

Nöropeptitlerin ve Peptit Hormonlarının RADYOİMMUNOASSAYLERİNİN KEŞFİ

Nöropeptitlerin ve Peptit Hormonlarının Radyoimmunoassaylerinin Keşfi

Dr. Merve Çalışır ve Dr. Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

1977, Kraliçenin Gümüş Jübile'sini kutladığı yıldır, Star Wars ateşi dünyayı sardı ve rock'n roll 'kralı' Elvis Presley öldü. Aynı zamanda Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nün üç seçkin Amerikalı bilim insanına verildiği yıldır. Bir yarısı 'beynin peptit hormonu üretimi' ile ilgili keşiflerinden dolayı Roger Guillemin ve Andrew Schally'ye, diğer yarısı da 'peptid hormonlarının radyoimmünoanalizlerinin gelişimi' için Rosalyn Yalow'a. Profesör Rolf Luft sunum konuşmasında uzun zamandan beri hormon terimiyle ilişkilendirilen gizemi şöyle anlattı:

"Bunlar, uzun süre ölçülmesi imkânsız görünen çok düşük konsantrasyonlarda genellikle çok güçlü eylemlere sahip kimyasal maddelerdi. Aktif kimyasal maddeleri - bu örnekte hormonları - tanımlamayı ve sentez oranlarını ölçmeyi öğrendikten sonra, ancak o zaman fantezi ve gizemi gerçeğe dönüştürmek için sağlam bir temel oluşturuldu."

Roger Guillemin ve Andrew Schally aynı amaç için birbirlerinden bağımsız olarak çalıştılar: Hipotalamustan maddeler çıkarmak ve izole etmek ve ardından bu maddelerin hipofiz hormonlarının salınmasına neden olma yeteneklerini göstermek. Bu nöropeptidleri keşfetmeleri, hipotalamus ile hipofiz bezi arasında gerçekten bir bağlantı olduğuna dair çığır açan bilgilere yol açtı. Bu nöropeptitlerin birçoğunu sıralayıp sentezlemeye devam ettiler. Böylece beyin ve iç organ sistemleri arasındaki kimyasal bağın kurulmasına yardımcı oldular. Rosalyn Yalow, meslektaşları Solomon Berson ile birlikte, kandaki bu hormonları ölçmenin getirdiği zorlukları ele aldı. Aşırı düşük konsantrasyonları nedeniyle, peptid hormonları kantitatif olarak ölçülemedi ve bu, araştırma alanında gerçek bir durğunluğa yol açtı. İnsülin tedavisi alan hastaların anti-insülin antikolarını geliştirdiğini keşfeden Yalow, bu antikoları izotop etiketli insülin ile plazma insülin seviyelerini belirlemek için kullanabildi. Çalışmalarının immünoloji, izotop araştırması, matematik ve fizik alanlarını birleştirdi ve tıbbi ve biyolojik araştırmalar üzerinde derin bir etkisi oldu.

Ödül Kazananların Geçmişi

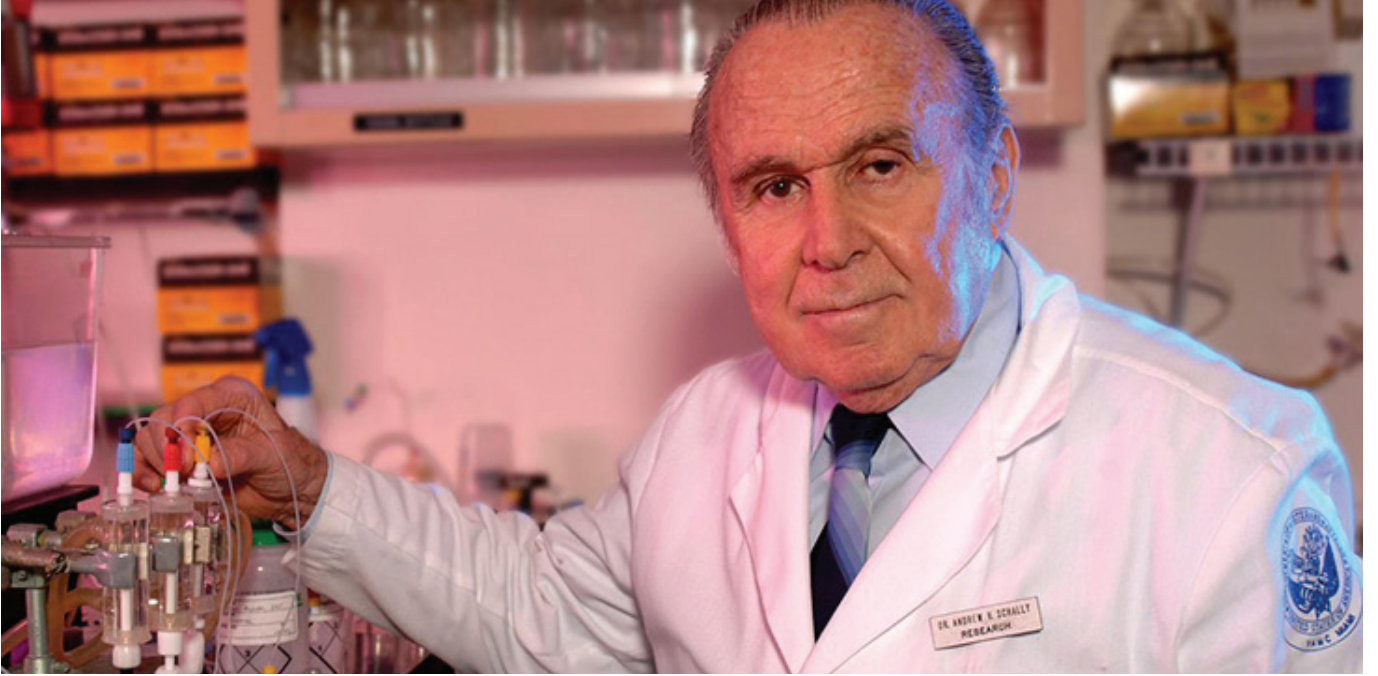
**Guillemin,
Temel
Bilimlerdeki
Lasker Ödülü
(1975) ve
ABD Başkanı
tarafından
sunulan Ulusal
Bilim Madalyası
(1976) dahil
olmak üzere çok
sayıda ödülle
onurlandırıldı.**



