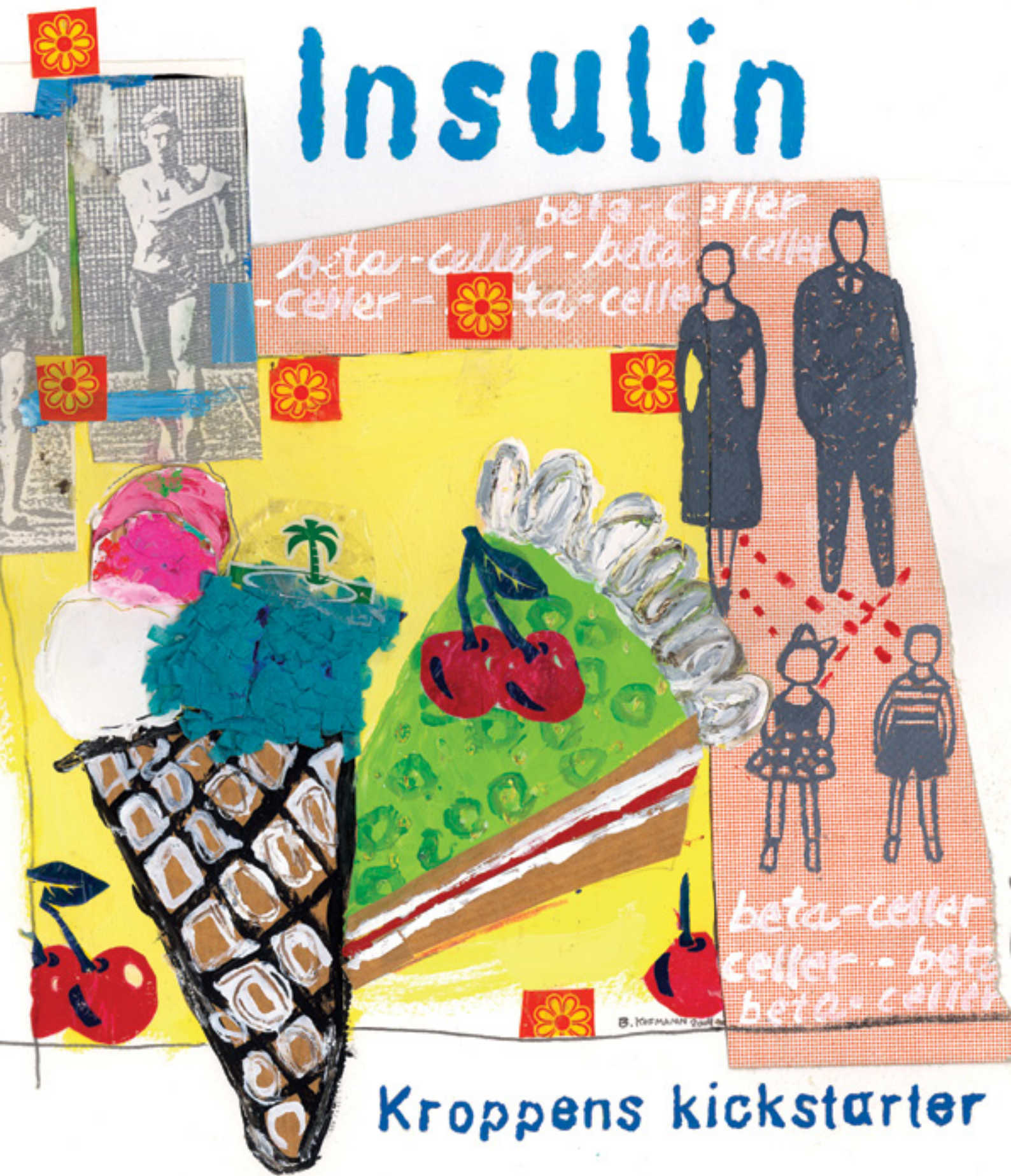


Insulin



Så blev den ferie ødelagt!

INSULIN

**Pernille fik konstateret sukkersyge - diabetes - da hun var 10 år gammel.
Fra da af skulle hun stikke selv og indsprøjte insulin flere gange dagligt.**

Det var ikke så meget det at stikke nålen i maveskindet. Det kunne hun godt få sig selv til. Men at stikke den helt igennem!? Dét, var hun ikke vild med. Der var bare ingen vej udenom. Pernille Wigell Christoffersen, der blev 19 år i 2005, var 10½ år gammel, da hun fik konstateret type 1-diabetes.

Hos personer med diabetes mangler organismen

hormonet insulin. Det betyder, at organismen ikke selv kan regulere blodsukkerkoncentrationen, og da man bliver alvorligt syg ved både en for høj og en for lav koncentration af sukker i blodet, skal organismen have tilført insulin.

For Pernille betød det, at hun skulle indsprøjte insulin fire gange om dagen. Hun overvandt forholdsvist hurtigt skrækken ved selve det at stikke gennem maveskindet, men i mange måneder var hun nervøs for at ramme forkert. Det gælder om ikke at ramme en muskel, for så gør det ondt. Hun var også bange for at komme til at få for meget insulin og dermed risikere at få et insulinchok, som kunne gøre hende bevidstløs.

I dag har Pernille en klar fornemmelse af, om hun er ved at stikke ind i en muskel, og hun har også udviklet en god fornemmelse for, om hun er i overskud af insulin og kan selv regulere sin blodsukkerkoncentration med små nødløsninger som et glas juice eller et stykke brød.

Pernille fik konstateret diabetes, mens hun var på ferie i Sverige. Så var den ferie ødelagt! Selv syntes Pernille ikke, at der var noget galt med hende og havde kun bemærket, at hun rendte lidt oftere på toilettet end sædvanlig. Hun blev derfor småsur, da moderen



Fig. 8.1: I gamle dage skulle en diabetiker bruge en traditionel injektionssprøjte. I dag bruger de fleste patienter en såkaldt insulinpen, der indeholder både insulinbeholder og sprøjte.

pludselig mente, at det var nødvendigt, at de tog ind på det lokale svenske sygehus for at få Pernille undersøgt. Men det var ikke blot en fiks idé, moderen havde fået. Gennem et stykke tid havde hun havde lagt mærke til, at Pernille var blevet mere og mere sløv og meget tørstig. Det havde fået alarmklokkerne til at ringe. Pernilles mor vidste nemlig, at træthed og stor tørst kan være symptomer på diabetes, fordi hendes søster som barn havde fået konstateret diabetes, og hun havde haft netop de symptomer. Pernilles mor vidste desuden, at type 1-diabetes ofte forekommer hos flere medlemmer af samme familie, og da Pernilles far også har diabetes, var det oplagt at fatte mistanke til diabetes.

Lægerne på det svenske sygehus kunne på baggrund af en enkelt blodprøve hurtigt afgøre, at Pernille rent faktisk havde diabetes.

Lige siden dengang og indtil årsskiftet 2002/2003 har hun dagligt skullet stikke sig fire gange, eller rettere fem gange.

- Morgen: Med både langtidsvirkende og hurtigtvirkende insulin, dvs. to sprøjter.
- Eftermiddag: En hurtigtvirkende.
- Inden middagsmaden: En hurtigtvirkende.
- Ved sengetid: En langtidsvirkende.

I begyndelsen tog det hende ca. 20 minutter at stikke sig, fordi hun var nervøs for at ramme forkert, og for at det skulle gøre ondt. I dag tager det kun et par minutter. Først måler hun blodsukkeret med en lille blodsuktermåler – det tager ca. 30 sekunder. På baggrund af blodsukkerkoncentrationen beregner hun,

hvor meget insulin hun skal have, doserer insulinsprøjten og indsprøjter insulinen.

Pernille synes, hun har haft gode betingelser for at leve normalt på trods af diabetes, og hun kan sagtens passe både gymnasiet, vennerne og festerne. I familien har de altid spist sundt og varieret, og det har ikke været nødvendigt at lægge vaner om eller at servere særlige retter for hende. Hun har heller ikke problemer med at dyrke sin sport, badminton. Det er faktisk godt at dyrke sport, fordi muskelcellerne bliver stimuleret til at optage mere sukker fra blodet. Det betyder, at Pernille skal huske at tage mindre insulin før sport og huske at drikke lidt mere sodavand, end hun måske ellers ville have gjort.

I de mindre klasser var skoledagene så korte, at hun kunne vente med eftermiddagssprøjten, til hun var kommet hjem, men efterhånden som hun lærte at få processen overstået på nogle få minutter, blev hun mindre afhængig af at være hjemme, og vennerne vænnede sig til, at hun skulle stikke sig.

