

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОЗОЗАВИСИМОСТИ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДА, ПРОИЗВОДНОГО РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА, НА ПРОДУКЦИЮ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ У КРЫС

К. В. Деркач,¹ Е. А. Шпакова,² В. М. Бондарева,¹ А. О. Шпаков¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

Деркач Кира Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН; *Шпакова Елена Александровна* — младший научный сотрудник межфакультетской лаборатории биомедицинской химии Института химии Санкт-Петербургского государственного университета; *Бондарева Вера Михайловна* — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН; *Шпаков Александр Олегович* — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН.

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова» Российской академии наук (ИЭФБ РАН), пр. Тореза, д. 44, Санкт-Петербург, 194223. Тел. +7(812)552-31-17; факс +7(812)552-30-12. E-mail: alex_shpakov@list.ru (Шпаков Александр Олегович).

Резюме

Поиск и разработка новых регуляторов функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси является одной из актуальных задач эндокринологии и фармакологии. Нами ранее показано, что пальмитолилованный пептид 612–627 (Pal), структурно соответствующий третьей внутриклеточной петле рецептора тиреотропного гормона (ТТГ), активирует аденилатциклазную сигнальную систему в тироидальных мембранах *in vitro* и стимулирует продукцию тироксина щитовидной железой *in vivo*. Цель настоящей работы состояла в исследовании дозозависимости стимулирующего влияния пептида 612–627 (Pal) на уровень тиреоидных гормонов при его интраназальном и внутримышечном введении крысам. Пептид вводили однократно самцам крыс Wistar в дозах от 45 до 900 мкг/кг при интраназальном введении и в дозах от 150 до 1350 мкг/кг при внутримышечном введении. До введения и в течение 6 ч после него оценивали динамику изменений уровня свободного (fT_4) и общего тироксина (tT_4) и общего трийодтиронина (tT_3). Показано, что при обоих путях введения пептид 612–627 (Pal) дозозависимо повышал уровень fT_4 и tT_3 . В то же время интраназальный путь был более эффективным, поскольку значение ED_{50} и максимальный стимулирующий эффект на продукцию fT_4 при интраназальном введении пептида составили 87 мкг/кг и 38 %, в то время как при внутримышечном — 275 мкг/кг и 25 %, соответственно. Полученные данные указывают на способность пептида 612–627 (Pal) эффективно стимулировать гормонопродуцирующую функцию щитовидной железы при его интраназальном введении крысам в диапазоне доз 225–450 мкг/кг.

Ключевые слова: пептид, рецептор тиреотропного гормона, щитовидная железа, тироксин, интраназальное введение.

THE STUDY OF DOSEDEPENDENCY OF THE STIMULATING EFFECT OF PEPTIDE DERIVED FROM THYROTROPIN HORMONE RECEPTOR ON PRODUCTION OF THYROID HORMONES IN RATS

K. V. Derkach¹, E. A. Shpakova², V. M. Bondareva¹, A. O. Shpakov¹

¹ *I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

² *Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

Corresponding author: I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Thorez av., Saint-Petersburg, Russia, 194223. Phone +7(812)552-31-17; fax +7(812)552-30-12; E-mail: alex_shpakov@list.ru (Alexander O. Shpakov — Sc. D., Head of Laboratory of Molecular Endocrinology, I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry).

