
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИНВЕРСИОННЫЙ
АГОНИСТ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПИНА АКТИВЕН
КАК ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ,
ТАК И ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ**

© 2024 г. К. В. Деркач^{1,*}, А. А. Бахтюков¹, В. Н. Сорокоумов^{1,2}, И. А. Лебедев¹,
Е. А. Диденко^{1,2}, А. О. Шпаков¹

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

²Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: derkatch_k@list.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Аутоиммунный гипертиреоз (болезнь Грейвса), причиной которого являются стимулирующие аутоантитела к рецептору тиреотропного гормона (ТТГ), и опухоли щитовидной железы, обусловленные конститутивно повышенной активностью этого рецептора, имеют широкое распространение и неблагоприятный прогноз. Препараты, используемые для их лечения, малоэффективны и имеют множество побочных эффектов. Одним из подходов для лечения этих заболеваний может стать применение аллостерических регуляторов рецептора ТТГ с активностью инверсионных агонистов. Цель работы состояла в изучении эффектов ранее разработанного нами соединения TP48 и нового соединения TPY5, относящихся к классу тиено[2,3-d]-пиримидинов, на базальные и стимулированные тиролиберин (TRH) уровни тиреоидных гормонов (ТГ) в крови крыс и на экспрессию генов, ответственных за синтез ТГ в щитовидной железе. Эффективность TP48 и TPY5 изучали как при внутрибрюшинном (в/б, 20 мг/кг), так и при пероральном (40 мг/кг) введении. С помощью иммуноферментного анализа оценивали уровни свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина в крови, в том числе при стимуляции TRH (интраназально, 300 мкг/кг), с помощью ПЦР – экспрессию генов тиреопероксидазы (*Tho*), тиреоглобулина (*Tg*), Na⁺/I⁻-симпортера (*Nis*), дейодиназы 2-го типа (*Dio2*) и рецептора ТТГ (*Tshr*) в щитовидной железе. TPY5 при обоих способах введения снижал как базальные, так и стимулированные TRH уровни ТГ, в то время как TP48 подавлял продукцию ТГ только при в/б введении. Перорально вводимый TPY5 в значительной степени снижал базальную экспрессию гена *Tho* и TRH-стимулированную экспрессию генов *Tg* и *Dio2*. Внутрибрюшинно вводимый TP48 снижал только TRH-стимулированную экспрессию генов *Tg* и *Dio2*. Достаточно неожиданно, что TPY5 (перорально) и TP48 (в/б) снижали базальную экспрессию гена *Tshr* и не предотвращали ее ингибирование, вызываемое TRH. Тем самым разработанное нами соединение TPY5 наделено активностью инверсионного агониста рецептора ТТГ, эффективно при пероральном способе доставки, который

в большей степени востребован в медицине, и может рассматриваться как прототип фармакологических препаратов для лечения аутоиммунного гипертиреоза и опухолей щитовидной железы.

Ключевые слова: рецептор тиреотропного гормона, инверсионный агонист, аллостерический регулятор, тиенопиримидин, тироксин, тиролиберин.

DOI: 10.31857/S0869813924010078, **EDN:** WJZCXE

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения функций щитовидной железы в настоящее время имеют широкое распространение, вызывают большое число осложнений со стороны нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой и других систем организма, приводят к инвалидизации и преждевременной смерти пациентов, вследствие чего поиск эффективных путей для их лечения является одной из актуальных проблем современной медицины [1, 2]. Для коррекции гипотиреоидных состояний, в том числе аутоиммунного тиреоидита, наиболее часто применяют заместительную терапию препаратами тиреоидных гормонов (ТГ), которая обычно хорошо переносится пациентами [3]. В то же время антитиреоидные препараты, в том числе наиболее широко применяемые в клинике производные тионамидов (мерказолил, метилтиоурацил и др.), которые используются для предотвращения тиреотоксикоза при аутоиммунном тиреоидите (болезни Грейвса), не столь эффективны и приводят к ряду серьезных побочных эффектов [4]. Вследствие этого для лечения такой тиреоидной патологии часто прибегают к терапии радиоактивным йодом и хирургическим вмешательствам [5]. Не менее острую проблему представляет лечение токсических аденом и опухолей щитовидной железы, причиной которых являются активирующие мутации в рецепторе тиреотропного гормона (ТТГ). Эти мутации вызывают значительное повышение базальной активности рецептора и делает его нечувствительным к регуляции эндогенным ТТГ. Для лечения аденом и опухолей щитовидной железы, практически безальтернативно, используют радиоизотопные и хирургические методы, которые несут в себе серьезные риски для здоровья пациентов [6, 7].

Одним из перспективных подходов для лечения болезни Грейвса, а также токсических аденом и опухолей щитовидной железы, обусловленных конститутивно повышенной активностью рецептора ТТГ, является применение низкомолекулярных инверсионных агонистов, которые взаимодействуют с аллостерическим сайтом, локализованным в трансмембранном канале рецептора [8–11]. Поскольку этот сайт топологически отделен от ортостерического сайта, который расположен во внеклеточном домене, то связывание с ним аллостерического инверсионного агониста не препятствует взаимодействию ТТГ с рецептором [8]. В настоящее время разработано несколько инверсионных агонистов рецептора ТТГ, которые были активны как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, подавляя активацию рецептора как гормоном, так и стимулирующими аутоантителами и снижая конститутивно повышенную базальную активность рецептора [12–15]. Нами было разработано соединение TP48, производное тиено[2,3-d]-пиримидина, наделенное свойствами инверсионного агониста, которое при внутривенном (в/в) введении крысам не только ингибировало продукцию ТГ, стимулированную тиролиберином (TRH), релизинг-фактором ТТГ, но и снижало, хотя и в небольшой степени, базовые уровни ТГ [16, 17].

Низкомолекулярные аллостерические регуляторы G-белок-сопряженных рецепторов имеют целый ряд преимуществ в сравнении с лигандами ортостерических сайтов. Они имеют более умеренную активность, и тем самым их применение не приводит к гиперстимуляции (в случае полных агонистов) или избыточному ингибированию (в случае инверсионных агонистов) рецептора. Кроме того, они характеризуются более

высокой селективностью регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов (“предвзятостью” сигналинга). В ряде случаев низкомолекулярные аллостерические регуляторы активны не только при парентеральных, но и при пероральном способе введения, будучи устойчивыми и хорошо всасываясь в желудочно-кишечном тракте, как это продемонстрировано нами для тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных с активностью агонистов рецептора лютеинизирующего гормона [18]. В этой связи следует отметить, что пероральный способ доставки более востребован в медицине.

