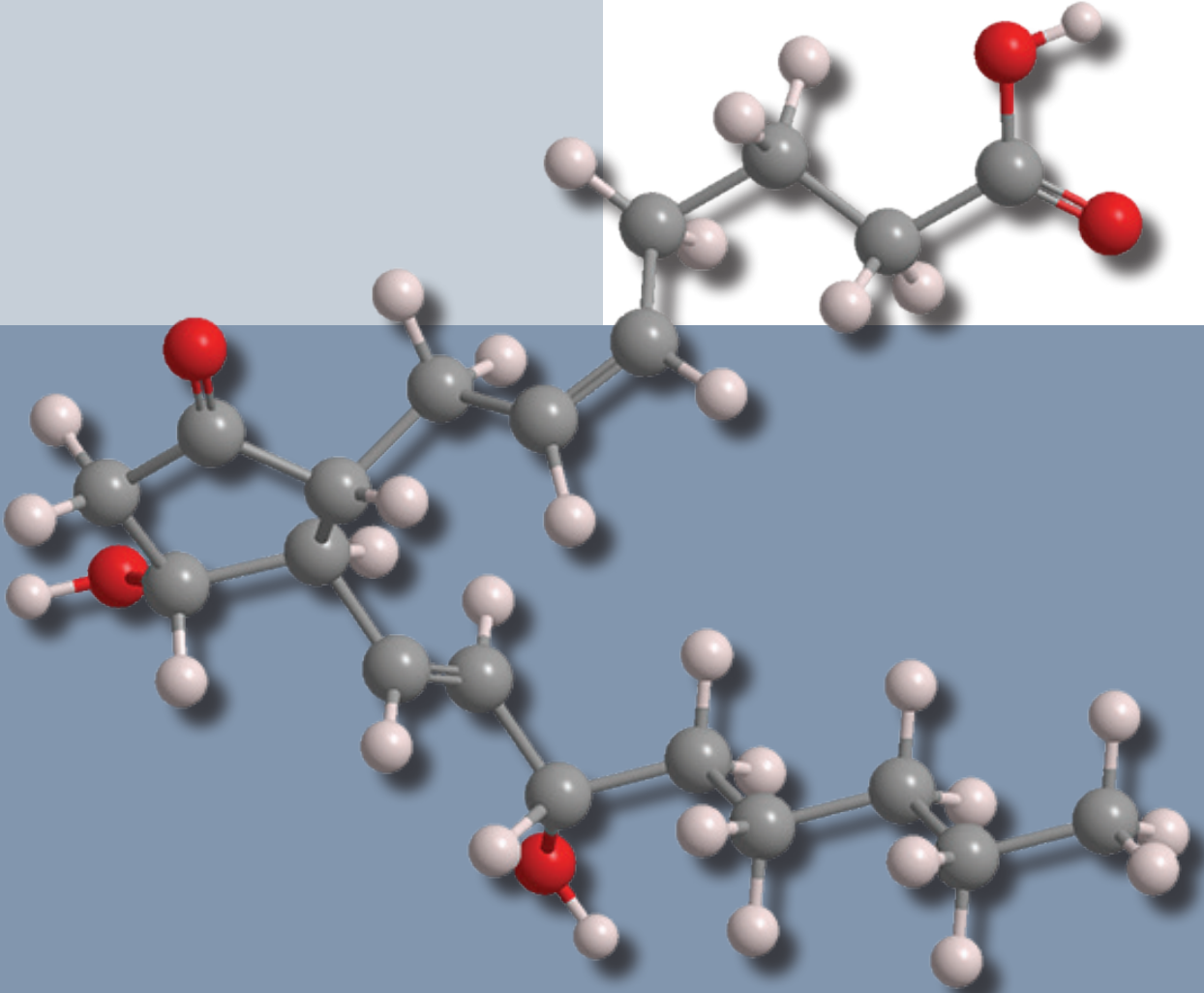


YAKINDAN KARAKTERİZE EDİLEN İLK LİPİD ARACILARI AİLESİ

# PROSTAGLANDİNLERİN KEŞFİ



# Prostaglandinlerin Keşfi

Merve Çaltır ve Dr. Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

## GİRİŞ

1982'de John Vane, Bengt Samuelsson ve Sune Bergström, "prostaglandinler" ve ilgili biyolojik olarak aktif maddelerle ilgili keşiflerinden dolayı Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü aldılar. Alıntılar (diğer öğelerin yanı sıra) Bergström'ün prostaglandinlerin saflaştırılması ve yapısal belirlenmesi, Samuelsson tarafından araziyonik asit metabolizmasının aydınlatılması ve aspirinin etki mekanizmasının Vane tarafından keşfedilmesi üzerine çalışmalarını belirtmiştir. Ödül, üç araştırmacının ömür boyu süren son derece önemli başarılarını kutlamakla kalmadı, aynı zamanda başka bir nedenle de dikkate değerdi; prostaglandinler, yakından karakterize edilen ilk lipid araçları ailesiydi. Çeşitli biyolojik etkilere sahip bir grup güçlü maddenin, bir yağ asidi gibi basit bir öncüden türetilebileceği fikri, hücre sinyallemede lipidlerin rolü hakkındaki düşünceyi temelden değiştirdi. Prostaglandin alanının önemi günümüzde çok sayıda araştırmacının çalışmalarına bir anıt olarak dursa da, çığır açan keşiflerin çoğu Stockholm'deki bir grup bilim insanı arasında büyük ölçüde fizikokimyasal ve biyokimyasal uzmanlığa dayanan entelektüel çapraz dölleme ile ortaya çıktı. Bu bölüm esas olarak o döneme ve bu etkileşimlerin prostaglandin sisteminin keşfedilmesine ve bunun hastalık ve anti-inflamatuar ilaç etkisiyle yakın bağlantısına nasıl yol açtığına odaklanmaktadır.

## LİPİTLER: SADECE YAĞLAR MI?

Bununla birlikte, lipid araçlarının biyosentezi ve eylemine ilişkin ortaya çıkan anlayışımızın öyküsü, geçen yüzyılın ilk yıllarına dayanıyordu. O zamanlar, lipidlerin beslenme dışı işlevlerine çok az önem veriliyordu. Genellikle organik çözücülerle hayvan ve bitki dokularından ekstrakte edilebilen "yağlı" maddelerin heterolog bir koleksiyonu olarak görülüyorlardı. Lipidlerin hücrelerin önemli yapısal bileşenleri olduğu kabul edildi: Diyetteki "yağ" uygun bir enerji kaynağıydı ve yağ dokusunda nötr lipidler yararlı bir metabolik depoyu temsil ediyordu. Çok az kişi lipidlerin (olası asetilkolin hariç) hücre içi sinyal faktörleri veya yerel hormonal düzenleme için aday olduğuna inanıyordu. 1930'larda işler değişti. George Burr ve Mildred Burr tarafından 'temel' yağ asitlerinin ufuk açıcı keşfi ve diyetteki öneminin fark edilmesi, tanımlayıcı bir olaydı. George Hevesey'in (ve bir radyoaktif izotopun tıbbi araştırmalarda ilk kullanımlarından biri), hücre zarlarındaki fosforun metabolik olarak çok kararsız olduğu yönündeki tamamen beklenmedik gözlemi bir diğerydi (Rex Dawson ve arkadaşları tarafından tartışıldı). Ancak bu bölüm için daha önemli olan, semenin biyolojik özelliklerine ilişkin 1930'lardan kalma bazı tuhaf gözlemlerdi.

