

© ПОТЕРЯЕВА О.Н., УСЫНИН И.Ф., 2019

Потеряева О.Н., Усынин И.Ф.

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ ПРОИНСУЛИНА

НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, 630117, Новосибирск, Россия

*Проинсулин – один из показателей, отображающих функциональную активность поджелудочной железы. При инсулин-независимом диабете соотношение проинсулин/инсулин увеличивается. В обзоре рассмотрены причины возникновения гиперпроинсулинемии и диагностическое значение проинсулина у больных сахарным диабетом 1 и 2 типов. Обсуждается роль проинсулина в регуляции метаболических путей и сохранении функциональной активности клеток в физиологических условиях, во время старения и при патологических процессах. Исследования в этих направлениях обосновывают включение прогормона инсулина в суперсемейство сигнальных факторов. Рассмотрены нейропротекторная активность проинсулина и его потенциал в качестве терапевтического инструмента при нейродегенеративных заболеваниях и дистрофии сетчатки.*

**Ключевые слова:** проинсулин; сахарный диабет; регуляторные функции; обзор.

**Для цитирования:** Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Диагностическое значение и регуляторные функции проинсулина. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 397-404. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-397-404>

Poteryaeva O.N., Usynin I.F.

### DIAGNOSTICS VALUE AND REGULATORY FUNCTIONS OF PROINSULIN

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

*Proinsulin is one of the indicators reflecting the functional activity of the pancreas. In insulin-independent diabetes mellitus the ratio proinsulin / insulin is increased. The review examined the causes of hyperproinsulinemia and the diagnostic value of proinsulin in patients with diabetes mellitus type 1 and 2. The role of proinsulin in the regulation of metabolic pathways and the preservation of the functional activity of cells under physiological conditions, during aging and during pathological processes is discussed. Studies in these areas justify the inclusion of proinsulin in the superfamily of signaling factors. The neuroprotective activity of proinsulin and its potential as a therapeutic tool for neurodegenerative diseases and retinal dystrophy are considered.*

**Key words:** proinsulin; diabetes mellitus; regulatory functions; overview.

**For citation:** Poteryaeva O.N., Usynin I.F. Diagnostics value and regulatory functions of proinsulin. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (7): 397-404 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-397-404>

**For correspondence:** Poteryaeva O.N., Dr. Sci. Med., lead researcher of the laboratory of intercellular interactions; e-mail: [olga\\_Poteryaeva@mail.ru](mailto:olga_Poteryaeva@mail.ru)

#### Information about authors :

Poteryaeva O.N., <http://orcid.org/0000-0003-1068-2431>

Usynin I.F., <https://orcid.org/0000-0003-1752-9034>

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 08.05.2019  
Accepted 15.06.2019

## Синтез и секреция проинсулина

Проинсулин (проИ) был впервые идентифицирован в качестве основного продукта трансляции гена инсулина в лаборатории Дональда Штейнера в 1967 г. Эксперименты, проведенные на  $\beta$ -клетках аденомы поджелудочной железы, привели к открытию белка с молекулярной массой 10,8 kDa. При расщеплении белка трипсином был получен инсулиноподобный материал, который стали рассматривать как белок-предшественник инсулина с очень низкой метаболической активностью, названный проИ [1]. В начале 90-х годов прошлого столетия были обнаружены ферменты, ответственные за эндопротеолитическое расщепление проИ на инсулин и С-пептид,

белок PC2, состоящий из 638 аминокислотных остатков (АКО) и белок PC3 (PC1), состоящий из 753 АКО [2]. Оба белка являются кальций-зависимыми сериновыми эндопептидазами, относящимися к классу субтилизинов. После селективного расщепления С-пептида от А-цепи по Lys-Arg или от В-цепи по Arg-Arg образуются продукты с С-концевыми основными остатками, которые затем удаляются карбоксипептидазой E [1, 2].

В настоящее время все этапы синтеза проИ, С-пептида и инсулина окончательно установлены [3]. Инсулин вырабатывается  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, главным стимулом к синтезу и выделению инсулина служит повышение концентрации глюкозы в крови. У человека ген, кодирующий первичную структуру предшественника инсулина, локализован в коротком плече 11 хромосомы. На рибосомах шероховатой эндоплазматической сети синтезируется пептид-предшественник – препроинсулин (11,5 kDa), который накапливается на цито-

**Для корреспонденции:** Потеряева Ольга Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. механизмов межклеточных взаимодействий; e-mail: [olga\\_Poteryaeva@mail.ru](mailto:olga_Poteryaeva@mail.ru)

зольной стороне эндоплазматического ретикулума (ЭР). Препроинсулин представляет собой полипептидную цепь, построенную из 110 АКО, которая включает в себя последовательно расположенные L-пептид, В-пептид, С-пептид и А-пептид. После синтеза от препроинсулина отщепляется сигнальный L-пептид, состоящий из 24 АКО, вследствие чего образуется молекула проИ. Этот процесс происходит в течение 1-2 мин, он необходим для прохождения синтезируемой молекулы через гидрофобную липидную мембрану ЭР. Полипептидная цепь проИ включает 86 АКО, её молекулярная масса составляет 9,39 kDa [4]. В молекуле проИ пептидные цепи А и В соединены линейным пептидом, так называемым С-пептидом, состоящим из 33 АКО и расположенным между карбоксильным концом В-цепи и аминокислотным концом А-цепи. С-пептид способствует приближению обеих линейных цепей для облегчения образования бисульфидных связей. Правильно уложенные пептиды проИ самообъединяются, формируя нековалентно связанные гомодимеры, выходят из ЭР, передвигаясь к комплексу Гольджи, который лимитирует скорость этапа транспортировки. В цистернах комплекса происходит созревание инсулина. Время этого этапа - 2-4 часа. Превращение проИ в инсулин происходит в малых (ранних) секреторных гранулах. В процессе созревания из молекулы проИ протеолитическим путём вырезается С-пептид. Молекула проИ разделяется на инсулин и инертный пептидный остаток, на что уходит 20-40 минут [5 - 7].

Проинсулин - это форма хранения инсулина в клетках поджелудочной железы, где он заключен в секреторные гранулы, в которых проИ формирует гексамеры. Здесь же происходит протеолитическое отщепление С-пептида и хранится зрелый инсулин. Под действием стимулирующих факторов из гранул путем экзоцитоза в кровотока освобождается инсулин. При этом не требуется времени на образование гормона [8,9]. Примерно 80-90% общего циркулирующего инсулина происходит из зрелого, биологически активного инсулина. В норме содержание проИ в плазме крови не превышает 3-5%. При патологии эта цифра может возрастать до 50%. Аффинность проИ к инсулиновому рецептору не превышает 5% [3], а его сахароснижающая способность в 12-14 раз ниже, чем у инсулина [10]. Кроме того, в крови обнаруживают небольшой процент продуктов неполного расщепления проИ - пептидов (31,32)-проинсулин и (64,65)-проинсулин [11].

