УДК 577.112.389.5/.6/.175.722:57.05 DOI: 10.18699/SSMJ20210103

Роль С-пептида проинсулина в регуляции инсулиновой сигнальной системы (систематический обзор)

О.Н. Потеряева, И.Ф. Усынин

НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Резюме

С-пептид является фрагментом проинсулина, в результате отщепления которого образуется активный инсулин. За последние годы появилась новая информация, свидетельствующая о том, что С-пептид участвует не только в процессинге инсулина в секреторных гранулах панкреатических β-клеток, но и оказывает важное регуляторное влияние на функции многих органов и тканей. С-пептид осуществляет физиологические эффекты через сигнальные пути, связываясь со специфическим рецептором на клеточной мембране. Внутриклеточная передача сигналов происходит через G-белок и Ca^{2+}-зависимые пути, что приводит к активации и повышенной экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота, Na^+/K^+-АТР-азы и факторов транскрипции, участвующих в апоптозе, противовоспалительных и других внутриклеточных защитных механизмах. Одним из наиболее важных физиологических эффектов С-пептида является регулирование и модифицирование сигнальных механизмов инсулина. Показано, что характер влияния С-пептида на инсулиновую сигнальную систему зависит от концентрации гормона: при низком уровне последнего рецептор С-пептида связывается с $G_{i/o}$-белками, что приводит к усилению активации индуцированных инсулином процессов, при высоком взаимодействует с $G_{q/11}$-белками, вследствие чего активируется протеинкиназа С и ослабляются каскады передачи сигналов, связанных с инсулином. В данном обзоре представлены новые факты, свидетельствующие об участии С-пептида в регуляции инсулиновой сигнальной системы.

Ключевые слова: С-пептид проинсулина, инсулин, сигнальные системы, регуляция.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Автор для переписки: Потеряева О.Н., e-mail: olga_Poteryaeva@mail.ru
Для цитирования: Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Роль С-пептида проинсулина в регуляции инсулиновой сигнальной системы (систематический обзор). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (1): 33–43. doi: 10.18699/SSMJ20210103

The role of C-peptide in regulation of the insulin signaling system (systematic review)

O.N. Poteryaeva, I.F. Usynin

Institute of Biochemistry of Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

Abstract

The C-peptide is a fragment of proinsulin, the cleavage of which forms active insulin. In recent years, new evidence has emerged indicating that C-peptide is involved not only in the processing of insulin in the secretory granules of pancreatic β-cells, but also has an important regulatory effect on the functions of many organs and tissues. C-peptide mediates physiological effects through signaling pathways by binding to a specific receptor on the cell membrane. Intracellular signaling occurs through the G-protein and Ca^{2+}- dependent pathways, which leads to the activation and increased expression of endothelial nitric oxide synthase, Na^+/K^+-ATPase, and important transcription factors involved in apoptosis, anti-inflammatory and other intracellular defense mechanisms. One of the most important physiological effects of C-peptide is the regulation and modification of insulin signaling mechanisms. The nature of the effect of C-peptide on the insulin signaling system depends on the concentration of insulin. It is assumed that under conditions of low insulin levels, the C-peptide receptor binds to $G_{i/o}$-proteins and leads to increased activation of processes induced

by insulin. In this case, the C-peptide acts as insulin-mimetic peptide. Under high insulin conditions, the C-peptide receptor binds to $G_{q/11}$-proteins and leads to activation of protein kinase C with subsequent weakening of insulin-related signaling cascades. This review presents new facts indicating the participation of C-peptide in the regulation of the insulin signaling system.

Key words. C-peptide, insulin, signaling systems, regulation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Correspondence author: Poteryaeva O.N., e-mail: olga_Poteryaeva@mail.ru
Citation: Poteryaeva O.N., Usynin I.F. The role of C-peptide in regulation of the insulin signaling system (systematic review). *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2021; 41 (1): 33–43. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20210103

Введение

В настоящее время все этапы синтеза проинсулина, инсулина и С-пептида окончательно установлены. Инсулин вырабатывается β-клетками поджелудочной железы, главным стимулом к его синтезу и выделению служит повышение концентрации глюкозы в крови. В коротком плече 11-й хромосомы человека локализован ген, кодирующий первичную структуру предшественника инсулина – белка массой 11,5 кДа, состоящего из 110 аминокислотных остатков (АКО). Препроинсулин включает в себя последовательно расположенные сигнальный пептид, цепи А и В и соединительный пептид, или С-пептид. Для прохождения синтезируемой молекулы через гидрофобную липидную мембрану эндоплазматического ретикулума необходимо отщепление сигнального пептида (24 АКО), после чего образуется молекула проинсулина, из которого в дальнейшем в процессе созревания протеолитическим путем вырезается С-пептид, при этом молекула разделяется на инсулин и инертный пептидный остаток [1].

С-пептид (от англ. connecting peptide) состоит из 31 АКО, имеет формулу $C_{112}H_{179}N_{35}O_{46}$ и молярную массу 3020,29 г/моль [2]. Он несет отрицательный заряд и в физиологических условиях не имеет третичной структуры. Изоэлектрическая точка (pI) С-пептида равна 3,45 из-за большого числа отрицательно заряженных АКО. Не содержит ароматических аминокислот, проявляя хорошую растворимость в водных растворителях [3, 4]. С-пептид попадает в кровь в концентрации, эквимолярной концентрации инсулина. Период полувыведения инсулина из плазмы крови составляет 2–3 мин, а С-пептида – около 30 мин. Основная часть инсулина (80 %) подвергается протеолитическому распаду в печени, остальная часть – в почках, жировых и мышечных клетках. С-пептид главным образом катаболизируется в почках, при этом его небольшая часть выделяется с мочой. По содержанию С-пептида в крови можно косвенно судить об инсулин-секретирующей способности островкового аппарата поджелудочной железы [3].

Значительное количество информации посвящено структуре и функциям инсулина, его рецептору и последствиям нарушения инсулиновой сигнальной системы. Однако литературы, рассматривающей регуляторную и диагностическую роль исходной молекулы проинсулина и образующегося из него С-пептида, недостаточно. Роль проинсулина в регуляции метаболических путей и сохранении функциональной активности клеток в физиологических условиях, в процессе старения и при патологии обсуждалась в недавнем обзоре [5]. Ранее считалось, что основной функцией С-пептида на этапе синтеза биологически активной молекулы инсулина является стабилизация ее структуры за счет правильной укладки его А- и В-цепей и их сшивки дисульфидными связями. Взаимодействие N-концевого участка С-пептида с инсулином обеспечивает правильное сворачивание всей молекулы и ее сохранение в биологически активной форме в секреторных гранулах β-клеток. В отсутствие С-пептида и катионов цинка синтезированный *de novo* инсулин быстро агрегирует с образованием амилоидоподобных фибрилл, что приводит к гибели β-клеток и развитию сахарного диабета (СД) [4, 6]. Цель данного обзора – дать представление о С-пептиде как о биоактивной эндогенной молекуле, которая не только участвует в процессинге инсулина в секреторных гранулах панкреатических β-клеток, но и оказывает важное регуляторное влияние на инсулиновую сигнальную систему.

