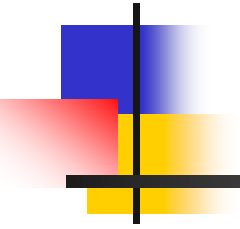


INZULIN





Az inzulin története és előállítása

Az inzulin (a latin insula = sziget szóból) a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben található béta-sejtek által termelt polipeptid hormon, amely a szénhidrátok, a fehérjék és a zsírok anyagcseréjének szabályozásában vesz részt. A szervezet sejtjei csak inzulin jelenlétében képesek felvenni a vérből a glükózt.

Az 1920-as évekig minden esetben halálos cukorbetegséget először a XVII. sz. közepén írták le. Felismerték, hogy a betegeknek nemcsak a vizeletében, hanem a vérében is található cukor, ami arra utalt, hogy a betegség nem a vesék elégtelen működéséből ered, hanem komolyabb anyagcsere problémák okozzák. Viktória királynő orvosa volt az első, aki a betegek hasnyálmirigyében apró kristályokat fedezett fel, amiből e szervnek a betegségben játszott szerepére következtetett. Felfedezését németföldön is igazolták: egy egészséges kutya hasnyálmirigyét eltávolítva az állat rövid időn belül cukorbetegségben elpusztult. A kísérletek arra mutattak, hogy a hasnyálmirigyből valamilyen anyag közvetlenül jut a véráramba, ami megakadályozza a betegség kialakulását.



Az inzulin kivonása a hasnyálmirigyből

A keresett anyagot először két kanadai orvosnak Frederick Bantingnak és Charles H. Bestnek sikerül kivonnia a hasnyálmirigyből. Az első adag hasnyálmirigy-kivonatot egy haldokló kutyába fecskendezték be, aki néhány órán múlva tünetmentessé vált. A szer azonban nem bizonyult tartós hatásúnak, az állat néhány nap múltán a tünetek kiújulásával elpusztult. A nagy mennyiségű inzulin előállításához a tudósok ekkor vágóhidakról szerzett állatok hasnyálmirigyeit kezdték használni. A kísérletek sikeresek voltak; folyamatos adagolással hosszú időn át életben tudták tartani a beteg állatokat.

Ideje volt a szert emberen is alkalmazni. Az első adagokat saját magukon próbálták ki, nem tudva, hogy túladagolásuk végzetes is lehetett volna. Cukorbeteg ember először 1922. január 11-én kapott a kivonatból, a már haldokló 14 éves fiatalember néhány nap múlva elhagyhatta a kórházat, bár továbbra is rászorult az injekciókra.

A Nobel-díj

A felfedezésért a kutatók 1923-ban Nobel-díjat kaptak. Banting és Best az inzulin szabadalmát nem védte le, szabadon elérhetővé tették és nem tettek kísérletet az inzulinprodukciónak a károsítására sem. Ennek az önzetlenségnek köszönhetően az inzulinkezelés gyorsan elterjedt a világon.





Az inzulin gyártás modern kora

Az inzulingyártás 60 évig a torontói felfedezők (Banting, Best és Collip) elvei alapján történt. Az inzulint sertés, illetve szarvasmarha hasnyálmirigyéből vonták ki savas-alkoholos módszerrel. Az állatok levágását követően a hasnyálmirigyet azonnal lefagyasztották. Darabolás után savanyú közegben alkoholos kivonatot készítettek. Ezt semlegesítették, és eltávolították a kicsapódó fehérjéket, az alkoholt és a zsírnemű anyagokat. Végül semleges közegben konyhasó (NaCl) hozzáadásával az inzulin kicsapódott. Az így nyert készítmény 80-90 százalék kristályos inzulint tartalmazott, ez a klasszikus "gyors" hatású inzulin. A mindennapi gyógyításban jól alkalmazható kristályos inzulint először Abel állított elő 1926-ban.