Roger Guillemin

Roger Guillemin, 1924'te Fransa'nın Dijon kentinde doğdu. İlk eğitimini burada aldı ve tıp fakültesine girdi. Daha sonra 1949'da doktorasını aldığı Lyon'daki Faculté de Médecine'ye transfer oldu, Hans Selye'nin genel adaptasyon sendromunun endokrinolojisi üzerine çalıştı. Selye'yi, Montreal Üniversitesi Deneysel Tıp ve Cerrahi Enstitüsünde doktora için deneysel çalışmalar yaptığı Kanada'ya kadar takip etti. Selye'nin laboratuvarı üretkendi ve genç Guillemin'in deneysel endokrinoloji konusunda deneyim kazanması için mükemmel bir yerdi. Burada hipotalamik hormonların araştırılmasına ve bunların akut stres tepkisi sırasında hipofiz kontrolüne katılımına daha fazla dâhil oldu. 1953'te, Houston, Teksas'taki Baylor Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yardımcı doçentlik görevine başladı, fizyoloji öğretmenliği yaptı ve 18 yıl orada yaşadı. Schally Houston'a geldi ve birlikte kortikotrofin salgılama faktörünü karakterize etme arayışlarına başladılar. Guillemin 1970 yılında Nöroendokrinoloji

Laboratuvarlarını kurduğu Salk Enstitüsüne taşındı ve hipotalamik hormonlar üzerindeki çalışmaları hız kazandı. Tirotropin salgılayan hormon (TRH), lutinize edici hormon salıcı hormon (LHRH), somatostatin ve ayrıca endorfin izolasyonu ve sentezi alanında ufuk açıcıydı. Bu çalışması için, Temel Bilimlerdeki Lasker Ödülü (1975) ve ABD Başkanı tarafından sunulan Ulusal Bilim Madalyası (1976) dahil olmak üzere çok sayıda önemli ödülle onurlandırıldı. Galya bakış açısını korudu ve her zaman mükemmel bir beyefendi oldu.



Andrew Schally

Andrew Schally, 1926'da Polonya'nın Wilno kentinde doğdu. Polonya, Avusturya-Macaristan, Fransız ve İsveç kökenleri de dâhil olmak üzere karışık bir soya sahipti. Çocukluğu pastoral olmaktan çok uzaktı. Önce savaştan zarar gören Polonya'da büyüdü ve ardından Romanya'daki Yahudi-Polonya yerleşimine taşındı. İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra, alışık olduğu zorlu koşullara kıyasla cennet gibi görünen İngiltere'ye gitti. 1946'da Schally, İskoçya'da eğitimini tamamladı ve ardından lisans düzeyinde kimya okuduğu Londra'ya taşındı. 1949'da genç bir bilim insanı olarak İngiltere'deki Ulusal Tıbbi Araştırma Enstitüsü'ne (NIMR, MRC) katıldı. Burada bilimsel araştırma için gerçek iştahı kendini göstermeye başladı. Bunda Nobel Kimya veya Fizyoloji veya Tıp Ödülü sahibi olan Dr Rodney Porter, Dr Archer Martin ve Dr John Cornforth'un da dâhil olduğu çok sayıda

yüksek kalibreli bilim insan ile aynı atmosferi paylaşmanın rolü büyüktü. Enstitüde geçirdiği üç yıl, ona teknik becerilerin yanı sıra bilime karşı hem mantıklı hem de etik bir temel yaklaşım öğretti. 1952'de Schally, McGill Üniversitesi'nde doktora yapmak için Kanada, Montreal'e taşındı. Profesör David Thomson'ın teşvik edici dersleri ve Dr Murray Saffran ile ACTH ve adrenokortikal steroidler arasındaki ilişkiyi inceleyen deneysel çalışma yoluyla endokrinolojiye ilgi duydu. Beyin fonksiyonu ile endokrin aktivitesi arasındaki potansiyel bağlantıyı ilgi çekici buldu ve bunu deneysel olarak göstermeye karar verdi. 1955'te Schally ve Saffran, kortikotrofin salgılayan faktörün (CRF) hipotalamus ve nörohipofizeal dokuda mevcut olduğunu gösteren ilk bilim adamları oldu. Bu, nöroendokrinoloji alanında gerçek bir gelişmeydi. Çünkü bundan önce birçok kişi bu konuya şüpheyle bakıyordu. Schally doktora çalışmalarını tamamladı ve Guillemin ile CRF konusundaki çalışmalarına devam etmek için 1957'de Baylor'a taşındı. Takip eden beş yıl gerçek bir hayal kırıklığı ve

tatminsizlik dönemiymişti. CRF'yi hipotalamik dokudan ayırmadaki başarısızlık, Schally'nin orijinal bulgularına şüphe uyandırdı; ancak, kararlılığından feragat etmedi ve 1962'de bir Veterans Administration laboratuvarı kurup yönetmek ve hipotalamik çalışmalarına devam etmek için New Orleans'a taşındı. Schally, 1969'da, grubu TRH'nin yapısını ve iki hipotalamik hormonu, 1971'de LHRH ve 1975'te domuz somatostatini keşfetmeyi başardığında, kararlılığı için ödüllendirildi. Somatostatinin yapısını aydınlatan ve sentezleyen Schally, hormonun fizyolojisini ve klinik önemini daha da güçlendirmek için dünyadaki diğer gruplarla işbirliğini yapmaya başladı. Londra'daki Hammersmith Hastanesi'nde, Schally ile Stephen R. Bloom arasındaki işbirliğini de bu çalışmalara örnekti. Schally, bu çalışma için sayısız ödülün, özellikle Gaziler İdaresi'nin en yüksek ödülü olan William S. Middleton Ödülü ve Temel Tıp Araştırmalarında Lasker Ödülü'nün sahibi oldu.