**1982'de John Vane, Bengt Samuelsson ve Sune Bergström, "prostaglandinler" ve ilgili biyolojik olarak aktif maddelerle ilgili keşiflerinden dolayı Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü aldılar.**



Seminal plazmanın güçlü farmakolojik özellikleri birkaç grup tarafından fark edilmiştir. Columbia Üniversitesi'nde Raphael Kurzrok ve Charles Lieb, uterus düz kası üzerinde uyarıcı bir etki bildirmişlerdi; Londra'da Martin Goldblatt, sadece insan seminal plazmasının kendisinin değil, aynı zamanda alkol veya aseton ekstralarının de hipotansif etkilerini tanımladı. 1935'te 'bulanık, alkali' sıvının anestezi uygulanmış kedilerde veya tavşanlarda hipotansif etkileri belirgin hale getirdiğini ve izole edilmiş ince bağırsak ve kobay izole seminal vezikülünü uyardığını bildirdi. Stockholm'den genç bir tıp mezunu olan Ulf von Euler, 1930'larda Londra'da Henry Dale ve John Gaddum ile çalışırken, bağırsak özlerinde daha sonra 'P maddesi' olarak adlandırdığı gizemli bir kasılma maddesi keşfetti. İsveç'e döndükten sonra farklı organlarda biyolojik olarak aktif diğer faktörleri aramaya devam etti. Euler, bazıları çeşitli hayvanlardan elde edilen aksesuar genital organlardan da dâhil olmak üzere çok çeşitli doku özütlerini test ettikten sonra, insan seminal sıvısını tavşanın kan basıncı üzerinde test ederek dramatik bir hipotansif etkiye

dikkat çekti. İnsan semendeki varlığına ek olarak, bu vazodepresör aktivitesi aynı zamanda insan, köpek ve tavşan prostat dokusunun özütlerinde ve ayrıca (cinsel olarak olgun) boğaların veziküler bezlerinde de tespit edilebildi. Biyolojik aktivite, o sırada bilinen herhangi bir bileşik tarafından açıklanamıyordu ve Euler başlangıçta bunun P maddesinin varlığından kaynaklandığına ikna olmuştu. Özütler bunun yerine, tavşan veya kobayların gastrointestinal ve uterin düz kaslarını kasıp, ayrıca bir vazodepresör ajanı olan düşük moleküler ağırlıklı lipide çözünen bir asit olarak davrandılar. Histamin, adenosin, kallikrein, P maddesi ve asetilkolin gibi bilinen diğer baskılayıcı maddeler dışlandı ve Euler tamamen yeni bir maddeyle uğraştığı sonucuna vardı. Prostat ekstralarında bol miktarda bulunduğu için ona "prostaglandin" adını verdi. Euler ayrıca maymunların veziküler bezinden (*Macacus rhesus*) benzer bir baskılayıcı madde çıkardı; bu, prostaglandin'e benzer şekilde, 'Euler vesiglandin' olarak adlandırıldı. İkinci Dünya Savaşı salgını prostaglandin alanındaki araştırmaları durdurdu ve savaştan sonra yeniden

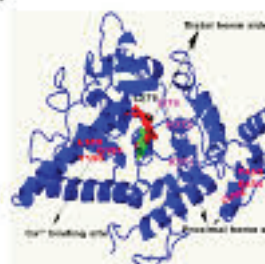
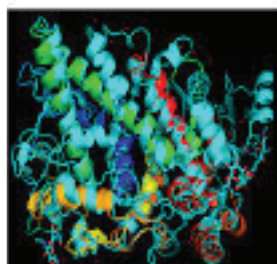
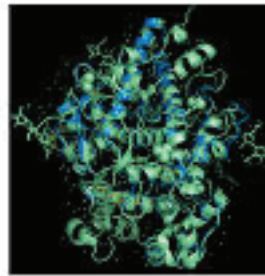
başladı, bu çalışmayı sürdüren bir İsveçli, Sune Bergström'dü. Bu arada, Euler'in kendisi de oldukça farklı bir alanda ayırım yapma yoluna gitti; 1970'te Julius Axelrod ve Bernard Katz ile katekolamin metabolizması üzerine çalışmaları için Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'nü paylaştı. Ancak Euler'in keşfiyle ilgili ilginç bir yazı vardı. Zarif deneysel çalışması hiçbir zaman sorgulanmamış olsa da, "prostaglandin" adının yanlış bir isim olduğu ortaya çıktı. Aslında, prostaglandinlerin (erkek üreme sisteminde) esas olarak türetildiği prostat değil, seminal veziküldür. Bu karışıklığın nedeni, şüphesiz, araştırdığı farklı türlerin karşılaştırmalı üreme anatomisinin açıklamalarındaki farklılıklardır. Bununla birlikte, adı doğru olsun ya da olmasın, 'prostaglandin' veziküler bezler tarafından üretilen farmakolojik olarak aktif lipidlere verilen terimdir ve o zamandan beri geçerliliğini korumaktadır. Vesiglandin ile çok az daha fazla çalışma yapıldı ve savaş sonrası biyomedikal topluluğunun ilgisine hâkim olan prostaglandinlerdi.

## BERGSTRÖM'ÜN PROSTAGLANDİN SAFLAŞTIRMASI ÜZERİNE ÇALIŞMASI

Çoklu doymamış yağ asitleri, özellikle "temel yağ asitleri" oksidasyona eğilimlidir. Bu, atmosferik oksijen varlığında kendiliğinden veya lipoksijenazlar tarafından katalize edilen bir reaksiyon yoluyla meydana gelir. Bergström, kolesterolün oto-oksidasyonunu araştırarak çalışmalarına başlamıştı. Bu tepkiler daha sonra büyük önem kazanacağı için mutlu bir konu seçiyordu. Tesadüfen, 1940'ta bu çalışmalara başladığı laboratuvar, birkaç yıl önce Kurzrok ve Lieb'in seminal sıvının biyolojik aktivitesi üzerine bu deneyleri gerçekleştirdiği Columbia Üniversitesi'ndeydi. Bergström, Columbia Üniversitesi ziyareti sırasında Kurzrok ile tanışmış olmasına rağmen, prostaglandinlerle ilgili bu çalışmadan haberdar değildi ve aslında 1947'de İsveç'e dönene kadar bu alana dâhil olmadı. Stockholm'deki Fizyoloji Derneği toplantısında, Bergström, linoleik asidin lipoksijenaz katalizli oksidasyonu hakkındaki diğer verilerle birlikte Columbia'da başlattığı otoksidasyon çalışması üzerine bir makale sundu. Başka bir tesadüf eseri, Euler de toplantıda hazır bulundu ve Bergström'ü savaş yıllarından beri derin dondurucuda saklanan 'prostaglandin' örneklerine yeni bir göz atmaya teşvik etti. Bergström, Amerika gezisinden bir tanesini geri getirmişti. O zaman mevcut olan en yeni analitik araçlardan biri olan Craig Karşı Akım Dağıtım