С-пептид – эндогенный пептид с собственной биологической активностью. В течение многих лет С-пептид считался биологическим побочным продуктом процессинга инсулина. За последние годы появилось много новой инфор-

мации, свидетельствующей о том, что он обладает собственной биологической активностью и терапевтическим потенциалом. Обсуждаются физиологические эффекты С-пептида, свидетельствующие о его положительном влиянии на функции многих органов и тканей, в том числе почки, нервную систему, сердце, сосудистый эндотелий и микроциркуляцию крови. Свое положительное влияние С-пептид оказывает на ранних стадиях развития функциональных и структурных нарушений, вызванных СД [7]. Физиологические эффекты С-пептида описаны в монографии [2] и обзоре [8].

Действие С-пептида на ткани осуществляется через внутриклеточные сигнальные пути после связывания со специфическим рецептором на клеточной мембране [3, 9]. Далее передача сигналов осуществляется через G-белки и Ca^{2+}-зависимые пути, что приводит к активации и повышенной экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (NO), Na^+/K^+-АТР-азы и транскрипционных факторов (PPARγ, GREB, ATF-1/2, NF-κB), участвующих в противовоспалительных, антиоксидантных, антиапоптотических и других внутриклеточных защитных механизмах [2, 8].

Экспериментальные исследования и клинические наблюдения установили, что С-пептид оказывает защитное действие на функцию почек при диабетической нефропатии. Его основные положительные эффекты проявляются в виде уменьшения скорости фильтрации, протеинурии и альбуминурии, экспрессии коллагена подоцитами, экспансии мезангиального матрикса и почечной гипертрофии [10]. Благодаря С-пептиду происходило улучшение функциональной активности почек за счет активации Na^+/K^+-АТФ-азы и эндотелиальной синтазы NO в эфферентных артериолах и снижения апоптоза в проксимальных почечных канальцах. По мнению исследователей, С-пептид, обладая благотворным влиянием на почки, может быть использован как нефропротектор при СД [11, 12].

В физиологических концентрациях С-пептид улучшает функцию периферической нервной системы при СД 1 типа посредством NO-чувствительного нейроваскулярного механизма или путем активации Na^+/K^+-АТФазы, способствуя тем самым снижению задержки Na^+ и частичному устранению внутриаксонального отека. В результате стимуляции С-пептидом транскрипционных факторов, регулирующих цитопротекторные, антиапоптотические и противовоспалительные клеточные эффекты, происходит восстановление нарушенной структуры миелиновых волокон периферической нервной ткани [7]. Введение С-пептида животным с экспериментальным диабетом или пациентам с СД 1 типа заметно увеличивало скорость проведения нервного импульса или снижало порог восприятия вибрации [13].

Лечение С-пептидом мышей со стрептозотоциновым диабетом предотвращает у них развитие ретинопатии: уменьшается проницаемость сосудов, что предупреждает макулярный отек, развитие множественных геморрагий и активацию нейродегенеративных процессов в сетчатке [7]. Интравитреальное введение С-пептида мышам ингибирует проникновение в сетчатку декстрана, меченного флуоресцентным красителем FITC, что свидетельствует о восстановлении гематоретинального барьера. С-пептид ингибирует генерацию активных форм кислорода (АФК), опосредованную фактором роста эндотелия сосудов (VEGF). Подобный эффект наблюдали при использовании моноклональных антител к VEGF и соединений, нейтрализующих АФК (N-ацетилцистеин и тролокс). Заместительная терапия С-пептидом является перспективной терапевтической стратегией для профилактики диабетической ретинопатии путем ингибирования проницаемости сосудов, опосредованной АФК [14]. В клетках ARPE-19 пигментного эпителия сетчатки человека С-пептид усиливал экспрессию генов, необходимых для функционирования этих клеток, что предотвращало передифференцировку их по мезенхимоподобному фенотипу в условиях высокого уровня глюкозы [15]. Выявлена отрицательная корреляция между содержанием С-пептида в крови у пациентов с СД 2 типа и развитием тяжелых форм диабетической ретинопатии [16]. Эти факты подтверждают возможность использования С-пептида в качестве эффективного агента для лечения диабетической болезни глаз.

В условиях *in vitro* и *in vivo* показано, что в эндотелиальных клетках С-пептид смягчает вызванные гипергликемией воспалительные реакции, нормализуя уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов в плазме крови. С-пептид замедляет или предотвращает апоптоз путем ингибирования НАДФН-оксидазы, снижения активности каспазы-3 и индукции синтеза антиапоптотического белка Bcl-2. Кроме того, С-пептид ингибирует экспрессию молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 и Е-селектина, что в конечном итоге снижает риск развития микрососудистых осложнений при СД [7].

В физиологических концентрациях С-пептид уменьшает образование АФК в эндотелиальных клетках у мышей с диабетом, индуцированным

стрептозотоцином. Этот эффект опосредован ингибированием НАДФН-оксидазы, являющейся основным источником генерации АФК в присутствии высокой концентрации глюкозы (С-пептид ингибировал активность фермента на 25 % [17]), а также подавлением активности проапоптотического фермента трансглутаминазы-2 [18] или модуляцией деятельности АМФ-активируемой протеинкиназы [19].

Трудно представить физиологическую или патофизиологическую ситуацию, в которой клетки *in vivo* подвергались бы воздействию С-пептида в отсутствие инсулина. Однако у больных СД 1 типа нарушается секреция обеих молекул, при этом они получают только инсулиновую терапию, без замены С-пептида. У пациентов потеря С-пептида, по-видимому, не вызывает каких-либо немедленных вредных эффектов, однако у большинства из них в какой-то момент жизни, обычно через десять или более лет после начала заболевания, развивается микрососудистая дисфункция (ретинопатия, невропатия, нефропатия или нарушения в заживлении ран), что позволяет предположить важность участия С-пептида в длительном поддержании эндотелиальной функции [20]. Интересно, что у пациентов с СД 1 типа более высокий уровень С-пептида в плазме крови положительно и достоверно коррелирует со снижением частоты эндотелиальной дисфункции и возникновением микрососудистых заболеваний [21, 22]. С-пептид, вводимый в течение трех месяцев в качестве заместительной терапии больным с ранними признаками диабетической невропатии, восстанавливает микрососудистую дисфункцию и улучшает состояние нервной системы, что также является доказательством его роли в нормальной функции эндотелия [3, 23].