В соответствии с вышесказанным нами была поставлена цель разработать инверсионные агонисты рецептора ТГ, способные снижать как стимулированную, так и базальную его активность не только при парентеральном (в/б), но и при пероральном способе доставки. Исследовали регуляторные эффекты ранее разработанного соединения TP48 и нового соединения TPY5, также относящегося к классу тиено[2,3-*d*]-пиримидинов, на базовые и стимулированные TRH уровни ТГ в крови крыс, а также влияние этих соединений на экспрессию генов, ответственных за синтез ТГ в щитовидной железе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении экспериментов были использованы самцы крыс линии Wistar в возрасте 3–4-х месяцев. Крыс содержали в режиме 12 ч день/12 ч ночь, при температуре $22 \pm 3^\circ\text{C}$, со свободным доступом к питьевой воде и гранулированному сухому корму.

Соединение TP48 (5-амино-*N*-(*mpem*-бутил)-4-(4-иодфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид) получали, как описано ранее, из 5-амино-4-(4-иодфенил)-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоновой кислоты как предшественника [16]. Структуру подтверждали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с помощью спектрометра “Bruker micrOTOF” (Германия). Масса иона $[M+K^+]$ для TP48 составила 536.9868 (вычислено 536.9886; $C_{18}H_{19}IN_4OS_2K$).

Соединение TPY5 (5-амино-*N*-(*mpem*-бутил)-4-(4-(3-(2,3-дигидроксипропокси)проп-1-ин-1-ил)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид) получали из TP48 по реакции Соногаширы с 2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)оксираном с последующим кислотным гидролизом оксиранового цикла. По данным масс-спектрометрического анализа масса иона $[M+Na^+]$ для TPY5 составила 523.1443 (вычислено 523.1444; $C_{24}H_{28}N_4O_4S_2Na$).

Оба соединения растворяли в ДМСО и однократно вводили крысам, в/б в дозе 20 мг/кг и перорально в дозе 40 мг/кг. Выбор доз основывался на результатах предварительных исследований зависимости доза–эффект, а в случае TP48 был продиктован результатами, полученными ранее при его в/б введении [16, 17]. При в/б введении соединения растворяли в объеме 200 мкл ДМСО. При пероральном введении соединения, растворенные в том же объеме ДМСО, вводили с помощью назогастрального зонда. Контрольной группе вместо тиено[2,3-*d*]-пиримидинов в/б вводили ДМСО в объеме 200 мкл. TRH производства фирмы “Sigma” (США) вводили крысам интраназально, однократно, в дозе 300 мкг/кг, как описано ранее [19]. Для этого животных переворачивали на спину и осторожно, по каплям, вводили раствор TRH в физиологическом растворе в носовую полость (общий объем 20 мкл, по 10 мкл в каждую ноздрю, поочередно, порциями по 5 мкл). Контрольным животным вместо раствора TRH вводили в том же объеме физиологический раствор.

В общей сложности были сформированы 10 групп: контрольные крысы (группа С), получавшие только растворители TRH и тиено[2,3-*d*]-пиримидинов; крысы, которые были обработаны либо с помощью TRH (группа TRH), либо с помощью TP48 при в/б и пероральном введении (группы TP48ip и TP48og), либо с помощью TPY5 при в/б и пероральном введении (группы TPY5ip и TPY5og); крысы, которые были последовательно обработаны тиено-[2,3-*d*]-пиримидинами, TP48 и TPY5 при различных способах введения и затем TRH (группы TRH-TP48ip, TRH-TP48og, TRH-TPY5ip

Таблица 1. Прямые и обратные праймеры для генов, кодирующих рецептор ТТГ и белки, ответственные за синтез ТГ, а также референсные гены

Ген	Последовательности прямого (For) и обратного (Rev) праймеров	Индексация в Genbank
<i>Tshr</i>	(For) CTCGACAAGACATGAGCCC	NM_012888.1
	(Rev) GGTCCAGGGACTTGCTCAA	
<i>Tg</i>	(For) GCCCTAACTCATCCGTCCA	NM_005106.4
	(Rev) TGTGATAAGCCCATCGTCCT	
<i>Dio2</i>	(For) CGTCATCCTCAAGTGTCACC	NM_031720.5
	(Rev) TGGTACGCGCACATTACCTT	
<i>Tpo</i>	(For) TTGGATCTGGCATCACTGAACTT	NM_005105.4
	(Rev) ATCTTGTGACCATGCTTCTGTTG	
<i>Nis</i>	(For) AAGTGACCGGGTTGGACATC	NM_052983.2
	(Rev) AGCCAACGAGCATTACCACA	
<i>18S rRNA</i>	(For) GGACACGGACAGGATTGACA	NM_046237.1
	(Rev) ACCCACGGAATCGAGAAAGA	
<i>Actb</i>	(For) CTGGCACCACACCTTCTACA	NM_031144.3
	(Rev) AGGTCTCAAACATGATCTGGGT	

Tshr – ген рецептора ТТГ; *Tg* – ген тиреоглобулина; *Dio2* – ген дейодиназы 2-го типа; *Tpo* – ген тиреопероксидазы; *Nis* – ген Na⁺/I⁻-симпортера; *18S rRNA* и *Actb* – гены *18S-pPHK* и β-актина, используемые как референсные гены.

и TRH-TPY5 α). В/б введение тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных осуществляли в 10.30, пероральное – в 10.15, в то время как TRH во всех случаях вводили в 11.00. Первый забор крови осуществляли в 10.00 (до введения препаратов), второй забор – в 14.00, через 3 ч. после введения TRH. Соответственно со времени в/б введения TP48 и TPY5 проходило 3 ч. 30 мин., со времени их перорального введения – 3 ч. 45 мин. В каждой группе было по шесть животных. Образцы крови получали из хвостовой вены, используя местный наркоз – 2%-ный раствор лидокаина (2–4 мг/кг).

Для определения концентрации в крови крыс ТГ – свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина использовали ИФА-наборы фирмы “Иммунотех” (Россия).