### Диагностическое значение проинсулина у больных сахарным диабетом

У лиц, не имеющих патологии со стороны углеводного обмена, иммунореактивность проИ и проИ-связанных пептидов составляет 2-4 % от реактивности секретированного инсулина. При сахарном диабете (СД) 2 типа соотношение проинсулин-подобных пептидов к инсулину увеличивается, что вызвано истощением зрелых гранул из-за гипергликемии и высвобождением продуктов неполного расщепления проИ из незрелых гранул [11, 12].

В настоящее время измерение концентрации проинсулина используется как потенциальный маркер  $\beta$ -клеточной дисфункции. Нарушение конверсии проИ в инсулин является одной из причин нарушения углеводного обмена различной степени выраженности, клинически характеризуется наличием нарушения толерантности к глюкозе или мягкого СД, имеющего се-

мейный характер [3]. В литературе встречается понятие «проинсулиновый диабет» для описания заболевания, связанного с дефектом проинсулинрасщепляющего фермента, и сопровождающегося высокими концентрациями проИ в крови [13].

Показано, что гиперпродукция проИ является характерной особенностью СД 2 типа, которая проявляется позднее признаков гипергликемии натощак и снижения толерантности к глюкозе [14]. По мнению А. Pflutzner и др. [15] увеличение концентрации проИ является высокоспецифичным предиктом инсулинорезистентности у больных СД 2 типа. Достоверное повышение уровня проИ у больных СД 2 типа по сравнению со здоровыми лицами было продемонстрировано в работе Steiner et al. [16].

Обследование 262 пациентов с СД 2 типа выявило повышение уровня проИ в 3,3 раза. При нарушении толерантности к глюкозе концентрация проИ возрастала в 2,5 раза. В тоже время содержание иммунореактивного инсулина увеличивалось в обоих случаях в два раза, а уровень С-пептида практически не менялся [17]. Высокие концентрации проИ в крови больных СД 2 типа длятся годами, при этом уровень глюкозы сохраняется в пределах 6-11 ммоль/л, что провоцирует развитие сердечно-сосудистых нарушений (ССН), способствует увеличению массы жировой ткани, и как следствие, усугубляет проявление инсулинорезистентности [10].

Иммунохемилюминесцентным методом было установлено, что уровень проИ у пациентов с СД 2 типа без инсулинотерапии ( $63 \pm 58$  пмоль/л,  $p < 0,05$ ) значительно выше, чем у больных ( $30 \pm 24$  пмоль/л), получающих инсулин. Референсные значения проИ в сыворотке здоровых людей колебались от 3 до 20 пмоль/л. Выявлена отрицательная корреляционная зависимость между концентрацией проИ и продолжительностью инсулинотерапии: чем дольше назначалась инсулинотерапия при СД 2 типа, тем ниже уровень проИ. При лечении больных СД 2 типа инсулином более 12 лет показатель проИ был ниже 20 пмоль/л. Уровень глюкозы натощак, триглицеридов и  $\alpha$ -холестерина положительно коррелировали с проИ. Самые низкие показатели проИ, вплоть до неопределяемого уровня, были отмечены у пациентов СД 1 типа, находящихся на инсулинотерапии. Низкие показатели проИ, вероятно, обусловлены аутоиммунным повреждением  $\beta$ -клеток, их истощением вследствие глюкозотоксичности или подавляющим эффектом инсулинотерапии [18].

В наших исследованиях для определения концентрации проИ в образцах сыворотки крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (BioVender, Чехия) [19]. В сыворотке крови здоровых лиц концентрация проИ составила  $2,6 \pm 1,3$  пмоль/л. В группе больных СД 2 типа значение проИ было выше уровня контрольной группы в 2 раза ( $5,0 \pm 0,5$  пмоль/л). Больные СД 2 типа были разделены на три группы в зависимости от стадии компенсации углеводного обмена. У пациентов в стадиях компенсированного ( $6,0-6,5$  % HbA1c) и субкомпенсированного диабета ( $6,6-7,0$  % HbA1c) сохранялась низкая концентрация прогормона. У больных в стадии декомпенсированного диабета ( $>7,0$  % HbA1c) наблюдали повышение концентрации проинсулина ( $7,89 \pm 0,70$  пмоль/л) в 2,8 раза по сравнению с аналогичными показателями больных в стадии компенсированного диабета [20]. В этой же группе возрастала концентрация глюкозы, фруктозамина. При этом содержание С-пептида

снижалось в стадии субкомпенсации на 19%, а в стадии декомпенсации – на 27 %. Концентрация проИ в стадии декомпенсации положительно коррелировала с уровнем глюкозы, концентрацией триглицеридов,  $\alpha$ -холестерина и отрицательно коррелировала с индексом атерогенности. Таким образом, измерение концентрации проинсулина может служить важным диагностическим критерием, который позволяет судить о степени декомпенсированности диабета и развитии его осложнений [21].

Концентрация проИ значительно снижалась у больных СД 2 типа с антителами к клеткам островков Лангерганса ICA<sup>+</sup> (*Islet Cell Antibodies - маркеры деструкции В-клеток*) по сравнению с пациентами без антител. Однако в обеих группах уровень проИ был выше, чем у пациентов контрольной группы. Повышению уровня проИ сопутствовала избыточная масса тела или ожирение [22]. Ожирение у беременных с гестационным СД также сопровождалось достоверным увеличением проинсулина в 3 раза, иммунореактивного инсулина в 2,7 раза, С-пептида в 1,6 раз по сравнению с показателями беременных без ожирения [23].

Непропорционально повышенные уровни проИ в сыворотке были отмечены на преддиабетической стадии СД 1 типа [24, 25]. Снижение уровня инсулина, являющееся характерным признаком СД 1 типа, обусловлено аутоиммунной гибелью  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Однако в ряде исследований было замечено, что у больных уровень проИ не снижался, как можно было бы ожидать, а оказался, напротив, выше общепринятой нормы. Были выявлены высокие концентрации проИ и диспропорции в соотношении проИ/инсулин у родных братьев и сестер больных СД 1 типа с ICA<sup>+</sup> или к инсулину. У 50% обследуемых больных отмечали снижение иммунореактивного инсулина и увеличение в 2-3 раза соотношения проИ/И или проИ/С-пептид. При нагрузке глюкозой (0,5 г глюкозы/кг веса) в этой группе уровень иммунореактивного инсулина и С-пептида в четыре раза ниже. В группе с высоким соотношением проИ/инсулин отмечали развитие СД 1 типа в течение 1-28 мес после исследования, таким образом, увеличение проинсулина начинается задолго до развития клинических признаков СД [25].