makinesi - ve büyük ölçüde bu ekipmanı kullanarak, iki yıl sonra, koyun veziküler bezlerinin ekstraktlarındaki biyolojik olarak aktif prensibin saflaştırıldığını duyurabildi. Yaklaşık 500.000 kez ve 280 nm'de bir UV emilimi olan nitrojen içermeyen doymamış bir hidroksil yağ asidi ile ilişkilendirildi. Lund Üniversitesi'nde yeni bir atama ve bununla bağlantılı yeni bir akademik bölüm yönetme sorumluluğu, Bergström'ün prostaglandinler üzerindeki çalışmasını birkaç yıl boyunca kesintiye uğrattı. Ancak bu süre zarfında ekibi lipid analizi ve bunu yapmak için geliştirdikleri teknikler konusunda önemli bir uzmanlık geliştirdi. Özellikle ters fazlı kromatografi, 1950'lerin ortalarında prostaglandinlere olan ilgisini sürdürdüğünde paha biçilemez bir değere sahip olduğu kanıtlandı. Bunu yaptığında, Bergström kısa sürede daha fazla çalışmanın önündeki en büyük engelin hazırladığı küçük miktarlarda malzeme olduğunu fark etti. Hazırlıklarını artırmak için, daha sonraki çalışmalarında kullanılmak üzere dünyanın dört bir yanındaki mezbahalardan çok sayıda koyun veziküler bezlerinin toplanmasını organize etti. Bu, büyük kazançlar ödedi ve 1957'de Bergström ve ortağı Jan Sjövall, kristal formda bir prostaglandin faktörünü (onlar tarafından 'prostaglandin F' olarak adlandırılır) izole etti, daha sonra bunun 5 ng/ml konsantrasyonda tavşan izole onikiparmak bağırsağında bir

kasılma ürettiğine dikkat çekti. Ayrıca ham özütlerde bulunan tek aktif asidik faktör değildi. Bu önemli bulgular, Bergström'ün Sjövall ile birlikte Stockholm'deki Karolinska Enstitüsüne taşınmasıyla büyük ölçüde genişledi. 1960'da yayınlanan iki makalede, iki araştırmacı, biri prostaglandin E (etere bölündüğü için) ve diğeri prostaglandin F (fosfat tamponuna bölündüğü için) hakkında yazdı. Yine, karşı akım sistemi prostaglandin F'yi hazırlamak için kullanılırken, prostaglandin E, ters fazlı kromatografi kullanılarak saflaştırıldı. Elemental analiz, ultraviyole ve kızılötesi spektroskopisi ile birlikte, en önemlisi, muhtemelen dünyanın ilk işlevsel gaz kromatografi-kütle spektrometresinden (GC-MS) elde edilen veriler, PGF için  $C_{20}H_{34}O_5$  ve lipidde daha fazla çözünür PGE için  $C_{20}H_{36}O_5$ 'in ampirik formülünü önerdi. Prostaglandin E, Karolinska grubu tarafından koç spermasında da tespit edildi. Bu önemliydi çünkü seminal plazmadaki biyolojik aktivitenin orijinal gözlemini bir prostaglandin varlığına bağladı. O zamana kadar elde edilebilen büyük miktarlarda saf kristal materyal, prostaglandinlerin çeşitli kimyasal işlemlerle bozunduğu sonraki analizi ve yeni GC-MS tarafından sağlanan bilgilerden çıkarılan nihai fragmanların yapılarını büyük ölçüde kolaylaştırdı. Bu yapılar kimyasal sentezle doğrulanmıştır.



## BERGSTRÖM VE SAMUELSSON'UN PROSTAGLANDİN BİYOSENTEZİ ÜZERİNE ÇALIŞMASI

İlk prostaglandin yapılarının aydınlatılmasıyla, birçok bilim insanının ilgisi daha sonra biyosentez sorusuna yöneldi. Rune Eliasson, veziküler bez homojenatlarından geri kazanılan prostaglandinlerin sayısının, 37° C'de bir saat veya daha fazla süreyle bir su banyosunda inkübe edilmeleri durumunda önemli ölçüde arttığını (yaklaşık 20 kat) bildirmişti. Bu gözlem, diğerleri ile birleştiğinde (reaksiyon için belirli bir pH optimumunun olduğu gerçeği gibi), bazı enzimatik işlemlerin iş başında olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koydu. Karolinska grubu, prostaglandin E ve F'nin yapılarını, özellikle cis çift bağlarının düzeninde 20 karbonlu 'temel' yağ asidine benzerlik gösterdiğini fark etti. Aslında benzerlik, Karolinska grubunu bu yağ asitlerinin prostaglandinlerin üretildiği öncüler olabileceğine ikna etmeye yetecek kadar ikna ediciydi. Bu fikir nasıl test edilebilir? İlginç bir şekilde, Eliasson bu

yağ asitlerinden birini, araşidonik asidi kıyılmış veziküler bezlerine eklemenin etkisini test etmişti, ancak prostaglandin oluşumunda ek bir artış gözlemlememişti. Şimdi, muhtemelen, preparatta zaten mevcut olan araşidonik asit miktarı zaten maksimum seviyede idi, ancak açıklama ne olursa olsun, Karolinska grubu, hipotez olsaydı, etiketli prostaglandinlerin homojenatlarda görüneceği beklentisiyle radyoaktif araşidonik asit kullanmayı tekrar denemeye karar verdi. Etiketli araşidonik asidin ticari bir kaynağı yoktu ve tercih edilen sentetik yol, trityum gazı ile bir asetilenik araşidonik asit türevinin (5,6,11,14 eikosatetraynoik asit) katalitik olarak indirgenmesini gerektirdi. Ancak şu anda Bengt Samuelsson ve Henry Danielsson'dan ve Bergström'den oluşan Karolinska grubunun bu reaktifte erişimi olmadığı için Hollanda'daki Unilever Araştırma Laboratuvarlarından David van Dorp ile temasa geçtiler. Van Dorp'un

grubu temel yağ asitlerine uzun süredir ilgi duyuyordu ve Bergström bilmediği gibi aynı fikri çoktan değerlendirmişti. Bergström, bu iki grubun nominal olarak "rekabet" halinde olmasına rağmen, kendi prostaglandin biyosentezi çalışması için hazırladığı etiketli yağ asitlerinden bir numune sağlamayı cömertçe kabul eden van Dorp'u aradı. Önemli deney daha sonra her iki grup tarafından gerçekleştirildi ve eşzamanlı olarak Biochim'de ardışık makalelerde yayınlandı. Hem Hollandalı hem de İsveçli gruplar, radyoaktif araşidonik asidin gerçekten etiketli prostaglandin E2'ye dönüştürüldüğünü bildirdi. Her durumda, dönüşümden sorumlu enzim (ler), bozulmuş veziküler bez dokusunun "mikrozomal" (100,000 x g) fraksiyonu ile ilişkilendirildi. Bu enzim sistemi ilk başta "prostaglandin sentetaz" olarak adlandırılıyordu, ancak bugün genel olarak yağ asidi siklo-oksijenaz (genellikle Cox olarak kısaltılır) olarak biliniyor.