Abstract

Background. Search and development of new regulators of functional activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis is one of actual problems in endocrinology and pharmacology. We have previously shown that palmitoylated peptide 612–627 (Pal) structurally corresponding to the third intracellular loop of receptor of thyroid-stimulating hormone (TSH) activates the adenylyl cyclase signaling system in thyroidal membranes *in vitro* and stimulates the production of thyroxine by the thyroid gland *in vivo*. **Objective.** The aim of this work was to study a dose-dependency of the stimulating effect of peptide 612–627 (Pal) on the level of thyroid hormones in its intranasal and intramuscular administration into rats. **Design and methods.** The peptide was administered once to Wistar male rats at the doses from 45 to 900 µg/kg when administered intranasally and at the doses from 150 to 1350 µg/kg when administered intramuscularly. Prior to administration and for 6 h after administration the changes of the levels of free (fT₄) and total thyroxine (tT₄) and total triiodothyronine (tT₃) were evaluated. **Results.** It is shown that peptide 612–627 (Pal) in both routes of administration in a dose-dependent manner increased the levels of fT₄ and tT₃. At the same time, the intranasal route was more effective as ED₅₀ value and the maximal stimulating effect on fT₄ production when peptide administered intranasally was 87 µg/kg and 38 %, while in the case of intramuscular route — 275 µg/kg and 25 %, respectively. **Conclusion.** These findings indicate the ability of peptide 612–627 (Pal) to effectively stimulate hormone-producing function of the thyroid gland when peptide administered intranasally into rats at the range of the doses 225–450 µg/kg.

Key words: peptide, receptor of thyroid-stimulating hormone, thyroid gland, thyroxine, intranasal administration.

Статья поступила в редакцию 25.12.2014, принята к печати 28.01.2014.

Введение

Гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная (ГГТ) ось является важнейшим компонентом эндокринной системы, которая вовлечена в регуляцию метаболических и ростовых процессов [1]. Одним из эндогенных регуляторов функций ГГТ оси является тиреотропный гормон (ТТГ), вырабатываемый передней долей гипофиза, который специфично связывается с рецепторами ТТГ, локализованными в продуцирующих тироксин клетках щитовидной железы. Контроль продукции ТТГ осуществляется с помощью тиролиберина, релизинг-фактора ТТГ, который вырабатывается гипоталамическими нейронами. Изменения синтеза и секреции тиролиберина и ТТГ, а также снижение чувствительности к ним тканей-мишеней, приводят к гипертиреозу,

гипотиреозу, развитию опухолей щитовидной железы [2, 3]. Основным подходом для компенсации нарушений функции ГГТ оси является применение тиреоидных гормонов, что, с одной стороны, позволяет компенсировать их недостаток и, с другой, по механизму обратной связи регулировать уровень ТТГ и тиролиберина [4]. ТТГ и тиролиберин используются в основном для диагностики рака щитовидной железы и гипофизарных дисфункций, в то время как применение этих препаратов в качестве лекарств ограничено множеством побочных эффектов, необходимостью строгого мониторинга и контроля при их использовании, особенно в случае рака щитовидной железы, а также высокой стоимостью [5]. Наиболее часто рекомбинантный ТТГ применяется для диагностики и лечения

дифференцированного рака щитовидной железы, а также для лечения пациентов с многоузловым зобом большого размера, обеспечивая усиленное поглощение радиоактивного йода тироцитами [6]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что поиск новых регуляторов функций ГТТ оси является одной из актуальных проблем современной эндокринологии и фармакологии.

Одним из перспективных направлений такого поиска является синтез пептидов, которые соответствуют функционально важным участкам рецепторов, которые специфически связываются с гормонами, регулирующими функции ГТТ оси, в первую очередь — с ТТГ. Рецептор ТТГ относится к рецепторам серпантинного типа, которые семь раз пронизывают плазматическую мембрану и функционально сопряжены с G-белками, во взаимодействие с которыми вовлечены вторая и третья цитоплазматические петли рецептора [7]. Ранее нами было показано, что модифицированный с С-конца пальмитатом пептид 612–627 (Pal), соответствующий по первичной структуре С-концевому участку третьей цитоплазматической петли рецептора ТТГ, стимулировал активность чувствительной к ТТГ аденилатциклазной сигнальной системы в щитовидной железе крыс, причем его действие было специфичным по отношению к рецептору ТТГ [8, 9]. Было также установлено, что пептид 612–627 (Pal) при многократном интраназальном его введении крысам в суточной дозе 450 мкг/кг повышал у них уровень свободного тироксина (fT_4) и общего трийодтиронина (tT_3) [10]. Эти данные указывают на способность пептида 612–627 (Pal) активировать рецептор ТТГ в условиях *in vitro* и *in vivo*, подобно тому, как это происходит при его связывании с ТТГ. Цель настоящей работы состояла в изучении дозозависимости стимулирующего влияния пептида 612–627 (Pal) на уровень тиреоидных гормонов у крыс при различных путях его введения — интраназальном и внутримышечном. В задачи исследования также входило сравнение эффективности интраназального и внутримышечного способов доставки пептида.