Поскольку увеличение концентрации проИ отмечалось у ICA<sup>+</sup> родственников, предполагают, что это может отражать незначительные повреждения  $\beta$ -клеток из-за предыдущих иммунологических атак [24]. Высокий уровень проИ был отмечен в работе I. Vauhkonen с соавт. [26] у родственников первой степени родства больных с латентной формой аутоиммунного диабета взрослых с нормогликемией. В работе Н.Ю. Лотош с соавт. [27] было показано, что у половины детей от 3 до 14 лет больных СД 1 типа содержание проИ в 2-4 раза ниже значения принятого за нижнюю границу нормального интервала, что полностью согласуется с общепринятыми представлениями о ключевой роли повреждения и гибели  $\beta$ -клеток островков Лангерганса в патогенезе СД 1 типа. Между уровнями проИ и С-пептида наблюдался высокий коэффициент корреляции. Кроме того, среди обследованных детей у 4% содержание проИ в два раза превышало верхнюю границу нормального интервала значений, а корреляции между концентрацией проИ и С-пептидом не наблюдалось. По мнению авторов, клиническая картина диабета у этой группы больных обусловлена не аутоиммунной деструкцией  $\beta$ -клеток, а, возможно, связана с нарушением этапа превращения проИ

в инсулин. Таким образом, определение проИ в клинической практике позволяет выявлять случаи, отличные от аутоиммунного диабета, и, возможно, применять иную тактику лечения [27].

В литературе обсуждаются причины развития гиперпроинсулинемии у больных СД 2 типа. Предполагают, что увеличение высвобождения проИ у таких пациентов связано с дефектом инсулинового процессинга, что приводит к секреции незрелого инсулинового предшественника, тем самым способствуя ухудшению инсулиновой функции [11]. Уровень проИ повышался при дефиците/снижении активности фермента конвертазы PC1/3 или при нарушении этапа превращения проИ в инсулин за счет мутации в гене инсулина, обуславливающей замену Arg69 на гистидин [28]. Полиморфизм или мутации гена TCF7L2 (*T-клеточный транскрипционный фактор 4*) у больных СД 2 типа проявляется нарушением молекулярного механизма, связанного с изменением конверсии проинсулина в инсулин [29]. Гетерозиготные миссенс-мутации (*точечные мутации*) в кодирующем регионе гена INS, приводящие к конформационным изменениям молекулы проИ и накоплению неактивного белка с измененными свойствами, описаны в литературе [30, 31]. Таким образом, неверное сворачивание проИ вследствие мутаций или генетической предрасположенности приводит к избыточному накоплению проинсулина в ЭР, [32] и является дефектом, действующим как «первый удар» по  $\beta$ -клеткам [33].

Известно, что ЭР обеспечивает синтез и созревание белков, предназначенных для секреции. Созревание любой белковой молекулы предполагает ее «фолдинг» (*от англ. to fold — «укладывать, сворачивать»*) - самопроизвольное приобретение единственно правильного трехмерного строения. Ошибка в процессе фолдинга ведёт к накоплению неправильно свернутых белков, функциональной перегрузки аппарата ЭР и нарушению созревания белковых молекул, так называемому «стрессу ЭР» [34]. Перегрузка ЭР (мисфолдинг) приводит к накоплению проинсулина в просвете ЭР, нарушению функции  $\beta$ -клеток, развитию и прогрессированию СД 2 типа [33]. Неправильное сворачивание проинсулина является фенотипом, который очень тесно связан с недостаточной выработкой инсулина и диабетом [32].

Аутосомно-доминантная мутация кодирующей последовательности в гене INS, влияющие на сворачивание проИ в эндоплазматической сети, вызывает синдром индуцированного диабета молодости. Мутантный проИ экспрессируется совместно с нормальным проИ и удерживает последний в ЭР, заставляя  $\beta$ -клетки использовать секреторные гранулы инсулина, приводя к их постепенному истощению. Недостаточность инсулина повышает уровень глюкозы в крови, которая стимулирует ещё большее производство мутантного проИ, усиливая стресс ЭР и апоптоз  $\beta$ -клеток [35]. При гипергликемии в организме резко возрастает нагрузка на ЭР  $\beta$ -клеток и создаются условия для апоптоза [34].

S.Alarcon и соавт. [36], используя модели мышей C57BL/6J db/db и C57BLKS/J db/db с ожирением для экспериментального моделирования СД 2 типа, показали, что в мышечных  $\beta$ -клетках синтез проинсулина повышался в 4 и 11 раз, соответственно, по сравнению с островками контрольных крыс дикого типа без ожирения. Скорость синтеза проинсулина, измеренная включением L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] лейцина в проинсулин, также заметно увеличивалась в островках обеих линий мышей db/db.

Кроме того, биосинтез проинсулина был чувствителен к глюкозе (измерено при 17 ммоль/л по сравнению с 3 ммоль/л глюкозы). Ультраструктурный анализ  $\beta$ -клеток обоих штаммов мышей db/db показал значительное снижение количества и истощение зрелых гранул инсулина, увеличение числа незрелых гранул, расширение аппарата Гольджи и ЭР, что, по мнению авторов, является результатом ускоренной, дисфункциональной обработки проИ, а не следствием недостаточного синтеза проинсулина [36]. Расширение ЭР в островках обеих линий мышей не сопровождалось увеличением фосфорилирования PERK (*Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) и экспрессии ССААТ-энхансер-связывающих белков (СНОР), что характерно для "стресса" ЭР. Фактически, наблюдаемый повышенный биосинтез проинсулина в островках мышей с диабетом 2 типа, страдающих ожирением, является результатом адаптивной, а не стрессовой реакции ЭР. Создание стресса ЭР очень маловероятно, так как он является ингибитором синтеза белка [36].

По мнению С. J. Nolan et al. [37] дисфункция  $\beta$ -клеток при СД 2 типа, связанном с ожирением, может быть следствием аномальной обработки проинсулина, которой способствуют такие факторы, как цитокины и токсины окружающей среды. Островковые  $\beta$ -клетки будут подвергаться наибольшему риску, в случае, если они имели врожденную предрасположенность реагировать на избыток питательных веществ или других стрессоров [37]. Наиболее эффективными в нарушении созревания инсулина являются провоспалительные цитокины: интерлейкин-23 (ИЛ), ИЛ-24 и ИЛ-33 [38]. В этих условиях нарушается естественный фолдинг проИ, что становится «вторым ударом» по ЭР и  $\beta$ -клеткам [33].

У мышей с ожирением C57BL/6 (HFDIO) нейтрализация ИЛ-23 и ИЛ-24 с помощью антител частично улучшало функциональное качество секретируемого инсулина. Лечение мышей противовоспалительным ИЛ-22 устраняло дефекты обработки проинсулина, стимулировало секрецию эффективного инсулина и полностью восстанавливало гомеостаз глюкозы и чувствительность к инсулину [38].