## BİYOSENTETİK REAKSİYONDA OKSİJENİN ROLÜ ÜZERİNE SAMUELSSON'UN ÇALIŞMASI

Araşidonik asit ve prostaglandinlerin yapıları karşılaştırıldığı zaman, C-9, C-11 ve C-15. 11'deki yağlı asit substratına üç oksijen atomunun sokulduğu açıktı. Peki, bu oksijen, çözünmüş gaz halindeki moleküler oksijenden mi, sudan mı yoksa bu kaynakların her ikisinden mi kaynaklandı? Cevap, GC-MS'nin yine çok önemli olduğunu kanıtladığı bir dizi ustaca deneyle sağlandı. Prostaglandinler, C-11 ve C-15 içeren bir 'ağır' oksijen (18O2) atmosferi altında dihomom- -Linolenik asit ile inkübe edilen veziküler bezlerin preparatlarından çıkarıldığında, 16O2 altında üretilen doğal prostaglandinlerden dört kütle birimi daha ağırdı. İlk başta, C-9'daki oksijenin moleküler oksijenden mi yoksa sudan mı kaynaklandığı net

değildi, ancak Samuelsson, sadece C-9'daki ketonik oksijenin moleküler oksijenden kaynaklandığını değil, aynı zamanda C-9'daki halka oksijen atomlarının da ortaya çıktığını gösterebildi ve C-11 aynı oksijen gaz molekülünden türetildi. Tamamen yeni bir tip dioksijenaz reaksiyonuydu ve Samuelsson'un prostaglandin biyosentezinde varsayımsal bir ara ürünün varlığını varsaymasına yol açtığı için önemli mekanik etkileri vardı. Daha sonra prostaglandin biyokimyasını anlamamız için çok önemli olan bir kavramdı. Prostaglandin molekülünün halkasını oluşturan bu yeni dioksijenaz reaksiyonuna ek olarak, başka bir enzim olan bitki lipoksijenazını son derece anımsatan bir şekilde C-15'e bir oksijen atomu sokan

bir mono-oksijenaz reaksiyonu da vardı. Koyun veziküler bezi homojenatları her zaman bir enzim kaynağı olarak kullanıldı. Bu inkübasyon karışımlarında saptanan ilginç bir yeni ürün, başka bir tür olan prostaglandin D2 idi. Prostaglandin E ve F'nin önerilen oluşum mekanizması, yani indirgemeli veya redüksiyonsuz varsayımsal bir endoperoksit benzeri ara ürünün oksijen-oksijen bağının bölünmesi göz önüne alındığında, bu ürünün varlığının tamamen makul olduğu açıktı. Daha sonra, birkaç başka dokunun da, daha sonra önemli hale gelecek olan kobay akciğeri dâhil olmak üzere, etiketli araşidonik ve diğer substrat asitlerinden prostaglandin ürettiği bulundu.



## VANE'İN PROSTAGLANDİNLERLE ÇALIŞMASI

Londra'da, "biyoanaliz kaskadı" onun imza tekniklerinden biriydi ve yaygın hala kullanımdadır. Burada ilgili deneylerde, gine domuzu izole edilmiş bir kalp-akciğer preparatı, gerekirse akciğerin ritmik olarak şişirilebileceği bir kanül ile trakeada askıya alındı. Fizyolojik Krebs'in solüsyonu, sağ kalpte bir kesikten pulmoner artere yerleştirilen bir kateterden pompalandı. Sol kalp genellikle, bir hunide toplanan ve biyo-tahlil dokuları üzerinde bir kaskada yönlendirilen (veya üzerine pompalanan) perfüzyon çözeltisinin serbest drenajına izin vermek için kesildi. Vane, araşidonik asidin böyle bir preparata (pulmoner arter kateteri yoluyla) infüze edildiğinde prostaglandinlere dönüştüğünü gözlemlemişti, bu da sırasıyla sıçan fundik şeridi veya kolon gibi, prostaglandinlere duyarlı oldukları görülmüştü. Önemli bir şekilde, perfüzatta prostaglandin miktarının artmasına neden olan sadece yağ asidi substratlarının enjeksiyonu değildi. 'SRS-A' bu preparattan prostaglandinleri serbest bıraktı. Bu uyarımlarla salınan prostaglandin miktarları, genellikle akciğerde bulunan toplam prostaglandin kütesinden fazladır; son rakam, doku soğuk alkolde homojenleştirildikten sonra ekstrakte edilen prostaglandin konsantrasyonunun tahmin edilmesiyle elde edilir. Prostaglandin salımı doğrudan araşidonik asit infüze edilerek başlatılabilir, prostaglandin oluşumu için hız sınırlayıcı adımın substratın mevcudiyeti olduğunu gösterir. Görünüşe göre içerdiği dokudan daha fazla prostaglandin salabileceği, prostaglandinlerin doku içinde depolanmadığını, ancak sentezlendiğini ve "gerektiği gibi" salındığını göstermek için alındı. Başka bir deyişle, biyosentez, serbest bırakılmadan hemen önce geldi. Son olarak, diğer maddelerin prostaglandinleri substrat olmadan serbest bırakabileceği gözlemi, hücre içinde araşidonik asidi prostaglandinlere dönüştürülecek ve serbest bırakılabilecek şekilde serbest bıraktıklarını gösterdi.



**Çok kararsız olmasına rağmen, bir numunedeki RCS aktivitesi azaldığından prostaglandin içeriğinin arttığı görüldü. John Vane ve Ryszard Gryglewski, prostaglandin biyosentezi sürecinin ara ürün olarak RCS'yi içerdiğini ve RCS'nin oluştuğunda kendiliğinden prostaglandinlere bozunduğunu iddia etti.**

## 'RCS'NİN KEŞFİ

Prostaglandinleri perfüze edilmiş akciğer preparatından salmanın bir başka yolu da anafilaktik şoku indüklemektir. Ovalbümüne aşılansmış bir kobaydan bir akciğer preparatı alındı ve antijenin pulmoner arteriyel kateter içine enjekte edilmesiyle anafilaksi indüklendi. Bu prosedür, histamin, prostaglandinler ve gizemli SRS-A dahil olmak üzere birçok kimyasal aracı salıverdi. Vane ve meslektaş Priscilla Piper bu fenomeni araştırırken önemli bir keşif yaptılar. Söz konusu deney, yalnızca anafilaksi sırasında üretilen histamin ve SRS-A gibi maddelerin salınımını değil, aynı zamanda araştırmacıların o sırada salgılabileceğini düşündükleri bradikinin, prostaglandinleri ve 5-HT'yi görmek istiyorlardı. Bunu yapmak için, kobay trakea şeritleri (SRS-A'yı tespit etmek için), kedi terminali ileum (histamin), tavşan aortunun spiral olarak kesilmiş şeritleri, sıçan mide şeridi (prostaglandinler ve 5-HT) dahil olmak üzere bir dizi biyoanaliz dokusu dikkatle seçilmiştir. Birkaç dokuyu daraltan antijen salgılayan maddelerin enjeksiyonu, ancak izlemelerin analizi, bradikinin veya 5-HT salınmadığını, ancak histamin, SRS-A ve prostaglandinlerin mevcut olduğunu gösterdi. 5HT'yi saptamak için kullanılan tavşan aortunun spiral olarak kesilmiş şeritleriyle bağlantılı olarak ilginç bir gözlem yapıldı. Normal olarak, östrustaki dişi tavşanlardan şeritler kullanıldı ve bunlar, anafilaksi sırasında büzülmedi, bu da hiçbir 5HT