Материалы и методы

Для экспериментов были взяты пяти- и шестимесячные самцы крыс Wistar (вес 240–280 г), которые содержались в стандартных условиях при свободном доступе к пище и воде. Все эксперименты проводились в соответствии с международными требованиями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях».

Пептид Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala^{612–627}-Lys (Pal)-Ala-амид (612–627 (Pal)) был синтезирован твердофазным методом, как описано ранее [8]. Степень чистоты пептида и его структуру определяли с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения. По данным масс-спектрометрического анализа молекулярная масса пептида 612–627 (Pal) составила 2336.50, что хорошо соответствует рассчитанной молекулярной массе 2336.45. Концентрацию fT_4 , общего тироксина (tT_4) и tT_3 оценивали с помощью иммуноферментного анализа, используя наборы фирмы «Иммунотех» (Россия). Кровь из хвостовой вены крыс забирали в условиях местной анестезии, для чего использовали 2% раствор лидокаина в дозе 2–4 мг/кг веса тела животного.

Введение пептида крысам осуществляли в 10.00. Контрольные животные в это же время получали растворитель пептида. Интраназальное введение пептида 612–627 (Pal) осуществляли по методике, аналогичной таковой для инсулина [11]. Пептид растворяли в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.5, и 20 мкл полученного раствора вводили по каплям в обе ноздри. В каждой экспериментальной группе было по пять животных. В общей сложности было сформировано 6 групп крыс — контрольная группа, которая получала буфер, и пять экспериментальных групп, которые получали пептид в дозах 45, 90, 225, 450 и 900 мкг/кг веса. Для внутримышечного введения пептид растворяли в 200 мкл физиологического раствора и вводили в мышцу бедра. В общей сложности было сформировано 5 групп крыс — контрольная группа, которая получала физиологический раствор, и 4 группы, которым внутримышечно вводили пептид в дозах 150, 450, 900 и 1350 мкг/кг веса. Для анализа изменений уровня тиреоидных гормонов образцы крови (250 мкл) отбирали за 30 мин до введения пептида, а также через 15, 45, 120, 240 и 360 мин после введения.

Группы животных анализировали с помощью Mixed ANOVA, используя два фактора — метод обработки и время обработки. Нормальность распределения оценивали с помощью теста Шапиро-Вилка ($P < 0,05$). В том случае, когда взаимодействие между двумя факторами было статистически значимым, оценивали различия между группами. В том случае, когда One-Way ANOVA показывал статистически значимые различия между группами, проводили множественное сравнение по критерию Tukey. Различия между группами оценивали как достоверные при $P < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Результаты и их обсуждение

При интраназальном введении крысам пептид 612–627 (Pal) повышал уровень тиреоидных гормонов, причем его эффект характеризовался дозозависимостью (рис. 1). В дозе 45 мкг/кг никакого влияния на уровень тиреоидных гормонов во всех изученных временных точках пептид не оказывал. В дозах 90 и 225 мкг/кг пептид достоверно повышал только уровень fT_4 , в то время как в дозах 450 и 900 мкг/кг он достоверно повышал продукцию всех изучаемых форм тиреоидных гормонов — fT_4 , tT_4 и tT_3 .

