بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

همسانه سازی وانتقال پایدار ژن پروانسولین انسانی با واسطه‌گری اگروباکتریوم به گیاه توتون

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

فرگل مظاهری کلهرودی

اساتید راهنما

دکتر بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی

دکتر هوشنگ علیزاده

۱۳۹۲

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی خانم فرگل مظاهری کلهرودی

تحت عنوان

همسانه سازی وانتقال پایدار ژن پروانسولین انسانی با واسطه‌گری اگروباکتریوم به گیاه توتون

در تاریخ۹۲/۱۰/۲۴ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای اول پایان نامه	دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی
۲- استاد راهنمای دوم پایان نامه	دکتر هوشنگ علیزاده
۳- استاد مشاور پایان نامه	دکتر سیروس قبادی
۴- استاد داور	دکتر مجید طالبی
۵- استاد داور	دکتر مسعود بهار
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر محمد مهدی مجیدی

تقدیر و تشکر

سپاس و ستایش خداوندی را سزاست که کسوت هستی را بر اندام موزون آفرینش بپوشانید و تجلیات قدرت لایتزالی را در مظاهر و آثار طبیعت نمایان گردانید.

بار الها! من با یاد تو، به تو تقرّب می جویم و تو را به پیشگاه تو شفیع میآورم و از تو خواستارم، به کرمت مرا به خودت نزدیک گردانی و یاد خود را به من الهام کنی و بر من رحمت آوری و به آنچه بهره و نصیب من ساخته ای، خشنودم قرار دهی و در همه حال به فروتنی ام وا داری.

بر دستان پرمهر پدر و مادر عزیزم به خاطر همدلی‌هایشان و همه تلاشهای محبت‌آمیزشان در مراحل مختلف زندگیم بوسه می‌زنم.

برخودلازم می دانم ازکلیه کسانی که بنده را در تدوین و نگارش این پایان‌نامه یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم. به خصوص از اساتید فرزانه جناب آقایان دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی ودکتر هوشنگ علیزاده که در کلیه مراحل انجام این پژوهش با خوشروئی، یاری و راهنمائی‌ام نمودند و همچنین از استاد فرهیخته جناب آقای دکترسیروس قبادی که وقت خود را بی شائبه در اختیار من گذاشته و با دقت نظر خاصی مشاوره لازم در این خصوص ارائه نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از جناب آقایان دکتر مجید طالبی و دکتر مسعود بهار که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را به‌عهده گرفتند، صمیمانه سپاسگزارم.

از کمک‌های بی‌دریغ سرکار خانم غزاله خاکسار در یکایک مراحل انجام این پژوهش، سپاسگزارم.

از دوستان عزیزم خانم‌ها و آقایان قاسمی گوجانی، عبایی، محولاتی، تقدس، نبی‌زاده، رضایی، محمدی، منشیان و صدراوی کمال تشکر را دارم.

در پایان از کلیه اساتید، مسئولین آزمایشگاه‌ها و همکلاسی‌هایم در گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و اساتید،کارمندان و دانشجویان گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران که اینجانب را حمایت نمودند، سپاسگزاری می نمایم.

فرگل مظاهری کلهرودی

زمستان ۹۲

تقدیم به پدر و مادر مهربانم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این
پایان نامه (رساله) متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب.....هشت