salımının meydana gelmediğini gösterdi. Ancak bunun yerine erkek tavşanlardan aort şeritleri kullanıldığında, antijen yüklemesini takiben güçlü bir kasılma gözlemlendi. Bunun 5-HT olmadığı, sadece oldukça hassas dişi aortların kasılmadığı için değil, aynı zamanda bir 5-HT antagonisti olan metiserjidin kasılmaları tersine çeviremediği için de açıktı. Aslında, sonraki deneyler, erkek aortların daralmasını, bu tür deneyde karşılaşılan konsantrasyonlarda bilinen herhangi bir aracı tarafından açıklamayacağını açıkça gösterdi. Açıkça yeni bir madde tanımlanmıştı ve hemen "RCS" olarak adlandırıldı, bu da Tavşan Aortu Sözleşen Maddenin kısaltması ve ayrıca Kraliyet Cerrahlar Koleji'nin kısaltmasıydı. RCS'nin oldukça şaşırtıcı birkaç özelliği kısa süre sonra gün ışığına çıktı. Birincisi, oldukça dengesizdi. Daha sonraki tahminler, yarı ömrünü bir ila iki dakika olduğunu ortaya koydu. İkinci olarak, anafilaktik tehdit, RCS'nin serbest bırakılabileceği tek yöntem değildi. Bradikinin, kısmen saflaştırılmış SRS-A ve daha az ölçüde histamin enjeksiyonları da RCS'yi serbest bıraktı. Bununla birlikte, hepsinin en önemli bulgusu, aspirin dâhil olmak üzere birkaç anti-enflamatuar ilacın, akciğer antijen tarafından tehdit edildiğinde veya bradikinin ile uyarıldığında RCS'nin salınmasını engellediğiydi. Bir süredir aspirinin kobaylarda bradikinin kaynaklı bronkokonstriksiyonu önleyebileceği

biliniyordu ve aslında bu bağlamda bu deneysel modelde test ediliyordu. Piper ve Vane, RCS'nin inhibisyonunun aspirinin eyleminde önemli olabileceğini tahmin etti. RCS'nin kesin kimliği, gelecek birkaç yıl boyunca araştırmacılardan kaçmaktı, ancak bu arada bazı biyolojik deneylerden hayati bir ipucu geldi. Araşidonik asit de dâhil olmak üzere prostaglandinleri serbest bırakan tüm uyarıların her zaman RCS salgıladığı ortaya çıktığında prostaglandin sistemiyle güçlü bir bağlantı kuruldu. RCS'yi serbest bırakabilen tek organ perfüze akciğer de değildi. Parçalanmış dalak parçaları, ajite edildiğinde maddeleri serbest bıraktı ve en ilginç, biyoanaliz dokularını süperfüze eden sıvıda araşidonik asit ile inkübe edildiğinde siklooksijenaz enzimini içeren ham bir mikrozomal preparat da önemli miktarda RCS üretti. Bu deneyde de önemli bir gözlem daha yapıldı: çok kararsız olmasına rağmen, bir numunedeki RCS aktivitesi azaldığından prostaglandin içeriğinin arttığı görüldü. John Vane ve Ryszard Gryglewski, prostaglandin biyosentezi sürecinin ara ürün olarak RCS'yi içerdiğini ve RCS'nin oluştuğunda kendiliğinden prostaglandinlere bozunduğunu iddia etti. Bunun anlamı, RCS'nin muhtemelen Karolinska ve Unilever grupları tarafından öne sürülen prostaglandin biyosentezinde "endoperoksit" ara ürünü olduğuydu.

## ASPIRİN ENİGMASI

1890'larda sentezlenen Aspirin terapötik bir muammaydı. 20. yüzyılın ilk yıllarında, başlıca eylemlerinin ateş düşürücü, iltihap önleyici ve analjezik etkileri olduğu biliniyordu. Zaman geçtikçe benzer bir farmakolojiye sahip başka ilaçlar keşfedildi: antipirin, parasetamol, fenilbutazon, indometasin ve naproksen. Bu ilaçlar, yalnızca aspirinin terapötik etkilerini değil aynı zamanda mide tahrişi gibi istenmeyen etkilerini de paylaştıkları için topluca "aspirin benzeri" ilaçlar olarak biliniyordu. Ancak yaygın klinik kullanıma rağmen, bu ilaçların gerçek etki mekanizması hakkında çok az şey biliniyordu. Steroidler gibi diğer anti-enflamatuar ilaçlardan niteliksel ve niteliksel olarak farklı bir antiinflamatuar etki ürettiler. Analjezik eylemleri de opioidler tarafından üretilenlerden farklı bir doğaya sahipti. Bu ilaçların biyokimyasal etkileri belgelendi ve bu etkilere dayanan teoriler bol miktarda vardı. Örneğin, aspirin benzeri ilaçların

çoğunun oksidatif fosforilasyonu ayırdığı, birkaç salisilatın dehidrojenaz enzimlerini, özellikle de piridin nükleotidlerine bağımlı olanları inhibe ettiği gözlemlendi. Bazı amino-transferazlar ve dekarboksilazlar da inhibe edildi ve bu nedenle protein ve RNA biyosentezinde rol oynayan birkaç anahtar enzim vardı. Tüm bu inhibe edici eylemler, aspirinin terapötik etkisini açıklamak için bir zamanlar çağırıldı. Bu fikirlerin çoğuyla ilgili bir sorun, enzim inhibisyonu için gerekli ilaç konsantrasyonunun (bazen büyük ölçüde) tedaviden sonra plazmada tipik olarak bulunan konsantrasyonlardan fazla olması ve bu ilaçların yetenekleri arasında her zaman bir korelasyon eksikliği olmasıydı. Dahası, bu enzimlerden herhangi birinin engellenmesinin, aspirinin üçlü anti-enflamatuar, analjezik ve antipiretik etkisini - karakteristik istenmeyen etkileri bir yana, neden üretmesi gerektiğine dair ikna edici bir neden yoktu. İngiliz farmakolog Harry Collier de dahil olmak üzere birçok farmakolog bu problemle ilgileniyordu. Collier, ağrı, ateş ve iltihaplanma gibi fizyolojik savunma mekanizmalarının normal şekilde işlev görmesini önleyebilmesi nedeniyle aspirini 'anti-savunma' bir ilaç olarak adlandırmıştı. Grubuyla birlikte,