Специфическое связывание С-пептида с клеточными мембранами. Многочисленные исследования показали, что С-пептид специфически связывается с множеством типов клеток, включая фибробласты кожи человека, клетки почечных канальцев и эндотелиоциты [7]. Имеются доказательства, подтверждающие специфическое взаимодействие С-пептида с мембранами через клеточный рецептор GRP146 [15], инсулин же опосредует свой сигнал через рецепторную тирозинкиназу [24]. На клетках почечных канальцев человека установлено, что меченый родамином С-пептид вытесняется из мембранной фракции клетки избытком немеченого С-пептида и его С-концевого пентапептида, но не инсулином, проинсулином, нейропептидом Y, инсулиноподобными факторами роста (IGF-I, IGF-II), что свидетельствует о специфичности его связывания. Показано, что С-пептид и его С-концевой пентапептид связываются с рецептором клеточной мембраны, функционально сопряженным с G-белками ингибирующего типа ($G_{i/o}$). Обработка коклюшным токсином (ингибитор $G_{i/o}$-белков) значительно угнетала специфическое связывание С-пептида с мембраной [2, 25].

Эксперименты подтверждают существование специального рецептора для С-пептида (G-protein-coupled receptor, GPCR). Предполагают, что рецептор GRP146 непосредственно вовлечен в реализацию регуляторных эффектов С-пептида. Методом поэтапного нокдауна GRP146 продемонстрировано, что влияние С-пептида на внутриклеточную передачу сигнала блокируется малыми интерферирующими РНК (siRNA). Инкубация с антителами к внеклеточному домену GPR146 полностью блокировала влияние С-пептида, но не инсулина, на высвобождение АТФ из эритроцитов человека [26]. Рецептор GRP146, состоящий из 333 АКО, относится к суперсемейству рецепторов серпантинного типа, семь раз пронизывающих плазматическую мембрану, и функционально взаимодействует с гетеротримерными G-белками [27]. Анализ его первичной структуры, проведенный с помощью программы Basic Local Alignment Search Tool (BLASTp), выявил умеренную гомологию (от 20 до 24 %) рецептора GRP146 с хемокиновыми рецепторами, рецепторами интерлейкина-8, бомбезина, тахикинина, соматостатина, ангиотензина-II, нейрокинина и ряда других пептидных гормонов. Степень идентичности с эстрогеновым рецептором GRP30 составила до 44% [2]. Однако попытки идентифицировать взаимосвязь С-пептида с этим рецептором пока остаются безуспешными.

Регуляция С-пептидом инсулиновой сигнальной системы. Установлено, что С-пептид модифицирует сигнальные механизмы, которые обычно связаны с рецептором инсулина, характер этого влияния зависит от стехиометрического соотношения С-пептида и инсулина: в присутствии высоких концентраций последнего С-пептид ингибирует инсулиновую сигнальную систему, при низких концентрациях гормона – повышает, действуя как инсулиномиметик. В основе активирующего эффекта С-пептида лежит его способность вызывать диссоциацию неактивных гексамерных комплексов инсулина [2, 28]. Во время биосинтеза проинсулин собирается в секреторных гранулах, где присутствует в виде растворимых гексамеров, содержащих Zn^{2+} и Ca^{2+}; при отщеплении С-пептида растворимость изменяется, и они кристаллизуются. Чтобы быть биологически активным, инсулин должен быть в мономерной форме.

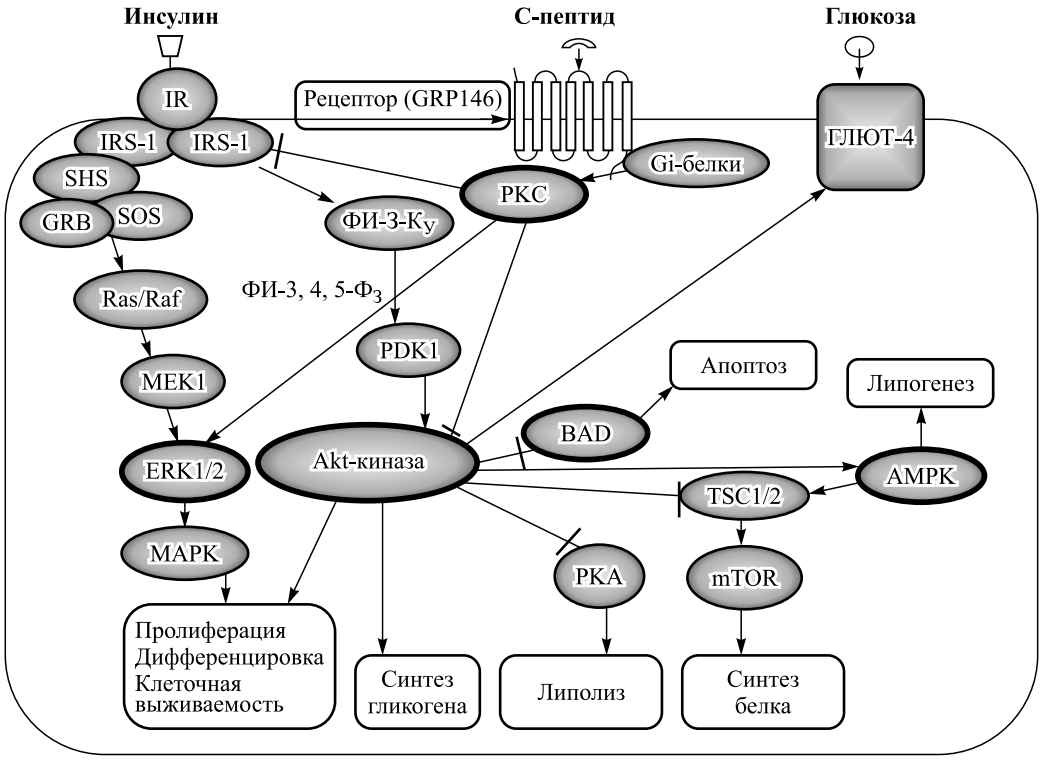

Рис. 1. *Предполагаемые пути пересечения сигнальных каскадов С-пептида и инсулина (адаптировано из [20]). С-пептид пересекается с инсулиновыми сигнальными каскадами в нескольких точках (выделены жирным шрифтом). Активирование протеинкиназы С, Akt-киназы, PI3K (ФИ-3,4,5-Ф$_3$) регулирует множественные метаболические события, а также пролиферацию, рост и выживание клеток. IR – инсулиновый рецептор; IRS-1 – инсулинорецепторный субстрат-1; ГЛЮТ-4 – глюкозный транспортер 4 типа; AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа; Akt-киназа – протеинкиназа B; PKC – протеинкиназа C; PKA – протеинкиназа A; BAD – белок; обладающий проапоптотическим действием*