چکیده.....۱

فصل اول: مقدمه وبررسی منابع

۱-۱-بیماری دیابت ۲

۱-۲-انسولین..... ۲

۱-۲-۱- ژن انسولین..... ۳

۱-۲-۲- ساختار انسولین..... ۳

۱-۲-۳- ترشح و عمل انسولین در بدن..... ۴

۱-۳-نحوه‌ی تحویل دارو ۵

۱-۳-۱- ارائه خوراکی..... ۵

۱-۴-زراعت مولکولی..... ۶

۱-۴-۱- انتخاب گیاهان به عنوان سیستم بیان..... ۶

۱-۴-۲- چگونگی زراعت مولکولی پروتئین های نوترکیب در گیاهان ۷

۱-۴-۲-۱- فراهم کردن ژن برای بهره‌برداری..... ۷

۱-۴-۲-۲- وارد کردن ژن به سیستم بیان..... ۷

۱-۴-۳- انتقال ژن به گیاهان از طریق *Agrobacterium tumefaciens*..... ۷

۱-۵-راهکارهایی به منظور افزایش بیان ژن پروانسولین در سیستم گیاه ۸

۱-۵-۱-بهینه سازی رمز ژنتیکی ژن پروانسولین ۸

۱-۵-۲- بکارگیری راه‌انداز ویروسی CaM V 35S..... ۸

۱-۵-۳-استفاده از افزایش‌دهنده بیان کزاک ۸

۱-۶-راهکارهایی به منظور هدایت بهتر پروانسولین تولید شده..... ۹

۱-۶-۱- استفاده از توالی CTB..... ۹

الف- ساختار ۹

ب- اتصال و مکانیسم عمل ۹

۱-۶-۱-۲- توالی LTB باکتری *E. coli* به منظور افزایش انتقال پروتئین تولید شده به درون سلول‌های تراریخت ۱۰
۱-۶-۱-۳- مقایسه‌ای بین توالی CT و LT ۱۰
۱-۶-۲- استفاده از توالی اکستنسین ۱۱
۱-۶-۳- پپتیدهای نفوذکننده به سلول ۱۲
۱-۷-مکانیسم‌های خالص‌سازی ۱۲
۱-۷-۱-استفاده از توالی ضمیمه هیستیدین ۱۲
۱-۷-۲-استفاده از توالی ترومبین ۱۳
۱-۸-طراحی سازه‌ای به منظور غلبه بر موانع ۱۳
۱-۹-تحقیقات انجام شده در تولید انسولین و پروانسولین نوترکیب ۱۳
۱-۱۰-هدف از انجام این تحقیق ۱۵

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد مورد استفاده ۱۸
۲-۲-سازه مورد استفاده ۱۸
۲-۳-باکتری‌های مورد استفاده ۱۹
۲-۴-محیط کشت باکتریایی ۱۹
۲-۵-ذخیره‌سازی باکتری‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ۱۹
۲-۶-تهیه سلول‌های مستعد باکتری E. coli سویه DH5α ۱۹
۲-۷-تراریختی سلول‌های مستعد E. coli ۲۰
۲-۸-استخراج پلاسمید در حجم کم ۲۰
۲-۹-بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده ۲۱
۲-۱۰-تکثیر ژن پروانسولین انسانی با استفاده از PCR ۲۲
۲-۱۱-انتقال سازه با روش انجماد و ذوب به اگروباکتریوم ۲۳
۲-۱۲-کشت بافت و مواد گیاهی ۲۵
۲-۱۳-انتقال سازه حاوی ژن پروانسولین انسانی به گیاه توتون ۲۶
۲-۱۴-تأیید مولکولی گیاهان تراریخت ۲۷
۲-۱۴-۱-تجزیه و تحلیل گیاهان تراریخت در سطح DNA ۲۷

۲-۱۴-۱-۱-استخراج DNA ژنومی از گیاه توتون تراریخت: ۲۷
۲-۱۴-۲-تائید گیاهان تراریخت توتون در سطح RNA ۲۷
۲-۱۴-۲-۱- استخراج RNA ۲۷
الف-آماده سازی وسایل جهت استخراج RNA ۲۷
ب- استخراج RNA ۲۸
ج- تعیین کمیت و کیفیتRNA ۲۸
۲-۱۴-۲-۲- تهیه cDNA ۲۹
۲-۱۴-۲-۳ - واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) ۳۰
۲-۱۵-تأیید تولید انسولین در بافت‌های تراریخت ۳۰
۲-۱۵-۱-استخراج پروتئین ۳۰
۲-۱۵-۲-تعیین غلظت پروتئین کل ۳۰
۳-۱۵-۳- بررسی تولید انسولین فعال براساس دستورالعمل کیت Mono-bind ۳۱
۲-۱۶-آنالیز گیاهان نسل اول ۳۱
۲-۱۶-۱-کشت بذور نسل اول تراریخت در محیط انتخابی ۳۱
۲-۱۶-۲-تأیید وجود و بیان ژن پروانسولین انسانی در گیاهان نسل اول ۳۲