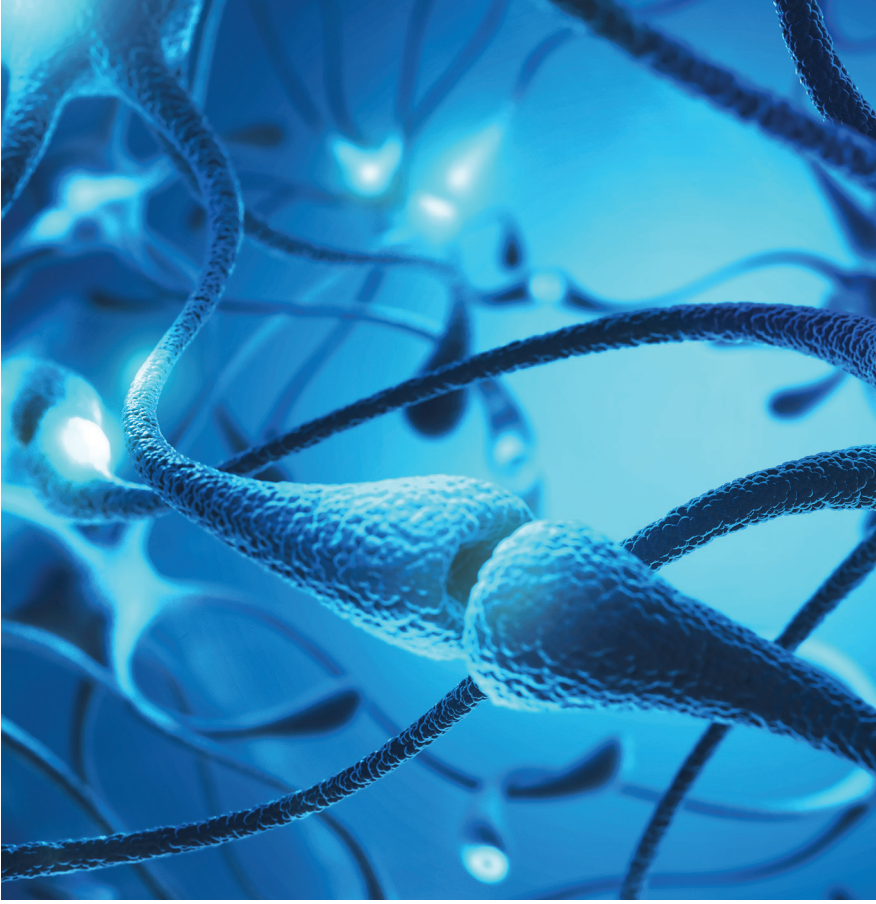


Rosalyn Yalow

Rosalyn Yalow, 1921'de hayatının çoğunu geçirdiği New York'ta doğdu. Ne Alman kökenli Annesi ne de karışık Doğu Avrupa kökenli babası ortaokul eğitimini tamamlama fırsatına sahip değildiler. Bu nedenle çocuklarının üniversiteye girmesi için ellerinden yapmaya karar verdiler. Yalow'un fizik sevgisi okulda başladı. Daha sonra New York Şehir Üniversitesi'nin kadınlardan oluşan koleji Hunter'a gittiğinde, onu özellikle oraya çeken şey nükleer fizikti. Marie Curie'nin biyografisinden ilham aldı ve Dr. Enrico Fermi'nin "sıcak" nükleer fisyon konusu üzerine katıldığı bir konferanstan etkilendi. Yalow'un ailesi, Hunter'dan mezun olduktan sonra ilkokul öğretmeni olarak istikrarlı bir işe yerleşmesi için istekliydiler. Ancak Yalow'un başka fikirleri vardı. Fizik alanındaki çalışmalarına devam etmeye kararlıydı, ancak mali durumu sınırlayıcı bir faktördü. Bu nedenle, 1940 yılında,

yüksek lisans çalışmalarının yolunu açmak için Columbia Üniversitesi'nde tanınmış bir biyokimyacı olan Dr. Rudolf Schoenheimer'in yanında yarı zamanlı sekreter olarak göreve başladı. Bu çaba, ertesi yıl Illinois Üniversitesi'nde fizikte öğretim asistanlığı teklif edildiğinde meyvesini verdi. Yalow geldiğinde, fakültenin 400 üyesi arasındaki tek kadın olduğunu ve 1917'den beri ilk olduğunu öğrendi. Bu onu caydırmadı ve Ocak 1945'te nükleer fizik alanında doktorasını radyoaktif izotopları ölçmek için uygun tekniklerin oluşturulması ve kullanımında deneysel beceriler kazanarak tamamladı. Ayrıca bu süre zarfında Aaron Yalow ile tanıştı ve 1943'te evlendiler. Doktora çalışmalarını tamamladıktan sonra Yalow, Hunter'da fizik öğretmenliği yaptığı New York'a döndü. 1947'de Bronx Veterans Yönetim Hastanesinde bir radyoizotop hizmeti kurması için ona eşsiz bir fırsat sunuldu. Oraya, 1950'de, sonraki 22 yıl boyunca yakın çalışacağı Dr. Solomon Berson da katıldı. Yalow'un fizik bilgisi ve Berson'un klinik deneyimi, şimdiye

kadar keşfedilmemiş tıbbi uygulamalar için radyoizotopları kullanmalarını sağladı. Çalışmaları onları hormonlar gibi küçük peptitlerin ölçülmesi zorluğuna götürdü ve bu çalışma için Yalow Tıpta Nobel Ödülü'ne layık görüldü. Bu ödülü alan ikinci ve herhangi bir Nobel Ödülü alan altıncı kadın oldu. Yalow, aynı zamanda, 1976'da Albert Lasker Temel Tıp Araştırma Ödülü'nü kazanan ilk kadın ve ilk nükleer fizikçiydi. Berson'ın 1972'deki erken ölümü, bu ödüllerin hiçbiri de ölümden sonra verilmediği için, bu ödüllerini alamadığı anlamına geliyordu. Ancak Yalow, laboratuvarının adını Solomon A. Berson Araştırma Laboratuvarı olarak değiştirdi. Böylece Berson'ın adı gelecekteki tüm yayınlarında görünecekti. İşine ciddiyete ve algılanan küstahlığına rağmen, Yalow genellikle yaşam ve toplum konusunda oldukça yumuşaktı. Bir anekdota şöyle der "Biliyorsunuz, biz katı Ortodoks Yahudileriz. Tüm kanunlara ve geleneklere uyarız. Caddede yürürken kocamın arkasından yürüyorum. Tabii ki, Nobel Ödülümü almaya gittiğimde, arkamdan yürüyebilir!"