Развитие аутоиммунной формы сахарного диабета у крыс сопровождается продукцией цитокинов, которые могут приводить к деструкции  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Действительно, добавление комбинации цитокинов к изолированным островкам крыс приводило к разрушению  $\beta$ -клеток в течение 24 часов [39]. В человеческих  $\beta$ -клетках цитотоксический эффект наблюдали только через 3-е суток после инкубации с цитокинами (40). В культуре человеческих островков при добавлении ИЛ-1 $\beta$  (50 ед/мл) + ИФН- $\gamma$  (1000 ед/мл) в течение 1-3 дней на 40% снижалось содержание внутриклеточного инсулина, что не связано с процессами цитодеструкции, так как количество некротических или апоптотических клеток не изменялось. Секрета проИ статистически значимо увеличивалась через 4, 24 и 72 часа. В присутствии цитокинов конверсия проинсулина в инсулин замедлялась в 1,4 раза, при этом соотношение проинсулина/инсулин было в 3-6 раз выше, чем в контрольных клетках. Цитокины снижали на 40-45% количество конвертаз PC1 и PC2, но не влияли на экспрессию мРНК ферментов, что, вероятно, свидетельствовало о нарушении структуры конвертаз на посттранскрипционном уровне [41]. Таким образом, было показано, что длительное воздействие более чем одного цитокина, в частности ИЛ-1 $\beta$ + ИФН- $\gamma$ , может представлять одну из

причин непропорционального повышения уровня проИ в сыворотке крови в стадии преддиабета. Это условие может возникнуть в островках с инфильтрирующими иммунными клетками при длительном воздействии цитокинов [40].

Различная антидиабетическая терапия оказывает влияние на уровень проИ у больных СД. Терапия пероральными препаратами сульфонилмочевины увеличивает уровень проИ. Под влиянием препаратов стимулирующих секрецию инсулина преобразование проИ становится неполным из-за ограниченной каталитической вместимости протеаз [6].

Гиперпроинсулинемия может быть обусловлена увеличением спроса на инсулин (из-за инсулинорезистентности), истощением пула зрелых гранул и мобилизацией инсулина из резервного пула, который содержит значительное количество незрелого инсулинового предшественника [11]. Данная теория нашла подтверждение у больных с частичной резекцией поджелудочной железы, в крови которых увеличивалось соотношение проИ/инсулин [42].

Не исключено, что увеличение проИ связано с низкой активностью матриксных металлопротеиназ [ММП] в сыворотке крови больных СД 2 типа [43]. Нами было обнаружено, что в стадии декомпенсации, наряду с возрастанием уровня глюкозы, гликированного гемоглобина и концентрации проИ снижались активность ММП и концентрация С-пептида. В результате отношение концентрации проИ к активности ММП на стадиях компенсации и субкомпенсации СД 2 типа было примерно 1:50, в то время как на стадии декомпенсации – 1:12. Таким образом, оценка соотношения этих показателей в сыворотке крови может служить в качестве дополнительного диагностического критерия стадии декомпенсации диабета и степени тяжести развития его осложнений [44]. Как известно, ММП вносят основной вклад в деградацию внеклеточного матрикса. Нарушение регулируемой активности ММП при СД ведет к повышенной продукции вещества внеклеточного матрикса, интенсивному процессу склерозирования ткани [45] и развитию осложнений СД [46].

### Регуляторные функции проинсулина

В течение нескольких десятилетий проИ рассматривали как белок-предшественник инсулина с очень низкой метаболической активностью. Однако, обнаружение экспрессии проИ не только в поджелудочной железе, но и в других тканях, дало возможность предположить, что проИ может иметь и иные функции [47].

Известно, что инсулин связывается с изоформами А и В рецептора инсулина (RI) с высокой аффинностью. ПроИ, напротив, с высокой аффинностью связывается только с изоформой RI-A, которая является преобладающей или исключительной формой, экспрессируемой в тканях плода, створочных клетках и мозге взрослого млекопитающего [48]. Форма рецептора RI-A является единственной изоформой, экспрессируемой в нейронах [49]. В культивируемых клетках наномолярные концентрации проИ приводили к сопоставимой с активностями инсулина стимуляции фосфорилирования RI-A и активации пути ERK (*extracellular signal-regulated kinase*, один из ключевых сигнальных путей MAPK). При этом проИ приводил к меньшей активации протеинкиназы В, обычно обозначаемой как АКТ-киназа (*ключевой фермент сигнального пути PI3K/AKT*) и не связывался с

рецепторами IGF-1 (insulin-like growth factor 1) или гибридными рецепторами IR/IGF-IR [50].

Взаимодействие проИ с RI-A оказывает антиапоптотический и нейропротекторный эффекты в развивающейся и постнатальной нервной системе [48]. Экспрессия проИ была выявлена на ранних стадиях развития эмбриона цыплят, особенно в нервной системе. Причём экспрессия проИ являлась финальной стадией. Регуляция экспрессии мРНК проИ у эмбрионов в отличие от  $\beta$ -клеток поджелудочной железы не регулировалась глюкозой. Нейрональный проИ, вероятно, секретируется конститутивным путём, так как в культивируемых нейронах быстрая секреция проинсулина в среду происходила в пределах нескольких часов, даже без секретогенных факторов. Авторы предположили, что проинсулин способствует клеточной пролиферации, дифференцировке и выживанию эмбриональной нервной системы цыплёнка или мыши. Интересно, что блокировка антителами рецепторов проИ индуцировала апоптоз в сетчатке цыплёнка, уменьшая число нейронов [51]. Подобный апоптотический эффект наблюдали при использовании антисмысловых олигонуклеотидов, применение которых направлено на блокаду сигнальных путей проИ (52).

Матричная РНК проИ была обнаружена в сетчатке глаза на раннем этапе эмбрионального развития мыши. Первоначальная высокая активность проИ уменьшалась по мере созревания сетчатки. Было показано, что антиапоптотический эффект проИ в культуре сетчатки сопоставим с эффектами инсулина или IGF-1 [53]. Однако введение экзогенного проИ *in ovo* (в эмбрион куриных яиц) приводило к уменьшению естественного апоптоза и аномалиям развития нервной трубки и оптических везикул. Оказалось, что контролируемое регулирование экспрессии и функции проИ имеет решающее значение для правильного развития нервной системы [51]. Перечисленные факты свидетельствуют о том, что секретируемый проИ является важным регуляторным фактором [51].

В экспериментах на мышинной модели дистрофии сетчатки показано, что проинсулин предотвращает патологическую гибель клеток сетчатки. У линии мышей rd10 (retinal degeneration 10) впервые месяцы жизни развивается прогрессирующая ретинальная дегенерация, приводящая к слепоте. Трансгенная экспрессия человеческого проИ задерживала процесс потери зрения, что коррелировало со снижением гибели клетки и сохранением фоторецепторного слоя [47]. Нейропротекторное действие проИ было показано на мышинной и крысиной моделях пигментного ретинита (ПР). Внутримышечное введение аденоассоциированного вирусного вектора (Adeno-associated dependovirus A, AAV), несущего ген проИ человека, способствовало замедлению дегенерации фоторецепторов и потери зрения [48].