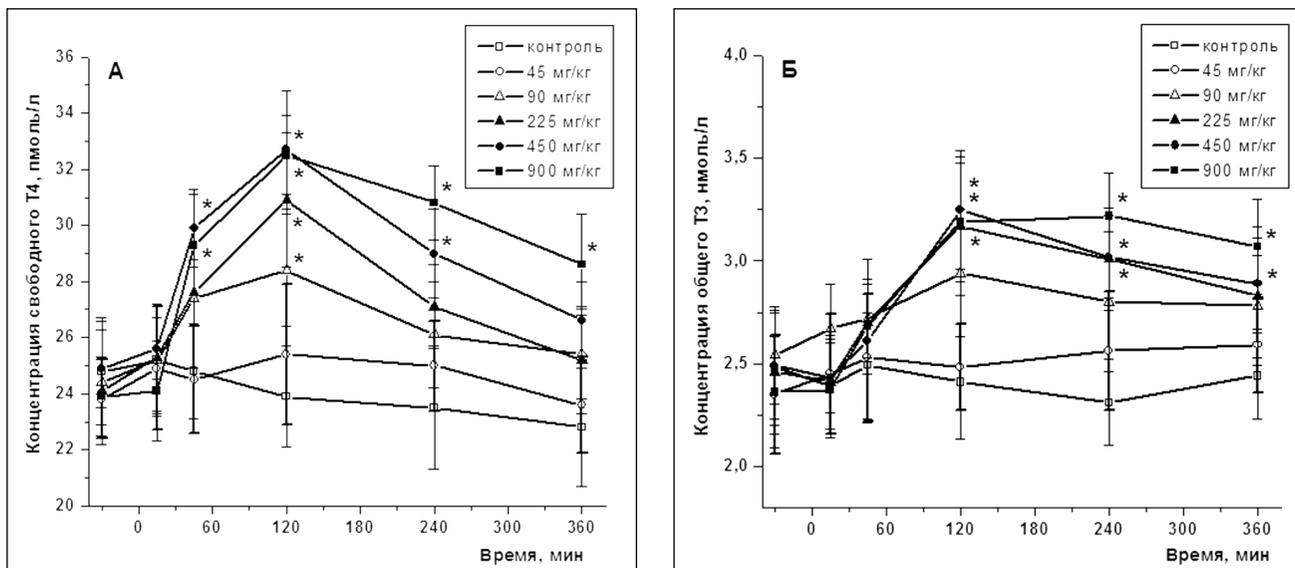
Максимальный стимулирующий эффект пептида 612–627 (Pal) на уровень fT_4 достигался через 2 ч после его интраназального введения крысам в дозе 450 мкг/кг (+38%). При повышении дозы пептида до 900 мкг/кг его максимальный эффект уже не менялся. Хотя через 4 и 6 ч после обработки наблюдали снижение стимулирующего эффекта пептида, в группе крыс, обработанных пептидом в дозе 900 мкг/кг, уровень fT_4 оставался достоверно выше такового в контроле (рис. 1, А). Качественно сходную картину наблюдали и в случае стимулирующего действия пептида на уровень tT_4 с той лишь разницей, что максимальный стимулирующий эффект пептида на уровень общего тироксина был выражен существенно слабее в сравнении с его эффектом на уровень свободного тироксина (данные не представлены).

Максимальный стимулирующий эффект на уровень tT_3 достигался через 2 ч после обра-

ботки крыс пептидом 612–627 (Pal) уже в дозе 225 мкг/кг, и не менялся при повышении дозы до 450 и 900 мкг/кг. Однако при повышении дозы пептида менялась временная динамика его влияния на уровень tT_3 . Так, при использовании дозы 225 мкг/кг через 6 ч после обработки уровень tT_3 статистически значимо не отличался от такового в контроле, в то время как при использовании более высоких доз пептида уровень гормона через 4 и 6 ч был достоверно выше, чем в контрольной группе (рис. 1, Б). Отличия во временной динамике повышения уровней fT_4 и tT_3 под действием пептида обусловлены тем, что пептид сначала активирует рецептор ТТГ в тироцитах щитовидной железы, что приводит к стимуляции синтеза и секреции тироксина. В дальнейшем в периферических тканях и мозге с помощью ферментов дейодиназ тироксин превращается в трийодтиронин, который является основным эффекторным гормоном гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси.