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱-انتقال پلاسمید به *E.coli* ۳۳
۳-۲ -انتقال پلاسمید به *Agrobacterium tumefaciens* ۳۴
۳-۳- انتقال ژن پروانسولین انسانی به گیاه توتون با استفاده از برگ ۳۶
۳-۴- نتایج انتقال پایدار ۳۸
۳-۴-۱ تأیید گیاهان تراریخت احتمالی به‌وسیله PCR ۳۸
۳-۴-۳- تأیید تولید انسولین فعال درگیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از کیت مونوبایند ۴۱
۳-۴-۴- بررسی تولید انسولین فعال در گیاهان تراریخت ۴۳
۳-۵-کشت گیاهان T_1 ۴۴

فصل چهارم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۴-۱- نتیجه‌گیری ۵۲

۴-۲-پیشنهادات.....۵۳
منابع.....۵۴
چکیده انگلیسی.....۶۰

فهرست اشکال

شکل۱- ۱-A : مراحل تبدیل پری-پروانسولین به انسولین B: ساختمان آمینواسیدی پروانسولین ۴
.شکل۱- ۲-ساختار سم CT ۹
شکل۳- ۱- ظهور همسانه‌های حاوی ژن پروانسولین انسانی در محیط انتخابی دارای کانامایسین ۳۳
شکل۳- ۲- تکثیر قطعه ۱۱۹۰ جفت باز با استفاده از آغازگر پیش‌رو 35S و آغازگر پس‌رو PRO-R ۳۴
شکل۳- ۳- تکثیر قطعه ۲۵۸ جفت نوکلئوتیدی با استفاده از آغازگر پیش‌رو PRO-F و آغازگر پس‌رو PRO-R ۳۴
شکل۳- ۴- ظهور همسانه در محیط انتخابی دارای کانامایسین و ریفامپسین..... ۳۵
شکل۳- ۵- تأیید وجود سازه در باکتری‌های تراریخت به وسیله PCR با استفاده از آغازگر پیش‌رو 35S و آغازگر پس رو PRO-R..... ۳۵
شکل۳- ٦- تأیید وجود ژن به‌وسیله PCR در همسانه‌های اگروباکتریوم با استفاده از آغازگر های PRO-F و PRO-R ۳۵
شکل۳- ۷- مراحل باززایی و رشد گیاهان هم‌کشت شده با اگروباکتریوم..... ۳۶
شکل۳- ۸- از بین رفتن ریزنمونه‌ها به دلیل آلودگی با اگروباکتریوم ۳۷
شکل۳- ۹- گیاه تراریخت احتمالی منتقل شده به خاک ۳۷
شکل۳- ۱۰- گیاهان تراریخت منتقل شده به خاک در گلخانه دانشگاه تهران..... ۳۸
شکل۳- ۱۱-استخراج DNA از گیاهان تراریخت احتمالی منتقل شده به گلدان ۳۸
شکل۳- ۱۲- نتایج PCR گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگر پیش‌رو 35S و آغازگر پس‌رو PRO-R ۳۹
شکل۳- ۱۳- نتایج PCR گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای PRO-F و PRO-R ۳۹
شکل۳- ۱۴- نتایج حاصل از استخراج RNA از گیاهان تراریخت احتمالی..... ۴۰
شکل۳- ۱۵- نتایج RT-PCR برگ‌های گیاهان تراریخت..... ۴۰
شکل۳- ۱۶- تأیید عدم وجود DNA در cDNA ساخته شده ۴۰
شکل۳- ۱۷- منحنی استاندارد غلظت پروتئین..... ۴۱
شکل۳- ۱۸- رنگ گیری استانداردهای کیت Mono-bind در غلظت‌های مختلف انسولین در مرحله افزودن پیش‌ماده ۴۲
شکل۳- ۱۹- منحنی استاندارد غلظت انسولین..... ۴۳
شکل۳- ۲۰- رنگ‌گیری نمونه‌های پروتئن استخراج شده از گیاهان تراریخت و شاهد منفی در مرحله افزودن پیش‌ماده ۴۴
شکل۳- ۲۱- گل‌دهی گیاه تراریخت T_o ۴۵
شکل۳- ۲۲- مقایسه جوانه‌زنی و رشد بذور گیاهان تراریخت نسل اول با بذور غیرتراریخت ۴۶
شکل۳- ۲۳- بروز تنوع مندلی در بذور حاصل از گیاهان تراریخت T_o. ۴۶
شکل۳- ۲۴- گیاهان تراریخت نسل اول تراریخت منتقل شده به خاک ۴۷