Az inzulin beadásának módszere

A huszas-harmincas években kidolgozták az inzulinadás módszerét. A készítményt bőr alá adagolták főétkezések előtt. Sajnos ez az adagolási mód nem olyan, mint ahogy a szervezetben - természetes módon - jut a vérbe az inzulin, de mindmáig nincs jobb. Az eltérés lényege, hogy a hasnyálmirigyben termelődött inzulin a vérbe kerülve előbb átfolyik a májon, és ott közel a fele megkötődik. A bőr alá adagolt inzulin viszont előbb a szövetekbe jut. A kezelés hatását a vizeletcukor mérésével ellenőrizték. Abban az időben a vércukor mérése még nagyon nehézkes és költséges volt. Rájöttek arra is, hogy a különböző testtájokról másként szívódik fel az inzulin.



Az első inzulinkészítmény

Hagedorn 1936-ban fejlesztette ki az első tartós hatású inzulint (Zink-Protamin Insulin). Kristályos inzulint lazac spermiumból kivont fehérjével (protamin) és cinkkel kevert össze, ezzel sikerült elérnie a felszívódás elhúzódását és a tartósabb hatást. Ugyancsak ő állította elő 1946-ban az első semleges vegyhatású, stabil tartós hatású inzulinkészítményt (NPH = Neutralis Protamin Hagedorn). 1951-ben alkották meg a "lente" inzulinokat. A harmincas évek végétől tehát a tartós hatású inzulinok bevezetésétől egyértelmű törekvés volt az injekciók számának csökkentése. Sajnos a korábbi, étkezések előtt adott gyors hatású inzulinok helyett a napi egy vagy kétszeri adagolás vált általánossá. Merev kezelési sémákat alkalmaztak. Hosszú távra igyekeztek "beállítani" a vércukrot, feleslegessé téve a szorosabb ellenőrzést és az inzulinadag gyakoribb módosítását. Ez a hetvenes évekig uralkodó elv a gyakorlatban nem vált be, ma már egyértelműen túlhaladottnak tekintett.



Inzulin szarvasmarhából

Három évtizeden át használták a szarvasmarha-inzulint, amikor 1953-ban sikerült Sangernek meghatározni az aminosavak pontos összetételét és sorrendjét. Az A-lánc 21, a B-lánc 30 aminosavat tartalmaz, és a láncokat két "kénhíd" (diszulfid) köti össze. 1960-ban sikerült az emberi (humán) inzulin aminosav-sorrendjének, majd pedig pontos térbeli szerkezetének feltérképezése. Kiderült, hogy a sertésinzulin csupán egyetlen, a marha-inzulin pedig 3 aminosavban tér el az emberétől. A későbbiekben megtalálták a humán inzulin génjét, ami a 11. kromoszómán van. 1967-ben felfedezték, hogy az inzulin a hasnyálmirigy béta-sejtjeiben, a 85 aminosavból álló proinzulinból keletkezik, miután lehasad belőle az úgynevezett C-peptid. A C-peptid mérése inzulinkezelés esetén is lehetőséget ad a saját inzulintermelés meghatározására. A hetvenes évektől kiterjedt kutatás indult az inzulin sejtszintű hatásainak tisztázására.

Gázkromatográfiás eljárás segítségével 1973-tól lehetővé vált a nagyfokban tisztított MC (monocomponens) állati inzulinok előállítása. Az igazi robbanást a nyolcvanas évek hozták.



Szintetikus inzulin

Az évtized elejéig az inzulint szarvasmarha vagy sertés hasnyálmirigyéből vonták ki. Egy átlagos (40 egység/nap) inzulinkezelésre szoruló cukorbeteg 20 év alatt hozzávetőlegesen 4000 sertés vagy 600 szarvasmarha hasnyálmirigyét "használta" el. Az emberi inzulinnal azonos humán inzulin előállítása először szintetikus úton történt a nyolcvanas évek elején. A sertésinzulinban kicserélték azt az egyetlen aminosavat, amely különbözött az emberétől. Azonban ez a módszer nem vált be, mivel növelte az állati hasnyálmirigy-szükségletet, ugyanis a gyártás során nagyobb lett a veszteség.

1987-ben az emberi vastagbélben normálisan is jelenlevő *Escherichia coli* baktériumba beültetett emberi inzulin gén segítségével előállított "humán" inzulin került a gyógyszerpiacra. 1991-től közönséges sütőélesztőbe bejuttatott szintetikus DNS segítségével is gyártanak inzulint. Napjainkra a géntechnológiával előállított készítmények teljesen kiszorították az állati inzulinokat. Magyarországon 1996-ban fejeződött be a cukorbetegék átállítása humán inzulinokra.