Количественную ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией осуществляли, как описано ранее [16,17]. Для этого из ткани щитовидной железы выделяли тотальную РНК, используя реагент “ExtraRNA”, обратную транскрипцию проводили с помощью набора “MMLV RT Kit” фирмы “Eurogen” (Россия). Процедуру амплификации осуществляли в инкубационной смеси, содержащей 10 нг продукта ПЦР, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, а также реагент “qPCRmix-HS SYBR+LowROX” (“Eurogen”, Россия). Сигнал детектировали с помощью прибора “7500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для оценки экспрессии генов использовали последовательности комплементарных кДНК прямого и обратного праймеров,

а также референсные гены, кодирующие 18S-рРНК (*18S rRNA*) или β -актин (*Actb*). Структура праймеров для генов, кодирующих тиреопероксидазу (*Tpo*), тиреоглобулин (*Tg*), Na^+/I^- -симпортер (*Nis*), дейодиназу 2-го типа (*Dio2*) и рецептор ТТГ (*Tshr*), а также для референсных генов представлена в табл. 1. Полученные данные рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta\text{C}_t$, значения RQ рассчитывали по отношению к экспрессии гена в контрольной группе, которую принимали за единицу.

Статистический анализ проводили с помощью компьютерной программы “IBM SPSS Statistics 26” (“IBM”, США). Нормальность распределения данных проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки равенства дисперсий применяли критерий Ливиня. Все данные имели нормальное распределение, вследствие чего для сравнения групп при оценке влияния препаратов, включая комбинации TRH и тиено-[2,3-d]-пиримидинов, на уровни ТГ и экспрессию генов использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки. Для сравнения уровней ТГ в одной группе, в исходной точке и после обработки TP48 или TPY5, использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm SEM$. Все различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соединение TP48 при в/б введении самцам крыс снижало у них базовые уровни ТГ, причем уровни общего и свободного трийодтиронина, основного эффекторного гормона тиреоидной системы, снижались на 27 и 43% соответственно (табл. 2). Предобработка животных с помощью TP48 при его в/б введении снижала стимулирующий эффект интраназально вводимого TRH на продукцию fT4 и tT4, в меньшей степени ослабляя TRH-индуцированную стимуляцию продукции трийодтиронина (табл. 3). TRH в отсутствие TP48 повышал уровень fT4 на 38%, в то время как после предобработки TP48 только до 21%. Однако при пероральном введении ингибирующее влияние TP48 на базальные и стимулированные TRH уровни ТГ полностью утрачивалось. На это указывает отсутствие влияния TP48, вводимого перорально, на базовые уровни обоих ТГ (табл. 2), а также сохранение в его присутствии стимулирующего эффекта TRH (табл. 3). Таким образом, TP48 функционирует как инверсионный агонист рецептора ТТГ только при в/б введении этого соединения.

Новое соединение TPY5, производное TP48, было активным как при в/б, так и при пероральном введении (табл. 2). На это указывает снижение у крыс с обработкой TPY5 базового уровня всех изученных форм ТГ (за исключением tT3 в группе TPY5ip), причем ингибирующие эффекты TPY5 в изученных дозах при обоих способах введения были сопоставимыми. Так, уровни fT3 при в/б и пероральном введении TPY5 снижались на 34 и 31% соответственно. Стимулирующий эффект TRH на продукцию ТГ у крыс с предобработкой в/б вводимым TPY5 снижался для tT4 и fT3, в то время как в случае перорально вводимого TPY5 отмечали снижение уровней всех изученных форм ТГ, причем, за исключением tT3, они не отличались от таковых в контрольной группе (табл. 3). Тем самым, в отличие от TP48, соединение TPY5 проявляло свойства инверсионного агониста при обоих способах введения.

На заключительном этапе исследования в ткани щитовидной железы крыс изучали влияние TP48 и TPY5 на экспрессию генов, кодирующих рецептор ТТГ и основные белки, ответственные за синтез ТГ. Оценивали эффекты перорально вводимого TPY5 на генную экспрессию, а также соответствующие эффекты TP48 при его в/б введении, поскольку при пероральном введении TP48 утрачивал активность.

Достаточно неожиданным был тот факт, что в/б вводимый TP48 и перорально вводимый TPY5 снижали базальную экспрессию гена *Tshr*, кодирующего рецептор ТТГ, в ткани щитовидной железы (рис. 1). Обработка TRH, который, стимулируя тиреоид-

Таблица 2. Влияние тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных на базовые уровни ТГ в крови при их внутривнутрибрюшинном и пероральном введении самцам крыс

Группа	Общий Т4, нмоль/л	Свободный Т4, пмоль/л	Общий Т3, нмоль/л	Свободный Т3, пмоль/л
TP48ip-0	71.9 ± 2.0	36.6 ± 0.9	4.01 ± 0.15	3.86 ± 0.19
TP48ip	56.9 ± 2.7 ^a	29.0 ± 1.6 ^a	2.92 ± 0.26 ^a	2.20 ± 0.23 ^a
TP48or-0	69.3 ± 2.6	36.4 ± 2.2	3.84 ± 0.24	4.13 ± 0.19
TP48or	65.6 ± 2.9	33.3 ± 1.5	3.71 ± 0.24	3.93 ± 0.17
TPY5ip-0	68.0 ± 2.8	35.9 ± 1.1	3.72 ± 0.23	4.24 ± 0.16
TPY5ip	49.9 ± 1.2 ^a	27.3 ± 1.3 ^a	2.89 ± 0.19	2.79 ± 0.15 ^a
TPY5or-0	67.2 ± 3.3	35.0 ± 0.8	3.70 ± 0.22	3.90 ± 0.25
TPY5or	54.9 ± 3.0 ^a	26.5 ± 1.0 ^a	2.62 ± 0.23 ^a	2.69 ± 0.20 ^a

^a – различия статистически значимы с исходной точкой (до введения TP48 или TPY5, а также их растворителя ДМСО) при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения уровней ТГ в исходной точке и после обработки препаратами использовали *t*-критерий Стьюдента.