aspirin almış olan kobayların bradikinin, ATP veya SRS-A enjeksiyonu ile bu hayvanlarda normal olarak ortaya çıkan bronkokonstriksiyondan korunduğuna dair önemli bulguyu yaptı. Aspirin ayrıca, SRS-A ve bradikininin neden olduğu kobay izole trakeo-bronşiyal kasın kasılmasını ve ayrıca farelerde ATP'ye karşı nosiseptif tepkiyi de önledi. Başlangıçta Collier, "A-reseptörlerinin" (aspirin benzeri ilaçlar tarafından bloke edilebilen) bu ajanlara spazmojenik yanıtta rol oynadığını öne sürdü, ancak daha sonra bu ilaçların altta yatan bazı hücrel mekanizmaları engellediğine inanarak bu kavramı terk etti. Vane tüm dikkatini prostaglandin salınımı sorununa tamamina odakladı. Bir inceleme yazısı yazarken, prostaglandinlerin 'salınması' aslında taze sentezle eşitlendiğinden, prostaglandinleri serbest bırakan uyarıların aslında bu bileşiklerin sentezini 'açtığı' fark etti. Vane'in vardığı sonuç, aspirinin prostaglandin sentezini engelliyor olabileceğiydi. Birleşik Krallık'ta koyun seminal veziküllerini (şimdiye kadar geleneksel Cox enzimi kaynağı) elde etmek zor olduğundan, Vane, biyoanaliz ile prostaglandin F2a oluşumunu tahmin eden kobay akciğer homojenat preparatına başvurdu. Aspirin, indometasin ve

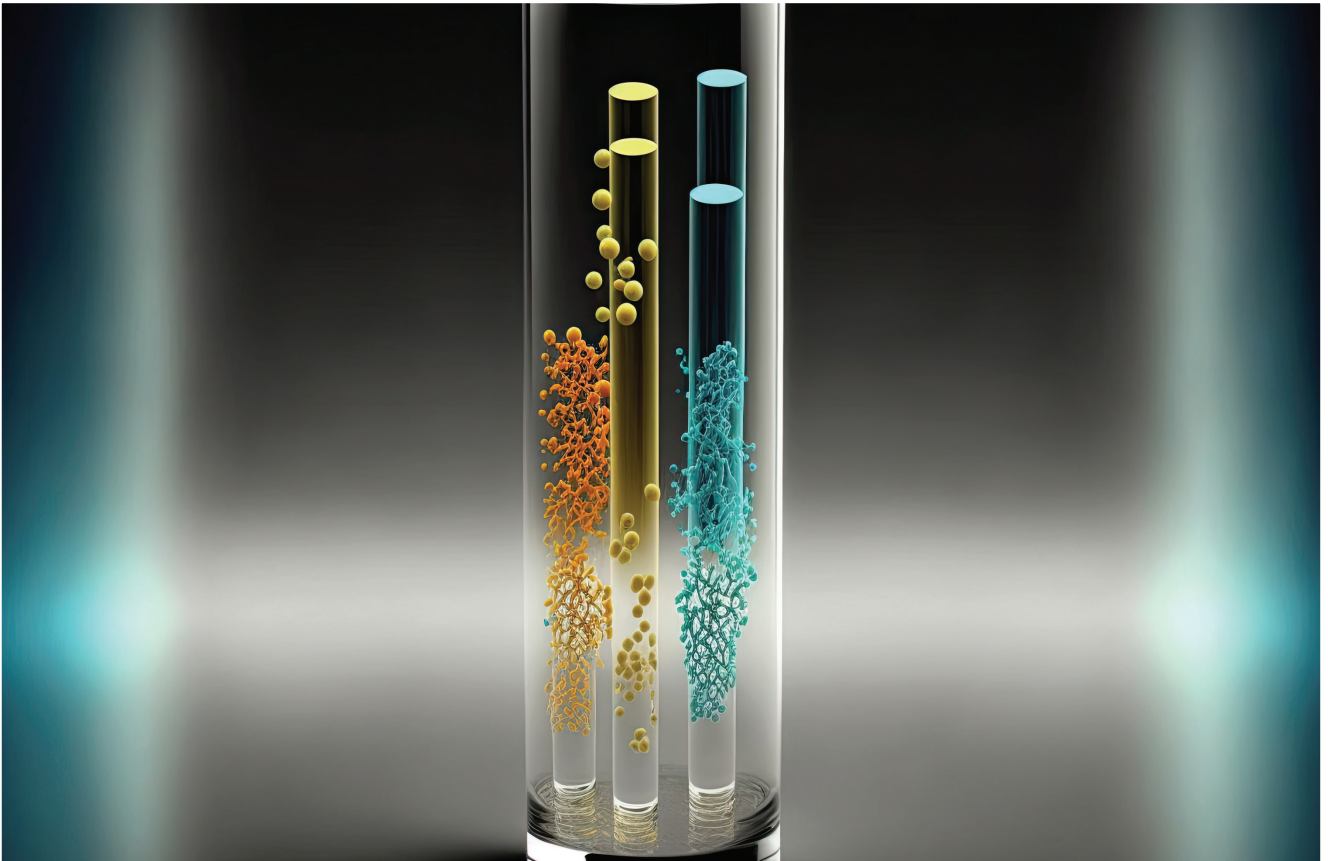




sodyum salisilat tarafından prostaglandin oluşumunun konsantrasyona bağlı inhibisyonu varken, morfin, hidrokortizon ve mepiramin gibi diğer birkaç alakasız ilaç etkisizdi. Vane, bu deneylerin sonuçlarını 1971'de Nature'da yayınladı. O yıl RCS grubundan diğer üç makale bu bulguyu destekledi ve onu önemli ölçüde genişletti. Tesadüfen bunlardan biri tamamen bağımsız bir soruşturma hattından kaynaklanıyordu. Aspirinin, kolajen veya ADP gibi uyarılara yanıt olarak trombositlerin toplanmasını inhibe ettiği ve ayrıca prostaglandin F2a olduğu varsayılan düz kas kasılma maddesinin salınımını önlediği birkaç yıldır biliniyordu. Jim Smith ve Bryan Willis tarafından araştırılan hipotez, bunun dolaylı olarak fosfolipaz A1'in trombositlerden salınmasıyla ortaya çıktığı ve bu enzimin aspirinin inhibitör etkisinin hedefi olduğuydu. Bir kez daha deneysel protokol basitti: venöz kan örnekler 600 mg aspirin oral yoldan alınmadan önce ve 1 saat sonra alındı. Trombositler izole edildi, yıkandı, güçlü topaklaştırıcı madde trombin ile

inkübe edildi ve süpernatant, salgılanan nükleotidler, fosfolipaz ve çeşitli diğer enzimlerin yanı sıra prostaglandinlerin varlığı açısından test edildi. Yalnızca prostaglandinler büyük ölçüde inhibe edildi. Başka bir insan çalışmasında, Joe Collier ve Rod Flower, aspirinin insan seminal plazmasındaki prostaglandinler üzerindeki etkisini değerlendirdi (bu, büyük miktarlarda prostaglandin içerir, bu nedenle tahlil edilmesi kolaydır). Gönüllülere üç gün boyunca aspirin veya plasebo verildi ve seminal sıvı örnekleri alındı, ekstrakte edildi ve prostaglandin E ve F içeriği bioassay ile değerlendirildi. Bir kez daha, sonuçlar, bu ilaçla dozlamadan sonra elde edilen her iki prostaglandin için önemli bir inhibisyon ile kesin olmuştur. Bir başka doğrulayıcı çalışmada, Vane, Sergio Ferreira ve Salvador Moncada ile birlikte, aspirin benzeri ilaçların, in vitro perfüze izole edilmiş köpek dalağında elektrik stimülasyonu veya katekolamin enjeksiyonu ile ortaya çıkan prostaglandin salınımını engellediğini gösterdi. Aspirin etkisinin doku, tür veya