Ved årsskiftet 2002/2003 skete der noget helt nyt for Pernille. Hun meldte sig frivilligt til en undersøgelse, hvor hun og et antal andre unge diabetikere gennem et års tid skulle teste en mekanisk insulinpumpe. Den bliver sat fast på huden og er indstillet til at afgive et vist antal enheder insulin i timen – uden at patienten mærker noget til det. Hun fik lagt et lille plasticrør ind under maveskindet, og selve pumpen er fastgjort på et plaster, der fx sættes på maveskindet. Pumpe og plasticrør er forbundet med en lille slange. Hun måler selv sit blodsukker og indtaster på pumpen den mængde ekstra insulin, hun skal have ved måltider. Plastrer skal udskiftes ca. hver 3.-4. dag, og der skal



Fig. 8.2: Insulinpumpe.

fyldes insulin på pumpen, men ellers behøver Pernille faktisk ikke tænke meget over, at hun har diabetes. Pumpen alarmerer automatisk, hvis den er løbet tør for insulin, eller hvis den ikke har injiceret i et vist antal timer. I det hele taget er der mange ting, der er blevet lettere, efter at hun er begyndt at bruge insulin-pumpen. Tidligere kunne hun fx ikke bare sove længe, for så risikerede hun, at hendes blodsukker steg. Selvom hun var træt, blev hun nødt til at sætte vækkeuret til at ringe tidligt om morgenen for at komme op og injicere sig. Når hun bader, hægter hun pumpen af plastret og slangen af plasticrøret under huden. I stedet påsæt-



ter hun en plasticdime, der lukker tæt om hullet ind til plasticrøret.

Det største problem med pumpen er dens pris. En pumpe koster ca. 60.000 kroner, et plaster ca. 100 kroner, og dertil kommer insulinen og slangerne. Den månedlige udgift ligger på mellem 1000 og 2000 kroner. Når forsøget på Steno Diabetes Center er slut, skal hun selv betale alt – dog med tilskud fra Sygesikringen.

Selvom mange diabetikere, ligesom Pernille, lærer at leve med sygdommen og i mange tilfælde kan leve uden store gener, er det en sygdom, der ikke blot er alvorlig i sig selv, men også kan føre til mange andre alvorlige og livstruende

sygdomme, som fx hjerte-kar-sygdomme. Derfor forskes der intensivt i at udvikle en behandling, der én gang for alle kan helbrede diabetes.

I USA er der opstået en stærk organisation, Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), der via kampanjer, arrangementer og fundraising rejser midler til forskningen. Nogle af forskningsmidlerne går også til stamcelleforskning på det danske diabetesforskningsinstitut, Hagedorn, der er ejet af Novo Nordisk.

I sommeren 2003 fik JDRF også en dansk afdeling, og Pernille blev udvalgt til at repræsentere Danmark ved et stort møde, *Children's Congress*, i Washington D.C. Her var forskere fra hele verden samlet, og de unge diabetikere fra mange forskellige lande fortalte om, hvordan det er at leve med diabetes og om deres behov for behandling.

”Det er vigtigt, at forskerne møder os, som det drejer sig om, og jeg vil meget gerne bruge min tid, hvis det kan hjælpe med både at skaffe penge til forskningen, og til at forskerne får mulighed for fortsat at forbedre behandlingsmetoderne,” siger Pernille.

Fig. 8.3: Eksempel på integrationen af medicin og teknologi. InDuo™ (udviklet af Novo Nordisk), der er en kombination af en blodsuktermåler og en insulinodoser med hukommelse. Den husker, hvornår den sidste insulin-dosis blev givet og dosisstørrelse. Ideen bag hukommelsen er, at diabetikeren ikke pludselig sidder på arbejdet eller i skolen og spørger sig selv: ”Tog jeg mon min morgeninsulin???” Inde i InDuo™ findes insulinbeholderen, som doseres og påsættes en nål.



Måske en fremtidig behandlingsmetode

På verdensplan er der ca. 150 millioner mennesker med diabetes. Over hele verden arbejder forskere på at udvikle en behandling, der én gang for alle kan helbrede diabetes.

I disse år er der meget fokus på stamceller. Forsknin-gen koncentrerer sig i særlig grad om at tage stamcel-ler ud fra et kun få dage gammelt befrugtet æg og påvirke dem til at blive beta-celler, som er de celler, der producerer insulin i mennesket.

Dernæst vil man transplantere de kunstigt skabte beta-celler over i diabetikeren. Der er dog stadig lang vej endnu.

For det første vil patientens immunforsvar gå løs på de fremmede beta-celler og tilintetgøre dem, fordi de vil blive opfattet som netop fremmede.

For det andet ligger der en stor udfordring i at dyrke stamcellerne og påvirke dem til lige præcis at udvikle

sig til beta-celler. Forskerne tror dog på, at det en dag kan lade sig gøre.

Der er gjort forsøg med at transplantere naturlige beta-celler fra organdonorer over i diabetikere. Patien-terne har efterfølgende kunnet undgå at behandle sig med insulin i op til to år, men der er også ulemper ved metoden. Behandlingen kræver nemlig, at pa-tienterne får medicin, som hæmmer immunforsvarets angreb på de fremmede donorceller. Det medfører en nedsat evne til at bekæmpe infektioner og en øget kræftirisiko. Derfor anbefales denne behandling kun til patienter, som har en diabetes, der giver meget alvorlige komplikationer. Desuden rækker antallet af organdonorer kun til under én procent af diabetikerne.

To typer diabetes

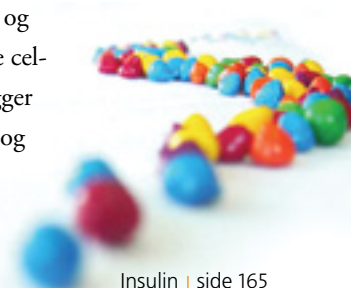
Der er to typer diabetes:

Type 1-diabetes, som ca. 0,4 procent af Danmarks befolkning lider af. Det svarer til ca. 20.000 danskere.

Type 2-diabetes, som mellem 100.000 og 150.000 danskere er ramt af. Det skønnes dog, at yderligere mellem 100.000 og 150.000 danskere går rundt med en uopdaget type 2-diabetes.

Type 1-diabetes skyldes en nedsat produktion af eller mangel på hormonet insulin. Insulinets funktion er at regulere glucosetofskiftet i alle væv undtagen hjernen. Alle kroppens celler har brug for at optage glucose som energikilde.

De insulinproducerende celler hedder beta-celler, og der er mellem 10^8 og 10^9 af dem. De hører til i de cel-legrupper, der kaldes de langerhanske øer, som ligger mellem bugspytkirtlens enzymproducerende væv og udgør ca. 2 procent af hele bugspytkirtlen.



Insulin udskilles fra bugspytkirtlen til blodet under og umiddelbart efter et måltid og øger transporten af glucose ind i især muskel- og fedtceller, der er særligt insulinfølsomme.

Hos en diabetiker opfatter kroppens immunforsvar – uvist af hvilke grunde – beta-cellerne som fremmede og ødelægger dem. Derfor hører type 1-diabetes til kategorien *autoimmune sygdomme*, dvs. sygdomme, hvor kroppens immunforsvar går til angreb på kroppen selv. Man véd, at personer med særlige vævstyper rammes oftere end andre af en autoimmun sygdom, men årsagen er ikke klarlagt. Ofte ser man, at en autoimmun sygdom som fx type 1-diabetes bliver udløst efter et følelsesmæssigt chok eller en virusinfektion.

Når immunforsvaret har ødelagt så mange af beta-cellerne, at der kun er 10-15 procent tilbage, bliver der ikke produceret tilstrækkeligt med insulin til at stimulere optagelsen af glucose fra blodet. Det medfører, at blodsukkerkoncentrationen øges – især efter et måltid, og hvis den bliver højere end 6 mmol/L, er det især et problem for hjernen, som skal have en koncentration af glucose i blodet på mellem 4 og 6 mmol/L. Ved en for høj blodsukkerkoncentration sker der en osmotisk reaktion (*se næste side*) i og omkring cellerne, hvilket især er skadeligt for nervecellerne, og patienten risikerer at miste bevidstheden.

Både en for høj og en for lav blodsukkerkoncentration er skadelig, og ubehandlet risikerer patienten at dø. Insulin har altså en livsvigtig funktion, og hvis man ikke selv kan producere tilstrækkeligt, skal man have hormonet tilført.

Diabetes kan føre til øjensygdomme (blindhed), nyresvigt, nervebetændelse, hjerte-kar-sygdomme og koldbrand, så det er vigtigt, at mennesker med diabe-

tes hele tiden sørger for at leve sundt og jævnlgt får tjekket deres helbredstilstand og kontrolleret, om der skal justeres op eller ned på deres insulindosis.

Symptomer: De mest fremtrædende symptomer på diabetes er træthed, tørst, øget vandladning og vægttab. Symptomerne skyldes, at der ikke er tilstrækkeligt med insulin, der kan sørge for optagelsen af glucose i kroppens celler. Blodsukkeret stiger, og nyrerne kan ikke overkomme at genoptage al glucosen, hvorfor glucose udskilles med urinen. Glucosen trækker vand med over i urinen, hvilket medfører, at personen får en øget vandladning. Det kan føre til et alvorligt væske- og saltunderskud, og personen bliver tørstig.

I Pernilles tilfælde blev sygdommen opdaget på baggrund af ovenstående symptomer. Andre mennesker har oplevet, at sygdommen først blev opdaget, da den var så fremskreden, at de fik en syreforgiftning, som de var i risiko for at dø af (*se næste side*).

Type 2-diabetes skyldes en kombination af nedsat insulinfølsomhed i skeletmuskulaturens celler, og at beta-cellerne i længden ikke kan producere nok insulin som kompensation. Resultatet bliver en forhøjet koncentration af glucose i blodet med samme følgevirkninger som hos type 1-diabetes, men det er ikke altid nødvendigt at behandle med tilførsel af insulin.