Fig. 1. *A suggested schema of C-peptide and insulin signaling cascades intersection (adapted from [20]). C-peptide intersects with insulin signaling pathways at several points (shown in bold). Activation of protein kinase C, Akt kinase, PI3K regulates multiple metabolic events, as well as cell proliferation, growth and survival. IR – insulin receptor; IRS-1 – insulin receptor substrate 1; ГЛЮТ4 – glucose transporter type 4; AMPK – AMP-activated protein kinase; Akt-киназа – protein kinase B; PKC – protein kinase C; PKA – protein kinase A; BAD – pro-apoptotic protein*

Предполагают, что С-пептид функционирует как шаперон, предотвращающий агрегацию зрелого инсулина. Некоторые катионы, в том числе Zn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Cr^{3+}, повышают эффективность взаимодействия С-пептида с комплексами инсулина, в то время как удаление этих катионов с помощью комплексообразователей (ЭДТА), напротив, препятствуют этому взаимодействию. Для разрушения олигомеров инсулина важен N-терминальный конец С-пептида 1-11, включая Glu11 [28].

Наряду с этим С-пептид модулирует функциональную активность инсулинового сигналинга на различных его этапах: на уровне инсулинового рецептора (ИР), инсулинорецепторного субстрата-1 (IRS-1), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK), Akt-киназы (протеинкиназа B, AKT). Потенциально возможные взаимодействия между С-пептидом и инсулином представлены на рис. 1 [20].

Инсулин связывается со специфическим ИР и проявляет нисходящие эффекты посредством стимуляции PI3K, AKT, AMPK и MAPK-пути. Все эти пути, являясь ответственными за множественные метаболические события при действии инсулина, также служат мишенями для действия С-пептида через протеинкиназу С. С-пептид может взаимодействовать с индуцированными инсулином сигнальными каскадами в нескольких точках (см. рис. 1, выделены жирным шрифтом).

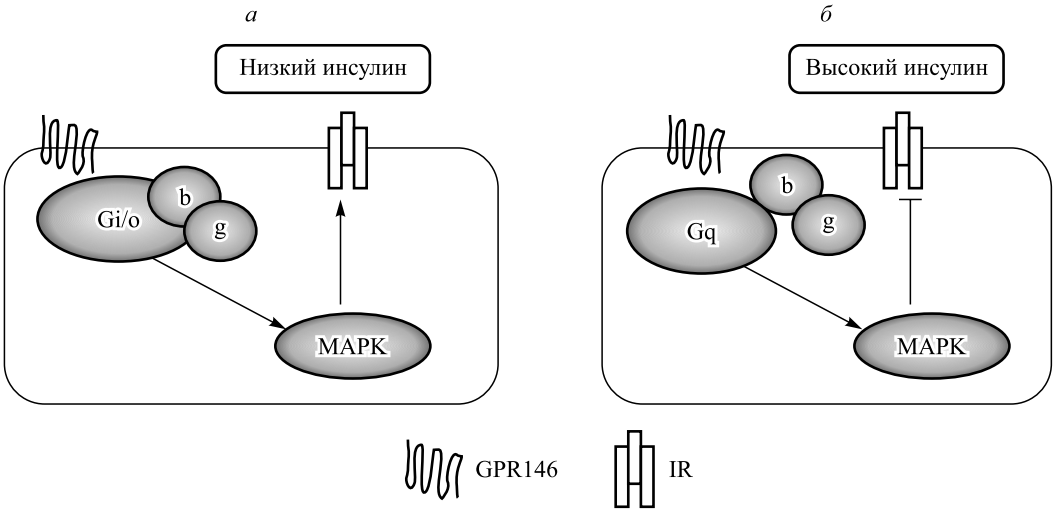

Рис. 2. *Предполагаемая модель участия С-пептида в модулировании передачи сигналов инсулина (адаптировано из [20]). В условиях низкой концентрации инсулина (а) С-пептид через специфический рецептор связывается с белками Gi/o, что приводит к усилению активации связанных с инсулином сигнальных путей MAPK (включая активацию нижестоящего AKT). В условиях высокого уровня инсулина (b) рецептор С-пептида связывается с Gq с последующей активацией протеинкиназы С и ослаблением каскадов передачи сигналов, связанных с инсулином*

Fig. 2. *A suggested modelfor the involvement of C-peptide in modulating insulin signaling (adapted from [20]). In low insulin concentration (a), C-peptide binds through a specific receptor to Gi/o proteins, which leads to an increase in the activation of insulin-associated MAPK signaling pathways (including the activation of downstream AKT). In high insulin conditions (b), C-peptide receptor binds to Gq, resulting in subsequent PKC activation, followed by a weakening of insulin-related signaling pathways*

Показано, что С-пептид усиливает фосфорилирование тирозина IRS-1, что способствует индукции PI3K и AKT [29]. Результатом активации AKT являются транслокация в плазматическую мембрану транспортера GLUT4 с последующей стимуляцией захвата глюкозы клетками, а также регуляция других метаболических эффектов (см. рис. 1). Модулирование ERK1/2-пути С-пептидом ведет к фосфорилированию ряда факторов транскрипции (PPARγ, GREB, ATF-1/2, NF-κB), которые контролируют пролиферацию, рост и выживание клеток (см. рис. 1) [20].

Механизм функционирования С-пептида и инсулина пока полностью не установлен. Возможно, они взаимодействуют на уровне пептидов, действуя как аллостерические модуляторы своих рецепторов. Вероятно**,** что С-пептид регулирует эффекты инсулина внутриклеточно на уровне вторичных сигнальных молекул. Предполагаемый рецептор С-пептида, GPR146, очевидно, участвует в переключении G-белка в зависимости от концентрации инсулина [15]. Таким образом, С-пептид, действуя через специфический рецептор, может либо усиливать, либо ослаблять передачу сигналов инсулина посредством активации или ингибирования соответствующих нижестоящих сигнальных молекул. В условиях уменьшения содержания инсулина (рис. 2) рецептор GPR146 связывается с $G_{i/o}$-белками, что приводит к индукции связанных с гормоном сигнальных путей MAPK, включая активацию AKT. При высоких концентрациях инсулина рецептор взаимодействует с $G_{q/11}$-белками, стимулируя протеинкиназу С с последующим ослаблением передачи сигналов, связанных с инсулином [20].