Beynin Peptid Hormon Üretimi ile İlgili Keşifler

Hipotalamus ve hipofiz arasındaki zor bağlantı

1950'lerin başlarında, Atlantik'in her iki yakasındaki çeşitli gruplar tarafından, hipofizin ön lobunun hedef endokrin organların kontrolünde yer aldığı ve bunun da hipotalamustaki nöronal unsurlar tarafından düzenlenebileceği bildirilmişti. Hipotalamusun bu süreç nasıl dâhil olduğu daha az açıktı. Küçük kan damarlarıyla bağlanan hipotalamus ve hipofiz arasındaki bağlantının ilginç anatomisinin, bağlantının anahtarı olduğu varsayıldı. Bu, Guillemin ve Rosenberg'in 1955'te yaptığı doku kültürü deneyleriyle gösterildi. Bununla birlikte, nöronal faktörler henüz belirlenemedi. Bunların

küçük peptitler olması muhtemeldi ve bu nedenle karakterize edilmesi zordu. Bu fraksiyonları testetmek için yeni saflaştırma teknikleri ve deneyler acilen gerekiyordu. Ek olarak, her bir parça bu maddelerden yalnızca bin milyonda biri içerdiği için çok sayıda hipotalamik parçanın gerekli olacağı tahmin ediliyordu. Bu devasa görev, Guillemin ve Schally önderliğindeki iki bağımsız grup tarafından, zorlu bir yol haline gelecek olan bu görevde üstlenildi.

İlk hipotalamik hormonun tanımlanması: Tirotropin salgılayan hormon (TRH)

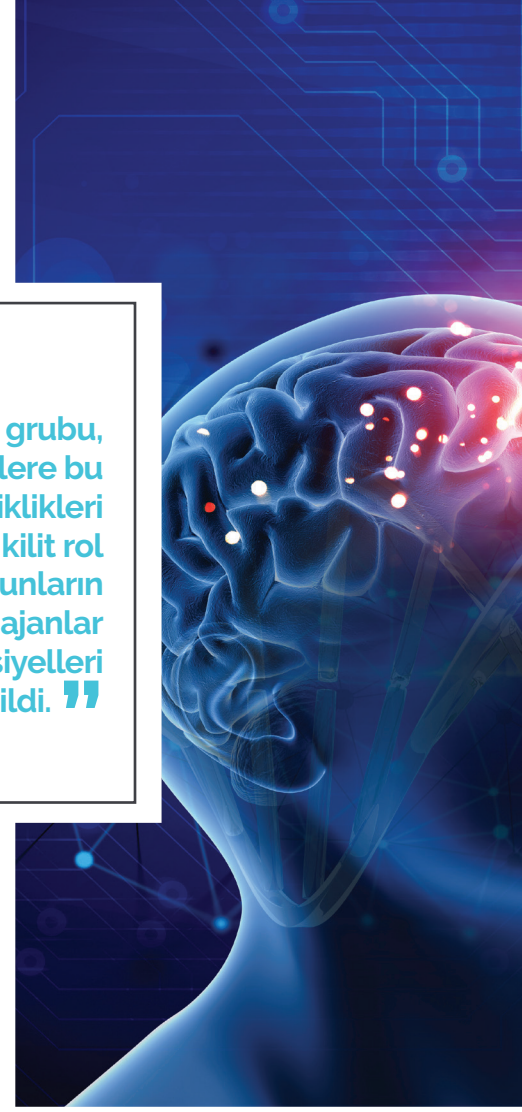
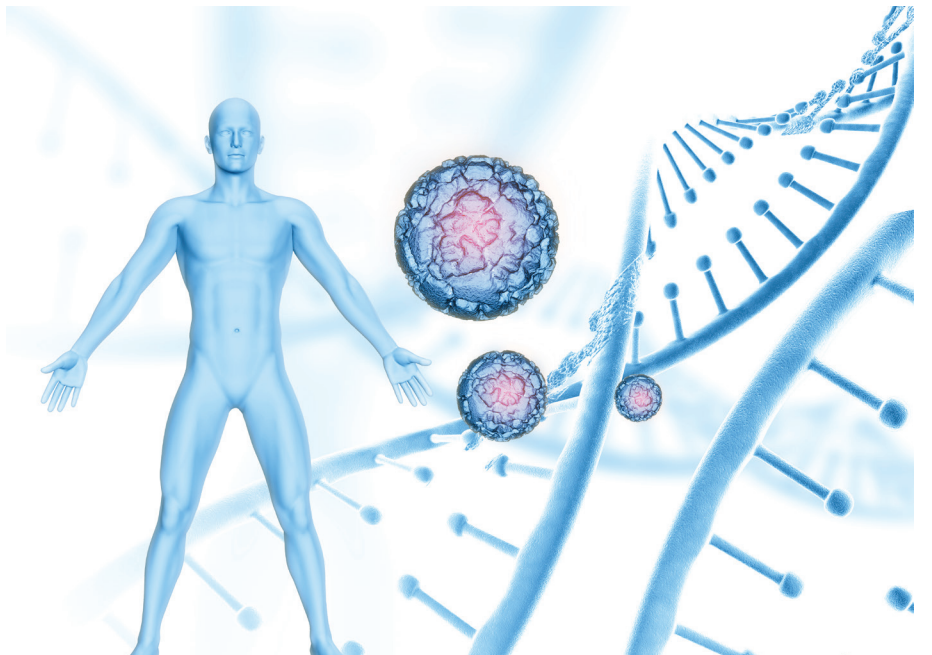
Guillemin grubu, TRH'yi karakterize etmek için büyük bir çabayla, 300.000'den fazla koyun hipotalamik parçası topladı ve 1968'in sonlarında, hipofiz yoluyla tiroid bezini kontrol eden zor faktörü başarıyla izole ettiler. Aynı zamanda, Schally ve meslektaşları 100.000 domuz hipotalamusu topladılar ve 2,8 mg TRH izole etmeyi başardılar. Önemli teknik zorlukların