Терапевтический потенциал проИ, как нейропротекторной молекулы, был проверен на модели аутосомно-доминантного ПР у трансгенных крыс P23H. Модель характеризуется модификацией гена Rho, приводящего к агрегации родопсина и дегенерации фоторецепторов. Оценивали терапевтический эффект проинсулина человека (hPi+) на дегенерацию фоторецепторных клеток и функциональную активность сетчатки. Гомозиготные крысы P23H получили внутримышечную инъекцию AAV1, экспрессирующего проИ человека (hPi+) или нулевой вектор AAV1 (hPi-). В ходе эксперимента было

выявлено ослабление ухудшения зрения, которое коррелировало с задержкой дегенерации фоторецепторов и сохранением цитоархитектоники сетчатки. Крысы hPi+ имели на 49% больше фоторецепторов, чем контрольные животные, у них были сохранены пресинаптические и постсинаптические элементы, а также синаптические контакты между фоторецепторами и биполярными или горизонтальными клетками. Эти эксперименты показывают, что экспрессия hPi+ сохраняет структуру и функцию фоторецепторов, а также их контакты с постсинаптическими нейронами. Авторы исследования считают важным дальнейшее развитие терапии на основе проИ для лечения пигментного ретинита [54].

На мышинной модели Pde6brd10 проверяли, оказывает ли нейропротекторные эффекты в сетчатке внутриглазное лечение биоразлагаемыми микросферами на основе поликислот (молочной и гликолевой) с метилированными рекомбинантным проИ человека. Дегенерация сетчатки у мыши rd10 была замедлена однократной интравитреальной инъекцией микросферы. Проинсулин вызывал быстрый и эффективный нейропротекторный эффект, что может представлять собой будущий потенциально возможный способ доставки для лечения пигментного ретинита на основе проИ [55].

У мышей SAMP8 (модель преждевременного старения мозга, которая проявляет некоторые признаки болезни Альцгеймера) AAV-опосредованная экспрессия проИ снижала выработку нейровоспалительных маркеров (TNF- $\alpha$ , интерлейкина-1 $\beta$  и антипротеазного  $\alpha$ 2-макробулина) в гиппокампе через 5 мес после инъекции. Важно отметить, что эти нейропротекторные эффекты коррелировали с улучшением когнитивных функций мышей в задачах пространственного распознавания [48].

Привлекает особое внимание влияние инсулина на нейронную пластичность посредством регуляции поглощения, высвобождения и дегенерации дофамина и норадреналина; его участие в контроле над чувствительностью постсинаптических рецепторов [49]. Существует множество доказательств того, что нарушение активности инсулина в головном мозге нарушает функции нейронов и синаптогенез [49]. Однако в большинстве исследований воздействия инсулина на мозг мало внимания уделялось потенциальному вкладу местного проинсулина в наблюдаемые результаты [48].

Kojima et al. [56] впервые идентифицировали популяцию лейкоцитов, продуцирующих мРНК проИ, так называемые PI-producing bone marrow derived cells (PI-BMDCs или PI+). Клетки PI+ также обнаруживались в тканях мышей с экспериментальным диабетом, вызванным стрептозотоцином (STZ), и отсутствовали у контрольных мышей [57]. Инъекции глюкозы недиабетическим мышам индуцировали появление PI+ в течение 1-3 дней [56], а инверсия STZ-диабета инсулином вызывала быстрое снижение их числа [57]. Клетки PI+ часто экспрессировали провоспалительные маркеры, такие как TNF- $\alpha$  [56, 57, 58]. Резко увеличивалось число макрофагов, секретирующих CD11c (маркер классической активации макрофагов). Провоспалительные макрофаги не распределялись случайным образом по всей висцеральной жировой ткани, а формировали кластер вокруг мертвых адипоцитов, так называемые "crownlike" структуры. Внутри этих структур макрофаги поглощали липиды с образованием пенистых клеток или образовывали многоядерные синцитии [58].

Ожирение, индуцированное высокожировой диетой (60%) в течение 16 нед, у мышей C57BL/6/J приводило к накоплению макрофагов в жировой ткани (МЖТ). Гипергликемия, развивающаяся в результате такой диеты, индуцирует появление проИ из клеток костного мозга мышей. В жировой ткани гонад иммуногистохимически были обнаружены PI+-продуцирующие клетки, которых не было у мышей на стандартной диете. Такие клетки обильно заселяли брыжеечную, околопочечную ткани и редко встречались в печени и скелетной мускулатуре. Показано, что 95% клеток, позитивно окрашенных на PI+, коэкспрессировали F4/80 (*маркёрный антиген клеточной поверхности макрофагов*). Кроме того, 59% PI+ коэкспрессировали CD11c (*экспрессирован в основном на миелоидных клетках, экспрессия повышается под действием медиаторов воспаления*) и 68% - TNF- $\alpha$ . Снижение уровня глюкозы с помощью различных гипогликемических средств (инсулин Гларгин и Флоридзин - ингибиторы реабсорбции глюкозы в почечных канальцах) предотвращало накопление PI+-МЖТ и воспаление в ней. Применение стратегии, основанной на использовании дифтерийного токсина, для выборочного удаления PI+- из МЖТ, приводило к почти полному исчезновению сложных "crownlike" структур, улучшало гомеостаз глюкозы, снижало резистентность к инсулину [58].

Клетки PI+ также обнаруживали в периферической нервной системе STZ-диабетических мышей, где они играли решающую роль в патогенезе диабетической невропатии [59]. PI-BMDCs находили у мышей с умеренной гипергликемией, получающих жировую диету и у мышей линии C57BL/6J ob/ob. Интересно, что клетки PI-BMDCs являются многочисленными в висцеральной жировой ткани мышей с моделью СД 2 типа [56].

Роль макрофагов при СД 2 типа ещё плохо изучена, непонятен механизм активации макрофагов и её зависимость от степени гликемии. Значение PI-BMDCs клеток в развитии диабета предстоит ещё выяснить.

Нарушение синтеза или секреции инсулина приводит к хроническому повышению свободных жирных кислот (СЖК). Влияние последних на процессинг проИ и прогормон-конвертазы PC2 и PC1/PC3 исследовали в клетках линии MIN6, являющихся экспериментальной моделью для изучения деталей биосинтеза проинсулина. Через 7 дней культивирования в клетках под действием СЖК увеличивался процент внутриклеточного проИ на 26%, а в культуральной среде - на 75%; при этом секреция инсулина снижалась на 50%. Уровни клеточных конвертаз PC2 и PC3, проанализированные с помощью вестерн-блоттинга, были снижены. Кроме того, нарушалась конверсия прогормона PC2 и прогормона PC3 в зрелые формы [28].

Изучение новой роли проИ в регуляции метаболических путей привели к включению прогормона инсулина в суперсемейство сигнальных факторов, которые у человека также включают в себя инсулиноподобные факторы роста (IGFs-1,-2 -7), подсемейство релаксин-подобных пептидов [60]. Все они обладают обширным функциональным спектром, включая участие в регуляции метаболизма углеводов и липидов, отвечая за пролиферацию и рост клеток [48].