شکل۳- ۲۵- استخراج DNA از گیاهان تراریخت نسل اول ۴۷
شکل۳- ۲۶- واکنش PCR گیاهان تراریخت نسل اول با استفاده از آغازگر پیش‌رو 35S و آغازگر پس‌رو PRO-R
..... ۴۸
شکل۳- ۲۷- استخراج RNA از گیاهان تراریخت نسل اول..... ۴۸
شکل۳- ۲۸- نتایج RT-PCR در گیاهان نسل اول..... ۴۹

فهرست جداول

جدول ۲- ۱-ترکیبات بافر TAE ۲۲
جدول ۲- ۲- مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR آغازگرهای Pro-F و Pro-R ۲۲
جدول ۲- ۳- چرخه حرارتی مورد استفاده برای تکثیر ژن پروانسولین ۲۳
جدول ۲- ۴- مواد لازم جهت تایید ژن انسولین انسانی با آغازگرهای 35S و Pro-R ۲۴
جدول ۲- ۵- شرایط PCR با آغازگر اختصاصی 35S و Pro-R ۲۴
جدول ۲- ۶- ترکیب نمک‌های پرمصرف محیط کشت MS ۲۵
جدول ۲- ۷- ترکیب نمک‌های کم‌مصرف محیط کشت MS ۲۵
جدول ۲- ۸- ترکیب ویتامین‌های محیط کشت MS ۲۶
جدول ۲- ۹- ترکیبات بافر بارگذاری ۲۹
جدول ۲- ۱۰- مواد مورد نیاز و مقادیر آن برای مرحله اول سنتز cDNA ۲۹
جدول ۲- ۱۱- مواد مورد نیاز و مقادیر آن برای مرحله دوم سنتز cDNA ۳۰
جدول ۲- ۱۲- ترکیبات مورد نیاز جهت تهیه استاندارد های برادفورد ۳۱
جدول ۳- ۱- میزان جذب غلظت‌های مختلف پروتئین BSA در ۵۹۵ نانومتر ۴۰
جدول ۳- ۲- تعیین میزان غلظت پروتئین در نمونه‌های برگی در ۵۹۵ نانومتر ۴۲
جدول ۳- ۳- میزان جذب استانداردهای کیت Mono-bindدر ٤٥٠ نانومتر ۴۳
جدول ۳- ۴- مقادیر انسولین تولیدشده به‌وسیله گیاهان تراریخت ۴۴

اختصارات

Cys: Cysteine
GLUT: Glucose transporter
CT: *Cholerae Vibrio* toxin
LT: heat Labile Toxi
ST: Shigella Toxin
RT: Ricin Toxin
TAT: Trans Activator Transporter
CPP: Cell Penetrating Peptid
NMR: Nuclear Magnetic Resonance
TSP: Total Soluble Protein
PRO-F: proinsulin forward primer
PRO-R: proinsulin reverse primer
NAA: 1-Naphthalene Acetic Acid
BAP: 6-Benzyl Amino Purine
NOS: Nopalin Synthase

