blood mononuclear cells // The 43rd FEBS Congress Prague (Прага, Чехия, 7 – 12 июля 2018)

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность Татьяне Анатольевне Щелкуновой за чуткое руководство, помощь и поддержку на всех этапах исследования; Ольге Вячеславовне Смирновой, Петру Михайловичу Рубцову, Ивану Алексеевичу Морозову, Айтсане Алексеевне Маслаковой за помощь в освоении методик и техническую поддержку во время работы над исследованием; Татьяне Александровне Балакиной, Наталье Сергеевне Сиротиной, Полине Александровне Абрамичевой, Надежде Сергеевне Павловой, Алексею Игоревичу Гончарову, Виктории Львовне Шляпиной за ценные замечания и помощь в экспериментальной работе; Инне Соломоновне Левиной и всему коллективу лаборатории химии стероидных соединений ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН за возможность изучать интересные соединения; Ольге Дмитриевне Лопиной за внимательное прочтение и рецензирование работы; Александре Александровне Гусевой за помощь в анализе результатов; Сергею Олеговичу Кирюхину и Оксане Олеговне Кирюхиной за внимательное отношение, профессиональные советы, информационную и моральную поддержку; сотрудникам кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ за положительное отношение и всестороннюю помощь; Татьяне Егоровой, Марьяне Бардиной, Марине Дженковой, Анне Стариковой, Ивану Галкину, Светлане Васильевой, Виктории Скопенковой, Анне Шмидт, Никите Трушкину за искренний интерес и помощь в решении сложных ситуаций; Сергею Литвинову, Анфисе Поповой, Евгении Лагеревой, Всеволоду Павшинцеву, Евгению Тихонову, Андрею Поветкину, Михаилу Лебедину, Татьяне Данилиной, Арине Лебединой за участие в исследовании в качестве доноров крови; друзьям и родным, особенно, Елене Львовне Поликарповой, Вадиму Геннадьевичу Поликарпову, Юлии Вадимовне Коцюк, Елене Михайловне Уколовой, Олегу Владимировичу Кирюхину за понимание, неоценимую помощь и поддержку на всех этапах работы.