üstesinden geldikten sonra, Guillemin basit bir tripeptit olarak kütle spektrometresi ile koyun (koyun) TRH'nin birincil yapısını araştırmaya devam etti. Glu-His-Pro-NH₂. Schally'nin grubu bu bulguları doğruladı ve domuz TRH karakterizasyonu da aynı yapıyı verdi. TRH'nin karakterizasyonu, alalade bir başarı değildi. Hormon izole edildikten sonra, TRH'nin küçük bir polipeptit olabileceğini belirlemek için ultraviyole, kızılötesi ve nükleer manyetik rezonans dahil üzere spektrometrik tekniklerin bir kombinasyonu kullanıldı. Ayrıca, spektrumlar üç belirli amino asidin varlığıyla tutarlıydı: His, Pro ve Glu. Her iki grup da üç amino asidin eş molar oranlarını içeren analogları inceleyerek TRH aktivitesini inceledi; ancak her iki grubun analogları biyolojik aktivite göstermedi. Olumlu bulgularından yoksun olan Schally, dikkatini LHRH'ye çevirdi. Ancak birkaç yıl sonra TRH sorununa geri döndü. Bu arada Guillemin analogları takip etti ve N-terminalini korumak için bunları asetik anhidrit ile tedavi etmeyi önerdi. Bu analoglardan birinin, Glu-His-Pro-OH'nin, doğal TRH'ye niteliksel olarak benzer biyolojik aktiviteye sahip olduğunu buldu ve bunun gerçekten de kütle spektrometrisinin ana reaksiyon ürünü olduğunu doğruladı. Bununla birlikte, ikisi kromatografik işlemler sırasında aynı şekilde davranmadı ve Guillemin'in grubu daha da derinlemesine araştırma yaptı. Yapısının oksitosin gibi diğer doğal olarak oluşan hormonlara benzerliğine dayanarak Glu-His-Pro-NH₂ yapısını önerdiler ve bunların çıkarılması doğru oldu. Spesifik aktivitesinin in vitro ve in vivo olarak TRH ile aynı olduğunu gösterdiler. Guillemin'in grubunun çalışmaları, Schally'ninkiyle paraleldi ve domuz TRH'nin aynı zamanda koyun TRH ile aynı olduğu gösterildi. Schally'nin grubu daha sonra domuz TRH'nin insanlarda TSH salınımını uyardığını gösteren ilk gruptu. Günümüzde TRH, TSH ve TRH eksikliği arasında ve ayrıca TSH salgılayan bir tümör ile tiroid hormonu direnci arasında ayırım yapmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Luteinize edici hormon salıcı hormon (LHRH)

1960'ların başlarında, hipofizden luteinize edici hormonun salgılanmasını uyarabilen bir faktörün hipotalamustan izole edildiği bildirildi. Bu yeteneği nedeniyle luteinize edici hormon salgılayan hormon (LHRH) olarak adlandırılmıştır. Bu bulgudan etkilenen Guillemin, LHRH'yi bir hayvan biyoanalizinde 1 ug'de aktif olacak şekilde hızla saflaştırdı ve bu işlem daha sonra Schally tarafından onaylandı. 1971'de Schally'nin grubu, domuz LHRH'sini başarılı bir şekilde izole etti ve enzimatik hidroliz yoluyla yaklaşık 200 nmol peptit kullanan bir dizi deney yoluyla, bir decapeptit olan LHRH dizisini aydınlattılar. Dört hafta sonra Guillemin, bu decapeptidin koyun LHRH'si ile aynı in vivo ve in vitro aktiviteye sahip olduğunu bildirdi. LHRH'nin keşfinin klinik önemi çok büyüktü. Her iki grup da bunun üreme tıbbının iki yelpazesi üzerinde gerçek bir etkisi olabileceğini fark etti: doğurganlık ve doğum kontrolü. Böylece molekülün agonistlerini ve antagonistlerini tasarlama yarışı başladı. 1972'de Guillemin, potansiyel olarak yeni bir kontraseptif ajan olan LHRH'nin ilk antagonistinin yapısını yayınladı. Ayrıca güçlü agonistler ararken, "süper LHRH'ler" terimi yumurtlamayı doğal LHRH'den 150 kat daha güçlü bir şekilde uyarabilen bir analoglar grubunu tanımlamak için icat edildi. Guillemin'in grubu, süper LHRH'lere bu özelliği veren değişiklikleri belirlemede kilit rol oynadı ve bunların yumurtlama uyarıcı ajanlar olarak potansiyelleri gerçekleştirildi. LHRH'nin keşfi, onkoloji alanında da geniş kapsamlı sonuçlara sahipti. 1972 ile 1978 arasında, Schally çok sayıda agonistik LHRH analogları geliştirdi ve farelerde prostat kanseri hücre çoğalmasını engellediğini gösteren ilk kişi oldu. Prostat kanseri olan hastalarda LHRH agonistlerini kullanan ilk klinik denemelerde etkili oldu ve bunların sürekli salım türleri artık hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılıyor.