Az inzulin használata

A hagyományos "gyors hatású" inzulin beadása után fél órát kell várni az étkezéssel. A bőr alá adott inzulin felszívódása ugyanis késik, mert a beadás helyén az inzulinmolekulák hatásával, hexamerré kapcsolódnak össze. Kiderült, hogy ezért az inzulin B-lánc a felelős. Rövidesen előállították az úgynevezett "inzulin analógok" készítményeket. Ezek első forgalomba került képviselője a liszpro inzulin, amely annyiban különbözik a hagyományos emberi inzulintól, hogy a B-láncon két aminosavat, a lizint és a prolint felcserélték. A módosítással elérték, hogy a liszpro inzulin azonnal felszívódik a beadás helyéről, mivel molekulái nem kapcsolódnak egymáshoz. A liszpro inzulin a humán inzulinnal azonos biológiai hatás mellett lehetővé teszi a beadást követő azonnali étkezést. A gyors hatású inzulin analógot hamarosan követték az "elhúzó hatású" készítmények, amelyek még rugalmasabbá és változatosabbá tehetik a kezelést.

A beadás segédeszközei sokat és gyorsan fejlődtek az utóbbi időben. Először megjelentek a tűvel egybeépített, "holtér nélküli" fecskendők, majd feltalálták az inzulinadagoló "tollat", a PEN-t. A PEN-ben több napra elegendő inzulin van, így nagyobb szabadságot biztosít a betegnek, hiszen nem kell az inzulinfelszívással sem bajlódnia. Ily módon az adagolás is pontosabbá vált. Az ampullás inzulinkészítmények jelenleg minden cukorbeteg számára ingyenesek, a PEN-be való patronok azonban csak azoknak, akik naponta kettőnél több injekcióra vannak beállítva. Az egyszer használatos PEN-ek azonban nem támogatottak. A sokak által várt beültethető inzulinpumpa, amely visszerbe (intravénásan), vagy a hashártyaűrbe (intraperitoneálisan) adagolja az inzulint, hazánkban még nem elérhető, külföldön is csak kísérleti jelleggel, és szűk körben alkalmazott lehetőség.

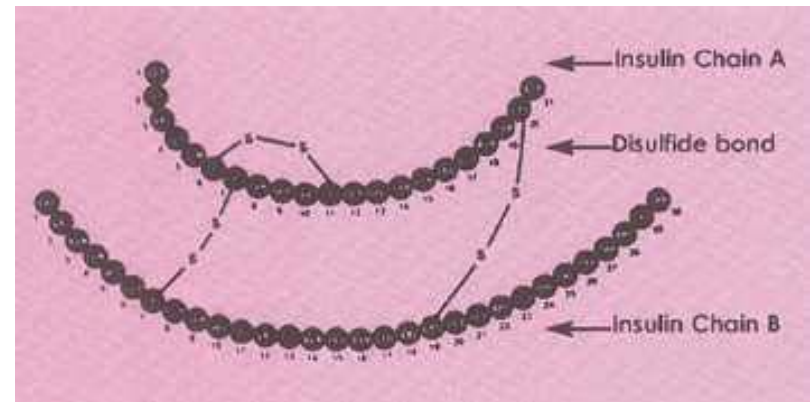
Az inzulin beadásának módszerei és segédeszközei

Amióta az inzulint alkalmazzuk, - a sürgősségi állapotokat kivéve - mindig a bőr alá (subcutan) adagoljuk. A tűszúrás kiváltására más inzulin-beviteli módok keresése világszerte folyik, de mindeddig nem sikerült megnyugtatóan megoldani a nehéz problémát. Például a szájon át történő bevitel legnagyobb akadálya, hogy az emésztőenzimek az 51 aminosavból álló inzulint lebontják. A betegek érthető okokból nagy figyelemmel kísérik a legkülönbözőbb próbálkozásokat, de tudomásul kell venni, hogy a tablettákról, tapaszokról és egyéb alkalmasnak beállított inzulin beviteli módokról szóló újsághírek legjobb esetben is csak kísérletekről tudósítanak.