### Перспективы использования проинсулина

В настоящее время в лечебной практике прибегают к иммунотерапии с использованием коротких иммуногенных пептидов, связанных с аутоиммунным заболеванием для индукции специфической толерантности Т-клеток к

антигену. Такая терапия была успешной для некоторых пациентов с аллергией, где она позволяла избежать проблемы использования целых антигенов, которые могут вызывать гиперчувствительность, опосредованную иммуноглобулином Е [61].

СД 1 типа является хроническим аутоиммунным заболеванием, характеризующимся прогрессирующей, иммуноопосредованной потерей массы и функции  $\beta$ -клеток. М.А. Ali и соавт. [62] провели рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование, чтобы определить, может ли иммунопептидная терапия проИ быть безопасной и эффективной в отношении пациентов с недавно диагностированным СД 1 типа (через 100 дней от начала постановки диагноза). Одним из критериев включения в исследуемую группу наличие генотипа DRB1\*0401. Последний является группоспецифическим вариантом гена HLA-DRB1 и одновременно маркёром предрасположенности к СД 1 типа [61]. Ограниченный иммунодоминантный проинсулиновый пептид C19-A3 вводили внутривенно каждые 2 или 4 нед в течение 6 месяцев, с последующим 6-месячным периодом наблюдения. В группе, получавших плацебо, наблюдали значительное снижение С-пептида на 3, 6, 9 и 12 месяце по сравнению с исходным уровнем. В группе, получавших проинсулиновый пептид каждые 2 или 4 нед, не наблюдали значительных изменений данного показателя. В группе, получавших плацебо, ежедневная доза инсулина увеличилась на 50% за 12 мес, но осталась неизменной в экспериментальной группе. Исследование показало, что лечение, по-видимому, модифицирует ответы Т-клеток и не влияет на остаточную функцию  $\beta$ -клеток. Отсутствие снижения С-пептида у пациентов, получавших лечение, была связана с проинсулинстимулированной продукцией интерлейкина-10 (*иммуносупрессивный цитокин*), повышенной экспрессией FoxP3 (*транскрипционный фактор, ответственный за развитие и функционирование регуляторных Т-клеток, способствующих снижению иммунного ответа*), низкими базовыми уровнями активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8 Т-клетки). Таким образом, проинсулиновая пептидная иммунотерапия оказалась безопасной, не снижала функции  $\beta$ -клеток и была связана с антиген-специфической и неспецифической иммунной модуляцией. Эти обнадеживающие результаты подтверждают необходимость более масштабного исследования для изучения эффективности пептидной проИ терапии для лечения СД [62].

### Заключение

Таким образом, в настоящее время изучены все основные этапы синтеза проИ, С-пептида и инсулина. Измерение концентрации проИ в сыворотке крови используется как потенциальный маркер функциональной активности поджелудочной железы, а также может являться важным диагностическим критерием, который позволяет судить о степени декомпенсированности диабета и развитии его осложнений. При СД 2 типа и некоторых формах СД 1 типа соотношение проинсулин/инсулин увеличивается. Одной из причин возникновения проинсулинемии лежит ошибка в процессе фолдинга молекулы проинсулина. Перегрузка ЭР неправильно свёрнутым инсулиновым предшественником (мисфолдинг) приводит к нарушению функции  $\beta$ -клеток, развитию и прогрессированию СД. В последнее время особое внимание уделяется изучению новой роли проИ в мета-

болических путях, в том числе, регулирование выживаемости клеток и их роста во время раннего развития нервной системы в физиологических условиях, во время старения и при патологических процессах. Исследования в этом направлении привели к возможности включения прогормона инсулина в суперсемейство сигнальных факторов. Изучаются антиапоптотический эффект и нейротропная активность проинсулина и его потенциал в качестве терапевтического инструмента при нейродегенеративных состояниях центральной нервной системы, особенно при дистрофиях сетчатки. Исследуются возможности иммунопептидной терапии с использованием проИ для лечения некоторых форм СД.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1, 2, 6, 8, 9, 11, 12, 14-16, 18, 22, 24-26, 28-30, 32, 33, 35-42, 44-60, 62 см. REFERENCES)

- Смирнова О.М. Роль комбинированной терапии в лечении сахарного диабета 2. *Consilium medicum*. 2005; 7(9):739-43.
- Ваизова О.Е. Инсулин: от открытия до эволюции. В кн.: Ваизова О. Е., Столяров В. А., Самойлова Ю. Г., ред. *Инсулин и инсулинотерапия*. Томск: Печатная мануфактура; 2009: 2-23.
- Балаболкин М. И., ред. Эндокринология: Учебник. 2-е изд. М.: Универсум паблишинг; 1998. 416 с. *Invest*. 2002; 32(Suppl 3): 14-23.
- Дедов И.И., Смирнова О.М., Кононенко И.В. Новые представления о нарушении глюкозостимулированной секреции инсулина при сахарном диабете 2 типа. Клинические последствия. *Сахарный диабет*. 2015; 18 (3): 23-31.
- Каналес Х., Богомолов М.В., ред. *Виртуозная инсулинотерапия*. М.: Диабетическая газета; 2002.
- Фаллер Д. М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей. М.: Бином-Пресс; 2011.
- Майоров А.Ю. Инсулинорезистентность в патогенезе сахарного диабета 2 типа. *Сахарный диабет*. 2011; 14(1): 35-43.
- Зубова А.В., Потеряева О.Н., Русских Г.С., Геворгян М.М. Иммуноферментный анализ проинсулина в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа. *Медицина и образование в Сибири*. 2015; №1. [http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1656](http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1656).
- Зубова А.В., Потеряева О.Н., Русских Г.С., Геворгян М.М. Содержание проинсулина и гликозилированного гемоглобина в зависимости от стадии компенсации сахарного диабета. *Медицина и образование в Сибири*. 2015; 3. <http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1812>.
- Потеряева О.Н., Русских Г.С., Зубова А.В., Геворгян М.М. Проинсулин - диагностический биохимический маркер декомпенсированного сахарного диабета 2 типа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(5): 278-282.
- Сибко Т.В., Доброхотова Ю.Э., Иванова Т.А. Генетические маркеры инсулинорезистентности при гестационном сахарном диабете. *Сахарный диабет*. 2009; 12(4): 38-41.
- Лотош Н.Ю., Селищева А.А., Надоров С.А., Бадыштов Б.А., Волков И.Э., Савельев С.В. Уровень проинсулина в крови детей, больных сахарным диабетом 1 типа разной продолжительности. *Биомедицинская химия*. 2013; 59(5): 563-9.
- Тихонович Ю.И., Петрайкина Е.Е., Рыбкина Е.Г., Гаряева И.В., Тюльпаков А.Н. Моногенный сахарный диабет, обусловленный мутацией в гене (INS). *Проблемы эндокринологии*. 2013; 59(2): 45-48.
- Дедов И.И., Смирнова О.М., Горельшев А.С. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека. *Проблемы эндокринологии*. 2012; 58(5):
- Потеряева О.Н., Русских Г.С., Панин Л.Е. Анализ активности матриксных металлопротеиназ и  $\alpha$ -1 протеиназного ингибитора в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 152 (11): 509-10.
- Алексеев Л.П., Дедов И.И., Хаитов Р.М., Болдырева М.Н., Тро-

фимов Д.Ю., Петеркова В.А., Кураева Т.Л., Абрамов Д.Д. Иммуногенетика сахарного диабета 1 типа — от фундаментальных исследований к клинике. *Вестник РАМН*. 2012; 67(1): 75-80.