Таблица 3. Влияние тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных, вводимых внутривнутрибрюшинно или перорально, на стимулированные тиролиберином уровни ТГ в крови самцов крыс

Группа	Общий Т4, нмоль/л	Свободный Т4, пмоль/л	Общий Т3, нмоль/л	Свободный Т3, пмоль/л
TRH-0	69.1 ± 1.6	39.4 ± 1.3	3.79 ± 0.21	3.55 ± 0.15
TRH	96.5 ± 3.8 ^a	54.5 ± 2.6 ^a	5.43 ± 0.26 ^a	5.44 ± 0.38 ^a
TRH-TP48ip-0	67.7 ± 3.1	36.7 ± 2.1	3.99 ± 0.22	3.60 ± 0.20
TRH-TP48ip	79.6 ± 4.6 ^{a,b}	44.5 ± 2.9 ^{a,b}	4.75 ± 0.25 ^a	4.41 ± 0.34 ^a
TRH-TP48or-0	66.1 ± 2.9	40.2 ± 1.9	4.06 ± 0.22	3.49 ± 0.14
TRH-TP48or	90.7 ± 5.2 ^a	54.3 ± 2.4 ^a	5.38 ± 0.21 ^a	4.94 ± 0.26 ^a
TRH-TPY5ip-0	70.9 ± 2.9	38.5 ± 1.9	3.95 ± 0.21	3.77 ± 0.19
TRH-TPY5ip	80.0 ± 2.5 ^{a,b}	46.7 ± 3.5 ^a	4.51 ± 0.30 ^a	4.11 ± 0.29 ^b
TRH-TPY5or-0	69.4 ± 1.5	35.8 ± 1.5	3.70 ± 0.31	3.63 ± 0.26
TRH-TPY5or	76.3 ± 3.6 ^b	42.2 ± 3.8 ^b	4.13 ± 0.30 ^{a,b}	4.17 ± 0.23 ^b

Различия с исходной точкой (до введения TRH или совместно TRH и тиено[2,3-d]-пиримидинового производного) (^a) и между группами с обработкой одним TRH и комбинацией TRH и тиено[2,3-d]-пиримидинового производного (^b) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения уровней ТГ в исходной точке и после обработки препаратами использовали *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения групп TRH, TRH-TP48ip и TRH-TP48or, а также для сравнения групп TRH, TRH-TPY5ip и TRH-TPY5or использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

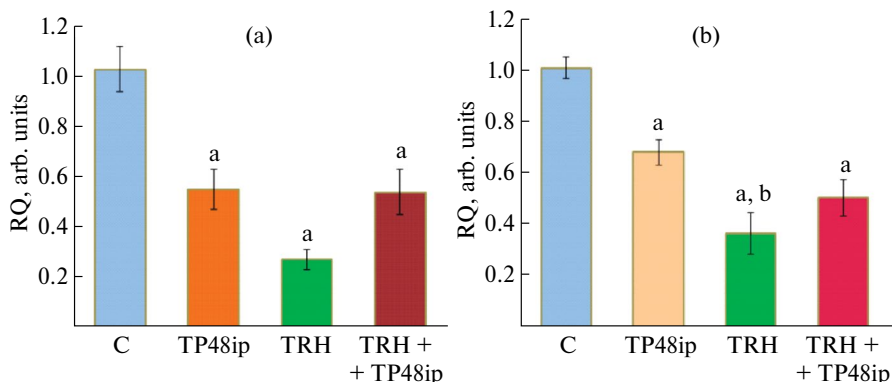


Рис. 1. Влияние внутривенно вводимого TP48 (а) и перорально вводимого TPY5 (б) на экспрессию гена рецептора ТТГ (*Tshr*) в щитовидной железе крыс с обработкой тиролиберинем и без таковой. Различия статистически значимы при $p < 0.05$ при сравнении с контролем (°) и группами TP48ip или TPY5or (°). Значения представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

ную ось, усиливал продукцию ТГ, в значительной степени подавляла экспрессию гена *Tshr*, причем соединения TP48 и TPY5 хотя и смягчали ингибирующий эффект TRH, но не вызывали нормализации экспрессии этого гена (рис. 1).

Соединение TP48 существенно не влияло на базальный уровень экспрессии генов, вовлеченных в синтез ТГ, за исключением тенденции к снижению экспрессии гена *Nis*, кодирующего Na^+/I^- -симпортер, но различия с контролем в этом случае не были достоверными (рис. 2). В то же время соединение TPY5 значимо снижало базальный уровень экспрессии гена *Tpo*, кодирующего тиреопероксидазу (рис. 3). Предобработка крыс как с помощью TP48, так и TPY5 ослабляла стимулирующие эффекты TRH на экспрессию генов *Tg* и *Dio2*, кодирующих тиреоглобулин, прекурсор ТГ и дейодиназу 2-го типа, осуществляющую конверсию тироксина в трийодтиронин (рис. 2, 3). Ослабление экспрессии этих генов может быть одним из механизмов ингибирующего влияния тиено-[2,3-d]-пиримидиновых производных на продукцию ТГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные демонстрируют, что соединения TP48 и TPY5 по характеру их влияния на синтез ТГ являются инверсионными агонистами рецептора ТТГ, которые не только снижают базальный уровень ТГ, но и их уровни, стимулированные TRH. Необходимо отметить, что стимулирующее действие TRH на тиреоидный статус, в том числе при интраназальном введении, обусловлено активацией синтеза и секреции ТТГ тиреотрофами гипофиза. Это приводит к ТТГ-индуцированной стимуляции рецептора ТТГ и усилению синтеза ТГ в тироцитах [20]. TP48 при обработке им крыс был эффективен только при парентеральном способе введения (в/б), но терял активность при пероральном введении, в то время как TPY5 был в одинаковой степени эффективен как при в/б, так и при пероральном введении. Это указывает на устойчивость и хорошую всасываемость TPY5 в желудочно-кишечном тракте, что существенно расширяет возможности его применения в клинике.