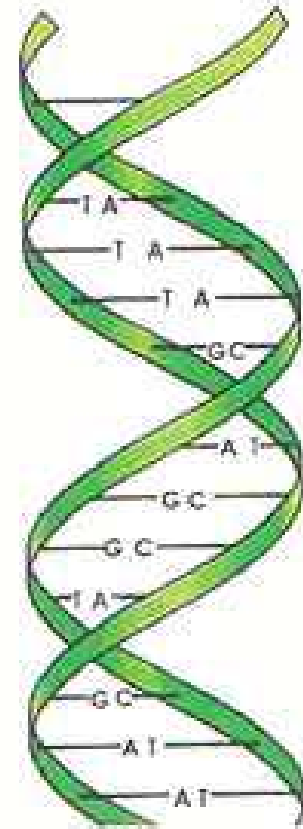
Az inzulin szerkezete

Az inzulin egy kisméretű, egyszerű fehérje. 51 aminosavból áll, amelyek közül 30 alkotja az egyik, 21 a másik polipeptidláncot. A két lánc egy diszulfid híddal kapcsolódik egymáshoz.



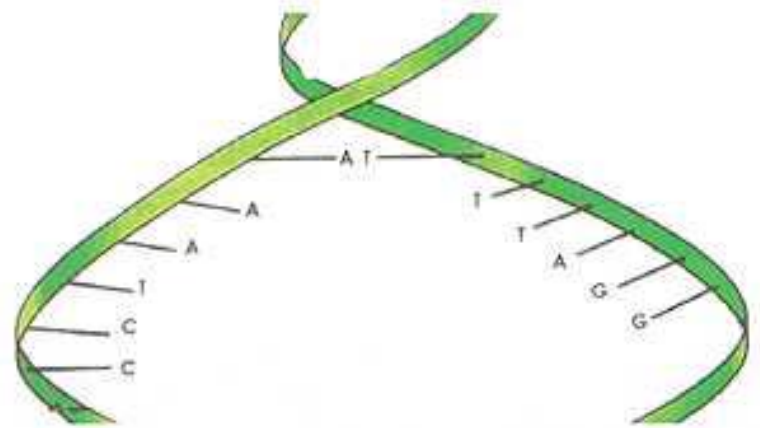
A dupla hélixen belül

Az inzulin genetikai kódja a 11. kromoszóma rövid karjának tetején található a DNS-ben. 153 nitrogénbázist tartalmaz (63-at az A-, 90-et a B-lánchoz). A kromoszómát felépítő DNS két hosszú, egymáshoz csatlakozó hélixből áll, egy nukleotid láncból felépülve, amelyek mindegyike tartalmaz egy dezoxiribóz cukrot, egy foszfát csoportot és egy nitrogén bázist. Négy különböző nitrogén bázis található a DNS-ben: adenin, timin, citozin és guanin. Egy adott fehérje szintézisét ezen bázisok sorrendje határozza meg.



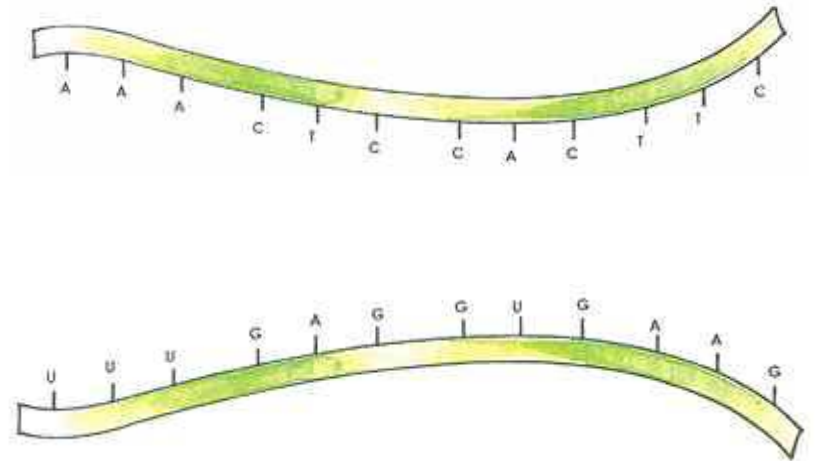
Az inzulin szintézise a genetikai kódból

A 11. kromoszóma dupla szála kettéválik, az inzulintermelésre jellemző páratlan nitrogén bázisokat eredményezve.