Инсулиномиметическое действие С-пептида. **Синергизм.** Молекулярные механизмы инсулиномиметического действия С-пептида были исследованы в клетках скелетных мышц крыс. На клеточных культурах миобластов L-6 и миоцитов L-6 показано, что синтетический крысиный С-пептид в физиологических концентрациях (0,3–3,0 нМ) стимулирует тирозинкиназу ИР, фосфорилирование тирозина IRS-1, активность PI3K, фосфорилирование MAPK. Скремблированный С-пептид (вариант с рандомизированной последовательностью тех же АКО, он же контроль) не оказывал никаких эффектов. Ингибитор PI3K вортманнин блокировал синтез гликогена, индуцированный С-пептидом. Установлено, что при низкой концентрации инсулина (до 10 нМ), в отличие от высокой (100 нм), С-пептид усиливал ме-

таболические эффекты гормона. Интересно, что инсулин в дозе 100 нМ максимально увеличивал синтез гликогена, что в присутствии С-пептида достигалось при меньшей концентрации гормона (10 нМ). Аналогичный эффект получен при поглощении [^{14}C]-метиламиноизомасляной кислоты [29].

На синергизм действия указывают данные о совместном влиянии инсулина и С-пептида на экспрессию мРНК c-Fos (ген раннего реагирования) в культуре клеток ARPE-19. Монослой эпителиальных клеток ARPE-19 образует гематоретинальный барьер и играет важную метаболическую роль в сетчатке. Комбинация 1 нМ инсулина и 1нМ С-пептида почти в четыре раза усиливала экспрессию мРНК c-Fos, в то время как обработка молекулами по отдельности характеризовалась очень низкой эффективностью. Кроме того, при высокой концентрации глюкозы (25 мМ) эффект полностью отсутствовал, что предполагает зависимость передачи сигналов С-пептидом в клетках этого типа от концентрации внеклеточной глюкозы и от его взаимодействия с инсулином [15].

В клетках нейробластомы SH-SY5Y человека в присутствии инсулина (4 нМ) С-пептид (3 нМ) проявлял синергетический эффект на пролиферацию клеток и разрастание нейритов. С-пептид значительно увеличивал аутофосфорилирование ИР, стимулировал активацию PI3K и митогенактивированного белка p38, усиливал экспрессию и транслокацию NF-κB, активировал экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2. В условиях интенсивного апоптоза, индуцированного высокой концентрацией глюкозы, С-пептид усиливал антиапоптотическое действие инсулина [30]. У пациентов с СД 1 типа без структурных повреждений сетчатки обнаружено проникновение флуоресцеина через гематоретинальный барьер, что считается ранним показателем повреждения сосудов сетчатки. При совместном введении инсулина и С-пептида попадание метки в сетчатку глаза было на 30 % меньше, чем при монотерапии инсулином [31].

Ранние исследования продемонстрировали, что физиологические концентрации С-пептида пролонгируют гипогликемическое состояние, вызванное действием инсулина. Показано, что С-пептид человека дозозависимо стимулирует транспорт глюкозы в скелетных мышцах человека через механизм, независимый от ИР и активности тирозинкиназы. Катехоламины не оказывали влияния на транспорт глюкозы, опосредованный С-пептидом, в отличие от инсулина [32]. У крыс со стрептозотоциновым диабетом физиологические концентрации С-пептида пролонгировали гипогликемическое состояние, вызванное инсулином, и значительно (на 80–90 %) увеличивали утилизацию глюкозы, чего не наблюдалось у здоровых контрольных крыс. Увеличение содержания С-пептида не дало дополнительных эффектов [33], что связано с относительно небольшим количеством и высокой аффинностью его рецепторов на клеточных мембранах, благодаря чему достигается насыщение при низких концентрациях С-пептида [13]. Показано, что у крыс с СД 1 типа совместное интраназальное введение инсулина и С-пептида значительно усиливало гипогликемический эффект при отсутствии заметных изменений концентрации инсулина в кровотоке. Уровень глюкозы при лечении только инсулином снижался на 39 %, при совместном введении – на 58 % [6].

У крыс подкожное комбинированное введение инсулина и С-пептида приводило к повышению биоактивности инсулина на уровне тканевого поглощения глюкозы, внутриклеточной сигнализации и активации ферментов [34]; эугликемический гиперинсулинемический клэмп позволил определить увеличение (на 35 и 50 % соответственно по сравнению с отдельными инъекциями инсулина или С-пептида) скорости захвата глюкозы тканями за счет активации фосфорилирования AKT и киназы 3β-гликогенсинтазы. Эти эффекты, вероятно, осуществлялись благодаря усилению С-пептид-опосредованной дезагрегации гексамерного инсулина в его мономерную, биологически активную форму. В эксперименте использовали инсулин для клинического применения, который присутствует в гексамерной форме. Интересно, что введение аналога инсулина «Лизпро» с ультракоротким действием и С-пептида не приводило к вышеперечисленным эффектам. В данной модификации инсулина лизин и пролин «переставлены» местами (LysB28 и ProB29), в результате чего связывание гормона с рецептором не изменяется, но блокируется или уменьшается его агрегация в гексамеры. В результате того, что инсулин частично или полностью дезагрегирован, дальнейшее влияние С-пептида на его агрегацию не ожидается [34]. Кроме того, в исследовании *in vitro* с использованием поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, метод определения констант связывания макромолекул) и масс-спектрометрии показано, что С-пептид в диапазоне 10–50 мкМ облегчает дезагрегацию гексамерного инсулина, что может увеличивать биодоступность гормона [35].

При проведении эугликемического клэмпа у пациентов СД 1 типа введение С-пептида в концентрации 0,8 нМ сопровождалось увеличением утилизации глюкозы на 25 % за счет усиления ее

захвата мышцами или снижения глюконеогенеза в печени [36], первый путь подтвержден при прямом измерении поглощения глюкозы в мышцах предплечья [31].