“ Guillemin'in grubu, süper LHRH'lere bu özelliği veren değişiklikleri belirlemede kilit rol oynadı ve bunların yumurtlama uyarıcı ajanlar olarak potansiyelleri gerçekleştirildi. ”





Somatostatin

TSH ve LH salgılayan hipotalamik hormonlar keşfedildi ve bunu, büyüme hormonunu (GH) uyaran bir peptidin de var olması gerektiği izledi. Analizlerdeki farklılıklar ve metodolojideki yanlışlıklar, bu peptidin 1977 Nobel Ödülü verildiğinde keşfedilmediği anlamına geliyordu. Bununla birlikte, araştırmada, hipotalamik fragmanların sıçan hipofiz hücrelerine eklenmesinin GH'nin dinlenme salgılanmasında bir azalmaya yol açtığı gözlemlendi. Bu, doza bağlı ve spesifik; serebellar ekstrakt eklenmesiyle veya vazopressin, oksitosin ve serotonin dahil olmak üzere bir dizi başka peptid eklendiğinde görülmedi. Bu etkiden sorumlu olan faktör "somatostatin" olarak adlandırıldı. Guillemin grubu,

koyun hipotalamusundan somatostatini ekstrakte edebildi ve onu jel filtrasyonu ile saflaştırabilirdi. 1973'te yapısını kütle spektrometresi ile açıkladılar. Schally, domuzlardaki somatostatinin yapısını koyun peptidinin yapısıyla aynı olduğunu doğruladı ve farenin pankreasında, bağırsağında ve midesinde varlığını göstermeye devam etti.

Schally, İngiltere'deki birkaç grup ve insanla (yazar Stephen R. Bloom dahil) yaptığı işbirliği sayesinde, somatostatinin sağlıklı ve diyabetik bireylerde pankreastan glukagon ve insülin salınımını bastırıldığını ve bunun karbohidrat metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığını gösterdi. Daha sonra somatostatin ve benzerlerinin anti-tümör etkilerini hayvan modellerinde gözledi. Bunlar artık akromegali ve

karsinoid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Endorfinler

1973'te beyindeki opiat reseptörlerinin gösterilmesi, endojen ligandların araştırılmasına yol açtı. Bunlar, "endojen" ve "morfin" kelimelerini birleştirerek "endorfin" olarak adlandırıldı. Guillemin, bu hormonların morfin enjeksiyonundan sonra salındığı bilindiğinden, endorfinlerin GH ve prolaktin salgılanmasında rol oynadığını varsaydı. Tüm öküz, domuz ve sıçan beyinlerinden morfin benzeri aktiviteye sahip bir maddeyi izole etmek grubun sadece birkaç ayını aldı. En yüksek konsantrasyon hipotalamik bölgede bulundu ve jel filtrasyonu ile Guillemin, endorfin olarak adlandırdığı birkaç oligopeptidi izole edebildi. Guillemin, hipotezini test etmek için, beta-endorfini sıçanlara intraventriküler olarak enjekte etti ve GH ve prolaktin salınımı gösterdi. Bununla birlikte, endorfinler doğrudan hipofiz seviyesinde aktif değildi. Bu da bu işleve merkezi sinir sisteminde (CNS) başka bir yerde aracılık edildiğini gösteriyor. Endorfinlerin beyindeki nörotransmitterler olarak rolü de grup tarafından incelendi. Son olarak, hayvan modellerinde betaendorfin katatoniyeye neden olduğu gözlemlendi ve Guillemin, regülasyonundaki bozulmanın ruhsal hastalıkta önemli olabileceğini öne sürdü. Endorfinlerin yapısı ve fizyolojisi hakkındaki bilgimiz ve anlayışımız, Guillemin ve meslektaşlarının çalışmaları sayesinde muazzam bir şekilde ilerlemiştir.

Peptit Hormonlarının Radyoimünoanalizlerinin Gelişimi

Peptit hormonu ölçümünün zorlukları

1950'lerin ortalarına gelindiğinde, hormonların kimyasal tayini sıradan hale geldi ve rutin olarak hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılıyordu. Bununla birlikte, çalışılacak peptit hormonlarının kanda çok düşük bir konsantrasyona sahip olması nedeniyle, bu yöntemlerin endokrinoloji gibi belirli alanlarda kullanılması mümkün değildi. Aslında, o zamanın geleneksel yöntemlerini kullanarak, bazal plazma ACTH seviyelerini (yaklaşık 1×10^{-12} mol / l) ölçmek için, birinin 250 ml kana ihtiyaç duyacağı tahmin ediliyordu. Araştırmadaki durgunluk ve literatürde şüpheli iddialara yol açan ölçümdeki yanlışlıklar, peptit hormonu konsantrasyonunu belirlemek için doğru bir tekniğe duyulan ihtiyacın ilerleme için çok önemli olduğu anlamına geliyordu.

Radyoimmünolojik testin temeli

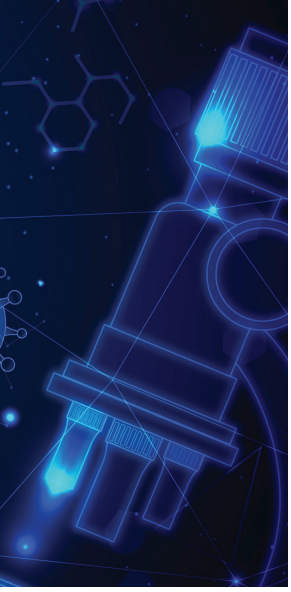
Yalow ve Berson'ın radyoimmunoassay yönetimini geliştirmesi, yönlendirilmiş tasarımla değil, daha çok bağımsız bir proje üzerinde çalışarak tesadüfi keşifle oldu. Tip 2 diabetes mellitus'un hızlı insülin metabolizması ile ilişkili olup olmadığını bulma arayışlarında, sağlıklı ve diyabetik deneklerde ^{131}I etiketli insülinin farmakokinetiğini incelediler. Her ikisinin de gözledikleri şey ilgisini çekti: daha önce hastalıkları için bir tedavi olarak insülin almış olan hastalarda radyo etiketli insülin daha hızlı kayboldu. Yalow ve Berson, bu hastaların kendi insülin tedavilerine karşı antikolar geliştirdiklerini, dolayısıyla etiketli insülinin bağlanarak temizlenmesini teşvik ettiğini varsaydılar. Elektroforez kullanarak,