Значения ED_{50} для стимулирующего эффекта интраназально вводимого пептида на уровни fT_4 и tT_3 составили 87 и 78 мкг/кг соответственно. Несмотря на то, что в дозах 450 и 900 мкг/кг пептид оказывал сходный по величине максимальный стимулирующий эффект на уровни fT_4 и tT_3 , значения площади под кривыми «прирост концентрации гормона — время» (AUC, area under the curve) для этих доз пептида заметно различались. Так при использовании доз 450 и 900 мкг/кг значения AUC_{15-360} для стимуляции пептидом продукции fT_4 были равны

Рисунок 1. Влияние различных доз пептида 612–627 (Pal) при его интраназальном способе введения крысам на уровень у них свободного тироксина (А) и общего трийодтиронина (Б) в течение 6 ч после обработки



Примечание: исследовались дозы пептида от 45 до 900 мкг/кг. Различия между экспериментальной группой и контролем достоверны при $P < 0,05$. В каждой группе животных $n = 5$.

1618 ± 420 и 2231 ± 200 (различия между экспериментальными группами составили $P = 0,018$), в то время как для стимуляции продукции tT_3 — 174 ± 73 и 296 ± 84 ($P = 0,052$), соответственно. Причиной таких различий является менее выраженное снижение уровня тиреоидных гормонов через 4 и 6 ч после обработки крыс пептидом в дозе 900 мкг/кг в сравнении с дозой 450 мкг/кг (рис. 1). Эти данные могут указывать на то, что при повышении дозы пептида достигается более продолжительная стимуляция рецепторов ТТГ и продукции тироксина щитовидной железой, в то время как эффективность такой стимуляции уже не меняется.

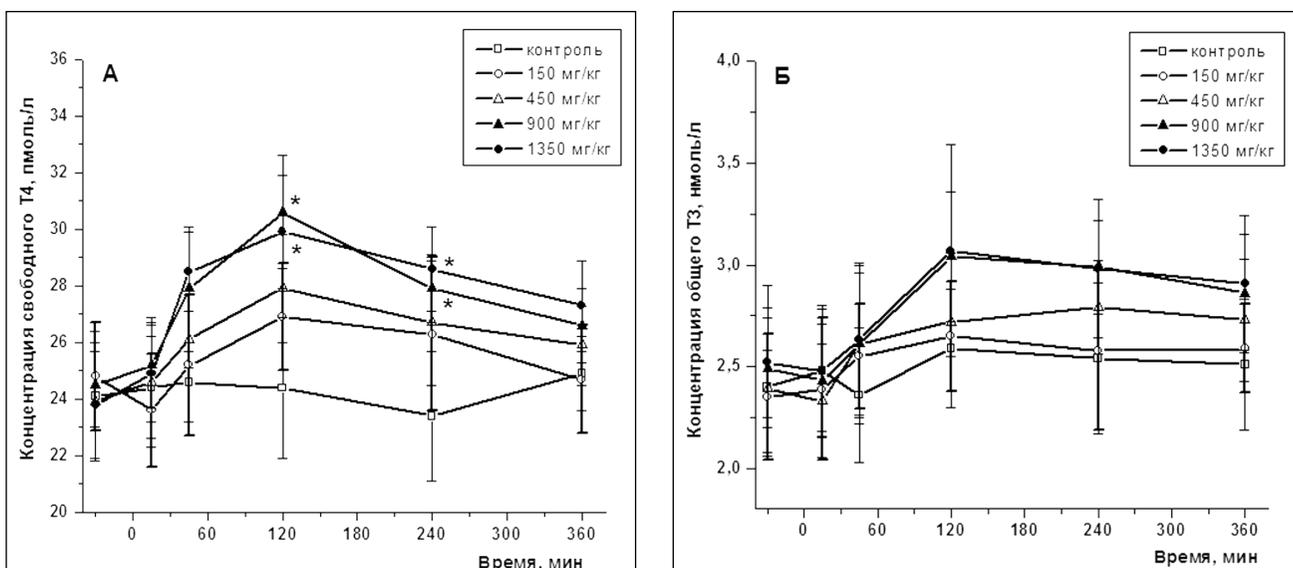
При внутримышечном способе введения эффективность стимулирующего влияния пептида 612–627 (Pal) на уровень тиреоидных гормонов у крыс была выражена намного слабее, чем при интраназальном введении (рис. 2). Достоверное повышение уровня гормона было отмечено только в случае fT_4 через 2 и 4 ч после обработки пептидом в дозах 900 и 1350 мкг/кг, в то время как для tT_4 и tT_3 различия в сравнении с контрольной группой животных во всех временных точках не были статистически значимыми. Максимальные стимулирующие эффекты внутримышечно вводимого пептида 612–627 (Pal) (900 мкг/кг) для fT_4 и tT_3 составили 68 и 54% от таковых, достигаемых при интраназальном его введении. Значения AUC_{15-360} для кривой «прирост концентрации гормона — время» в случае повышения уровней fT_4 и tT_3 при обработке крыс внутримышечно вводимым пептидом (900 мкг/кг) составили