В двойном слепом рандомизированном исследовании пациенты СД 1 типа получали обычный инсулин, смешанный с эквимолярным количеством биосинтетического человеческого С-пептида в течение одного месяца в виде подкожных инъекций с использованием инсулиновой помпы. В конце исследования у больных достоверно снижалось содержание фруктозамина и гликированного гемоглобина; концентрация глюкозы в крови натощак, как правило, также была ниже в группе, получавшей инсулин и С-пептид. У лиц, получавших только инсулин, статистически значимых изменений не продемонстрировано [31]. Более поздние клинические наблюдения также показали, что совместное введение инсулина и С-пептида путем подкожной инфузии в течение одного месяца пациентам с СД 1 типа приводит к улучшению гликемического контроля и снижению потребности в инсулине. Этот физиологический эффект усиления биодоступности инсулина был интерпретирован вкладом С-пептида на дезагрегацию гормона в месте введения инсулина с образованием его мономеров [35].

Возможно, что при введении С-пептида происходит локальное высвобождение NO, приводящее к усилению подкожного кровотока, что, в свою очередь, может увеличить абсорбцию инсулина и, следовательно, утилизацию глюкозы [37]. Интересно, что в гладкомышечных стенках артериол влияние С-пептида на расширение сосудов наблюдали только в присутствии низких концентраций инсулина [38]. L-NMMA (N^G-monomethyl-L-arginine), известный ингибитор NO-синтазы, блокировал на 85 % утилизацию глюкозы, вызванную С-пептидом, что подтверждает данную гипотезу [32]. Позднее было показано, что С-пептид, как и инсулин, стимулирует концентрационно-зависимую индукцию транскрипционной активности PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ). Последние улучшают чувствительность тканей к инсулину и повышают опосредованную гормоном утилизацию глюкозы периферическими тканями [39].

Совместное введение С-пептида с инъекционными формами инсулина существенно повышает эффективность терапии, что позволяет снизить дозу гормона. При интраназальной инъекции С-пептида в различных экспериментальных моделях СД показано, что наилучший эффект на функции ЦНС и на периферический гомеостаз оказывает совместное введение С-пептида и инсулина, взятых в эквимолярных концентрациях. Полагают, что в основе синергизма их действия лежит стабилизация конформации инсулина, в которой гормон с наибольшей эффективностью взаимодействует с инсулиновыми рецепторами в нейронах и глиальных клетках. Положительные эффекты совместно вводимых С-пептида и инсулина на метаболические и гормональные показатели у крыс с моделями СД 1 и 2 типов были более выражены в сравнении с монотерапией. Одним из механизмов восстанавливающего эффекта совместного введения обоих препаратов была нормализация основных мишеней С-пептида и инсулина – АКТ, киназы 3β-гликогенсинтетазы, ключевых эффекторных компонентов 3-фосфоинозитидного пути в гипоталамусе диабетических крыс [6].

В двойном слепом рандомизированном исследовании больные СД 1 типа с микроальбуминурией получали инсулин вместе с С-пептидом человека подкожно в течение трех месяцев, другая группа пациентов получала инсулин и плацебо. После окончания приема препаратов гликемический контроль незначительно улучшился в обеих группах, однако в группе «инсулин + С-пептид» экскреция альбумина прогрессивно снижалась, а в группе «инсулин + плацебо» альбуминурия имела тенденцию к увеличению. Авторы предполагают, что совместное применение инсулина и С-пептида в течение трех месяцев может предотвращать начинающуюся нефропатию у больных СД 1 типа за счет снижения экскреции альбумина с мочой [7].

Различие эффектов инсулина и С-пептида. Сочетанное применение С-пептида с инсулином может приводить к биологическому эффекту, который отличается от такового для каждого по отдельности. В частности, это важно для нормального функционирования обоих пептидов в эритроцитах [40]. Инкубация эритроцитов человека с одним инсулином в концентрации, необходимой для регулирования уровня глюкозы в крови у лиц с инсулинрезистентностью и СД, ингибирует высвобождение АТФ. Как известно, АТФ в условиях низкого напряжения кислорода стимулирует выработку NO в эндотелиальных клетках и вызывает местную вазодилатацию, усиливая кровоток [41]. У больных СД 2 типа высвобождение АТФ из эритроцитов нарушено и дополнительно усугубляется назначением инсулина. Однако при совместном введении инсулина и С-пептида в физиологических концентрациях и соотношениях последний противодействует неблагоприятным эффектам инсулина на высвобождение АТФ [18, 19, 20].

Было показано, что С-пептид может оказывать влияние на липидный обмен путем стиму-

лирования образования жирных кислот (ЖК) из глюкозы и превращения их в триацилглицериды для краткосрочного накопления в мышечных клетках. Роль инсулина, в отличие от С-пептида, заключается в регуляции транспорта жирных кислот в жировую ткань для их долгосрочного хранения [42].

Заключение

Имеющиеся в настоящее время факты свидетельствуют о том, что С-пептид обладает собственной биологической активностью и терапевтическим потенциалом. Экспериментальные и клинические исследования показали, что он осуществляет физиологические эффекты через сигнальные пути, связываясь со специфическим рецептором на клеточной мембране. Внутриклеточная передача сигналов осуществляется через G-белок и Ca^{2+}-зависимые пути, что приводит к активации и повышенной экспрессии эндотелиальной синтазы NO, Na^{+}/K^{+}-ATP-азы и важных факторов транскрипции, участвующих в апоптозе, противовоспалительных и других внутриклеточных защитных механизмах. Существует много фактов об их совместном влиянии на транспорт глюкозы, аминокислот, синтез гликогена, пролиферацию клеток. Обнаружены антиапоптотический эффект и участие в устранении эндотелиальной дисфункции. Механизмы взаимодействия инсулина и С-пептида до сих пор изучены недостаточно. Основываясь на литературных данных, можно предположить несколько вариантов взаимодействия:

1) на уровне пептидов, действующих как аллостерические модуляторы своих рецепторов;

2) С-пептид регулирует влияние инсулина на уровне вторичных сигнальных молекул (IRS-1, PI3K, MAP-киназ, AKT) через собственный рецептор, который переключает G-белок в зависимости от концентрации инсулина;

3) С-пептид индуцирует диссоциацию неактивных гексамерных комплексов инсулина, функционируя как шаперон, предотвращающий агрегацию зрелого инсулина.

Характер влияния С-пептида на инсулиновую сигнальную систему зависит от концентрации гормона. Предполагают, что при низкой концентрации последнего рецептор С-пептида связывается с $G_{i/o}$-белками, что приводит к усилению активации индуцированных инсулином процессов (инсулиномиметическое действие). В условиях высокого уровня инсулина рецептор взаимодействует с $G_{q/11}$-белками, вследствие чего активируется протеинкиназа С и ослабляются каскады передачи сигналов, связанных с инсулином.