uygulama yolu ile sınırlı olmadığı görüldü. Elbette tüm bu bulguların önemi, aspirin benzeri ilaçların terapötik etkilerini nasıl uyguladıklarına dair önemli bir ipucu sağlamasıydı. O zamanlar prostaglandin E1'in güçlü bir piretik ajan olduğunu ve F veya E prostaglandinlerin intradermal olarak enjekte edildiğinde enflamatuar yanıtı taklit ettiğini gösteren kanıtlar zaten birikiyordu. Prostaglandinler ayrıca enflamatuar eksüdalarda da tespit edilmiştir. Elbette şimdiye kadar sadece üç aspirin benzeri ilaç test edilmişti, ancak Vane'nin grubu tüm aspirin benzeri ilaçların tedavi sırasında bulunan plazma seviyeleri içindeki konsantrasyonlarda prostaglandin oluşumunu engellediğini gösteren daha fazla veri yayınladığında bu durum kısa süre sonra değişti. Başka bir çıkarım daha vardı, biyologlar artık prostaglandin sentezini ve salınımını önlemek ve böylece prostaglandinlerin biyolojik sistemlerdeki işlevlerini değerlendirmek için basit bir araca sahipti.



## PROSTAGLANDİN BİYOSENTEZİNDE ARA ÜRÜNÜN SAPTANMASI, İZOLASYONU VE RCS KARAKTERİZASYONU

Çoğu araştırmacı hala prostaglandin ailesinin esas olarak E ve F tipi bileşikleri içerdiğini düşünüyordu, ancak bu durum 1973'te Karolinska ve Unilever grupları oluşan iki ara maddeyi izole etmeyi başardığında değişti. Bu sadece prostaglandin ailesine iki bileşik daha eklemek ve biyosentetik mekanizma ile ilgili birkaç önemli soruyu açıklığa kavuşturmakla kalmadı, aynı zamanda doğrudan RCS yapısının aydınlatılmasına ve ilave prostaglandinlerin ve ilgili bileşiklerin keşfine yol açtı. Prostaglandin biyosenteziyle ilgili daha fazla çalışma, Samuelsson'ın bir endoperoksit ara maddesinin gerçekten var olduğuna dair inancını güçlendirdi ve Piper ve Vane'in 'RCS' deneyleri, değişken prostaglandinle ilgili madde için de ikinci dereceden kanıtlar sağladı. Mats Hamburg ve Samuelsson, koyun veziküler bezi homojenatları tarafından substrat araşidonik asidin oksijenlenme hızı ile prostaglandin E2'nin ortaya çıkışı arasında bir tutarsızlık gözlemlemişler, bu da bir ara maddenin geçici olarak biriktiğini kuvvetle düşündürmektedir. Vane'in RCS'si bu ara ürün olsaydı, açıkça bağımsız olarak var olabilirdi, aksi takdirde süperfüzyon biyoanaliz teknikleri kullanılarak tespit edilemezdi. Öyleyse bu ara ürün veziküler bez homojenatlarından çıkarılabilir mi? Bu gerçekten de geçerliydi ve şimdiye kadar tespit edilmemiş bir ürün daha sonra bu tür inkübasyon karışımlarından ince tabaka kromatografisi ile izole edildi. Homojenat önce bir indirgeyici ajan ile işleme tabi tutulunca, bileşik kayboldu ve prostaglandin F miktarı arttı. Bilinmeyen bileşik ayrıca peroksitleri tespit eden bir reaktifle pozitif reaksiyon verdi. Kromatografi plakasından ekstrakte edildiğinde ve yeniden analiz edildiğinde, gizemli bileşik tamamen esas olarak

prostaglandin E2 ve prostaglandin D2 içeren bir karışıma dönüştü. Bu sonuçlar, Samuelsson'un neredeyse on yıl önce varlığını tahmin ettiği ara oksit ara maddesi için tartışılmaz kanıtlar sağladı ve ayrıca malzemenin reaksiyon karışımından bağımsız bir madde olarak izole edilebileceğini gösterdi. Prostaglandinlerin aşamalı sentezi fikri, tüm yolun tek bir uyumlu enzim reaksiyonunun ürünü olduğu fikrinin yerini aldı. Samuelsson ve meslektaşları, ara ürünün prostaglandin E bileşiklerine yeniden düzenlenmesini katalize eden bir endoperoksit izomeraz enziminin ve endoperoksiti prostaglandin F2'a dönüştüren bir endoperoksit redüktazın varlığını tahmin etmeye devam ettiler. Karolinska grubunun sonraki yayınları, bir değil iki ara madde bildiren Unilever grubunun yayınlarına yeniden yansıdı. Vane'in RCS'si olduklarına ikna oldular. Daha sonra prostaglandin isimlendirme şemasında bir miktar tutarlılık sağlamak için G2 ve H2 olarak yeniden adlandırılmalarına rağmen, başlangıçta "prostaglandinler R1 ve R2" olarak adlandırıldılar. Bununla birlikte, hayal kırıklığı yaratan bir şekilde, prostaglandin G ve H'nin preparasyonları, RCS'yi anımsatan bir şekilde tavşan aortik şeridini daraltırken, iki maddenin stabilitesi arasında bir tutarsızlık vardı. RCS, Krebs solüsyonunda yaklaşık 30 saniyelik hesaplanmış yarı ömre sahipti, ancak endoperoksitlerin yarı ömrü yaklaşık 5 dakikaydı. Bu nedenle, Vane'in biyoanaliz sonuçlarını açıklamak için başka bir ürünün varlığına başvurmak gerekiyordu. Doğası gereği kararsız olsalar da, endoperoksitler birkaç ay soğuk kuru aseton içinde tutulabilir, bu da düz kas kasılma aktiviteleri için makul tahminlerin yapılabilmesini sağlar. Ancak bu tür deneylerin yorumlanmasında bir sorun vardı. Test

sistemindeki endoperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan parçalanmasının neden olduğu ve gözlemlenen yanıtın ne oranına endoperoksitlerin neden olduğu genellikle açık değildi. Ne mutlu ki, kendisini endoperoksit sentezi ve eyleminin analizine daha kolay teslim eden başka bir sistem vardı, trombosit agregasyon yanıtı. Araşidonik asidin koyun veziküler bezi mikrozomları ile inkübasyonunun, son derece güçlü, ancak geçici bir platelet kümeleşme maddesinin hızlı bir şekilde oluşmasına yol açtığı zaten tespit edilmişti. LASS (Labile Aggregation Stimulating Substance) kısaltması göz önüne alındığında, bu materyalin üretimi aspirin tarafından engellendi ve böylece prostaglandin sistemine güçlü bir şekilde bağlandı. Willis bunun aslında endoperoksit prostaglandin H2 olduğunu öne sürdü. Karolinska grubu, trombosit süspansiyonlarına saflaştırılmış endoperoksitlerin eklenmesinin doza bağlı bir kümelenmeye neden olduğunu gözlemlemiş ve ilginç bir şekilde, bir kanama bozukluğu için tedavi gören bir hastanın bir Cox eksikliğine sahip olduğunu bulunmuştur. Bu denekten alınan trombositlerde, prostaglandin G2 her zamanki gibi agregasyon oluşturmaya rağmen, araşidonik aside yanıt vermedi. Araşidonik asidin trombosit kümeleşmesinde metabolizması, radyoaktif bir izleme tekniği kullanılarak dikkatle incelendiğinde, oldukça şaşırtıcı bir bulgu elde edildi. Aslında prostaglandin E, F veya D'ye çok az dönüşüm oldu. Bunun yerine, ana ürünler tamamen yeni iki bileşikti. GC-MS tarafından 12-hidroksi eikosatrienoik asit (12-HETE) ve "PHD" olarak adlandırılan daha karmaşık bir molekül olarak tanımlandılar. Ancak PHD'yi sentezleyen sadece trombositler değildi.