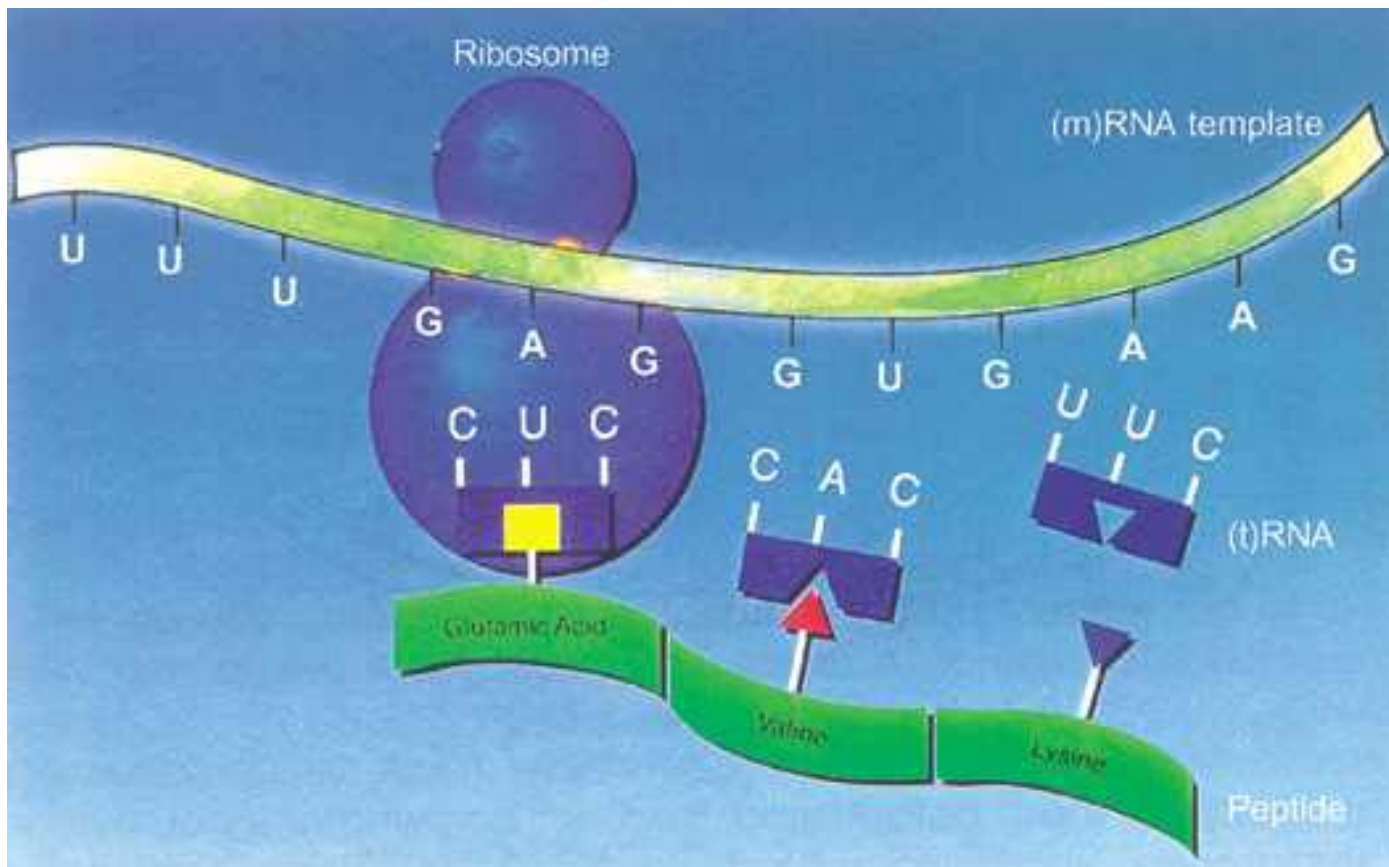


Az inzulin szintézise a genetikai kódból

A szétnyíló DNS-szálak egyikét templátként használva jön létre a messenger RNS a transzkripció során. Az mRNS szál (amelyen a timin bázis helyett uracil található) szerepe a genetikai információ szállítása a sejtmagból a citoplazmába, ahol kapcsolódik a riboszómához.