Таким образом, существует тесное пересечение сигнальных путей, опосредуемых инсулином и С-пептидом, что позволяет этим регуляторным молекулам, с одной стороны, функционально замещать друг друга, а с другой – конкурировать за регуляцию метаболических путей. Важно отметить, что совместное введение С-пептида с инъекционными формами инсулина существенно повышает эффективность инсулиновой терапии, что позволяет снизить дозу гормона. Кроме того, комбинированное введение позволяет избежать впоследствии осложнений СД, таких как ретинопатия, нейропатия, нефропатия, при которых развивается микрососудистая дисфункция. Клинические исследования С-пептида продолжаются.

Список литературы / References

1. Балаболкин М.И. Эндокринология: учебник. 2-е изд. М.: Универсум паблишинг; 1998. 416 с.

Balabolkin M.I. Endocrinology. 2ts ed. Moscow: Universum Publishing, 1998. 416 p. [In Russian].

2. Шпаков А.О., Деркач К.В., Басова Н.Е. С-пептид проинсулина. СПб.: Политех-Пресс, 2019. 210 с.

Shpakov A.O., Derkach K.V., Basova N.E. Proinsulin C-peptide. Saint-Petersburg: Politekh-Press, 2019. 210 c. [In Russian].

3. Wahren J. C-peptide and the pathophysiology of microvascular complications of diabetes. *J. Intern. Med.* 2017; 281 (1): 3–6. doi: 10.1111/joim.12541

4. Landreh M., Johansen J., Wahren J., Jörnvall H. The structure, molecular interactions and bioactivities of proinsulin C-peptide correlate with a tripartite molecule. *Biomol. Concepts*. 2014; 5 (2): 109–118. doi: 10.1515/bmc-2014-0005

5. Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Диагностическое значение и регуляторные функции проинсулина. *Клин. лаб. диагност*. 2019; 64 (7): 397–404. doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-397-404

Poteryaeva O.N., Usynin I.F. Diagnostic value and regulatory functions of proinsulin. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019; 64 (7): 397–404. [In Russian]. doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-397-404

6. Деркач К.В., Перминова А.А., Бузанаков Д.М., Шпаков А.О. Интраназально вводимый С-пептид проинсулина усиливает стимуляцию инсулином активности инсулиновой системы в гипоталамусе диабетических крыс. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2019; 167 (3): 324–329.

Derkach K.V., Perminova A.A., Buzanakov D.M., Shpakov A.O. Intranasal administration of proinsulin C-peptide enhances the stimulating effect of insulin on insulin system activity in the hypothalamus of diabetic rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019; 167 (3): 351–355. doi: 10.1007/s10517-019-04525-W

7. Wahren J., Larsson C. C-peptide: new findings and therapeutic possibilities. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2015; 107 (3): 309–319. doi: 10.1016/j.diabres.2015.01.016

8. Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Молекулярные механизмы действия и физиологические эффекты С-пептида проинсулина (систематический обзор). *Биомед. химия.* 2020; 66 (3): 196–207. doi: 10.18097/PBMC20206603196

Poteryaeva O.N., Usynin I.F. Molecular mechanisms of action and physiological effects of proinsulin C-peptide (systematic review). *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2020; 66 (3): 196–207. [In Russian]. doi: 10.18097/PBMC20206603196

9. Шпаков А.О., Гранстрем О.К. С-пептид: структура, функции и молекулярные механизмы действия. *Цитология*. 2013; 55 (1): 16–27.

Shpakov A.O., Granstrem O.K. C-peptide structure, functions and molecular mechanisms of action. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology.* 2013; 55 (1): 16–27. [In Russian].

10. Yaribeygi H., Maleki M., Sathyapalan T., Sahebkar A. The effect of C-peptide on diabetic nephropathy: a review of molecular mechanisms. *Life Sci.* 2019; 237: 116950. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116950

11. Brunskill N.J. C-peptide and diabetic kidney disease. *J. Inter. Med.* 2017; 281 (1): 41–51. doi: 10.1111/joim.12548

12. Li Y., Li X., He K., Li B., Liu K., Qi J., Wang H., Wang Y., Luo W. C-peptide prevents NF-kb from recruiting p300 and binding to the iNOS promoter in diabetic nephropathy. *FASEB Journal*. 2018; 32 (4): 2269–2279. doi: 10.1096/fj201700891R

13. Wahren J., Foyt H., Daniels M., Arezzo J.C. Long-acting C-peptide and neuropathy in type 1 diabetes: A 12-month clinical trial. *Diabetes Care*. 2016; 39 (4): 596–602. doi: 10.2337/dc15-2068

14. Lim Y.-C., Bhatt M.P., Kwon M.H., Park D., Lee S., Choe J., Hwang J., Kim Y.M., Ha K.S. Prevention of VEGF-mediated microvascular permeability by C-peptide in diabetic mice. *Cardiovasc. Res.* 2014; 101 (1): 155–164. doi: 10.1093/cvr/cvt238

15. Kolar G.R., Grote S.M., Yosten G.L.C. Targe_ting orphan G-protein coupled receptors for the treatment of diabetes and its complication: C-peptide and GPR146. *J. Inter. Med*. 2017; 281 (1): 25–40. doi: 10.1111/joim.12528

16. Chung J.O., Cho D.H., Chung M.Y. Relationship between serum C-peptide level and diabetic retinopathy according to estimated glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Complications.* 2015; 29 (3): 350–355. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.12.013

17. Cifarelli V., Geng X., Styche A., Lakomy M., Trucco M., Luppi P. C-peptide reduces high glucose-induced apoptosis of endothelial cells and decreases NAD(P)H-oxidase reactive oxygen species generation. *Diabetologia*. 2011; 54 (10): 2702–2712. doi: 10.1007/s00125-011-2251-0

18. Bhatt M.P., Lim Y.C., Hwang J., Na S., Kim Y.M., Ha K.S. C-peptide prevents hyperglycemia0induced endothelial apoptosis through inhibition of reactive oxygen species- mediated transglutaminase 2 activation. *Diabetes.* 2013; 62 (1): 243–253. doi: 10.2337/db12-0293

19. Bhatt M.P., Lim Y.-C., Kim Y.-M., Ha K.-S. C-peptide activates AMPKα and prevents ROS-mediated mitochondrial fission and endothelial apoptosis in diabetes. *Diabetes.* 2013; 62 (11): 3851–3862. doi: 10.2337/db13-0039

20. Yosten G.L.C., Kolar G.R. The physiology of proinsulin C-peptid unanswered questions and a proposed model. *Physiology (Bethesda).* 2015; 30 (4): 327–332. doi: 10.1152/physiol.00008.2015