Etiketli araşidonik asit, kobay akciğer homojenatları ile inkübe edildiğinde veya perfüze edilmiş akciğer preparatlarına enjekte edildiğinde, büyük miktarlarda hem PHD hem de bir hidroksiasit 12-HETE oluştu. Artık endoperoksitlerin Vane'in RCS'si olmadığı açık olsa da, en azından PHD'nin bir şekilde dâhil olduğu düşünülebilirdi. PHD'nin oluşturulabileceği birkaç olası reaksiyon mekanizması vardı, ancak Samuelsson ve meslektaşları, endoperoksit prostaglandin G2, bir su molekülünün birleşmesiyle yapıyı açıklayabilir. Şaşırtıcı bir şekilde, bu dönüşüm, başka bir geçici ara ürünün üretilmesini gerektirecekti. Bu, bulunması zor RCS olabilir mi? Trombositlerde bu kadar kısa ömürlü bir ara maddenin varlığına dair ikna edici kanıtlar sağlayan bir deney gerçekleştirildi. Bir trombosit süspansiyonuna az miktarda araşidonik asit ilave edildi ve kısmi bir topaklaşmaya neden oldu. 30 saniye sonra, trombositlerin kendileri tarafından aracılının üretimini engellemek için indometasin ile muamele edilmiş taze trombositleri içeren ikinci bir küvete, kısmen toplanmış süspansiyondan küçük bir miktar ilave edildi. Bu ilave yapıldığında, ikinci küvetteki trombositlerin kümeleştiği gözlemlendi. Açıkça, araşidonik asitle muamele edilmiş süspansiyonda, ikinci platelet

partisinin kümeleşmesine neden olan bazı maddeler vardı. Bilinen prostaglandinlerin hiçbiri veya aslında endoperoksitler G2 veya H2, numunede bulunan konsantrasyonlarda topaklanma etkisine sahip değildi ve bu nedenle, biyolojik olarak aktif başka bir maddenin bulunması gerektiği görüldü. Ancak daha da ilginç bir şekilde, bu maddeyi içeren özütler tavşandan izole edilmiş aort şeridinde test edildiğinde, endoperoksitlerin varlığıyla açıklanamayan güçlü bir kasılma ile yanıt verdi. Kasılma maddesi, yalnızca yaklaşık 35 saniyelik bir yarı ömür ile endoperoksitlerden çok daha kararsızdı. Bu rakam, 1960'ların sonlarında Piper ve Vane tarafından tahmin edilen RCS'nin yarı ömrüne neredeyse aynıydı. RCS'nin gizemi sonunda açıklığa kavuşmuş gibiydi. Belli ki, endoperoksitlerin PHD'ye dönüşümü sırasında üretilen kararsız bir ara üründü. Sadece bir olasılık kalana kadar çeşitli varsayılan ara maddeler dikkate alınmış ve titiz analizlerle elimine edilmiştir. İlk önce trombositlerde (trombositler) karakterize edildiğinden ve bir oksan halkası içerdiğinden, buna "tromboksan" adı verildi. Oldukça kararsız ara ürün (Vane RCS) tromboksan A2 olarak adlandırılırken, şimdiye kadar PHD olarak anılan aktif olmayan parçalanma ürünü tromboksan B2 olarak yeniden adlandırıldı.



## — BU KEŞİFLERİN TIP BİLİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Önemli bir bölüm sona ererken, prostaglandin hikâyesi ve sonuçları devam etti. Bergström'ün çalışmasının bir sonucu olarak, prostaglandinlerin kendileri (veya analogları), çeşitli kullanımlar için (örneğin, gastrik salgı önleyici ve oksitosik ilaçlar olarak) klinik tıbbı dahil edildi. Samuelsson ve Karolinska grubu, araşidonik asit metabolitlerinin yepyeni bir ailesi olan lökotrienler de dâhil olmak üzere diğer eikosanoid metabolitlerinin yapılarını açıklamaya devam ettiler. Şimdiye kadarki gizemli SRS-A, sonunda bu ailenin bir üyesi olarak ortaya çıktı. Hikayemizde başka bir boş nokta daha var. SRS-A, alerjik akciğer hastalığına karıştığından, lökotrien biyosentetik yolunun aydınlatılması, bazıları klinik kullanımda olan antiastım tedavileri için yeni hedefler sağladı. Vane, o sırada önde gelen bir ilaç şirketi olan Wellcome Foundation'da Araştırma ve Geliştirme Direktörü olarak görev yapmak için Royal College of Surgeons'taki üssünden taşındı. Kısa bir süre sonra, yeni bir sentaz enzimi tarafından endoperoksitlerden Ekibini yanına aldı ve varışlarından sentezlenen başka bir prostaglandin olan prostasiklin - prostaglandin I<sub>2</sub> - keşfettiler. Prostasiklinin biyolojik aktivitesi tromboksan A<sub>2</sub>'nin neredeyse tamamen tersiydi ve antiplatelet ve vazodilatör etkilerinin hemostatik mekanizmaların önemli düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir. Pulmoner hipertansiyonun tedavisi için bir analog klinik kullanımdadır. Vane'in aspirinin etki mekanizması hakkındaki fikirleri, steroid olmayan anti-enflamatuar ilaç (NSAID) tedavilerinde bir devrime yol açtı. Tarama aracı olarak Cox inhibisyonu kullanılarak yeni ilaçlar üretildi. Cox-2'nin bir izoformu keşfedildiğinde, bu teoriye dayanan NSAID eylemi için yeni bir paradigma doğdu. Bunun sonucu, seçici Cox-2 inhibitörlerinin ortaya çıkmasıydı. Bu ilaçlar başlangıçta kullanıcılar arasında artan kardiyovasküler hastalık insidansı nedeniyle basında bazı tartışmalara neden olurken, hala 'eski' NSAID'lerden daha az gastrik yan etkiye sahip, yaygın ve güçlü anti-enflamatuarlar olarak görülüyorlar. Ayrıca artrit ve spor yaralanmaları ve ameliyat sonrası travma gibi ilgili durumlarda mükemmel analjezik ve semptomatik iyileşme sağlıyorlar.