## REFERENCES

- Steiner D. F. The proinsulin C-peptide - a multirole model. *Experimental Diabetes Research*. 2004; 5(1): 7-14.
- Brandenburg D. History and diagnostic significance of C-peptide. *Exp. Diabetes Res*. 2008; 576862.
- Smirnova O.M. The role of combination therapy in the treatment of diabetes mellitus 2. *Consilium medicum*. 2005; 7(9): 739-43. (in Russian)
- Vaizova O.E. Insulin: from discovery to evolution. In: Insulin and insulin therapy [Insulin I insulinoterapiya]. Vaizova O. E., Stol-yarov V.A., Samoylova Yu. G., eds. Tomsk: Pechatnaya manufak-tura; 2009: 2-23. (in Russian)
- Balabolkin M. I., ed. Endocrinology {Endokrinologiya}. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Universum Publishing; 1998.
- Boden G., Shulman G.I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest*. 2002; 32(Suppl 3): 14-23.
- Dedov I.I., Smirnova O.M., Kononenko I.V. New concepts of glucose-induced insulin secretion in the development of type 2 diabetes: clinical implications. *Sakharnyi diabet*. 2015; 18 (3): 23-31. (in Russian)
- Kahn S.E., Halban Ph. A. Release of incompletely processed proin-sulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes*. 1997; 46(11): 1725-32.
- Haataja L., Snapp E., Wright J.M., Liu A.B. Hardy M.B. Wheeler et al. Proinsulin intermolecular interactions during secretory trafficking in pancreatic cells. *J. Biol. Chem*. 2013; 288(3): 1896-906.
- Kanales Kh., Bogomolov M.V., eds. *Virtuoso insulin therapy [Virtuoznaya insulinoterapiya]*. Moscow: *Diabeticheskaya gazeta*; 2002. 2014; 3 (107): 6-70. (in Russian)
- Breuer T. G. K., Menge B. A., Banasch M., Uhl W., Tannapfel A., Schmidt W.E., Nauck M. A. et al. Proinsulin levels in patients with pancreatic diabetes are associated with functional changes in insulin secretion rather than pancreatic b-cell area. *Eur. J. Endocrinol*. 2010; 163: 551-8.
- Skyler J.S. Atlas of Diabetes. 4<sup>th</sup> ed. Miami: Springer; 2012.
- Faller D. M., Shields D., eds. Molecular biology of the cell: a guide for physicians. Moscow: Binom-Press; 2011. (in Russian)
- Birkeland K.I., Torjesen P.A., Eriksson J., Vaaler S., Groop L. Hyperproinsulinemia of type 2 diabetes is not present before the development of hyperglycemia. *Diabetes Care*. 1994; 17: 1307-10.
- Pfutzner A., Weber M.M., Forst T. A biomarker concept for assessment of insulin resistance, b-cell function and chronic systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus. *Clin. Lab*. 2008; 54(11-12): 485-90.
- Steiner D. F. Chemistry and biosynthesis of the islet hormones. In: DeGroot L., Jameson J. L., eds. *Endocrinol*. Philadelphia: Elsevier; 2006: 925-60.
- Mayorov A.Yu. Insulin resistance in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Sakharnyi diabet*. 2011; 14(1): 35-43. (in Russian)
- Wu T-J., Lin C-L., Taylor R. L., and Kao P. C. Proinsulin level in diabetes mellitus measured by a new immunochemiluminometric assay. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 1995; 25(6): 467-74.
- Zubova A.V., Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Gevorgyan M.M. Immunoassay analysis of proinsulin in serum of patients with type 2 diabetes mellitus. *Meditsina I obrazovanie v Sibiri*. 2015; 1: [http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1655](http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1655) (in Russian)
- Zubova A.V., Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Gevorgyan M.M. Content of pro-insulin and glycosylated hemoglobin depending on the stage of diabetes mellitus compensation. *Meditsina I obrazovanie v Sibiri*. 2015; 3: <http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1812> (in Russian)
- Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Zubova A.V., Gevorgyan M.M. Proinsulin as a diagnostic biochemical marker of decompensated diabetes mellitus type II. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(5): 278-82. (in Russian)
- Gottsater A., Owens D.R., Luzio S., Sundkvist G. Proinsulin secretion during the first 3 years after diagnosis in diabetic patients with and without islet cell antibodies. *Diabetes care*. 1996; 19 (6): 659-62.
- Sibko T.V., Dobrokhotova Yu.E., Ivanova T.A. Genetic markers of insulin resistance with gestational diabetes. *Sakharnyi diabet*. 2009; 12(4): 38-41. (in Russian)