چکیده

در حال حاضر میلیون‌ها نفر در سراسر جهان برای گریز از اثرات کشنده بیماری دیابت به تزریق دائمی انسولین نیاز دارند. بنابراین توسعه سیستمی که بتواند این دارو را با قیمت و فراوانی مناسب در اختیار مصرف‌کنندگان قرار دهد؛ امری ضروری می‌باشد. با توسعه تکنیک مهندسی ژنتیک، انسولین انسانی در باکتری *E. coli* و مخمر تولید گردید؛ ولی به علت معایب تولید پروتئین‌های نوترکیب در میکروارگانیسم‌ها مانند هزینه نسبتاً بالا، امکان آلودگی با پروتئین‌های سمی و نیاز به مراحل هزینه‌بر خالص‌سازی؛ بیشتر تحقیقات برروی تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان متمرکز شده است. در این مطالعه، سازه pBI121 شامل توالی‌های ضمیمه حاوی کزاک، LTB، اکستنسین، ژن پروانسولین انسانی، پنتراتین و شش اسیدآمینه هیستیدین به‌واسطه‌گری اگروباکتریوم *Agrobacterium tumefaciens* pv. LBA4404 به گیاه توتون انتقال یافت. حضور ژن مورد مطالعه در ژنوم گیاهان تراریخت توتون توسط آزمایش مولکولی PCR تأیید گردید. همچنین نتایج حاصل از واکنش RT-PCR بر صحت بیان ژن پروانسولین انسانی در گیاهان تراریخت توتون تأکید نمود. نتایج حاصل از الیزا نیز نشان داد که گیاهان تراریخت توانایی ترجمه و تولید پروتئین الحاقی را داشته و انسولین تولیدی در بافت‌های گیاهی کاملاً فعال بوده و قابلیت کاربرد در پزشکی را دارد. به نظر می‌رسد که مقدار تخمینی پروتئین نوترکیب تولید شده در گیاهان تراریخت T_o (در حدود ۰/۱۸٪ کل پروتئین‌های گیاهان تراریخت) مناسب باشد و تولید این گیاهان تراریخت از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است. همچنین، حضور و بیان ژن پروانسولین انسانی در گیاهان تراریخت توتون در نسل بعد نشان داد که ژن مورد نظر به صورت پایدار در ژنوم گیاهان توتون قرار داشت. رشد گیاهان نسل اول در محیط کشت حاوی کانامایسین با نسبت مندلی ۳:۱ نیز انتقال ژن پروانسولین انسانی به گیاهان نسل بعد را تأیید نمود. اگرچه تا به حال پروانسولین انسانی در گیاهان تولید شده است ولی تا به امروز هیچ کدام از الحاق‌های مورد استفاده در این پژوهش در گیاهان استفاده نشده است. با توجه به نتایج مثبت به دست آمده از این پروژه به نظر می‌رسد سازه مذکور دارای توانایی مناسبی جهت تولید و بیان ژن پروانسولین بوده و برای بررسی‌های بیشتر و انتقال به گیاهان دیگر مناسب باشد.

کلمات کلیدی: دیابت، پروانسولین ، اکستنسین، پنتراتین، LTB

فصل اول
مقدمه و مرور منابع

۱-۱- بیماری دیابت

دیابت، یک ناهنجاری متابولیکی مزمن است که منجر به نارسایی بدن در تولید هورمون انسولین یا ناتوانی بدن در پاسخ به وجود انسولین می‌شود. این بیماری را می‌توان به دو نوع I و II تقسیم نمود، دیابت نوع I که در گذشته به عنوان "دیابت شیرین وابسته به انسولین" شناخته می‌شد، ناشی از عدم ترشح انسولین در بدن به دلیل خودایمنی و تخریب سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس پانکراس و افزایش غیر عادی گلوکز در خون می‌باشد [۴۰]. بیمارانی که از دیابت نوع I رنج می‌برند، به تزریق روزانه انسولین و خودکنترلی گلوکز خون نیاز دارند. در دیابت نوع II که در گذشته به عنوان "دیابت غیروابسته به انسولین" شناخته می‌شد، بیماران با داروهای خوراکی عوامل ضددیابتی درمان می‌شوند و در صورت پیشرفت بیماری، اغلب آنها برای کنترل بهینه گلوکز به انسولین نیاز دارند. لذا انسولین برای بیماران هر دو گروه، درمان حیاتی به شمار می‌آید [۴۷]. براساس اعلام سازمان جهانی بهداشت، بیش از ۱۸۰ میلیون نفر در سراسر جهان از انواع مختلف دیابت رنج می‌برند، که پیش‌بینی می‌شود تعداد افراد مبتلا به این بیماری در سال ۲۰۳۰، دو برابر شود [۴۰].