1307 ± 603 и 162 ± 105, что на 41 и 45% ниже, чем при обработке животных той же дозой интраназально вводимого пептида. При увеличении дозы до 1350 мкг/кг значения AUC_{15-360} для повышения уровней fT_4 и tT_3 составили 1592 ± 715 и 144 ± 84, и слабо отличались от таковых для пептида, взятого в дозе 900 мкг/кг. Значение ED_{50} для стимулирующего эффекта внутримышечно вводимого пептида 612–627 (Pal) на уровень fT_4 составило 275 мкг/кг, и было в три раза выше значения ED_{50} для интраназально вводимого пептида.

Выявленные нами различия в стимулирующем эффекте пептида 612–627 (Pal) при интраназальном и внутримышечном способах его введения, как мы полагаем, связаны с различиями в эффективности доставки пептида к тироцитам щитовидной железы, в которых локализованы мишени его действия — рецепторы ТТГ. Следует отметить, что интраназальный способ введения широко применяется как способ доставки пептидных препаратов в ЦНС и периферические ткани, расположенные вблизи выходов гипоталамических нейронов [12]. Нельзя исключить и того, что при внутримышечном способе введения наблюдается более интенсивная деградация пептида протеазами, обусловленная наличием в структуре пептида кластеров положительно заряженных аминокислотных остатков, мишеней действия этих ферментов.

Ключевую роль в межклеточном и внутриклеточном транспорте пептидов, соответствующих по первичной структуре цитоплазматическим

Рисунок 2. Влияние различных доз пептида 612–627 (Pal) при его внутримышечном способе введения крысам на уровень у них свободного тироксина (А) и общего трийодтиронина (Б) в течение 6 ч после обработки



Примечание: исследовались дозы пептида от 45 до 900 мкг/кг. Различия между экспериментальной группой и контролем достоверны при $P < 0,05$. В каждой группе животных $n = 5$.

участкам рецепторов серпантинного типа, играет присутствие в них гидрофобных радикалов, которые сопоставимы по размеру и липофильности с трансмембранными доменами рецептора. Такие липофильные производные называют пепдуцинами [13]. Имеются многочисленные данные о том, что гидрофобные радикалы обеспечивают эффективный перенос пепдуцинов через плазматическую мембрану к внутриклеточным белкам-мишеням, стабилизируют их биологически активную конформацию, повышают способность пептидов взаимодействовать с транспортными белками [14–19]. Нами и другими авторами показано, что пепдуцины, модифицированные остатком пальмитиновой кислоты, который сопоставим по физико-химическим параметрам с трансмембранными доменами рецепторов, действуют как внутриклеточные агонисты и антагонисты гормональных сигнальных систем и активны как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [13, 20–27]. Так, пепдуцины способны контролировать протекание воспалительных и иммунных процессов, подавлять развитие и метастазирование ряда опухолей, влиять на выработку тестостерона клетками Лейдига [25, 28, 29].