Alle forskningsstudier peger på, at fedme og fysisk inaktivitet øger risikoen for at udvikle type 2-diabetes væsentligt. Det betyder, at man i mange tilfælde kan mindske sygdomssymptomerne ved at tabe sig og ved at være fysisk aktiv. Fysisk aktivitet øger muskelcellernes insulinfølsomhed, og der sker derfor et øget sukkeroptag. Den øgede insulinfølsomhed bevirker, at insulinbehovet er mindre hos fysisk aktive end hos personer, der ikke er fysisk aktive.



FAKTA

Osmose

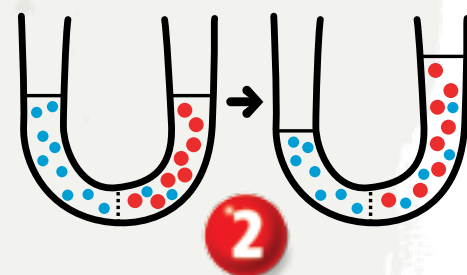
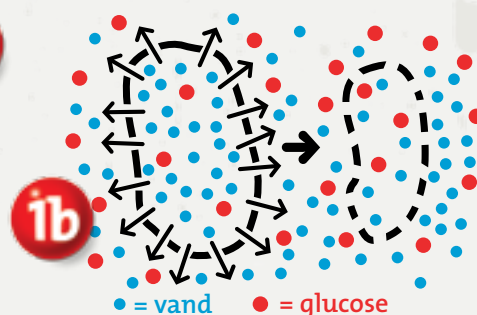
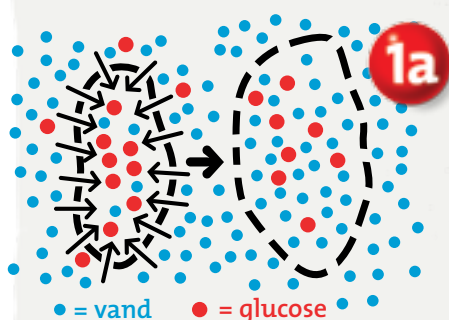
1a Når koncentrationen af et stof i en celle er forskellig fra koncentrationen af stoffet i væsken, der omgiver cellen, vil molekylerne automatisk forsøge at udligne forskellen ved at diffundere, dvs. bevæge sig ud og ind gennem cellemembranen. Små molekyler som vand går relativt let igennem, mens fx glucosemolekylet har sværere ved at diffundere igennem. Hvis koncentrationen af et stof er større inde i cellerne end udenfor,

vil vand diffundere ind i blodcellerne, hvorved deres volumen bliver øget, og de risikerer at sprænges.

1b Hos en diabetiker med høj koncentration af glucose i blodet, dvs. uden for cellerne, vil vandet diffundere ud til omgivelserne, og cellerne vil skrump.

2 Osmoseprincippet kan også illustreres med en situation, hvor vandkoncentrationen er større til venstre end til højre for cellemembranen i U-røret. Glucose-

molekylerne kan ikke passere membranen, men det kan vandmolekylerne. De vil automatisk diffundere gennem membranen for at forsøge at udligne koncentrationsforskellen. Væskestanden ændrer sig derfor på hver side. På et tidspunkt bliver trykket fra glucoseopløsningen så stort, at det opvejer diffusionen af vandmolekylerne. Dette ligevægtstryk kaldes det osmotiske tryk.

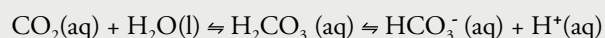


Syreforgiftning og insulinchok

Syreforgiftning opstår, når mængden af insulin-producerende celler er blevet så lille, at kroppens celler ikke kan optage nok glucose og ad den vej få den nødvendige energi. I stedet øges fedtstofforbrændingen. Undervejs i forbrændingsprocessen dannes stoffet acetyl-CoA, der spiller en vigtig rolle i citronsyre-cyklus. Normalt nedbrydes acetyl til CO_2 og H_2O ved at acetyl-CoA går i forbindelse med oxaleddikesyre.

Dannelsen af en tilstrækkelig mængde oxaleddikesyre (oxobutandisyre) er imidlertid afhængig af, at der er glucose i cellerne – hvilket der jo ikke er hos en ubehandlet diabetiker. Acetyl-CoA omdannes derfor i stedet til affaldsstoffer, kaldet ketostoffer, samt organiske syre, som fx acetone (propanon), aceteddikesyre (3-oxobutansyre) og β -hydroxysmørsyre (3-hydroxybutansyre). Den øgede syredannelse fører til et fald i blodets pH, hvilket registreres af åndedrætscentret, der findes i hjernestammen. Åndedrættet bliver auto-

matisk hurtigere og dybere, fordi organismen forsøger at genoprette syre-base-balancen ved at komme af med den overskydende syre i form af CO_2 , som udåndes. Organismen udskiller altså mere CO_2 i forhold til ligevægten:



og CO_2 -koncentrationen i blodet bliver lavere, fordi ligevægtssystemet forskydes til venstre. pH stiger igen. Systemet kan dog ikke blive ved med at følge med, og forgiftningen kan føre til, at patienten glider over i en bevidstløs tilstand og risikerer at dø.

Akut syreforgiftning kan opstå hos patienter med en dårligt behandlet diabetes, hvor der gives for lave insulindoser, eller hos personer med en fremskreden ubehandlet diabetes, der bliver opdaget netop på grund af syreforgiftningen.

Insulinchok opstår, når blodsukkerkoncentrationen bliver for lav. Insulinchok skyldes, at der er mere insulin i blodet, end der er behov for. Ved et lettere tilfælde af insulinchok kan diabetikeren behandle sig selv ved fx at drikke et glas juice eller spise druesukker. I alvorligere tilfælde kan diabetikeren miste bevidstheden og skal have sprøjtet glucose direkte ind i blodet. Der kan være en række forskellige årsager til insulinchok:

- Insulindosis er generelt for høj.
- Diabetikeren er kommet til at tage for meget insulin.
- Diabetikeren har spist mindre end sædvanligt, men ikke tilsvarende reduceret sin insulindosis.
- Diabetikeren har dyrket sport uden at have reduceret sin insulindosis. Fysisk aktivitet øger cellernes insulinfølsomhed og bruger blodsukkeret.
- Diabetikeren har drukket alkohol. I leveren oplagres et overskud af glucose som glycogen. Ved en lav blodsukkerkoncentration omdannes glycogen atter til glucose og frigives til blodet. Den proces blokeres imidlertid af alkohol. Hos ikke-diabetikere vil der som compensation ske en mindsket insulinudskillelse, men dette sker ikke hos diabetikere. En diabetiker skal derfor være forsigtig med mængden af alkohol og huske at drikke sodavand ved siden af.

Diagnosticering:

Det er forholdsvis nemt at stille diagnosen på en ubehandlet diabetes. Hvis en person har en høj blodsukkerkoncentration samt sukker og ketostoffer i urinen, er der stor sandsynlighed for, at vedkommende har diabetes. I gamle dage diagnosticerede lægen diabetes ved at smage, om patientens urin var sød.

Arvelighed

Nye tilfælde af diabetes optræder mere hyppigt i familier, hvor der i forvejen er familiemedlemmer med diabetes eller andre stofskiftesygdomme. Man kan altså være arveligt disponeret for at udvikle sygdommen.

- Blandt børn med mødre, der har type 1-diabetes, udvikler ca. 3 procent sygdommen.
- Blandt børn med fædre, der har type 1-diabetes, udvikler ca. 6 procent sygdommen. Hvorfor der er større risiko for at arve dispositionen for diabetes efter fædre end mødre, vides endnu ikke.
- Blandt børn, hvor begge forældre har type 1-diabetes, udvikler mellem 10 og 15 procent sygdommen.
- Blandt børn, hvis forældre ikke har diabetes, udvikler ca. 0,5 procent sygdommen.

Der er altså mange flere mennesker, der er arveligt disponerede for at få type 1-diabetes, end der er mennesker, der udvikler sygdommen. Forskerne kender endnu ikke præcist årsagen til, at nogle arveligt disponerede personer udvikler sygdommen og andre ikke. Måske er det en virusinfektion, eller måske er det andre miljøpåvirkninger, der i kombination med særlige vævstyper udløser sygdommen.

Blandt forskerne har der gennem mange år været udbredt enighed om, at det er variationer i arveanlæggene i vævstypeområdet på kromosom 6, der skaber dispositionen for type 1-diabetes. Nyere forskning har imidlertid identificeret hele 15 forskellige genetiske områder, der synes at have betydning for udvikling af sygdommen.

Endnu har forskerne ikke kunnet finde bestemte gener eller ændringer i gener, der øger risikoen for type 2-diabetes, men på baggrund af statistikkerne kan man se, at søskende til og børn af type 2-diabetikere har en risiko på mellem 30 og 40 procent for at udvikle sygdommen, hvis miljøfaktorer som fx fedme og fysisk inaktivitet er til stede. Man kan altså selv gøre en indsats for at reducere risikoen ved at dyrke motion og holde en normal kropsvægt.