۱-۲- انسولین

انسولین در سال ۱۹۲۱، توسط چهار دانشمند کانادایی فردریک گرنت باتینگ[1]، چارلز هربت بست[2]، جان جمیز

[1] Fredrich Grant Banting
[2] Charls Herbet Best

ریکارد مکلود[1]، جیمز برترام کالیپ[2] از پانکراس حیوانات استخراج گردید. پیش از آن، ابتلا به بیماری دیابت نوع اول، برابر با مرگ بود [۱۳]. ساختار اولیه این هورمون در اواسط دهه ۱۹۵۰ توسط سانگر[3] شناسایی شد و در سال ۱۹۶۰ ساختار کامل انسولین مشخص گردید [۹۳].

۱-۲-۱- ژن انسولین

ژن انسولین به طول ۱۸۶۱ جفت باز بر روی بازوی کوتاه کروموزم ۱۱ قرار گرفته است. این ژن دارای دو اینترون و سه اگزون می‌باشد که زنجیره A، زنجیره B و C-پپتید را کد می‌نماید [۱۰]. ژن انسولین در پایگاه اطلاعات داده NCBI[4] با شماره شناسایی[5] NC_000011 ثبت شده است.

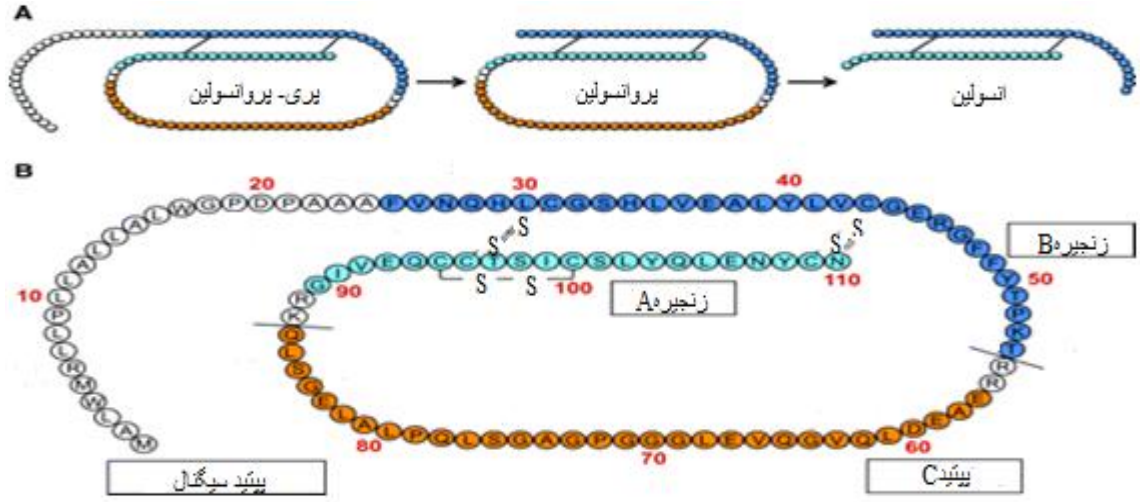
۱-۲-۲- ساختار انسولین

انسولین از پیش‌ماده پری-پروانسولین[6] [۱۰،۲۰] (دارای یک پپتید نشانگر[7] آبگریز با ۲۴ اسید آمینه در انتهای N[8]) تشکیل می‌شود [۶۷]. پپتید نشانگر سبب تسهیل انتقال پری-پروانسولین از سیتوپلاسم (که در آن بیوسنتز آغاز شده است)در سراسر غشای شبکه آندوپلاسمی زبر می‌شود؛ حذف آن همزمان با ترجمه و زمانی که پپتید تازه سنتز شده به لومن شبکه آندوپلاسمی زبر انتقال می‌یابد، رخ می‌دهد [۷۱].