daha önce insülin ile tedavi edilen hastaların serumunda insülin-antikor komplekslerinin varlığını gösterdiler. Bununla birlikte, çalışmalarını geçerli immünolojik teoriye karşıydı ve çok fazla şüphelenildi. Aslında, bulgularını açıklayan ilk makaleleri Journal of Clinical Investigation tarafından reddedildi. Başlıkta "insülin antikor" kelimesini kullanmamayı kabul ettikten sonra çalışma nihayet yayınlandı. Vazopressin gibi insülinin çok daha küçük peptitlerin immünolojik bir yanıt oluşturabileceği ve antikor üretimine yol açabileceği artık yaygın bir şekilde kabul edilmektedir; Yalow ve Berson'ın çalışması, bu görüşün yayılmasında kesinlikle etkili oldu. Bununla birlikte, radyoimmünodenyinin temelini oluşturan şu gözlemdi: eklenen etiketli insülinin küçük sabit miktarda eklenen antikora bağlanma yüzdesi, mevcut orijinal insülin miktarı ile orantılıydı.

Radyoimmunoassay'in geliştirilmesi

Radyoimmunoassay ilkesi teoride basittir. Test örneğindeki radyoaktif olmayan antijenin bilinmeyen konsantrasyonu ne kadar büyükse, radyoaktif antijene bağlanmak için o kadar az serbest antikor kalır, bu nedenle radyoaktif bağlanma yüzdesi düşer. Bağlanma derecesi daha sonra bilinen miktarlarda antijen eklenmiş benzer numuneler içeren test tüpleriyle karşılaştırılır. Bir bağlanma eşleşmesi elde ettiğinizde, bilinmeyen numunenin, bilinen konsantrasyonda antijen eklenmiş numuneyle aynı antijen konsantrasyonuna sahip olması gerekir. Teoride anlaşılması basit olsa da, Berson ve Yalow'un optimize etmesi birkaç yıl süren reaksiyonun kinetiğini ölçüyordu. Antikoronun tür özgüllüğü ile ilgili sorunların da ele alınması gerekiyordu. Bununla birlikte, 1959'da eksojen insülin