Снижение стимулированной TRH продукции ТГ в тироцитах щитовидной железы, осуществляемое на уровне рецептора ТТГ, представляет значительный интерес для лечения аутоиммунного гипертиреоза (болезни Грейвса), который составляет 60–80% от всех патологических форм гипертиреоза, а также для предотвращения ассоциирован-

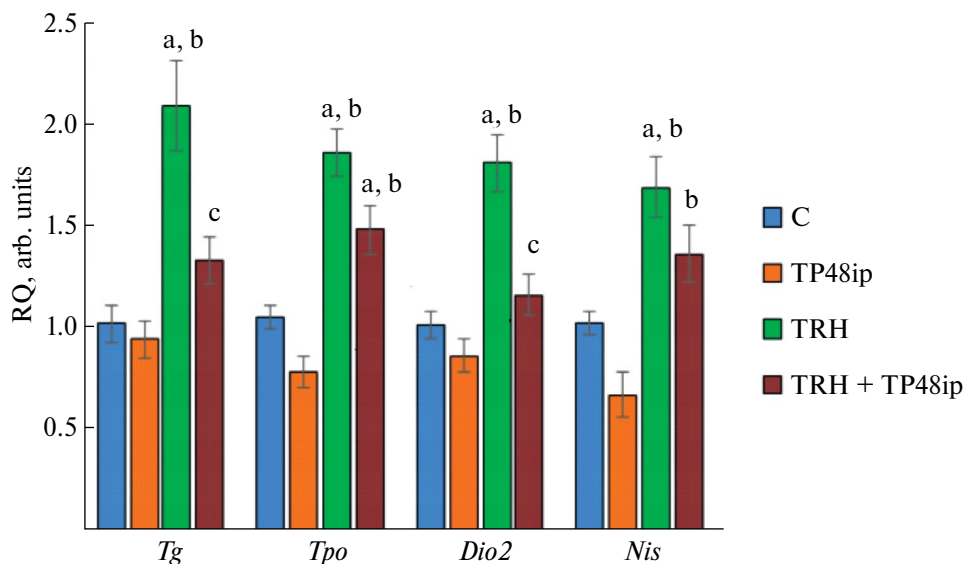


Рис. 3. Влияние TPY5 при его пероральном введении на экспрессию генов тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*Tpo*), дейодиназы 2-го типа (*Dio2*) и Na^+/I^- -симпортера (*Nis*) в щитовидной железе крыс с обработкой тиролиберином и без таковой. Различия статистически значимы при $p < 0.05$ при сравнении с контролем (^a), группами TPY5or (^b) или TRH (^c). Значения представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

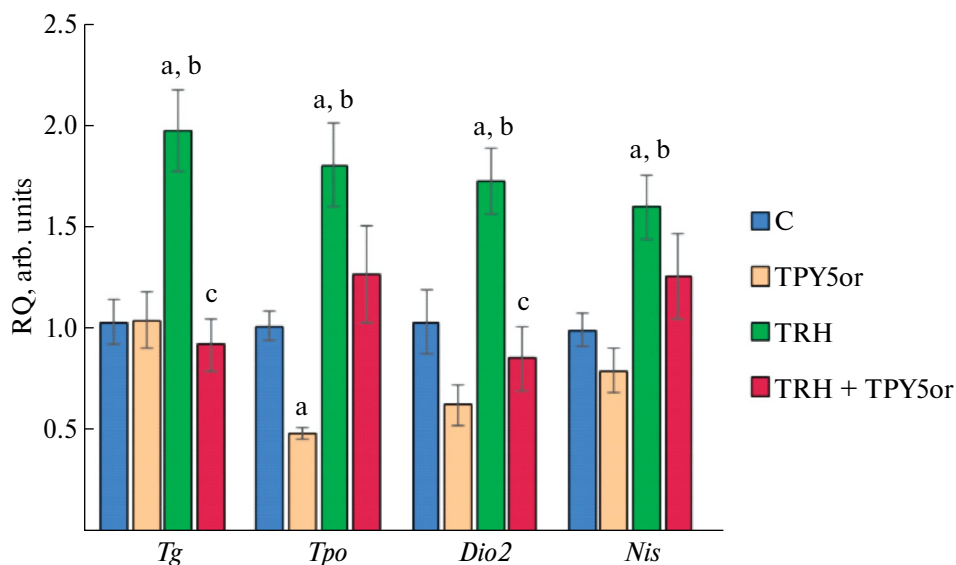


Рис. 2. Влияние TP48 при его внутрибрюшинном введении на экспрессию генов тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*Tpo*), дейодиназы 2-го типа (*Dio2*) и Na^+/I^- -симпортера (*Nis*) в щитовидной железе крыс с обработкой тиролиберином и без таковой. Различия статистически значимы при $p < 0.05$ при сравнении с контролем (^a), группами TP48ip (^b) или TRH (^c). Значения представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$. Для сравнения групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), апостериорный анализ проводили с использованием теста Тьюки.

ной с аутоиммунным гипертиреозом офтальмопатии Грейвса – тяжелого воспалительного заболевания глаз, угрожающего зрению изъязвлением роговицы и сдавлением зрительного нерва [21]. В основе развития аутоиммунного гипертиреоза лежит гиперпродукция ТГ тироцитами щитовидной железы в ответ на стимуляцию рецептора ТТГ стимулирующими аутоантителами. В свою очередь, основной причиной офтальмопатии Грейвса является вызываемая теми же аутоантителами гиперактивация рецепторов ТТГ, локализованных в соединительной ткани орбиты, и это приводит к усилению в ней воспалительных процессов и последующему фиброзу. Стимулирующие аутоантитела с высокой аффинностью связываются с локализованными в эктодомене рецептора сайтами, которые взаимно перекрываются с ортостерическим сайтом, мишенью ТТГ и мимикрируют стимулирующее действие гормона на рецептор ТТГ.

В настоящее время для нормализации тиреоидного статуса при аутоиммунном гипертиреозе применяют тотальную или частичную резекцию ткани щитовидной железы, терапию радиоактивным йодом и фармакотерапию антитиреоидными препаратами. Однако все эти подходы характеризуются множеством побочных эффектов, что во многом обусловлено острым дефицитом ТГ при хирургических операциях, высоким риском нарушений функционирования паращитовидных желез при проведении тиреоидэктомии, развитием агранулоцитоза, васкулитов, поражения печени, кожных реакций при использовании фармакотерапии тионамидами [4, 5, 22, 23]. Значимой проблемой является низкая эффективность этих подходов для предотвращения офтальмопатии Грейвса [22, 23]. Последнее обусловлено тем, что патогенетические механизмы развития аутоиммунного гипертиреоза и офтальмопатии Грейвса различаются. В первом случае в тироцитах аутоантитела активируют цАМФ-зависимые сигнальные пути, ответственные за синтез ТГ. Во втором случае в фибробластах орбиты и периорбитальных тканей они воздействуют на сигнальные пути, в первую очередь на цАМФ-зависимые и β -аррестининовые, обеспечивающие функциональное взаимодействие между рецепторами ТТГ и инсулиноподобного фактора роста-1, что и является пусковым механизмом для развития офтальмопатии Грейвса [24, 25].