Полученные в настоящем исследовании данные о высокой биологической активности *in vivo* пальмитоилированного пептида 612–627 (Pal) подтверждают тезис о важности модификации пептидов гидрофобным радикалом. Необходимо отметить, что пептид 612–627, лишенный гидрофобного радикала, как было показано нами ранее, характеризуется низкой биологической активностью в условиях *in vitro*, и полностью ее лишен в условиях *in vivo* [8–10]. Проведенная на предварительном этапе настоящего исследования оценка биологической активности немодифицированного пептида 612–627 показала, что в дозе 900 мкг/кг при интраназальном введении крысам он не влияет на продукцию у них тироксина (данные не представлены).

Таким образом, нами разработан пептид, который является стимулятором гормонпродуцирующей функции щитовидной железы, функционируя как внутриклеточный агонист рецептора ТТГ. При интраназальном введении в сравнительно низких дозах (225–450 мкг/кг) пептид 612–627 (Pal) повышает продукцию тироксина щитовидной железой, что указывает на перспективность разработки на его основе препаратов, усиливающих поглощение йода тироцитами. Такие препараты могут быть использованы для диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований щитовидной железы, а также при проведении терапии радиоактивным йодом дифференцированного рака щитовидной железы [6].

Список литературы

1. Klieverik LP, Coomans CP, Endert E et al. Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake *in vivo*. *Endocrinology*. 2009;150(12):5639–5648. doi: 10.1210/en.2009–0297.
2. Beck-Peccoz P, Persani L, Calebiro D et al. Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20(4):529–546.
3. Persani L, Calebiro D, Cordella D et al. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;322(1–2):72–82. doi: 10.1016/j.mce.2010.01.008.
4. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009;150(3):1091–1096. doi: 10.1210/en.2008–1795.
5. Pellegriti G, Scollo C, Regalbuto C et al. The diagnostic use of the rhTSH/thyroglobulin test in differentiated thyroid cancer patients with persistent disease and low thyroglobulin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;58(5):556–561.
6. Duntas LH, Cooper DS. Review on the use of a decade of recombinant human TSH: prospects and novel uses. *Thyroid*. 2008;18(5):509–516. doi: 10.1089/thy.2007.0331.
7. Шпаков АО. Структурно-функциональная организация рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LRR-повторы, и их взаимодействие с гетеротримерными G-белками. *Цитология*. 2009;51(8):637–649. [Shpakov AO. Structural-functional organization of polypeptide hormones receptors containing LRR-repeats and their interaction with heterotrimeric G proteins. *Tsitologiya*. 2009;51(8):637–649. In Russian].
8. Shpakov AO., Shpakova EA., Derkach KV. The sensitivity of the adenylyl cyclase system in rat thyroidal and extrathyroidal tissues to peptides corresponding to the third intracellular loop of thyroid-stimulating hormone receptor. *Current Topics in Peptide & Protein Research*. 2012;13:61–73.
9. Шпаков АО, Шпакова ЕА, Тарасенко ИИ, Деркач КВ. Пептид 612–627 рецептора тиреотропного гормона и его модифицированные аналоги как регуляторы аденилатциклазы в щитовидной железе крыс. *Цитология*. 2014;56(7):526–535. [Shpakov AO, Shpakova EA, Tarasenko II, Derkach KV. Peptide 612–627 of thyrotropin receptor and its modified derivatives as the regulators of adenylyl cyclase in the rat thyroid gland. *Tsitologiya*. 2014;56(7):526–535. In Russian].
10. Шпакова ЕА, Шпаков АО, Чистякова ОВ и др. Биологическая активность *in vitro* и *in vivo* пептидов, соответствующих третьей цитоплазматической петле рецептора тиреотропина. *Доклады Академии наук*. 2012;443(1): 123–126.
11. Shpakov AO, Chistyakova OV, Derkach KV et al. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Cent Eur J Biol*. 2012;7(1):33–47.
12. Chapman CD, Frey WH, Craft S et al. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans.