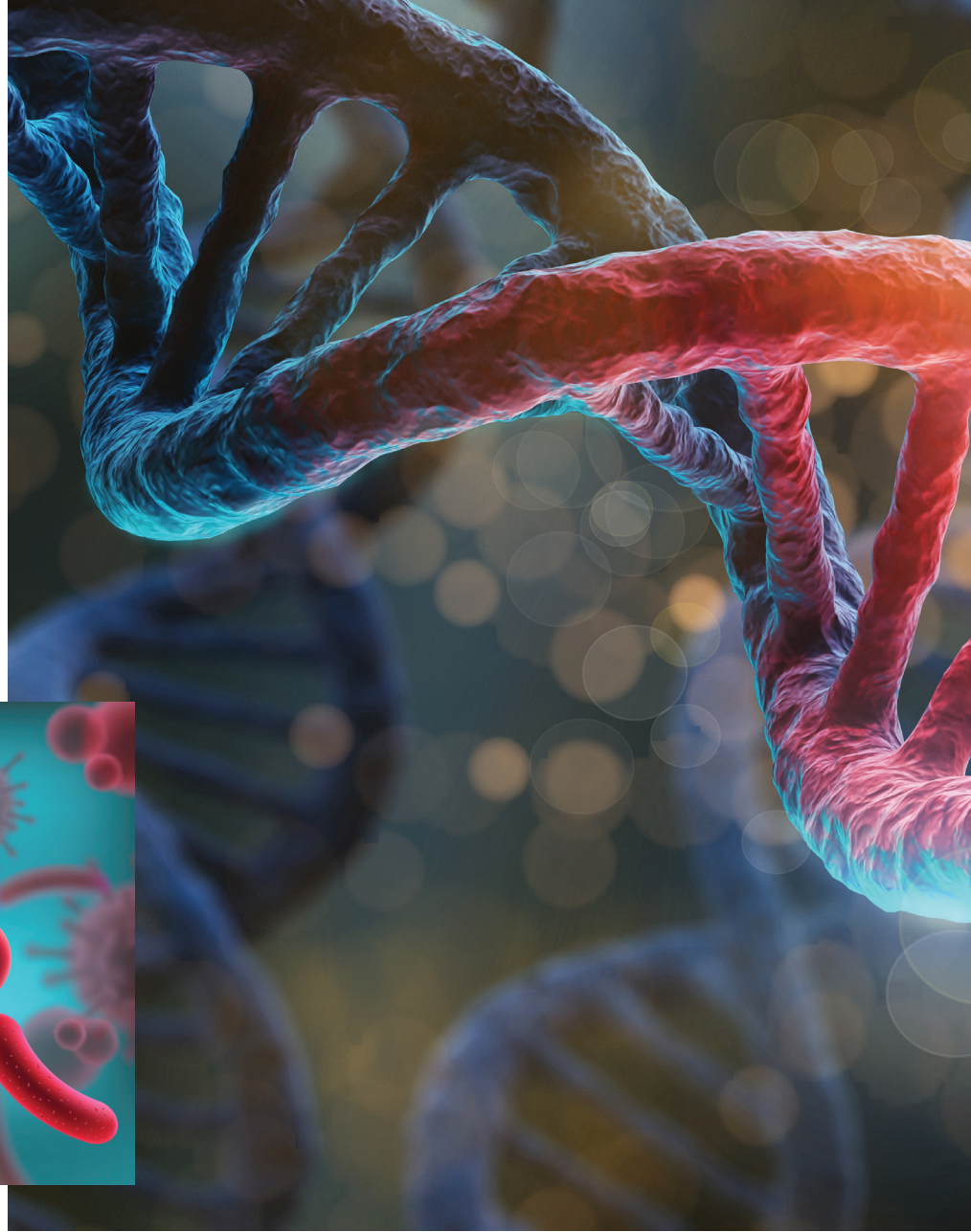


verilen bir tavşandaki insülin seviyelerini başarıyla ölçebildiklerini açıkladılar. Kısa bir süre sonra, insanlarda insülin seviyelerini doğru bir şekilde ölçmek için testi optimize ettiler. 1960 yılında, radyoimmunoassay peptit hormonu ölçümü yeni bir teknik olarak doğdu. Radioimmunoassay'in hassasiyeti çok etkileyiciydi; örneğin, gastrin artık 0.05 pmol/l'ye kadar düşük konsantrasyonlarda ölçülebilmektedir. Diğer bir büyük avantaj, tekniğin antikorlarla kullanımla sınırlı olmaması, ancak reseptörlere veya bağlayıcı proteinlere yarışmalı bağlanmanın da mümkün olmasıdır. Bu, Victor Herbert tarafından, bağlanma materyali olarak intrinsik faktör (B12'nin bir endojen ligand olduğu) kullanılarak B12 vitamini ölçümünde kullanıldı. Benzer şekilde Roger Ekins, serum tiroksin seviyelerini ölçmek için tiroksin bağlayıcı globülin kullandı.

Radioimmunoassay uygulaması

Radyoimmunoassay'in ortaya çıkışı, gerekli çok küçük örnek hacimleri ile birlikte gruplanan yüzlerce örnekte peptit hormonlarının ölçülmesine olanak sağladı. Yalow'un ödülünü aldığı 1950'lerin sonları ile 1970'ler arasında, radyoimmunoassay kullanan hastane sayısındaki artış katlanarak arttı. İnsülin, saflaştırılmış bir formda kolayca temin edilebildiği için ölçülecek ilk peptit hormonu olmuştur. Önümüzdeki yıllarda hipofiz, pankreas, bağırsak, tiroid, adrenal bezler ve gonadlardan kaynaklananlar da dahil olmak üzere her türlü peptit ve peptit olmayan hormonlar ölçüldü. Bu, endokrin bozuklukların daha doğru teşhisine ve izlenmesine izin verdi. Radioimmunoassay ayrıca birçok yeni hormonun, özellikle proinsülin ve "büyük" ACTH gibi prohormonların keşfedilmesini sağladı.

“ 1960 yılında, radyoimmunoassay peptit hormonu ölçümü için yeni bir teknik olarak doğdu. ”



Aynı zamanda, hormonların bozulmamış veya parçalanmış biçimlerinde var olabileceği heterojenlik kavramını da ortaya çıkarmıştır. Yalow'un grubu aktif olmayan bir PTH fragmanı tanımladı. Böylece bu hormonların biyosentez ve metabolizması hakkındaki anlayışımızı geliştirdi. Dahası, bu tekniği hormon salgılanmasının fizyolojisini ve patofizyolojisini incelemek için kullandılar. Bunun iyi bir örneği, gastrin salgılanması üzerine yaptıkları çalışmalardı.

Gıdının güçlü bir gastrin uyarıcısı olduğu ve mide asiditesini artırdığı ve bunun da gastrin sekresyonu üzerinde olumsuz bir geri dönüşe neden olduğu biliniyordu. Hem Zollinger-Ellison sendromunda hem de tümör olmayan hipergastrinemik hiperklorhidride, hastalar yüksek bazal gastrin seviyelerine sahipti; ancak, iki durumun tedavisi oldukça farklıdır. Yalow, ikisini doğru bir şekilde ayırt etmek için sekretinle provokasyondan sonra gastrin seviyelerinin ölçümünü yapabildi ve endokrinolojide yaygın olan dinamik fonksiyon testi kavramı doğdu. Endokrinoloji radyoimmunoassay'in ilk kullanım alanıydı.

Ancak tekniğin uygulanabilirliği birçok farklı alana yayıldı. İlaçlar, enzimler ve virüslerin tümü bu teknikle kolaylıkla tespit edilebilir. Toksikoloji ve terapötik ilaç izlemede, antikorun özgüllüğüne bağlı olarak ilaç metabolitlerinin farklılaşması ve tanımlanması da mümkün olabilir. Enzim konsantrasyonu, kofaktörlerin veya inhibitörlerin etkisi olmadan, katalitik tekniklerden daha düşük konsantrasyonlarda potansiyel olarak ölçülebilir. Yalow'un grubu, bulaşıcı hastalıklar alanında, hepatit virüslerinin yanı sıra tüberkülin saflaştırılmış protein



türevlerinin tespiti için radyoimmunoassay kullandı. Radioimmunassay, özellikle steroid hormonlarının ölçülmesinde günümüzde hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, gerçek alanı, enzimler, floresans ve kemilüminesans gibi radyoaktif olmayan etiketlerle uyarlanan ve kullanılan çalışmalarıdır. Bu, immünolojik testlerin otomasyonunu ve bugün çoğu hastane laboratuvarında rutin kullanımını sağlamıştır.

Radyoimmunoassay ve beyin peptidleri

Nobel Ödülü'nün Guillemin ve Schally'ye ve Yalow'a verildiği konular içsel olarak bağlantılıdır. Guillemin ve Schally'nin izole ettiği nöropeptidlerin doğru bir şekilde ölçülebildiği ve fizyolojilerinin çalışılabilirdiği Yalow'un geliştirdiği radyoimmunoassay sayesinde oldu. Üç Ödül Sahibi'nin keşifleri, titiz çalışmanın ve kararlılığın işe yaradığını ve bir bilimsel sorunun yanıtlandıktan sonra genellikle diğerlerini gündeme getirdiğini gösteriyor.

Yalow'un deyimiyle,

“ Öğrenmenin heyecanı gençliği yaşlılıktan ayırır. Öğrendiğin sürece yaşlı değilsin. ”