Поскольку механизмы активации рецептора ТТГ гормоном и стимулирующими аутоантителами и передача генерируемого ими сигнала к внутриклеточным мишеням как в тироцитах, так и в ретроорбитальных фибробластах реализуются с участием пути рецептор ТТГ–аденилатциклаза–цАМФ–протеинкиназа А [25,26], который является основной мишенью для разрабатываемых нами тиено-[2,3-d]-пиримидинов [16, 27, 28], то инверсионные агонисты TP48 и TPY5 могут быть эффективны не только для нормализации уровня ТГ в условиях гипертиреоза, но и для предотвращения офтальмопатии Грейвса. В пользу этого свидетельствуют и данные других авторов, исследовавших специфическую активность других аллостерических лигандов рецептора ТТГ с активностью инверсионных агонистов [13, 14]. Соединение NCGC00229600, производное 2,3-дигидрохиназолин-4-она, снижало стимулирующий аденилатциклазу эффект аутоантител к рецептору ТТГ в культуре тироцитов человека и соответствующий эффект ТТГ и аутоантител в культуре ретроорбитальных фибробластов, полученных от пациентов с офтальмопатией Грейвса [13, 14]. Соединение S37a подавляло стимуляцию аденилатциклазы, вызванную ТТГ и ауто-ТТГ-антителами (стимулирующими моноклональными антителами TSAb M22 человека и олигоклональными антителами TSAb, полученными от пациентов с болезнью Грейвса) [15]. Следует, однако, отметить, что эти инверсионные агонисты были изучены только в условиях *in vitro*, с использованием клеточных культур, что не позволяет оценить их возможный терапевтический потенциал. Только в случае соединения S37a были проведены пилотные исследования по его токсичности и биодоступности, но влияние S37a на тиреоидный статус и компоненты ТТГ-зависимых систем не оценивалось [15].

Ранее нами было показано, что TP48 при в/б введении в дозе 25 мг/кг снижает в щитовидной железе крыс базальный уровень экспрессии гена Na^+/I^- -симпортера, осу-

ществляющего транспорт йода в фолликулярные клетки, и подавляет TRH-стимулированную экспрессию всех изученных в том исследовании генов тиреоидогенеза – *Tg*, *Tpo* и *Nis* [16, 17]. В настоящем исследовании мы показали сходный паттерн ингибирующего влияния TP48, вводимого в более низкой дозе 20 мг/кг, на экспрессию генов, вовлеченных в синтез ТГ, но значимое снижение было обнаружено только в отношении экспрессии генов *Tg* и *Dio2* (рис. 2). Соединение TPY5 при пероральном введении снижало базальную экспрессию гена *Tpo* и подавляло TRH-стимулированную экспрессию генов *Tg* и *Dio2*, причем в большей степени в сравнении с TP48 (рис. 3). Это является одной из ключевых причин снижения базальных и стимулированных TRH уровней ТГ у крыс с обработкой TP48 и TPY5. В свою очередь, снижение экспрессии генов тиреоидогенеза в щитовидной железе при обработке животных TP48 и TPY5 обусловлено вызываемым этими соединениями ослаблением стимуляции рецептора гормоном. Установлено, что стимуляция экспрессии генов тиреоглобулина, тиреопероксидазы и других компонентов системы синтеза ТГ реализуется через цАМФ-зависимый каскад, активируемый связыванием гормона с рецептором ТТГ, который включает в качестве конечного эффекторного звена транскрипционный фактор CREB (cAMP response element binding protein) [29-31]. Другими авторами было показано, что соединение NCGC00229600, наделенное активностью инверсионного агониста, подавляло и базальную, и стимулированную аутоантителами экспрессию гена *Tpo* с эффективностью, сходной с таковой TP48 и TPY5, но эти исследования были проведены в условиях *in vitro*, в первичной культуре тироцитов человека [13]. Еще один аллостерический регулятор, NCGC00242364, при введении мышам в 4–5 раз снижал TRH-стимулированную экспрессию генов *Nis* и *Tpo*, но не влиял на базальную, в том числе на конститутивно повышенную, активность рецептора ТТГ, функционируя как нейтральный антагонист [32].

Снижение содержания йода в организме, приводящее к его дефициту и к снижению продукции ТГ, повышает экспрессию транскрипционных факторов TTF-1 и PAX8, которые положительно регулируют экспрессию гена *Tshr* [33]. В нашем исследовании у крыс, обработанных TRH, на фоне повышения продукции ТГ отмечали снижение экспрессии гена *Tshr* в среднем в 3–4 раза (рис. 1), что обусловлено запуском отрицательных обратных связей в тиреоидной оси. В связи с этим достаточно неожиданными оказались результаты влияния TP48 и TPY5 на экспрессию гена *Tshr*, которая в их присутствии снижалась (рис. 1). Одним из возможных объяснений этого может быть стабилизирующее или модулирующее влияние TP48 и TPY5 на интернализацию и внутриклеточный эндосомальный транспорт рецептора ТТГ, поскольку низкомолекулярные аллостерические регуляторы могут функционировать как шапероны для рецепторов гликопротеиновых гормонов [34]. Однако это требует дополнительных исследований, в том числе включающих изучение влияния TP48 и TPY5 на экспрессию и активность транскрипционных факторов TTF-1 и PAX8, регуляторов транскрипционной активности гена *Tshr*.