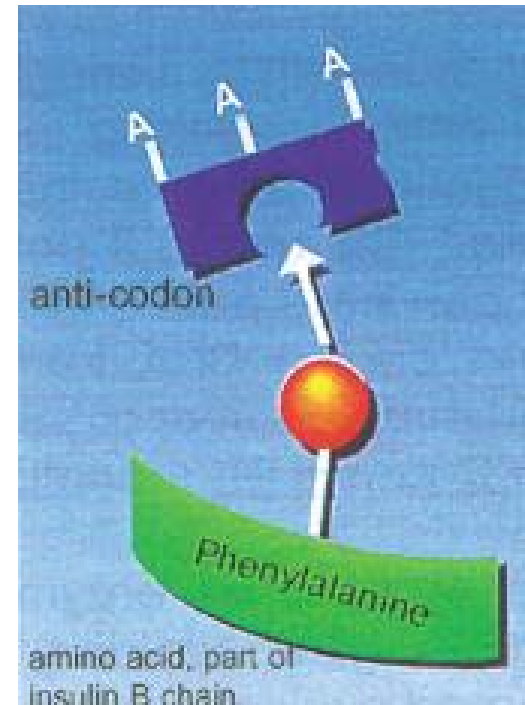
A transzláció folyamata a riboszómán



Transzláció

Az mRNS nitrogén bázisai hármasával csoportosíthatók, ezt hívjuk kodonnak. A transzfer RNS (tRNS) molekula három szabad nitrogén bázisból és a hozzájuk tartozó csatolt aminosavakból áll (anti-kodon). Ezek csatlakoznak párba a komplementer bázisokkal (kodonokkal) az mRNS-en.

Az mRNS tRNS általi átolvása a riboszómán a transzláció. Adott aminosav lánc jön létre az mRNS által meghatározott kódot követő tRNS-ek által. Az mRNS bázis szekvenciája átíródik aminosav-szekvenciává, és ezek az aminosavval összekapcsolódva együttesen alkotják majd az inzulin fehérjét.

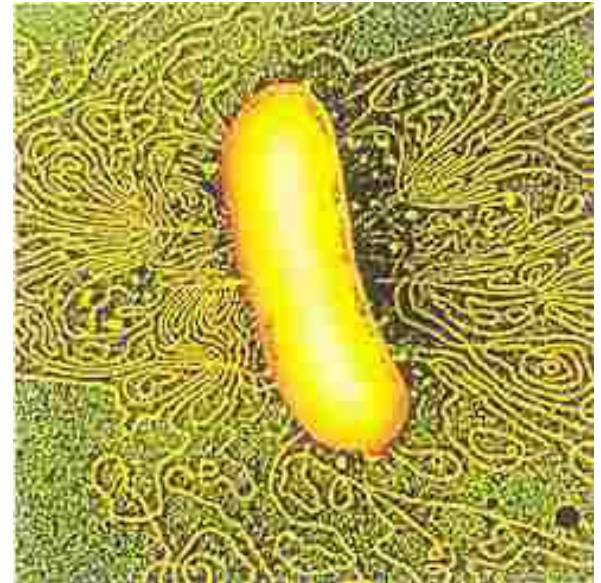


A vektor: *E. coli* baktérium

A gyakorta használt, legyengített *Escherichia coli* (*E. coli*) baktérium alkalmazható a célra (lásd képen). Ez a baktérium az emberi emésztési szervrendszerben található, és az inzulin „génmérnöki gyára”.

