

Yeni bir Siklooksijenaz İzoformu: Siklooksijenaz-2

Ahmet ULUGÖL¹, Dikmen DÖKMECİ², Hakan KARADAĞ¹, İsmet DÖKMECİ³

ÖZET

Yakın zamanda, siklooksijenaz'ın iki izoformu olduğu belirlenmiştir: konstitütif siklooksijenaz (siklooksijenaz-1, SO-1) ve induklenebilir siklooksijenaz (siklooksijenaz-2, SO-2). Konstitütif siklooksijenaz hücrelerde fizyolojik koşullarda bulunur; induklenebilir siklooksijenaz ise inflamasyon gibi patolojik durumlarda bazı sitokinler, mitojenler ve endotoksin tarafından induklanır. SO-1 ve SO-2'nin aktiviteleri üzerine nonsteroid antiinflamatuar ilaçların rölatif inhibitör etkinlikleri de farklıdır. Bu farklılık, nonsteroid antiinflamatuar ilaçların yan etkilerinin SO-1'i inhibe etme yeteneklerine, antiinflamatuar etkilerinin ise SO-2'yi inhibe etme yeteneklerine bağlı olduğu hipotezini desteklemektedir. Yeni bulunan NS-398 ve benzeri selektif SO-2 inhibitörü ilaçları tedaviye girmesiyle aspirin gibi istenmeyen etkileri fazla olan NSAİİ'lerin inflamasyon tedavisindeki önemleri azalacak ve inflamasyon tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Siklooksijenaz, siklooksijenaz-2, inflamasyon, NS-398

SUMMARY

A NOVEL CYCLOOXYGENASE ISOFORM: CYCLOOXYGENASE-2

Recently, two isoforms of cyclooxygenase have been identified: constitutive cyclooxygenase (cyclooxygenase-1, COX-1) and inducible cyclooxygenase (cyclooxygenase-2, COX-2). Constitutive cyclooxygenase is present in cells under physiological conditions, whereas inducible cyclooxygenase is induced by some cytokines, mitogens, and endotoxin presumably in pathological conditions, such as inflammation. The relative inhibitory effects of some nonsteroidal antiinflammatory drugs on the activities of COX-1 and COX-2 are also different, which supports the hypothesis that the side effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs correlate with their ability to inhibit COX-1, while the antiinflammatory effects of these agents are due to their ability to inhibit COX-2. The identification of selective inhibitors of COX-2, such as NS-398, will lead to advances in the therapy of inflammation.

Key Words: Cyclooxygenase, cyclooxygenase-2, inflammation, NS-398

Membran lipidleri, inflamasyonda ve fizyolojik olaylarda rol oynayan çok sayıda bileşigin sentezlendiği önemli bir kaynaktır. Buradan türeyen eikozanoidler (prostanoidler) 20 karbon atomlu bir siklopentan halkası ve ona bağlı doymamış yağ asitlerinin oksijenlenmiş ürünleridir. Eikozanoidler vücutta tüm doku ve sıvılarda yaygın bir şekilde bulunan, kısa ömürlü, lokal mediyatörlerdir. Hormonal, alerjik, inflamatuar, immunolojik, kimyasal ve mekanik nitelikteki çeşitli uyarılarla yapımıları artar ve oldukça geniş spektrumu güçlü

biyolojik etkiler oluştururlar. Bir eikozatetraenoik asid olan araşidonik asid, membran lipidlerinden fosfolipaz A₂ aracılığıyla ayrılır ve daha sonra siklooksijenaz, lipoksijenaz ve sitokrom P 450 olmak üzere başlıca üç temel oksidatif yolak aracılığı ile dokulara bağlı olarak spesifik son ürünlerde dönüşür; bunlara araşidonik asid türevleri adı verilir (1).

Araşidonik asid türevlerinden prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar, araşidonik asid ya da diğer prekürsör yağ asitleri üzerinde

¹ Yrd.Doç.Dr., T.Ü.Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne

² Araş.Gör.Dr., T.Ü.Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne

³ Prof.Dr., T.Ü.Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne

siklooksijenaz (SO) enziminin etkimesi sonucu oluştuklarından, siklooksijenaz ürünleri diye adlandırılırlar. Siklooksijenaz enzimi bu ürünlerin sentezinin hız kısıtlayıcı basamağıdır (2). Bu enzimin aktivitesini artırabilen ya da inhibe edebilen ilaçlar ya da maddeler vücutta çok önemli biyolojik değişikliklere neden olabilmektedirler.

Yakın zamanda siklooksijenazın yeni bir izoformunun olduğunu belirlenmesi prostaglandin sentezinin regülasyonu ile ilgili yeni soruları gündeme getirmiştir. Yeni bulunan bu siklooksijenaz izoformuna indüklenebilir siklooksijenaz ya da siklooksijenaz-1 (SO-1), diğerine ise konstitütif siklooksijenaz ya da siklooksijenaz-2 (SO-2) adı verilmektedir (3, 4, 5).