FAKTA

Faglige udtryk for diabetes

Til tider ser man type 1-diabetes omtalt som **IDDM** og type 2-diabetes som **NIDDM**.

IDDM er forkortelsen af den engelske betegnelse Insulin Dependent Diabetes Mellitus (insulin-krævende diabetes mellitus). Ordet diabe-

tes er græsk og betegner den store urinudskillelse.

Ordet mellitus er latin og betyder "sødt smagende".

NIDDM er forkortelsen af den engelske betegnelse Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (ikke-insulin krævende diabetes mellitus).

Organismens insulinproduktion

Så snart vi spiser, begynder organismen at producere insulin. Proteinsyntesen går i gang og slutter med et aktivt insulin-molekyle, der bliver frigivet til blodet.

Under og umiddelbart efter et måltid begynder beta-cellerne at producere insulin. Ved proteinsyntesen i beta-cellerne dannes først et biologisk inaktivt forstadium til insulin, kaldet præ-proinsulin. Det består af en ubrudt kæde af aminosyrer bundet sammen af peptidbindinger. Først B-kæden, så en forbindelses-

kæde kaldet C-kæden og A-kæden (*se næste side*).

I det færdige og aktive insulinmolekyle er C-kæden spaltet fra, og molekylet består altså af B- og A-kæden samt de tre disulfidbindinger, hvoraf to af dem forbinder kæderne.



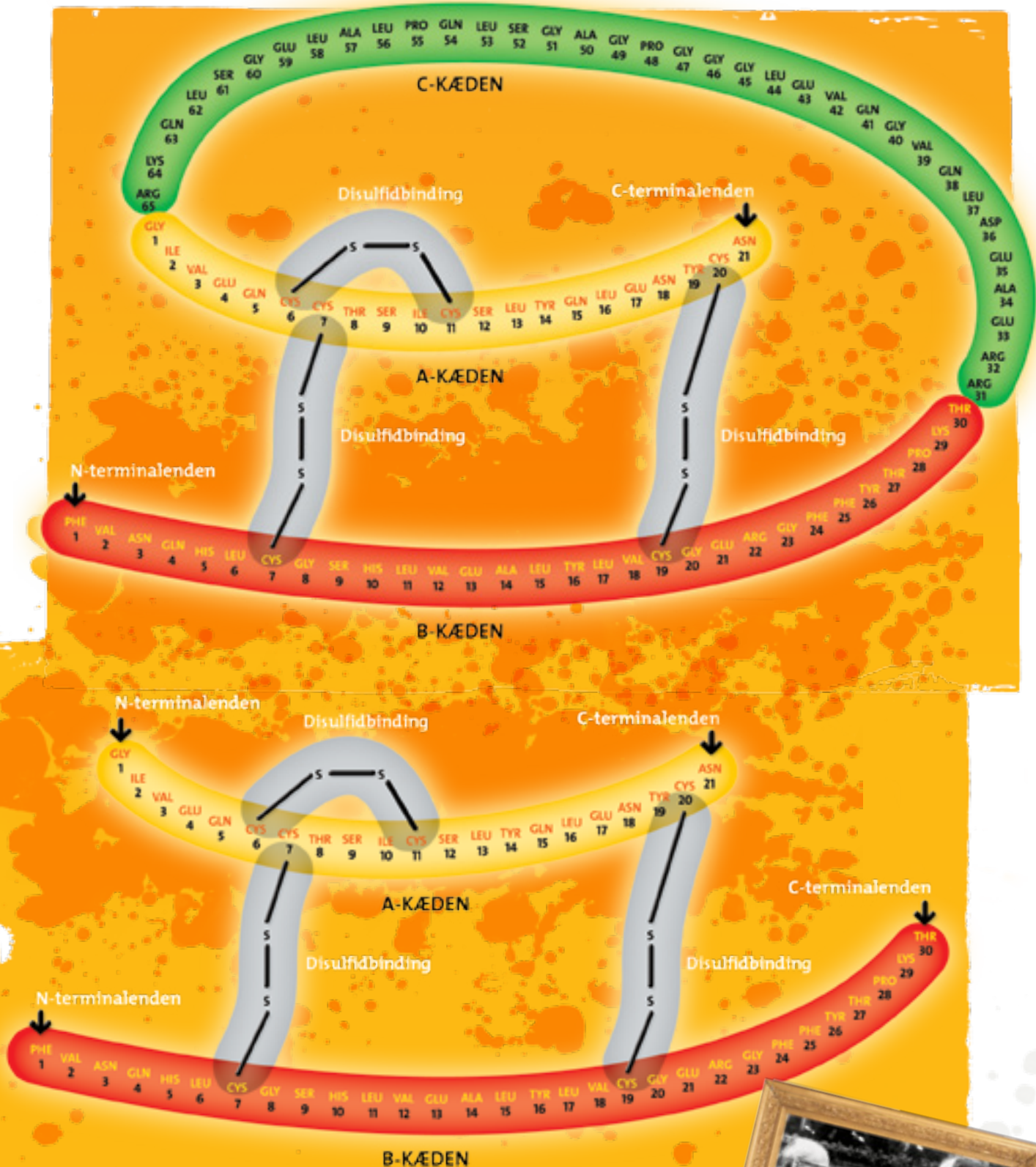


Fig. 8.4b: Humaninsulin – det aktive insulin.

Insulinhormonet er et forholdsvis lille proteinmolekyle, der kun består af 51 aminosyrer fordelt i de to kæder, A-kæden og B-kæden. Insulin var det første protein nogensinde, der fik bestemt rækkefølgen af aminosyrerne. Det skete i 1950'erne, og det var den britiske kemiker, Frederick Sanger, der stod bag sekvensbestemmelsen. Hans bedrift var så stort et videnskabeligt gennembrud, at han i 1958 modtog Nobelprisen for sit arbejde.



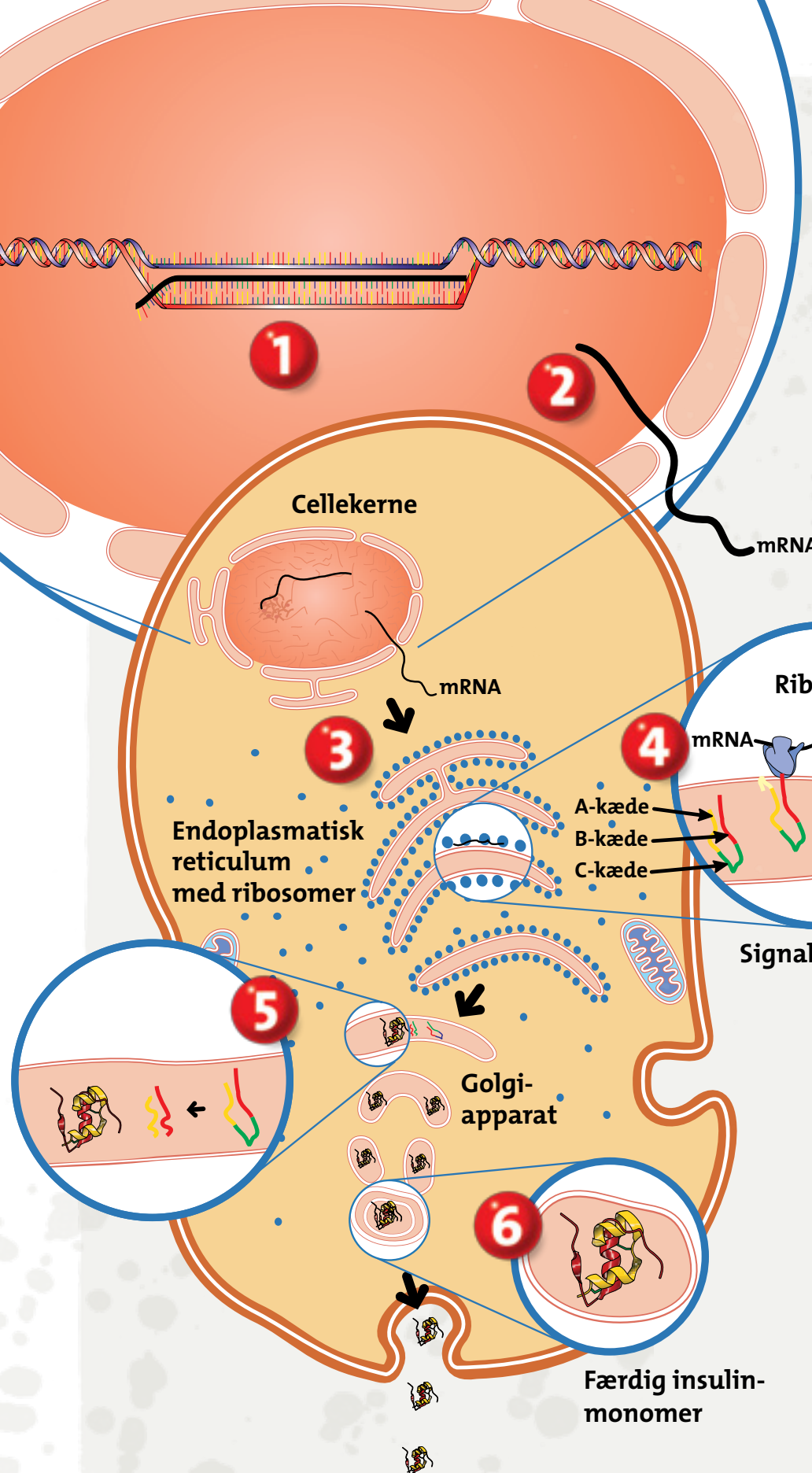


Fig. 8.4c:

1) Insulinmolekylet bliver dannet ved proteinsyntese. Genet, der koder for insulin, sidder på kromosom 11.