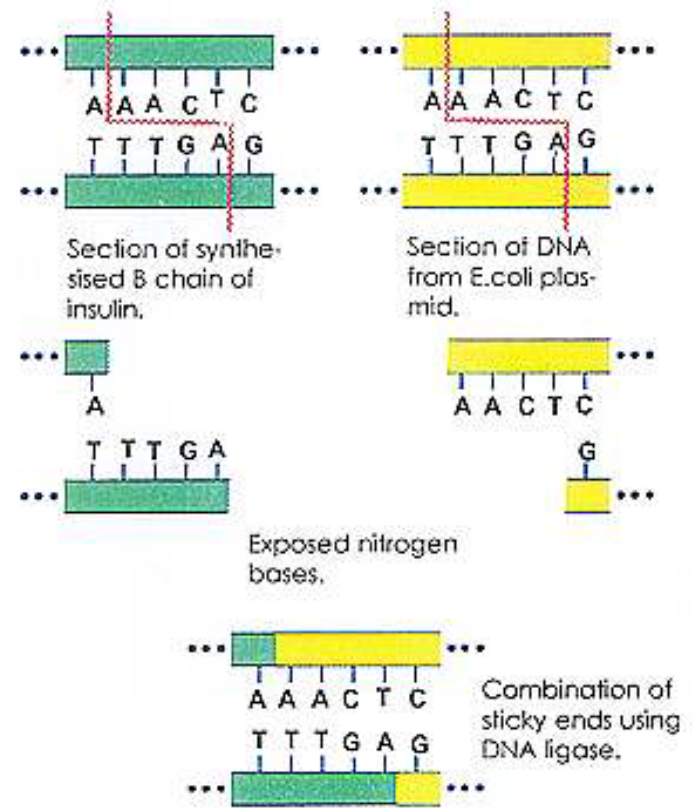
A baktérium szaporodásával az inzulin génje replikálódik egy cirkuláris DNS szakasszal, a plazmiddal együtt. Az *E. coli* sejt azonban olyan enzimeket termel, amelyek az idegen fehérjéket, mint az inzulin azonnal degradálják. Ezen enzimek hiánymutáns törzseit használva ez a probléma elkerülhető.

Az *E. coli* sejtben a B-galaktozidáz enzim kontrollálja a gének átírását. Ahhoz, hogy a baktérium inzulint termeljen, az inzulin génjét ehhez az enzimhez kell kötni.



A génmérnök szerszámosládája

A baktériumok által természetesen termelt restriktions enzimek biológiai szikeként működnek, csak azokat a nukleotid szakaszokat ismerve fel, amelyek pl. az inzulin kódját határolják. Ezáltal bizonyos nitrogén bázispárok kimetszhetők és az inzulinkódoló DNS szakasz eltávolítható adott organizmus kromoszómájából és beépíthető máshova. DNS ligáz enzim egy genetikai ragasztó, amely összehegeszti a felnyílt nukleotidok „ragadós végét” (sticky ends).