SO-1 ilk olarak koyun seminal veziküllerinden purifiye edilmiş, daha sonra koyun, fındık faresi ve insandan 2.8 kilobaz'lık (kb) cDNA klonları elde edilmiştir (6, 7). *In vitro* olarak, glukokortikoidler siklooksijenaz aktivitesini hızlı bir şekilde inhibe ederler (8). Bazı araştırmacıların glukokortikoid tedavisi ile 2.8-kb siklooksijenaz mRNA düzeylerinin azaldığını belirtmesine karşın, genelde bu tedavi ile siklooksijenaz enziminin aktivitesinin ve 2.8-kb mRNA düzeylerinin değişmediği kabul edilmektedir (4, 8). Yakın zamanda farklı araştırmacılar, daha önce klonlanan siklooksijenazdan (2.8-kb) farklı olarak yeni bir 4.1-kb cDNA klonlamışlardır (3, 4, 5, 9). Bu çalışmalar ilk olarak tavuk embriyo fibroblastlarında, 3T3 hücrelerinde ve insan umbilikal veni endotelyal hücrelerinde yapılmıştır (3, 4, 5, 10, 11). Ayrıca her iki siklooksijenaz izoformunun değişik canlılarda amino asid ardışımıları da saptanmıştır (12). Sıçanlarda SO-1'in 602, SO-2'nin 604 amino asid içeriği gösterilmiştir. Farelerde ise, SO-1 ve SO-2 proteinlerinin amino asid ardışımı %60'dan daha yüksek bir oranda aynıdır; ancak, SO-2'nin karboksil-terminal bölgesinde olduğu saptanan 18-amino asid'lik bir ardışım SO-1'de bulunamamıştır (12).

SO-2'nin bulunmasıyla steroid hormonları ve büyümeye faktörleri tarafından prostaglandin biosentezinin regülasyonu ile ilgili çok sayıda bilinmeyen nokta açıklığa kavuşturulabilir. İlk olarak kabul edilen iki tane siklooksijenaz havuzunun bulunduğu gerçeğidir: konstitütif havuz ve indüklenebilir havuz. İki siklooksijenaz izoformunun doku dağılımı ve subselüler yerleşimi ile ilgili de farklılıklar gözlenmektedir (3, 4, 5).

4.1-kb siklooksijenaz mRNA düzeylerinin fare fibroblastlarında serum ve insan monositlerinde interlökin 1 β tarafından hızla artırıldığı; glukokortikoidler tarafından ise azaltıldığı saptanmış ve bunu sonucunda SO-2'nin inflamatuar

yanıtın etkili eden önemli bir mediyatör olduğu düşünülmeye başlanmıştır (8). Daha sonraları, sıçan alveolar makrofajlarında lipopolisakkarid tarafından induklenen artmış siklooksijenaz aktivitesine selektif SO-2 ekspresyonunun neden olduğu; buna karşılık dinlenme fazındaki uyarılmış makrofajlarda ise sadece SO-1'in bulunduğu gösterilmiş ve bu sonuçlara dayanılarak SO-2'nin makrofajlarda immun ve/veya inflamatuar yanıtlar sırasında prostaglandinlerin hızla oluşumunda major bir rol oynadığı belirtilmiştir (13). Yakın zamanda ise, sıçan mezenşiyal hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde interlökin-1 β 'nın selektif olarak SO-2 ekspresyonunu artırdığı; ayrıca sistemik lipopolisakkarid uygulanımının *in vivo* olarak akciğer ve böbreklerde SO-2 ekspresyonuna neden olduğu saptanmış ve böylece sıçanlarda inflamatuar uyarıya yanıt olarak SO-2'nin selektif bir şekilde induklendiği belirlenmiştir (14, 15).

Crofford L.J. ve ark., bazal kültür şartları altında romatoid sinovyal dokularda hem SO-1 hem de SO-2'nin ekspresyonu ugradığını; ancak interlökin-1 β ya da forbol esterleri tarafından daha belirgin olarak uyarılması ve kortikosteroidler tarafından suprese edilmesi nedeniyle SO-2'nin major izoform olduğunu göstererek romatoid sinovyal dokularda SO-2'nin modülasyonunun romatoid artritteki inflamasyonu düzenleyen önemli bir mekanizma olabileceğini belirttiler (16).

Mitchell M.D. ve ark., insan amnion hücresi PGE₂ oluşumunun interlökin-1 β tarafından artırılmasına SO-2'nin etkili ettiğini gösterdiler (17). Slater D. ve ark. ise, doğumun başlangıcında ve doğum sırasında SO-2 mRNA'nın SO-1 mRNA'dan yaklaşık olarak 100 kez daha fazla miktarda olduğunu saptadılar (18). Bu bulgular doğum olayında da SO-2'nin önemine dikkat çekmektedir ve SO-2'nin ekspresyonunu kontrol eden faktörlerin daha detaylı olarak anlaşılması doğumun mekanizmalarının da aydınlatılabilmesini sağlayacaktır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, diğer dokularda ve fizyolojik olaylarda da SO-2 düzeylerinin ve önemini belirlemesinin yanı sıra, non-steroid antiinflamatuar ilaçların (NSAİ) farklı dokularda hangi siklooksijenaz üzerine daha etkin olduğunu araştırmaya ve bu izoformların selektif inhibitörlerini bulmaya yönelikdir (19, 20, 21).