2) På baggrund af genets baser dannes en enstrengt kopi, kaldet messenger-RNA, mRNA, der herefter diffunderer ud i cytoplasmaet til selve 'proteinfabrikken' bestående af **3**) de ribosomer, der sidder på det endoplasmatiske reticulum, e.r.

4) Ribosomerne aflæser den besked, som mRNA bringer, og sætter det ønskede protein sammen – aminosyre for aminosyre, bundet sammen med peptidbindinger. For insulins vedkommende bliver det enkeltkædede præ-proinsulinmolekyle dannet. Prædelen svarer til signalsekvensen, som fraspaltes på vej gennem e.r. til golgiapparatet. Herefter består molekylet, proinsulin, af A-kæden (gul på ill.), B-kæden (rød på ill.) og C-kæden (grøn på ill.).

5) I golgiapparatet bliver molekylet indlejret i vesikler, som er små sekretionsblærer dannet af cellemembranen. Inde i vesiklerne spaltes C-kæden fra ved hjælp af enzymer, og det aktive tokædede insulinmolekyle bliver dannet (se også fig. 8.4b).

6) Herefter fusionerer eller smelter vesiklerne sammen med cellemembranen, hvorved insulin afgives til blodet.

Tilfældige opdagelser

Mange store videnskabelige opdagelser bygger på tilfældigheder. Eller rettere på en særlig evne til at opdage ting og sammenhænge, som man egentlig slet ikke søgte efter. Tænk fx på englænderen Newton, der i slutningen af 1600-tallet fik ideen til tyngdeloven ved at betragte æbler, der faldt fra træerne. Eller tyskerne von Mehring og Minkowski, der i slutningen af 1800-tallet ved en tilfældighed bemærkede, at fluer blev tiltrukket af urin fra hunde, der havde fået fjernet bugspytkirtlen. Deraf udledte de en

teori om, at bugspytkirtlen måtte have en blodsukker-sænkende faktor. Den teori arbejdede de canadiske forskere Banting og Best videre på og opdagede i 1921 insulin.

Men det er selvfølgelig ikke nok, at man har øjnene med sig for at gøre store opdagelser. Man skal også være nysgerrig og have evnen og en vis portion baggrundsviden til at kunne udtænke teorier eller hypoteser om de mulige sammenhænge. Det forudsætter en god fantasi, kreativitet, mod og stædighed, for mange gange indebærer det, at man går imod etablerede teorier.

Fra svineinsulin til gensplejset humaninsulin

Meget forskningsarbejde handler om at få en idé, opstille en hypotese og efterprøve, om den holder. Undersøgelsesarbejdet fører til større viden, men det er langt fra alle ideer, der kaster afgørende resultater af sig. Ind imellem sker det dog. Fx i 1979 da en forsker hos lægemiddelvirksomheden Novo (i dag Novo Nordisk) fik en idé, der førte til, at Novo, som den første virksomhed i verden, kunne sende humaninsulin på markedet. Det gav Novo et forspring i forhold til konkurrenten, den amerikanske lægemiddelvirksomhed Eli Lilly.

Historien er typisk for forskningens verden, hvor det ofte er de ideer, som afviger fra vanetænkning, der skaber de store resultater. Historien illustrerer også det kapløb, der til stadighed foregår mellem verdens lægemiddelvirksomheder.

De insulinproducerende lægemiddelvirksomheder fremstillede frem til slutningen af 1970'erne fortrins-

vis insulinpræparater baseret på svinebugspytkirtler. Svineinsulin er nemlig en af de få dyreinsuliner, hvor kun én aminosyre afviger fra det humane insulin. I svineinsulin sidder aminosyren alanin på plads 30 i B-kæden, mens den samme plads i det humane insulin er optaget af aminosyren threonin.

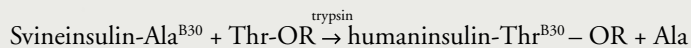
Også insulin fra hunde og kaskelothvaler kunne være

anvendt, men af følelsesmæssige årsager og tilgængelighed er valget af svinebugspytkirtler indlysende. På trods af at svineinsulin kun afviger fra humaninsulin med en enkelt aminosyre, er det ikke helt uproblematisk at anvende svineinsulin til mennesker. Det kan bl.a. fremkalde allergiske reaktioner. Det bedste er selvfølgelig at benytte insulin, der er identisk med den insulin, kroppen selv producerer, men endnu i 1970'erne var det ikke lykkedes at udvikle et humaninsulin-præparat.

Med fremkomsten af gensplejsningsteknikkerne i løbet af 1970'erne åbnede der sig nye muligheder, men mange forskere var skeptiske og tog ikke teknikken til sig. Heller ikke forskere på den danske virksomhed Novo.

I 1978 kom der forlydender om, at et amerikansk firma havde haft held med at udtrykke humaninsulinets A- og B-kæder i *E. coli* (colibakterier) – altså ved gensplejsning. Metoden var blevet solgt til det amerikanske lægemiddelfirma Eli Lilly, men hos Novo følte man sig ikke truet. Novo lå lunt placeret på verdensmarkedet med sin højtrensedes svineinsulin, og man troede ikke på, at det kunne lade sig gøre at fremstille insulin i mikroorganismer. I hvert fald ikke på, at det var noget, der kunne lade sig gøre inden for en kortere årrække. I efteråret 1979 kom man imidlertid på andre tanker, og der blev etableret et gensplejsningslaboratorium på Novo.

Samme efterår kom det frem, at forskere ved udenlandske akademiske institutioner havde haft held med at fremstille humaninsulin ud fra svineinsulin, men på en meget besværlig måde. Civilingeniør Jan Markussen, Novo, kunne ikke lade være med at tage udfordringen op. Selvom han var leder af en forskningsgruppe, der ikke arbejdede med insulinfremstilling, begyndte han sideløbende at udvikle en metode til kemisk at konvertere svineinsulin til humaninsulin. Den 14. november 1979 lykkedes det. Ved at udsætte svineinsulin for trypsin (et proteinspaltende fordøjelsesenzym) i en blanding af vand og organisk opløsningsmiddel med en threoninester (Thr-OR) i den viste reaktion lod det sig gøre at erstatte aminosyren alanin med aminosyren threonin. I ét og samme trin fik Jan Markussen fjernet alanin og sat threonin ind i stedet for (se også fig 8.5).



Dette semisyntetisk fremstillede humaninsulin fik Novo sendt på markedet, tre måneder før den amerikanske lægemiddelvirksomhed Eli Lilly fik registreret sin gensplejsede humaninsulin. Det var en stor begivenhed for Novo, og de tre måneders forspring bevirkede, at virksomheden erobrede markedsandele og fik et pusterum til selv at udvikle en metode til at gensplejse humaninsulin.

Eli Lilly anvendte *E. coli* til fremstilling af gensplejset humaninsulin, og Novo forsøgte det samme. Men resultaterne var dårlige. Desuden var det svært at omgå Eli Lillys metode, som virksomheden naturligvis havde patenteret. I stedet begyndte Novo at arbejde med gærceller, nærmere betegnet bagegærceller, *Saccharomyces cerevisiae*.

Forskerne på Novo brugte naturen som forbillede og tog udgangspunkt i genet for human præ-proinsulin. Genet blev indsat i gærceller, for at de skulle producere proinsulin-molekylet, som består af B-, C- og A-peptiderne i én kæde. Men det var ikke muligt at få gæren til at udtrykke human proinsulin i nævneværdig grad.

Der skulle med andre ord tænkes i nye baner.

Jan Markussen foreslog at tage udgangspunkt i et mindre molekyle, hvor C-kæden var udeladt i konstruktionen af genet. Men molekylærbiologerne var overbeviste om, at det var bedst at efterligne processen, som naturen foreskrev, dvs. tage udgangspunkt i et molekyle der bestod af samtlige tre peptider: B, A og C. Ved den naturlige insulinproduktion i beta-cellerne bliver proinsulin jo netop korrekt foldet og det aktive insulinmolekyle efterfølgende dannet i en proces, hvor C-kæden spaltes fra.