24. Spinas G.A., Snorgaard O., Hartling S.G., Oberholzer M., Berger W. Elevated proinsulin levels related to islet cell antibodies in first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes Care*. 1992; 15(5): 632-37.
25. Røder M.E., Knip M., Hartling S.G., Akerblom H.K., Binder C. Disproportionately elevated proinsulin levels precede the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings with low first phase insulin responses. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*. 1994; 79(6): 1570-5.
26. Vauhkonen I., Niskanen L., Knip M., Mykkänen L.M., Haffner S., Uusitupa M., Laakso M. Subtle hyperproinsulinaemia characterises the defective insulin secretory capacity in offspring of glutamic acid decarboxylase antibody-positive patients with latent autoimmune diabetes mellitus in adults. *Eur. J. Endocrinol.* 2005; 153(2): 265–73.
27. Lotosh N.Yu., Selishcheva A.A., Nadorov S.A., Badyshov B.A., Volkov I.E., Saveljev S.V. The proinsulin level in the blood of children with type 1 diabetes mellitus of various duration. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2013; 59(5): 563-9. (in Russian)
28. Furukawa H., Carroll L.J., Swift H.H., Steiner D.F. Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and progormon convertases 2 and 3 in pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes*. 1999; 48(7): 1395–401.
29. Schafer S.A., Machicao F., Fritsche A., Haring H.U., Kantartz K. New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011; 93(Suppl. 1): S9-24.
30. Stoy J., Edghill E.L., Flanagan S.E., Ye H., Paz V.P., Pluzhnikov A., Below J.E., Hayes M.G., Cox N.J., Lipkind G.M., Lipton R.B., Greeley S.A., Patch A.M., Ellard S., Steiner D.F., Hattersley A.T., Philipson L.H., Bell G.I. Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (38): 15040-4.
31. Tikhonovich Iu.V., Petriakina E.E., Rybkina I.G., Gariaeva I.V., Tiul'pakov A.N. Monogenic diabetes mellitus associated with a mutation in the insulin gene (INS). *Problemy endokrinologii*. 2013; 59(2): 45-8. (in Russian)
32. Liu M., Weiss M.A., Arunagiri A., Yong J., Rege N., Sun J., Haataja L., Kaufman R.J., Arvan P. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes Obes. Metab.* 2018; 20(Suppl 2): 28-50.
33. Sun J., Cui J. He Q., Chen Z., Arvan P., Liu M. Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes. *Molecul. Aspects Medicine*. 2015; 42: 105-18.
34. Dedov I.I., Smirnova O.M., Gorelyshev A.S. Endoplasmic reticulum stress: a cytological "scenario" of the pathogenesis of human diseases. *Problemy endokrinologii*. 2012; 58(5): 57-65. (in Russian)
35. Lui M., Hodish I., Haataja L., Lara-Lemus R., Rajpal G., Wright J., Arvan P. Proinsulin misfolding and diabetes: mutant *INS* gene-induced diabetes of youth. *Trends. Endocrinol. Metab.* 2010; 21(11): 652-9.
36. Alarcon C., Boland B.B., Uchizono Y., Moore P.C., Peterson B., Rajan S., Rhodes O.S., Noske A.B., Haataja L., Arvan P., Marsh B.J., Austin J., Rhodes C.J. Pancreatic  $\beta$ -cell adaptive plasticity in obesity increases insulin production but adversely affects secretory function. *Diabetes*. 2016; 65: 438-50.
37. Nolan C.J. and Delghingaro-Augusto V. Reversibility of defects in proinsulin processing and islet b-cell failure in obesity-related Type 2 diabetes. *Diabetes*. 2016; 65(2): 352-4.
38. Hasnain S.Z., Borg D.J., Harcourt B.E., Tong H., Sheng Y.H., Ng C.P., Das I., Wang R., Chen A.C., Loudovaris T., Kay T.W., Thomas H.E., Whitehead J.P., Forbes J.M., Prins J.B., McGuckin M.A. Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat. Med.* 2014; 20(12): 1417-26.
39. Rabinovitch A. Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet  $\beta$ -cell destruction. *Diabetes Reviews*. 1993; 1: 215-40.
40. Delaney C.A., Pavlovic D., Hoorens A., Pipeleers D.G., Eizirik D. L. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology*. 1997; 138: 2610-4.
41. Hostens K., Pavlovic D., Zambre Y., Ling Z., Van Schravendijk C., Eizirik D. L., Pipeleers D.G. Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. *J. Clin. Invest.* 1999; 104(1): 67-72.
42. Seaquist E.R., Kahn S.E., Clark P.M., Hales C.N., Porte D. Jr., Robertson R.P. Hyperproinsulinemia is associated with increased b-cell demand after hemipancreatectomy in humans. *J. Clin. Investigation*. 1996; 97: 455-60.
43. Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Panin L.E. Analysis of the activity of matrix metalloproteinases and  $\alpha$ -1 proteinase inhibitor in the serum of patients with type 2 diabetes. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* (BEEM). 2011; 152 (11): 509-10. (in Russian)
44. Poteryaeva O.N., Russkikh G. S., Zubova A.V., Gevorgyan M.M., Usynin I.F. Changes in activity of matrix metalloproteinases and serum concentration of proinsulin and C-peptide depending on the compensation stage of type 2 diabetes mellitus. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018; 164(6): 730-3. (in Russian)
45. McLennan S.V., Kelly D.J., Schache M., Waltham M., Dy V., Langham R.G., Yue D.K., Gilbert R.E. Advanced glycation end products decrease mesangial cell MMP – 7: a role in matrix accumulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2007; 72(4): 481-8.
46. Thraillkill K.M., Bunn R.C., Fowlkes J.L. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine*. 2009; 35(1): 1-10.
47. De la Rose E.J., De Pablo F. Proinsulin: from hormonal precursor to neuroprotective factor. *Front. Mol. Neurosci.* 2011; 4(20): 1-7.
48. De Pablo F., Hernández-Sánchez C., De la Rose E.J. The prohormone proinsulin as a neuroprotective factor: past history and future prospects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 11: 426.
49. Gralle M. The neuronal insulin receptor in its environment. *J. Neurochem*. 2017; 140(3): 359–367.
50. Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* 2009; 30(6): 586–623.
51. Hernández-Sánchez C., Mansilla A., de la Rosa, E. J. and de Pablo F. Proinsulin in development: new roles for an ancient prohormone. *Diabetologia*. 2006; 49 (6): 1142–50.
52. Hernández-Sánchez C., Rubio E., Serna J., De la Rosa E. J., De Pablo F. Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes*. 2002; 51 (3): 770–7.
53. Valenciano A. I., Corrochano S., de Pablo F., De la Villa P. and De la Rosa E. J. Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J. Neurochem*. 2006; 99(2): 524-36.
54. Fernández-Sánchez L., Lax P. Isiegas C., Ayuso E., Ruiz J.M., De la Villa P., Bosch F., De la Rosa E.J., Cuenca N. Proinsulin slows retinal degeneration and vision loss in the P23H rat model of retinitis pigmentosa. *Hum. gene ther.* 2012; 23(12): 1290-1300.
55. Isiegas C., Marinich-Madzarevich J.A., Marchena M., Ruiz J.M., Cano M.J., De la Villa P., Hernández-Sánchez C., De la Rose E.J., De Pablo F. Intravitreal injection of proinsulin-loaded microspheres delays photoreceptor cell death and vision loss in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016; 57 (8): 3610-8.
56. Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(8): 2458–63.
57. Fujimiya M., Kojima H., Ichinose M., Arai R., Kimura H., Kashiwagi A., Chan L. Fusion of proinsulin-producing bone marrow-derived cells with hepatocytes in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(10): 4030-5.
58. Buras E.D., Yang L., Saha P., Kim J., Mehta P., Yang Y., Hilsenbeck S., Kojima H., Chen W., Smith C. W., Chan L. Proinsulin-producing, hyperglycemia-induced adipose tissue macrophages underlie insulin resistance in high fat-fed diabetic mice. *FASEB J.* 2018; 29: 3537-48.
59. Terashima T., Kojima H., Chan L. Bone marrow expression of poly (ADP-ribose) polymerase underlies diabetic neuropathy via hematopoietic-neuronal cells fusion. *FASEB. J.* 2012; 26(1): 295-308.
60. Wilkinson T. N. and Bathgate R. A. The evolution of the relaxin peptide family and their receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 612: 1–13.
61. Alekseev L.P., Dedov I.I., Haitov R.M., Boldyreva M.N., Trofimov D.YU., Peterkova V.A., Kuraeva T.L., Abramov D.D. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus - from fundamental ideas to medical practice. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 67(1): 75-80. (in Russian)
62. Ali M. A., Liu Y-F., Arif S., Tatovic D., Shariff H., Gibson V. B. et al. Metabolic and immune effects of immunotherapy with proinsulin peptide in human new-onset type 1 diabetes. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9, eaaf7779.