انسولین در سلول‌های بتای پانکراس به صورت پیش‌ماده پروانسولین[9] (دارای ۸۶ اسیدآمینه) تولید شده و توسط برش آنزیمی به انسولین تبدیل می‌گردد. به نظر می‌رسد که بخشی از C-پپتید پروانسولین برای کمک به تطابق ساختار و تشکیل پیوند صحیح دی‌سولفید در زنجیره‌های A و B نقش دارد [۸۲]. مولکول انسولین متشکل از ۵۱ اسیدآمینه، در دو زنجیره پلی‌پپتیدی A و B قرار گرفته است و توسط دو پیوند دی‌سولفید بین‌زنجیره‌ای به یکدیگر متصل می‌شوند (A-Cys7/B-Cys7 و A-Cys20/B-Cys19). در زنجیره‌ی A یک پیوند دی‌سولفید درون زنجیره‌ای (A-Cys6/A-Cys11) نیز وجود دارد (شکل ۱-۱) [۸]. یکی از ویژگی ذاتی انسولین، توانایی آن در پیوستن بی‌درنگ جهت تشکیل ساختار دوجزئی، شش‌جزئی وتجمع‌های بالاتراست. در غلظت پایین در جریان خون ($<10^{-3}$میکرومولار)، انسولین به شکل تک‌جزئی وجود دارد که فرم فعال بیولوژیکی آن است. پس از بیوسنتز ، انسولین

[1] John James Rickard Macleod
[2] James Bertram Collip
[3] Fred Sanger
[4] http://www.ncbi.nlm.nih.gov
[5] Accession NC
[6] Pre-proinsulin
[7] Signal peptid
[8] N terminal
[9] Proinsulin

به صورت کریستالی متصل به عنصر روی (Zn)با ساختار شش‌جزئی در وزیکول‌های سلول‌های بتای پانکراس ذخیره می‌شود [۲۳].



شکل۱- ۱-A : مراحل تبدیل پری-پروانسولین به انسولین B: ساختمان آمینواسیدی پروانسولین

میزان بیوسنتز پروانسولین توسط عوامل بسیاری، از جمله مواد مغذی، انتقال دهنده‌های عصبی، هورمون‌ها، فعالیت پروتئین‌کینازها و به‌خصوص گلوکز تنظیم می‌شود[۸۷، ۱۴]. ترشح انسولین در پاسخ به افزایش سطح قند خون اتفاق می‌افتد و غلظت آستانه گلوکز مورد نیاز برای تحریک ترشح انسولین ۴ تا ۶ میلی مولار می باشد، اما میزان مورد نیاز برای تحریک بیوسنتز پروانسولین تنها ۲ تا ۴ میلی مولار است [۴۳]. بیوسنتز پروانسولین در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز، کمتر از دو ساعت رخ می‌دهد [۵۰]. به نظر می‌رسد تحریک گلوکز برای بیوسنتز پروانسولین ۲۰ دقیقه بعد از حضور گلوکز رخ می‌دهد و بعد از ۶۰ دقیقه به حداکثر سرعت (۳۰ تا ۴۰ برابر افزایش)می‌رسد. زمانی که محرک برداشته شود، میزان خاموش شدن بیوسنتز پروانسولین نسبتاً آهسته و در حدود یک ساعت به طول می‌انجامد [۵۲].