Dette argument lod Jan Markussen sig ikke slå ud af. For at teste sin hypotese gik han i laboratoriet og fremstillede et enkeltkædet molekyle ud fra svineinsulin, dvs. et molekyle, hvor B-kæden gik direkte over i A-kæden. Dog *uden* den ene aminosyre, der adskiller svineinsulin fra humaninsulin, altså uden aminosyren alanin på plads 30 i B-kæden i svineinsulin. Mole-

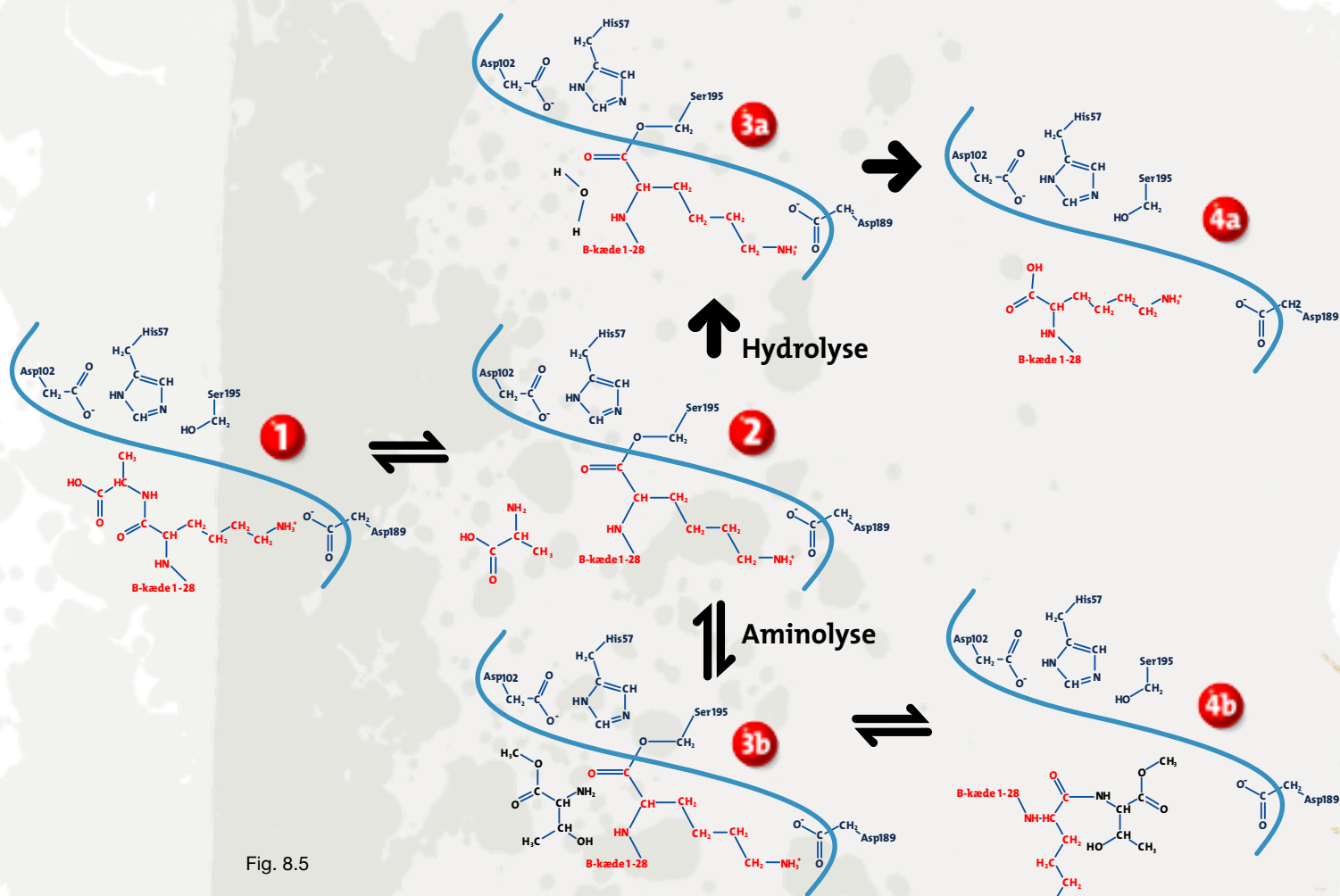


Fig. 8.5

1) Enzymet trypsin med svineinsulins B-kæde som substrat. B-kædens to sidste aminosyrer lysin og alanin er vist. Enzymet er blåt, og substratet er rødt.

2) Den C-terminale alanin er blevet fraspaltet, og den anden halvdel af produktet er covalent bundet i et enzymsubstrat-mellemprodukt.

3a) Under hydrolyse i en vandig opløsning vil et vandmolekyle reagere med enzymsubstrat-mellemproduktet. Herved gendannes hydroxygruppen på serin195 og carboxylsyregruppen på lysinsidekæden.

3b) Hvis der anvendes et organisk opløsningsmiddel, og der er en høj koncentration af threoninmethylester, vil enzymsubstrat-mellemproduktet kunne reagere med

threoninmethylester i stedet for med vand. Så kaldes reaktionen ikke for en hydrolyse men en aminolyse (der dannes et amid).

4a) Hydrolysen. Den anden halvdel af produktet er blevet fraspaltet, og samlet er reaktionen:
B-kæde (1-30) + trypsin $\rightarrow$ Ala + B-kæde (1-29) + trypsin

4b) Aminolysen. Den anden halvdel af produktet er blevet fraspaltet, og samlet er reaktionen:
B-kæde (1-30) + Thr-OME + trypsin $\rightleftharpoons$ Ala + humaninsulin-B-kæde (1-29)-Thr-OME + trypsin.

Den methylgruppe, der er esterbundet til B-kædens threonin nr. 30, kan efterfølgende let hydrolyseres.

kyllet blev døbt *enkeltkædet des(B30)-insulin*, hvor "des(B30)" betyder, at B-kædens aminosyre nr. 30 er fjernet. I en reaktionscyklus bestående af reduktion, foldning og oxidation viste det sig at give et meget bedre udbytte end svineproinsulin. Resultatet overbeviste molekylærbiologerne, og herefter blev genet for humant des(B30)-insulin klonet og indsat i en gærstamme, der producerede enkeltkædet des(B30)-insulin.

Herefter skulle enkeltkædet des(B30)-insulin konver-

teres til det tokædede humaninsulin, og aminosyren threonin skulle tilføjes i position B30. Til det formål kunne anvendes den samme metode, som Jan Markussen havde udviklet til at konvertere svineinsulin til humaninsulin. Kæden blev åbnet med enzymet trypsin, og threonin blev sat ind. Processen virkede, og efter at have optimeret spaltningstedet mellem B-og A-kæden, havde Novo en proces til produktion af gensplejset humaninsulin. Fabrikationen blev sat i gang i 1987.

FAKTA

Semisyntetisk fremstilling: Udgangsstoffet stammer fra en levende organisme. Herefter bliver det ændret ved kemiske metoder til det færdige/endelige molekyle.

Biosyntetisk fremstilling: Levende organismer (oftest mikroorganismer) danner det organiske stof.

Gensplejsning: En kunstig ændring af genetisk materiale ved hjælp af enzymer, der klipper og samler DNA.

Transfektion: Det modificerede gen overføres i en form, der kan reproducere sig selv til en mikroorganisme, oftest i form af et plasmid.

Udtrykning: Efter transfektion bringes mikroorganismen til at producere de proteiner (herunder hormoner), som de fremmede gener koder for.





Sådan binder insulinet til cellerne

Lige siden Frederick Sanger sekventerede insulinhormonet, er der blevet forsket intensivt i detaljeret at forstå, hvordan det fungerer.

Lægemiddelforskerne og lægemiddelvirksomhederne har udviklet og fortsat forbedret først dyreinsulin og siden gensplejset humaninsulin, men det er groft sagt sket på baggrund af en objektiv registrering af, hvad der virker og ikke virker. Det har ikke været ensbetydende med, at man har forstået hvordan og hvorfor. Udviklingen af nye biofysisk-kemiske metoder til at kigge molekyler efter i sømmene har dog ført til, at man gradvist har opnået større indsigt i insulins struktur og funktion.

I slutningen af 1960'erne fik man opklaret insulins rumlige struktur. Det skete ved hjælp af en røntgenkrystallografisk analyse og blev foretaget af den britiske forsker Dorothy Hodgkin og hendes gruppe ved Oxford University. Med kendskabet til den rumlige opbygning af insulinmolekylet kunne man begynde at sige noget mere konkret om, hvilke dele af molekylet der er vigtigt for dets aktivitet – det vil sige, hvilke dele der binder sig til insulinreceptoren på en insulinfølsom celle (*se fig. 8.6a*).

En røntgenkrystallografisk analyse bestemmer imidlertid kun molekylets struktur i en krystal, altså insulinet i fast form, mens insulin i organismen fungerer i vandig opløsning.

Sidenhen blev det dog muligt også at bestemme strukturen i vandig opløsning. Det blev det på grund af NMR-spektroskopi-teknikken (*NMR står for Nuclear Magnetic Resonance. På dansk kernemagnetisk resonans. Se side 179*). Med NMR-teknikken kan man ikke blot bestemme strukturen af proteiner i vandig opløsning. Man kan også bestemme og studere molekylernes indre fleksibilitet ved at identificere molekylets enkelte atomer og bestemme den indbyrdes

bevægelighed af molekylets enkelte dele i forhold til hinanden.

Den første komplette struktur af et insulinmolekyle i vandig opløsning blev bestemt af den danske kemiker docent dr. scient. Jens Jørgen Led og hans forskningsgruppe på Kemisk Institut, Københavns Universitet. Det var i 1992. Molekylet var en såkaldt dimer, det vil sige to insulinmolekyler, der er hægtet sammen. Den insulin, som diabetikere normalt får, består af en hexamer, det vil sige seks insulinmolekyler, der hænger symmetrisk sammen (*se fig. 8.6b*). Det er helt normalt for insulin, at det klumper sig sammen, men denne tendens til at klumpe sammen til store molekyler betyder, at insulinen ikke optages så hurtigt, og derfor ses en forsinket virkning. Insulin kan nemlig kun optages i blodet som enkeltmolekyle, dvs. som monomer (*se fig. 8.6c*). Den enkelte monomer skal derfor først frigøre sig fra hexameren, før den kan udøve sin virkning.