- Pharm Res. 2013; 30(10):2475–2484. doi: 10.1007/s11095-012-0915-1.
13. Covic L, Gresser AL, Talavera J, Swift S, Kuliopulos A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(2):643–648.
14. Miller J, Agarwal A, Devi LA et al. Insider access: pepducin symposium explores a new approach to GPCR modulation. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1180 Suppl 1:1–12. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05326.x.
15. Shpakov AO. Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling. *J Amino Acids*. 2011;2011:656051. doi:10.4061/2011/656051.
16. Tressel SL, Koukos G, Tchernychev B, Jacques SL, Covic L, Kuliopulos A. A pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models. *Methods Mol Biol*. 2011;683:259–75. doi: 10.1007/978-1-60761-919-2_19.
17. Шпаков АО, Шпакова ЕА. Применение пептидной стратегии для создания новых лекарственных препаратов. *Трансляционная медицина*. 2013;6:14–22. [Shpakov AO, Shpakova EA. The use of the peptide strategy for creation of new drugs. *Translational Medicine*. 2013;6:14–22. In Russian].
18. Shpakov AO. GPCR-peptides: prospective use in biology and medicine. *Endocrinol Metab Syndr*. 2013;2: e116. doi: 10.4172/2161-1017.1000e116.
19. Шпаков АО, Деркач КВ. Новые достижения в разработке и применении GPCR-пептидов. *Журн эвол биохим физиол*. 2015;51(1):11–16.
20. Shpakov AO, Gur'yanov IA, Kuznetsova LA et al. Studies of the molecular mechanisms of action of relaxin on the adenylyl cyclase signaling system using synthetic peptides derived from the LGR7 relaxin receptor. *Neurosci Behav Physiol*. 2007;37(7):705–714.
21. Agarwal A, Tressel SL, Kaimal R et al. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Res*. 2010;70(14):5880–5890. doi: 10.1158/0008-5472.
22. Shpakov AO, Shpakova EA, Tarasenko II et al. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5 hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. *Int J Pept Res Ther*. 2010;16:95–105.
23. Шпаков АО, Шпакова ЕА, Тарасенко ИИ, Деркач КВ. Рецепторная и тканевая специфичность действия пептидов, производных цитоплазматических участков рецепторов серпантинного типа. *Биол мембраны*. 2011;28(6):453–462.
24. O'Callaghan K, Kuliopulos A, Covic L. Targeting CXCR4 with cell-penetrating pepducins in lymphoma and lymphocytic leukemia. *J Biol Chem*. 2012;287(16):12787–12796. doi: 10.1074/jbc.R112.355461.
25. Zhang P, Gruber A, Kasuda S et al. Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin. *Circulation*. 2012;126(1):83–91. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.091918.
26. Шпакова ЕА, Деркач КВ, Шпаков АО. Биологическая активность липофильных производных пептида 562–572 рецептора лютеинизирующего гормона крысы. *Доклады Академии наук*. 2013;452(4):453–456.
27. Шпаков АО, Шпакова ЕА. Разработка негормональных регуляторов аденилатциклазной сигнальной системы на основе пептидов, производных третьей цитоплазматической петли соматостатиновых рецепторов. *Биомед химия*. 2012;58, вып 4:446–456. [Shpakov AO, Shpakova EA. Development of non-hormonal regulators of the adenylyl cyclase signaling system based on the peptides, derivatives of the third intracellular loop of somatostatin receptors. *Biomedical Chemistry*. 2011;5 Issue 3:246–252. In Russian]. doi: 10.1134/S1990750811030127.
28. Michael ES1, Kuliopulos A, Covic L, Steer ML, Perides G. Pharmacological inhibition of PAR2 with the pepducin P2pal-18S protects mice against acute experimental biliary pancreatitis. *Am J Physiol*. 2013;304(5):516–526. doi: 10.1152/ajpgi.00296.2012.
29. Деркач КВ, Шпакова ЕА, Шпаков АО. Пальмитилированный пептид 562–572 рецептора лютеинизирующего гормона повышает уровень тестостерона у самцов крыс. *Бюл. экспер. биол. мед*. 2014;158(8):172–176.