۱-۲-۳- ترشح و عمل انسولین در بدن

انسولین و قطعه C-پپتید در گرانول‌های ذخیره‌سازی متصل به غشا بسته‌بندی شده و تحریک ترشح انسولین منجر به تخلیه مقدار هم‌مولار[1] از انسولین به گردش خون می‌گردد. بخش بزرگی از انسولین به گیرنده خود متصل و از طریق کبد متابولیزه می‌شود؛ قطعه C-پپتید تا حد زیادی از متابولیسم کبدی فرار می‌کند، در نتیجه میزان C-پپتید محیطی یک نشانگر دقیق از ترشح انسولین درون‌زاد[2] است[۷۲]. به‌منظور فعال شدن ترشح انسولین، در ابتدا یک مولکول گلوکز

[1] Equimolar
[2] Endogenous

توسط پروتئین $GLUT_2$ به سلول‌های بتا منتقل و با آنزیم گلوکوکیناز فسفریله و متابولیزه شود. اطلاعات چندانی از فرآیند تحریک موجود نیست، اما احتمالاً شامل فعال شدن مسیر انتقال سیگنال میتوکندری، بسته شدن کانال‌های پتاسیم حساس آدنوزین‌تری‌فسفات و ورود کلسیم به سیتوپلاسم سلول بتا می‌باشد. به‌طور معمول، زمانی که غلظت قند خون افزایش می‌یابد و حتی کمی بالاتر از سطح ناشتا، سلول‌های بتا انسولین ذخیره شده و سپس انسولین تولید شده را ترشح می‌کنند. شدت پاسخ به انسولین توسط سطح گلوکز و همچنین نحوه ورود گلوکز تعیین می‌شود [۳۳].

انسولین برداشت، ذخیره‌سازی و مصرف گلوکز را در اکثر سلول‌های بدن (بجز سلول‌های عصبی)به سرعت افزایش می‌دهد. یکی از مهم‌ترین اثرات این هورمون پروتئینی جذب بخش اعظم گلوکز از روده و ذخیره آن در کبد به صورت گلیکوژن است. هرگاه مقدار گلوکزی که وارد سلول‌های کبدی می‌شود از ظرفیت ذخیره‌سازی به شکل گلیکوژن فراتر رود، انسولین تبدیل گلوکز به اسید چرب را تسهیل می‌کند. انسولین با یک مکانیسم ناشناخته "موتور ریبوزومی" را روشن می‌کند. گویی که انسولین یک مکانیسم روشن–خاموش را فعال می‌کند. همچنین انسولین میزان نسخه برداری از ژن‌های DNA را در هسته سلول افزایش می‌دهد و در نتیجه مقدار بیشتری mRNA و پروتئین تولید می‌شود. بارزترین تغییر، افزایش تولید مجموعه ای از آنزیم‌های دخیل در ذخیره‌سازی کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها است [۱].

۱-۳- نحوه‌ی تحویل دارو

حالت رایج برای تجویز انسولین، تزریق زیرپوستی است که از این طریق انسولین به‌صورت غیرفیزیولوژیکی به بدن ارائه می‌شود. به سبب اندازه بزرگ مولکول انسولین، آبدوستی و نفوذپذیری کم آن در عبور از غشا، تزریق زیرپوستی تنها راه تحویل آن به بیماران دیابتی در ۸۰ سال گذشته بوده است. این روش ارائه انسولین به بدن، دارای مشکلاتی نظیر درد موضعی، ناراحتی‌های ناشی از تزریق‌های مکرر، هیپوگلایسمی[1] به دلیل مصرف زیاد، خارش، حساسیت، هایپرانسولینی[2] و دیستروفی چربی[3] در اطراف محل تزریق است. به‌دلیل مشکلات فوق، رویکردهای جدیدی برای تحویل انسولین به بدن مانند ارائه خوراکی، پوستی، تنفسی، مقعدی، رحمی و چشمی در حال بررسی است [۴۷].

۱-۳-۱- ارائه خوراکی

مسیر خوراکی معقول‌ترین و راحت‌ترین مسیر برای ارائه دارو برای درمان بیماری‌های مزمن است. در ارائه خوراکی انسولین، کمک بزرگی به حذف درد ناشی از تزریق، موانع فیزیولوژیکی وابسته به تزریق از جمله اضطراب ناشی از تزریق و عفونت‌های احتمالی خواهد شد. در این مسیر، انسولین از طریق گردش خون به‌طور مستقیم توسط کبد دریافت

[1] Hypoglycemia
[2] Hyperinsulinemia
[3] Lipodystrophy