I dag behandles type 1-diabetes typisk med både langtidsvirkende basisinsulin og hurtigtvirkende insulin, og der forskes i stadig at forbedre dem. Målet er at udvikle langtidsvirkende insulin, der både har en endnu længere virkningstid og er tilpasset kroppens varierende behov, samt at udvikle hurtigtvirkende insulin der virker endnu hurtigere, og dermed giver patienten større fleksibilitet og bedre mulighed for at regulere blodsukkerkoncentrationen.

Jens Jørgen Leds forskning kan ikke mindst få betydning for udviklingen af en effektiv og hurtigtvirkende insulin. Til det formål skal der konstrueres et insulinmolekyle, der ikke klumper sammen. For at kunne konstruere et sådant molekyle er det nødvendigt at

kende insulinmolekylets strukturændringer på vejen til bindingsstedet på receptoren. Strukturændringerne er nemlig afgørende for, om molekylet kan navigere korrekt ind til insulinreceptoren, binde sig rigtigt og udøve sin blodsukkersænkende funktion. Endnu er det ikke lykkedes at opnå viden om strukturen af det sted på insulinreceptoren, hvor insulinmolekylet binder sig. Strukturen af insulinmolekylet, når det har bundet sig til receptoren, er også ukendt. Det afholder imidlertid ikke forskerne fra at forsøge at opklare, hvilke strukturændringer der er vigtige. Med hjælp af NMR studerer forskerne syntetisk fremstillede insulinvarianter med forskellige strukturer og sammenholder strukturforskellene med den biologiske aktivitet. Ved at bytte om på nogle af aminosyrerne og på anden måde ændre insulinmolekylet har forskerne indirekte opnået en viden om, hvilke dele af insulinmolekylet der er særlig ansvarlige for bindingen til receptoren og dermed den biologiske aktivitet. I 2001 syntetiserede Jens Jørgen Led og hans gruppe i samarbejde med læge Knud Josefsen, Bartholin Institut, Københavns Kommunchospital, en insulinvariant, kaldet *PT insulin*. På baggrund af sin tidligere forskning havde Jens Jørgen Led en formodning om, at varianten ville forblive i enkeltmolekyleformen og være biologisk aktiv, hvis han byttede om på rækkefølgen af aminosyrerne prolin (P) på plads 28 og threonin (T) på plads 27 i insulins B-kæde, heraf navnet PT insulin. Og biologisk aktiv det var varian-

ten – ud over al forventning.

Hidtidige studier af insulinmolekyler havde vist, at det er på A-kæden, at bindingen til receptoren sker, og at A-kæden er den mest bevægelige af de to kæder. Til alles overraskelse viste det sig, at hele strukturen i Jens Jørgen Leds insulinvariant var bevægelig, altså både A- og B-kæden. Derudover viste det sig, at varianten var 50 procent mere aktiv end naturlig insulin. Det skyldes formentlig, at molekylet er meget fleksibelt og allerede er delvist udfoldet i modsætning til naturlig insulin, der først får den delvist udfoldede struktur, når det skal navigere ind i den rette position for at kunne binde sig til receptoren. Da den fleksible insulinvariant allerede er delvist udfoldet, kan den umiddelbart binde sig til receptoren og har derfor en øget aktivitet.

Undersøgelsen antyder, at den foldede struktur er unødvendig for insulinmolekylets biologiske aktivitet. Desuden har forskningen givet anledning til at udlede en teori om de forandringer, det naturlige insulin gennemgår, når det binder til receptoren (*se fig. 8.6d*). Opdagelsen af den aktive insulinvariant har endvidere dannet grundlag for et fortsat udviklingsarbejde af mindre og mere stabile molekyler, der kan udøve den samme funktion som insulin. Måske endda i form af tabletter, så diabetikere ikke behøver at injicere insulin.

Fig. 8.6a:

Insulinreceptoren er et membranprotein, som består af fire polypeptidkæder: To α -kæder, der sidder uden på celleden, og to β -kæder, der sidder tværs gennem membranen. Kæderne er forbundet med disulfidbindinger. Når insulin binder sig til α -kæde på en insulinfølsom receptor, aktiveres glucosetransporterne og muliggør dermed glucoseoptagelsen i cellen.

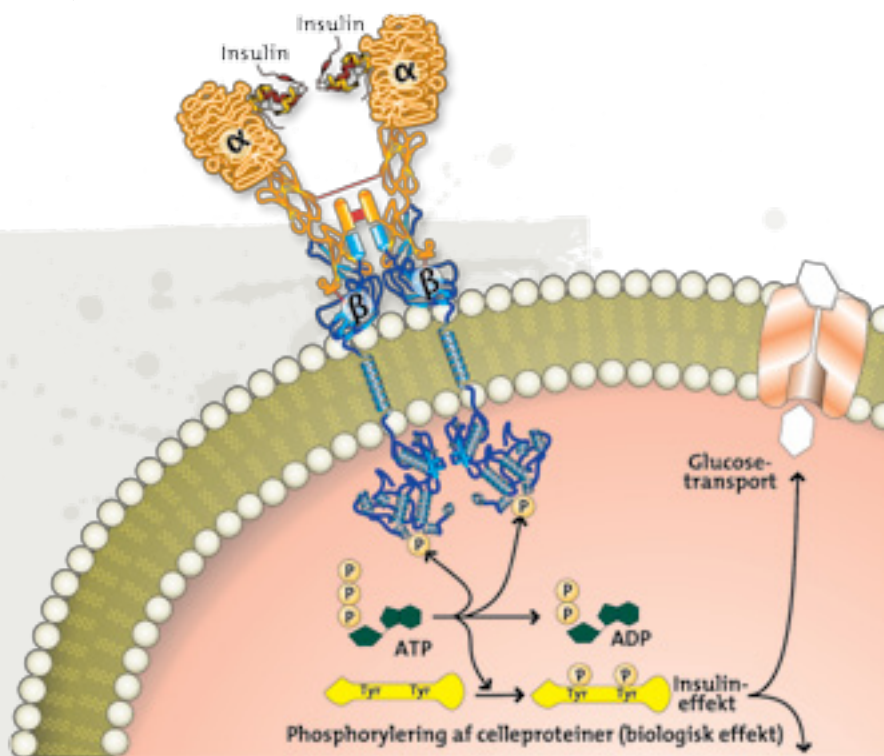


Fig. 8.6b: Den insulin, som diabetikere normalt får, består af en hexamer, det vil sige seks insulinmolekyler, der hænger symmetrisk sammen. For at kunne binde sig til insulinreceptorer på en celleoverflade og dermed udøve sin blodsukkersænkende effekt, må det enkelte molekyle eller den enkelte monomer løsrive sig fra hexameren.