21. Bo S., Gentile L., Castiglione A., Prandi V., Canil S., Ghigo E., Ciccone G. C-peptide and the risk for incident complications and mortality in type 2 diabetic patients: a retrospective cohort study after a 14-year follow-up. *Eur. J. Endocrinol*. 2012; 167 (2): 173–180. doi: 10.1530/EJE-12-0085

22. Lachin J.M., McGee P., Palmer J.P., DCCT/EDIC Research Group. Impact of C-peptide preservation on metabolic and clinical outcomes in the diabetes control and complications Trial. *Diabetes*. 2014; 63 (2): 739–748. doi: 10.2337/db13-0881

23. Ekberg K., Brismar T., Johansson B.L., Lindstrom P., Juntti-Berggren L., Norrby A., Berne C., Arnqvist H.J., Bolinder J., Wahren J. C-Pepetide replacement therapy and sensory nerve function in type 1 diabetic neuropathy. *Diabetes Care.* 2007; 30 (1): 71–76. doi: 10.2337/dc06-1274

24. Ткачук В.А., Воротников А.В. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину. *Сахар. диабет*. 2014; 2: 29–40. doi: 10.14341/DM2014229-40

Tkachuk V.A., Vorotnikov A.V. Molecular mechanisms of insulin resistance development. *Saharnyy diabet = Diabetes Mellitus.* 2014; 2: 29–40. [In Russian]. doi: 10.14341/DM2014229-40

25. Al-Rasheed N.M., Willars GB., Brunskill N.J. C-peptide signals via Gαi to protect against TNF-α-mediated apoptosis of opossum kidney proximal tubular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17 (4): 986–995. doi: 10.1681/ASN.2005080797

26. Yosten G.L.C., Kolar G.R., Redinger L.J., Samson W.K. Evidence for an interaction between proinsulin C-peptide and GPR146. *J. Endocrinol*. 2013; 218 (2): 986–995. doi: 10.1530/JOE-13-0203

27. Шпаков А.О. Механизмы действия и терапевтический потенциал С-пептида проинсулина. *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 2017; 53 (3): 161–168.

Shpakov A.O. Mechanisms of action and therapeutic potential of proinsulin C-peptide. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary*

Biochemistry and Physiology. 2017; 53 (3): 161-–168. [In Russian].

28. Nerelius C., Alvelius G., Jörnvall H. N-terminal segment of proinsulin C-peptide active in insulin interaction/desaggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010; 403 (3-4): 462–467. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.058

29. Grunberger G., Sima A.A. The C-peptide signaling. *Exp. Diabesity Res*. 2004; 5 (1): 25–36. doi: 10.1080/15438600490424497

30. Li Z.G., Zhang W., Sima A.A. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2003; 19 (5): 375–385. doi: 10.1002/dmrr.389

31. Wahren J., Callas Å, Sima A.A.F. The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2012; 61 (4): 761–772. doi: 10.2337/db11-1423

32. Zierath J.R., Handberg A., Tally M., Wallberg-Henriksson H. C-peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptor and tyrosine kinase activation. *Diabetologia*. 1996; 39 (3): 306–313. doi: 10.1007/BF00418346

33. Li L., Oshida Y., Kusunoki M., Yamanouchi K., Johansson B.L., Wahren J., Sato Y. Rat C-peptide I and C-peptide II stimulate glucose utilization in STZ-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 1999; 42 (8): 958–964. doi: 10.1007/s001250051254

34. Kubota M., Sato Y., Khookhor O., Ekberg K., Chibalin A.V., Wahren J. Enhanced insulin action following subcutaneous co-administration of insulin and C-peptide in rats. *Diabetes Metab. Res. Rev*. 2014; 30 (2): 124–131. doi: 10.1002/dmrr.2471

35. Shafqat J., Melles E., Sigmundsson K., Johansson B.-L., Ekberg K., Alvelius G., Henriksson M., Johansson J., Wahren J., Jörnvall H. Proinsulin C-peptide elicits disaggregation of insulin resulting in enhanced physiological insulin effects. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63 (15): 1805–1811. doi: 10.1007/s00018-006-6204-6

36. Wilhelm B., Kann P., Pfutzner A. Influence of C-peptide on glucose utilization. *Exp. Diabetes Res*. 2008; 2008: 769483. doi: 10.1155/2008/769483

37. Wallerath T., Kunt T., Forst T., Closs E.L., Lehmann R., Flohr T., Gabriel M., Schäfer D., Göpfert A., Pfützner A., Beyer J., Förstermann U. Stimulation of endothelial nitric oxide synthase by proinsulin C-peptide. *Nitric Oxid*. 2003; 9 (2): 95–102. doi: 10.1016/j.niox.2003.08.004

38. Jensen M.E., Messina E.J. C-peptide induces a concentration-dependent dilation of skeletal muscle arterioles only in presence of insulin. *Am. J. Physiol*. 1999; 276 (4): 1223–1228. doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.4.H1223

39. Hills C.E., Brunskill N.J. C-peptide and its intracellular signaling. *Rev. Diabet Stud.* 2009; 6 (3): 138–147. doi: 10.1900/RDS.2009.6.138

40. Richards J.P., Yosten G.L., Kolar G.R., Jones C.W., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S. Low O_2-induced ATP release from erythrocytes of humans with Type 2 diabetes is restored by physiological ratios of C-peptide and insulin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014; 307 (7): 862–868. doi: 10.1152/ajpregu.00206.2014

41. Ellsworth M.L., Sprague R.S. Regulation of blood flow distribution in skeletal muscle: role of erythrocyte-released ATP. *J. Physiol.* 2012; 590 (20): 4985–4991. doi: 10.1113/jphysiol.2012.233106

42. Newsome C.L. Investigation into the biological importance and function of proinsulin C-peptide. *Theses, Dissertations and Capstones.* 2015. 958. Available at: https://mds.marshall.edu/etd/958

Сведения об авторах:

Ольга Николаевна Потеряева, д.м.н., ORCID: 0000-0003-1068-2431, e-mail: olga_Poteryaeva@mail.ru
Иван Федорович Усынин, д.б.н., ORCID: 0000-0003-1752-9034, e-mail: ivan.usynin@niibch.ru

Information about the authors:

Olga N. Poteryaeva, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-1068-2431, e-mail: olga_Poteryaeva@mail.ru
Ivan F. Usynin, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0003-1752-9034, e-mail: ivan.usynin@niibch.ru

Поступила в редакцию 16.09.2020
После доработки 10.11.020
Принята к публикации 01.02.2021

Received16.09.2020
Revision received 10.11.2020
Accepted 01.02.2021