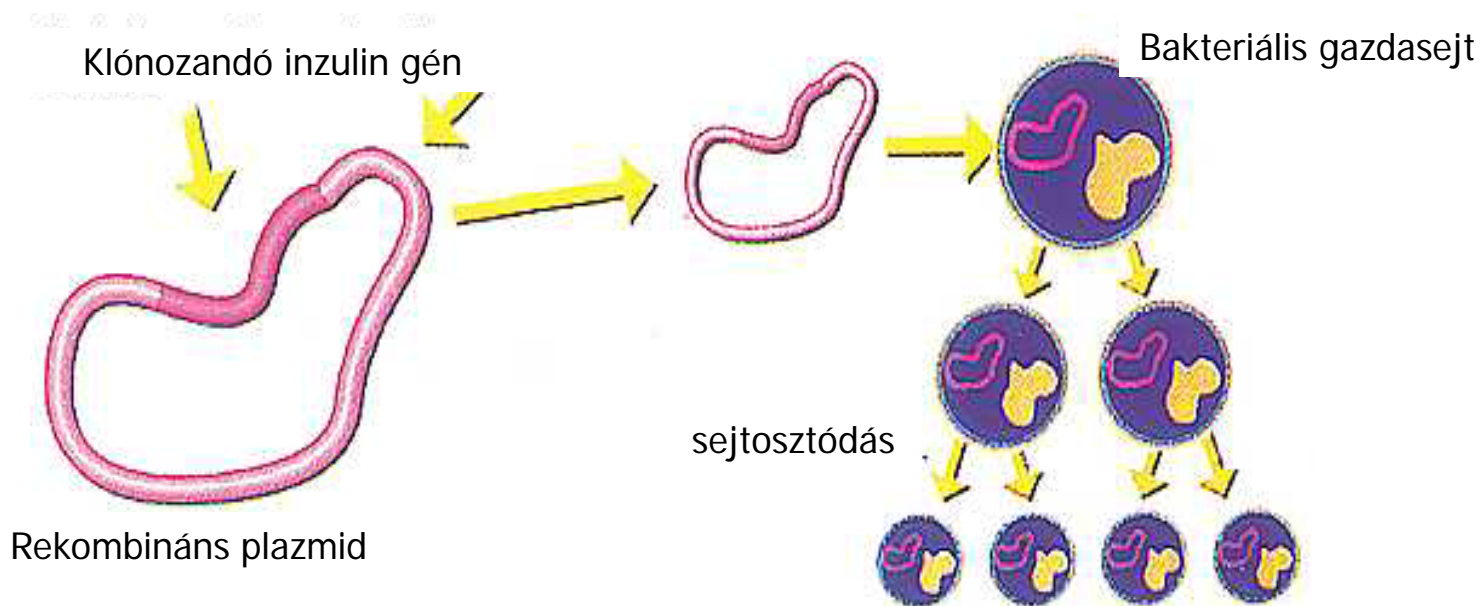
A humán inzulin gyártása

Az első lépés a DNS láncok kémiai szintézise, amelyek az inzulin A és B polipeptid láncát jellemző speciális nukleotid szekvenciáit adják meg.

A szükséges DNS szekvencia meghatározható, lévén mindkét lánc aminosav összetétele és sorrendje feltérképezett. 63 nukleotid szükséges az A, és 90 a B lánc szintéziséhez, plusz egy kodon mindkét végén, jelezve a fehérjeszintézis végét (termináció). Egy aminosavat (metionint) is hordozó anti-kodon kerül az egyes láncok elejére, amely lehetővé teszi az inzulin fehérje eltávolítását a baktérium sejt aminosavjaitól. A szintetikus A és B lánc „génje” ezután külön-külön kerül inzercióra egy bakteriális enzim, a béta-galaktozidáz génjébe, amely vektor plazmidjában van. Ebben a szakaszban nagyon fontos biztosítani, hogy a szintetikus gén kompatibilis legyen a B-galaktozidáz génjével.

A humán inzulin gyártása

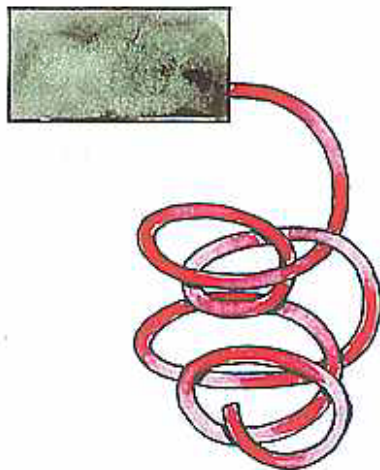
A rekombináns plazmidokat ezután az *E. coli* sejtekbe juttatják. A rekombináns DNS technológia gyakorlati alkalmazása során a hatékony inzulintermeléshez az inzulin génjét tartalmazó plazmidú baktériumok százait kell előállítani. Az inzulin gén a B-galaktozidázzal együtt zajló sokszorozódás során fejeződik ki a sejtben a mitózis során.



A humán inzulin gyártása

A keletkező fehérje részben β -galaktozidázból áll, amelyhez az inzulin A, vagy B lánc csatlakozik. Az A és B láncok ezután leválaszthatóak a β -galaktozidáz részletekről.

Az A és B lánc összekeverésük után összekapcsolódnak, kialakítva a diszulfid hidakat, létrehozva a tiszta Humulint – a szintetikus humán inzulint.



Inzulin A lánc



Inzulin B lánc

béta-galaktozidázzal kapcsolódva



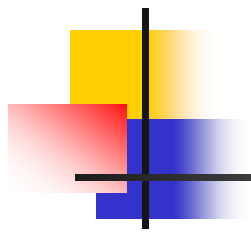
Linkajánló

- http://www.youtube.com/watch?v=m_BJWFVQWJI&feature=related
- <http://www.youtube.com/watch?v=TbdPwm6mR5U&feature=related>
- <http://www.dnalc.org/view/15505-Synthesizing-human-insulin-using-recombinant-DNA-3D-animation-with-no-audio.html>



Felhasznált források

- www.wikipedia.org
- www.macosz.hu
- www.littletree.com.au/dna.htm
- http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/transfer_and.php



Készítette: Kovács Valéria

Gruiz Katalin Biotechnológiai ismeretek c. tárgyához