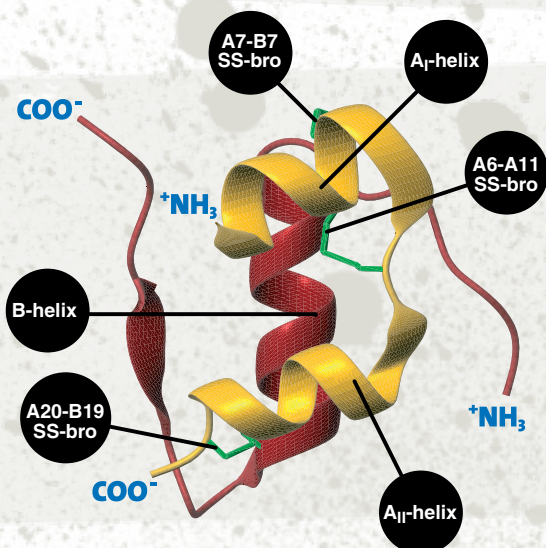
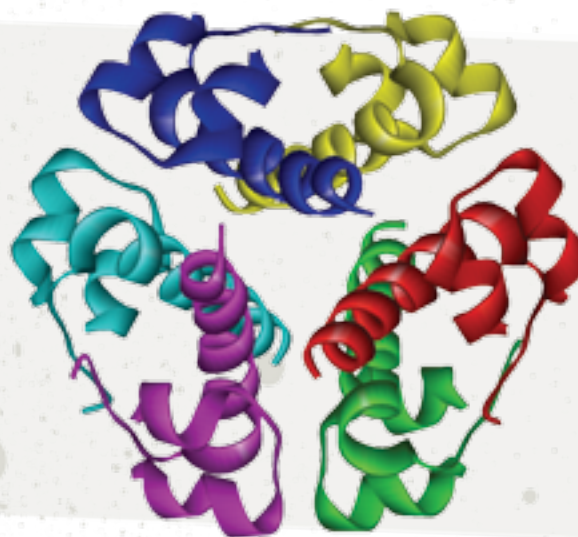
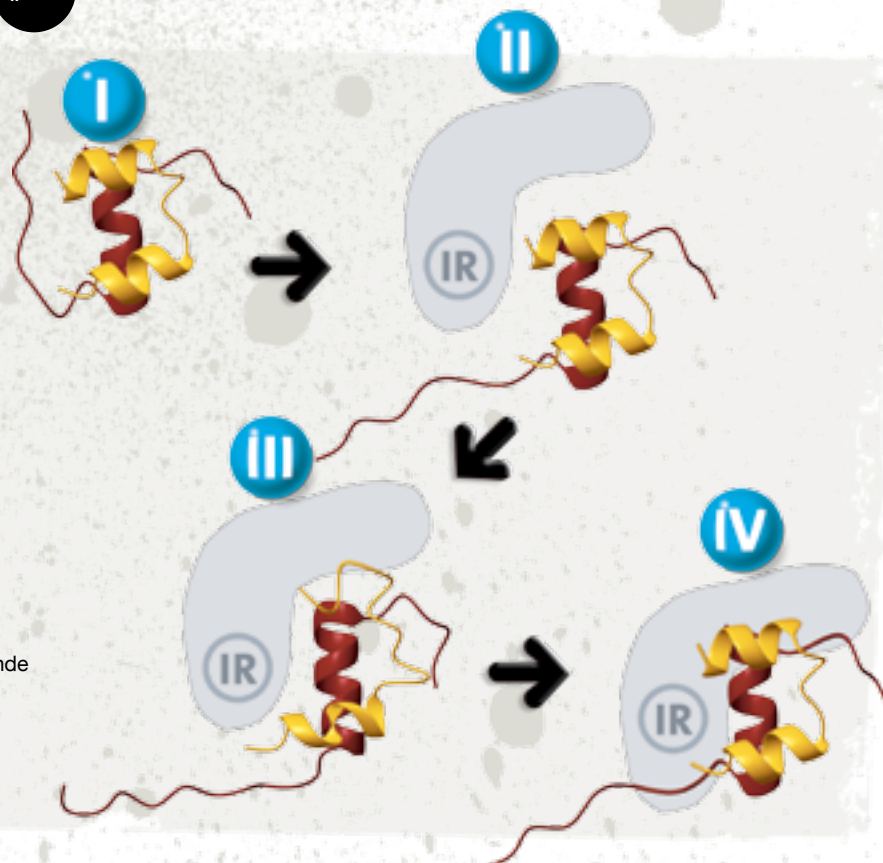


Fig. 8.6c: Insulin i enkeltmolekyleform hedder en insulinmonomer og består af to kæder af aminosyrer: A-kæden og B-kæden. Den biologisk aktive form af insulin er monomeren. SS-bro = disulfidbinding.

Fig. 8.6d: En model for naturlig insulins funktion viser vekselvirkningen mellem insulin og insulinreceptoren (IR). Det frie insulinmolekyle må undergå en strukturændring for at kunne binde sig korrekt til receptoren.



FAKTA

Langtidsvirkende og korttidsvirkende insulin

Langtidsvirkende insulin:

Virker over mange timer og anvendes som basisinsulin for at dække det grundlæggende behov. Injiceres typisk om morgenen og til natten. Langtidsvirkningen kommer af, at insulinen består af krystaller, der først skal opløses, før den kan optages.

Korttidsvirkende insulin:

Virker allerede efter en halv time og har en meget kort virkningstid. Den kan tages direkte i forbindelse med måltider og giver derfor patienterne mulighed

for at injicere insulin efter behov. Det betyder, at patienterne oplever at have en større kontrol med forbruget. Korttidsvirkningen kommer af, at insulinen er i opløsning og derfor kan trænge direkte fra under huden over i blodet. I dag bruger man i stigende grad insulinanaloger til hurtigtvirkende insulin. Det vil sige humaninsulin, der er blevet optimeret til at virke hurtigere. Analogerne fremstilles ved hjælp af bioteknologi, og den hurtigere virkning skyldes bl.a., at tendensen til at danne hexamerer er blevet reduceret ved at bytte om på enkelte aminosyrer.

NMR-spektroskopi

Fra engelsk: Nuclear Magnetic Resonance.

På dansk: Kernemagnetisk resonans

NMR-spektroskopi bruges til at bestemme den kemiske struktur af organiske forbindelser og til at bestemme den rumlige opbygning af molekyler.



For omkring $\frac{1}{3}$ af alle grundstoffer og deres isotoper gælder det, at deres atomkerner har et kernemagnetisk moment, og når man placerer et molekyle i et kraftigt magnetfelt og påvirker det med radiobølger, vil dets atomer - ligesom hvis de var små magneter - blive bragt i resonans med det omgivende elektromagnetiske felt, hvis radiobølgerne har den rigtige frekvens. Det er resonanssignalerne fra atomerne, man registrerer og måler ved NMR-spektroskopi. Til en bestemt resonansfrekvens svarer en bestemt atomkernes kemiske omgivelser, og dermed kan atomets position i molekylet bestemmes (*se fig. 8.7a og 8.7b*). Resonanssignalerne skyldes, at der sker ændringer af

atomkernernes energitilstande, når de bliver placeret i et magnetfelt. Atomkerner kan rotere om deres egen akse - man siger, de 'spinner'. De kan spinne op og spinne ned, og i et magnetfelt vil der opstå en energiforskel mellem de to tilstande. Det er den energiforskel, der giver resonanssignalerne. Jo større magnetfeltet er, desto større er energiforskellen, og jo bedre målinger får man.

NMR-spektroskopi kan også anvendes til at identificere et ukendt stof. De første forsøg med NMR-spektroskopi blev gennemført af amerikanske forskere helt tilbage i 1945, og siden er der indsamlet store mængder data om hvilke atomer, der giver hvilke

signaler under forskellige, men kendte betingelser (radiobølgenes frekvens, kemiske omgivelser og magnetfelt). Informationerne er samlet i tabeller og computerprogrammer, og det er derfor muligt at afgøre, hvilke atomer man har med at gøre og dermed også at identificere et ukendt molekyle. NMR-spektroskopi er fx blevet brugt til at bestemme kilden til forurenet drikkevand. Ved at identificere atomerne i vandet og deres kemiske omgivelser kunne man bestemme hvilke molekyler, der var tale om og dermed afgøre hvilken fabrik, der var ansvarlig for at have udledt forurenet vand.

NMR-apparatet består af en ca. halvanden meter høj metalcylinder, der er ca. en meter i diameter. Inde i metalcylinderen er der en følsom elektromagnet med et meget stærkt magnetfelt. Det stof eller den prøve, man vil undersøge, placeres i et lille rør i midten af den store magnet. Herefter påvirkes prøven med radiobølger. Er det molekylets protoner, man ønsker at observere, ligger frekvensen af strålingen i området mellem 200 og 900 MHz. Er det andre

kerner, man vil se på, fx isotoperne ^{13}C eller ^{15}N , er frekvensen noget lavere. I dag dannes magnetfelterne i NMR-apparatet af store og kraftigt superledende elektromagneter, som er kølet med flydende helium til 4,2 K (-268,9 °C). Magnetfeltstyrken ligger mellem 4,7 og 21 tesla.

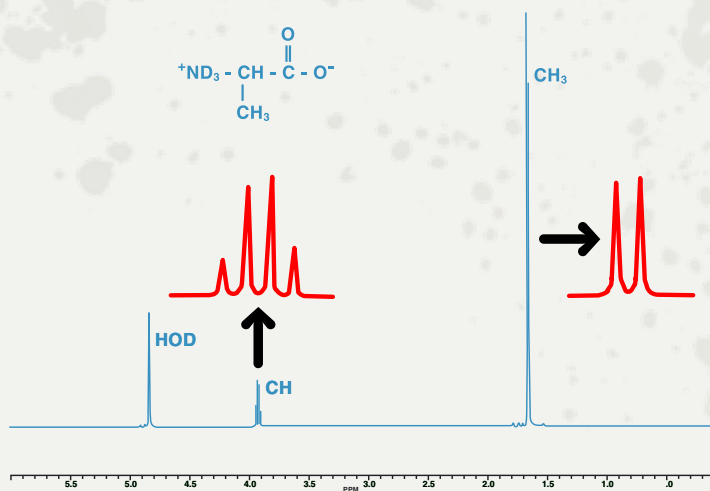


Fig. 8.7a: Proton NMR-spektrum af aminosyren alanin opløst i tungt vand.

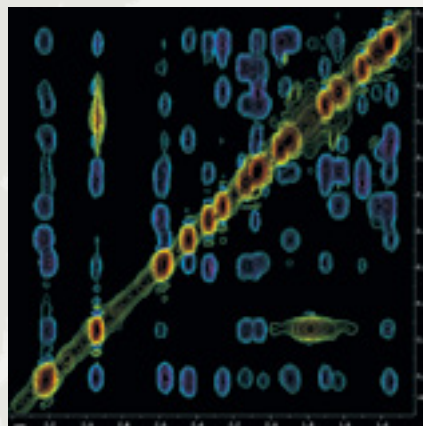


Fig. 8.7b: Placeringen og udseendet af en top fra et atom afhænger af, hvilke andre atomer det er bundet til samt de kemiske omgivelser. Informationerne fra toppene i spektret fortolkes ud fra tabeller, computerprogrammer og erfaring.