Таким образом, разработано новое соединение TPY5 – производное тиено-[2,3-d]-пиримидина, которое при различных способах введения, в том числе при пероральном способе доставки, снижало как базальный, так и стимулированный TRH уровни ТГ, действуя как инверсионный агонист рецептора ТТГ. В основе эффекта TPY5 лежит его ингибирующее влияние на экспрессию генов, вовлеченных в синтез ТГ в щитовидной железе, а также снижение экспрессии рецептора ТТГ. Несмотря на то, что ранее разработанный нами инверсионный агонист TP48 при его в/б введении сопоставим по активности с TPY5, он оказался неактивным при пероральном способе введения, что ограничивает его возможное применение в медицине. Тем самым, TPY5 может рассматриваться как прототип для создания лекарственных препаратов, предназначенных для лечения аутоиммунного гипертиреоза и офтальмопатии Грейвса, обусловленных выработкой в организме пациента стимулирующих аутоантител

к рецептору ТТГ, а также для лечения и профилактики токсических аденом и опухолей щитовидной железы, обусловленных конститутивно повышенной активностью рецептора ТТГ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены биоэтическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, протокол заседания № 4-2/2023 от 25.04.2023 г.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 19-75-20122). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.О.Ш. и К.В.Д.), сбор данных (А.А.Б., И.А.Л., В.Н.С.), химический синтез (Е.А.Д., В.Н.С.), обработка данных (А.А.Б., И.А.Л., В.Н.С., К.В.Д., А.О.Ш.), написание и редактирование манускрипта (К.В.Д., А.О.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Biondi B, Cappola AR, Cooper DS* (2019) Subclinical Hypothyroidism: A Review. *JAMA* 322(2): 153–160.
<https://doi.org/10.1001/jama.2019.9052>
2. *Vanderpump MP* (2011). The epidemiology of thyroid disease. *British medical bulletin* 99: 39–51.
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldr030>
3. *Bekkering GE, Agoritsas T, Lytvyn L, Heen AF, Feller M, Moutzouri E, Abdulazeem H, Aertgeerts B, Beecher D, Brito JP, Farhoumand PD, Singh Ospina N, Rodondi N, van Driel M, Wallace E, Snel M, Okwen PM, Siemieniuk R, Vandvik PO, Kuijpers T, Vermandere M* (2019) Thyroid hormones treatment for subclinical hypothyroidism: a clinical practice guideline. *BMJ* 365: l2006.
<https://doi.org/10.1136/bmj.l2006>
4. *Hoang TD, Stocker DJ, Chou EL, Burch HB* (2022) Update on Clinical Management of Graves Disease and Thyroid Eye Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 51(2): 287–304.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.12.004>
5. *Vos XG, Endert E, Zwinderman AH, Tijssen JG, Wiersinga WM* (2016) Predicting the Risk of Recurrence Before the Start of Antithyroid Drug Therapy in Patients With Graves' Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 101(4): 1381–1389.
<https://doi.org/10.1210/jc.2015-3644>
6. *Whitmer D, Phay JE, Holt S, O'Donnell B, Nguyen J, Joseph D, Chi A, Wu S, Hao Y, Huang J, Klopper JP, Kloos RT, Kennedy GC, Shin J* (2022) Risk of malignancy in cytologically indeterminate thyroid nodules harboring thyroid stimulating hormone receptor mutations. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 1073592.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1073592>
7. *Langdon J, Gupta A, Sharbidre K, Czeyda-Pommersheim F, Revzin M* (2023) Thyroid cancer in pregnancy: diagnosis, management, and treatment. *Abdom Radiol (NY)* 48(5): 1724–1739.
<https://doi.org/10.1007/s00261-023-03808-1>
8. *Jäschke H, Neumann S, Moore S, Thomas CJ, Colson AO, Costanzi S, Kleinau G, Jiang JK, Paschke R, Raaka BM, Krause G, Gershengorn MC* (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(15): 9841–9844.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C600014200>

9. Kleinau G, Worth CL, Kreuchwig A, Biebermann H, Marcinkowski P, Scheerer P, Krause G (2017) Structural-Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 86. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00086>
10. Mezei M, Latif R, Das B, Davies TF (2021) Implications of an Improved Model of the TSH Receptor Transmembrane Domain (TSHR-TMD-TRIO). *Endocrinology* 162(7): bqab051. <https://doi.org/10.1210/endo/bqab051>
11. Fokina EA, Shpakov AO (2022) Thyroid-stimulating hormone receptor: role in the development of thyroid pathology and its correction. *J Evol Biochem Physiol* 58(5): 1439–1454. <https://doi.org/10.1134/S0022093022050143>
12. Neumann S, Huang W, Eliseeva E, Titus S, Thomas CJ, Gershengorn MC (2010) A small molecule inverse agonist for the human thyroid-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 151(7): 3454–3459. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0199>
13. Neumann S, Eliseeva E, McCoy JG, Napolitano G, Giuliani C, Monaco F, Huang W, Gershengorn MC (2011) A new small-molecule antagonist inhibits Graves' disease antibody activation of the TSH receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 96(2): 548–554. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1935>
14. Neumann S, Pope A, Geras-Raaka E, Raaka BM, Bahn RS, Gershengorn MC (2012) A drug-like antagonist inhibits thyrotropin receptor-mediated stimulation of cAMP production in Graves' orbital fibroblasts. *Thyroid* 22(8): 839–843. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0520>
15. Marcinkowski P, Hoyer I, Specker E, Furkert J, Rutz C, Neuenschwander M, Sobottka S, Sun H, Nazare M, Berchner-Pfannschmidt U, von Kries JP, Eckstein A, Schülein R, Krause G (2019) A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 29(1): 111–123. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>
16. Derkach KV, Bakhtyukov AA, Sorokoumov VN, Shpakov AO (2020) New Thieno-[2,3-d]pyrimidine-Based Functional Antagonist for the Receptor of Thyroid Stimulating Hormone. *Dokl Biochem Biophys* 491(1): 77–80. <https://doi.org/10.1134/S1607672920020064>
17. Derkach KV, Fokina EA, Bakhtyukov AA, Sorokoumov VN, Stepanchikina AM, Zakharova IO, Shpakov AO (2022) The Study of Biological Activity of a New Thieno[2,3-D]-Pyrimidine-Based Neutral Antagonist of Thyrotropin Receptor. *Bull Exp Biol Med* 172(6): 713–717. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05462-x>
18. Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS, Shpakov AO (2014) Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl Biol Sci* 459: 326–329. <https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
19. Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 47(12): 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
20. Chiamolera MI, Wondisford FE (2009) Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 150(3): 1091–1096. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1795>
21. Ginsberg J (2003) Diagnosis and management of Graves' disease. *CMAJ* 168(5): 575–585.
22. Catania A, Guaitoli E, Carbotta G, Bianchini M, Di Matteo FM, Carbotta S, Nardi M, Fabiani E, Grani G, D'Andrea V, Fumarola A (2013) Total thyroidectomy for Graves' disease treatment. *Clin Ter* 164(3): 193–196. <https://doi.org/10.7417/CT.2013.1548>
23. Ma C, Xie J, Wang H, Li J, Chen S (2016) Radioiodine therapy versus antithyroid medications for Graves' disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2(2): CD010094. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010094.pub2>
24. Krieger CC, Boutin A, Jang D, Morgan SJ, Banga JP, Kahaly GJ, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC (2019) Arrestin- β -1 Physically Scaffolds TSH and IGF1 Receptors to Enable Crosstalk. *Endocrinology* 160(6): 1468–1479. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00055>
25. Cui X, Wang F, Liu C (2023) A review of TSHR- and IGF-1R-related pathogenesis and treatment of Graves' orbitopathy. *Front Immunol* 14: 1062045. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1062045>
26. Wiersinga WM (2011) Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: the result of an unfortunate marriage between TSH receptors and IGF-1 receptors? *J Clin Endocrinol Metab* 96(8): 2386–2394. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0307>

27. Шпаков АО, Деркач КВ, Дарьин ДВ, Лобанов ПС (2014). Активация аденилатциклазы тиенопиримидиновыми производными в семенниках и яичниках крыс. Цитология 56(5): 346–352. [Shpakov AO, Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS (2014) Activation of adenylyl cyclase in the testes and ovaries of rats using thienopyrimidine derivatives. Tsitologiya 56(5): 346–352. (In Russ)].
28. Деркач КВ, Легкодух АС, Дарьин ДВ, Шпаков АО (2016). Стимулирующее влияние тиенопиримидинов, структурных аналогов Org43553, на активность аденилатциклазы в семенниках и на продукцию тестостерона у самцов крыс. Цитология 58(8): 602–609. [Derkach KV, Legkodukh AS, Dar'in DV, Shpakov AO (2016) The stimulating effect of thienopyrimidines, the structural analogs of Org 43553, on the activity of adenylyl cyclase in the testes and on the testosterone production in male rats. Tsitologiya 58(8): 602–609. (In Russ)].
29. Chu YD, Yeh CT (2020) The Molecular Function and Clinical Role of Thyroid Stimulating Hormone Receptor in Cancer Cells. Cells 9(7): 1730. <https://doi.org/10.3390/cells9071730>
30. Jang D, Marcus-Samuels B, Morgan SJ, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC (2020) Thyrotropin regulation of differentiated gene transcription in adult human thyrocytes in primary culture. Mol Cell Endocrinol 518: 111032. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111032>
31. Jang D, Eliseeva E, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC (2022) TSH stimulation of human thyroglobulin and thyroid peroxidase gene transcription is partially dependent on internalization. Cell Signal 90: 110212. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110212>
32. Neumann S, Nir EA, Eliseeva E, Huang W, Marugan J, Xiao J, Dulcey AE, Gershengorn MC (2014) A selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice. Endocrinology 155(1): 310–314. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1835>
33. Huang H, Chen L, Liang B, Cai H, Cai Q, Shi Y (2016) Upregulation of TSHR, TTF-1, and PAX8 in Nodular Goiter Is Associated with Iodine Deficiency in the Follicular Lumen. Int J Endocrinol 2016: 2492450. <https://doi.org/10.1155/2016/2492450>
34. Newton CL, Whay AM, McArdle CA, Zhang M, van Koppen CJ, van de Lagemaat R, Segaloff DL, Millar RP (2011) Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. Proc Natl Acad Sci U S A 108(17): 7172–7176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>

Low molecular inverse agonist of the thyrotropin receptor is active both intraperitoneal and oral administration

**K. V. Derkach^{a,*}, A. A. Bakhtuykov^a, V. N. Sorokoumov^{a,b}, I. A. Lebedev^a,
E. A. Didenko^{a,b}, and A. O. Shpakov^a**

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: derkach_k@list.ru*

Autoimmune hyperthyroidism (Graves' disease), which is caused by stimulating autoantibodies to the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor, and thyroid gland (TG) tumors, caused by constitutively increased activity of this receptor, are widespread and have a poor prognosis. The drugs used to treat them are not very effective and have many side effects. One of the approaches for the treatment of these thyroid diseases may be the use of allosteric regulators of the TSH receptor with the activity of inverse agonists. The purpose of the work was to study the effects of our previously developed compound TP48 and the new compound TPY5, belonging to the class of thieno[2,3-d]-pyrimidines, on the basal and thyrotropin-releasing hormone (TRH)-stimulated levels of thyroid hormones (THs) in the blood of rats and on the expression of genes responsible for the synthesis of THs in the TG. The effectiveness of TP48 and TPY5 was studied both with intraperitoneal (i.p., 20 mg/kg) and oral (40 mg/kg) administration. Using ELISA, the levels of free

(fT4) and total (tT4) thyroxine and free (fT3) and total (tT3) triiodothyronine in the blood were assessed, including during TRH stimulation (intranasally, 300 µg/kg). The gene expression for thyroid peroxidase (*Tpo*), thyroglobulin (*Tg*), Na⁺/I⁻-symporter (*Nis*), type 2 deiodinase (*Dio2*) and TSH receptor (*Tshr*) in the TG was assessed using PCR. TPY5, with both routes of administration, reduced both basal and TRH-stimulated TH levels, while TP48 suppressed TH production only with i.p. administration. Orally administered TPY5 significantly reduced basal *Tpo* gene expression and TRH-stimulated *Tg* and *Dio2* gene expression. I.p. administered TP48 reduced only TRH-stimulated expression of the *Tg* and *Dio2* genes. Quite surprisingly, TPY5 (oral) and TP48 (i.p.) reduced basal *Tshr* gene expression and did not prevent its inhibition by TRH. Thus, the TPY5 compound we developed has the activity of an inverse agonist of the TSH receptor, is effective when administered orally, which is more in demand in medicine, and can be considered as a prototype of drugs to treat autoimmune hyperthyroidism and thyroid tumors.

Keywords: thyroid-stimulating hormone receptor, inverse agonist, allosteric regulator, thienopyrimidine, thyroxin, thyroliberin