SO-1'in aktivasyonu sonucu ortaya çıkan etkilerden birisi, endotelden salındığında antitrombojenik, gastrik mukozadan salındığında sitoprotektif etki gösteren prostasiklinin oluşumudur. Buna karşılık, SO-2, sitokinler, mitojenler ve endotoksin gibi proinflamatuar

ajanlara maruz kalan hücrelerde induklenir (5, 8, 13). NSAİ'lar siklooksijenaz enziminin aktivitesini inhibe ederler; bu özellik hem terapötik etkilerinin hem de yan etkilerinin bir nedenidir. Sonuç olarak, NSAİ'larin SO-2'yi inhibe etme yetenekleri antiinflamatuar bir ilaç olarak terapötik özelliklerinin, SO-1'i inhibe etme yetenekleri ise mide ve böbrek zedelenmesi gibi istenmeyen yan etkilerinin göstergesi olarak düşünülebilir.

Mitchell J.A. ve ark., yaptıkları çalışmalarında farklı dokularda SO-1 (sigir aort endotelyal hücrelerinde) ve SO-2'nin (endotoksin ile aktive edilen J774.2 makrofajlarda) aktiviteleri üzerine bazı NSAİ'larin inhibitör etkilerini karşılaştırdılar (20). SO-1 inhibisyonunun SO-2 inhibisyonuna oranı dikkate alınarak yapılan değerlendirmelerde indometazinin SO-1'i SO-2'ye göre yaklaşık 50 kez daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği, aspirinin de bu değerlere yakın derecelerde inhibisyon yaptığı gözlandı. İndometazinin siklooksijenaz aktivitesi üzerine biraz daha güçlü bir inhibisyon yapması, bu ilaçın aspirinden biraz daha ülserojenik bir ilaç olmasının ve biraz daha güçlü bir antiinflamatuar bir ilaç olmasının nedeni olabilir. İbuprofen de, aspirin ve indometazin gibi, SO-1'i SO-2'ye göre çok daha güçlü bir şekilde inhibe etmektedir; ancak, intakt hücrelerde SO-2'yi inhibe etme potansiyeli aspirine göre 5 kez daha fazla olmasına karşın, SO-1'i yaklaşık aynı oranda inhibe ederler. Bu durum, eşit antiinflamatuar dozlarda ibuprofenin aspirine göre daha az ülserojenik yan etkilerinin olmasını

açıklayabilir. SO-1 inhibisyonun SO-2 inhibisyonuna oranı yaklaşık olarak 1 olan diklofenak ve naproksenin de, aspirin ve indometazinden daha az ülserojenik etki göstermesi beklenen sonuçtur. Asetaminofen'in aspirin, indometazin ve ibuprofene göre çok daha düşük oranlarda SO-1 ve SO-2'yi inhibe etmesi ise bu ilaçın ülserojenik etkilerinin olmamasının ve zayıf antiinflamatuar etkileri olmasının nedeni olabilir (20).

SO-2'nin bulunmasından sonra elde edilen bütün veriler araştırmacıları selektif bir SO-2 inhibitörünün bulunmasına doğru yöneltmiş ve yakın zamanda in vitro olarak SO-2 aktivitesini selektif bir şekilde inhibe eden yeni bir antiinflamatuar ajan, NS-398, bulunmuştur (21). Futaki N. ve ark., yaptıkları çalışmalarında önce NS-398'in çok yüksek dozlarda oral uygulanımından sonra bile gastrointestinal lezyon oluşturmadan antiinflamatuar ve analjezik etki gösterdiğini saptamışlardır (22). Daha sonra ise, bu ilaçın tamamen SO-2'ye spesifik olduğunu göstermişler ve bu durumun da NS-398'in minimal toksisite ile birlikte antiinflamatuar ve analjezik etki göstermesini açıklayabileceğini belirtmişlerdir (21). Çok yakın zamanda bulunan bir diğer selektif SO-2 inhibitörü ise DuP 697'dir (23, 24). NS-398, DuP 697 ve benzeri selektif SO-2 inhibitörü, ilaçların tedaviye girmesiyle inflamasyona karşı etkin bir önlem alınılabilecek ve aspirin gibi istenmeyen etkileri fazla olan NSAİ'larin inflamasyon tedavisindeki önemleri minimuma indirilebilecektir.

KAYNAKLAR

- Dökmeçi İ., Dökmeçi G., Kadaifci R. *Eikozanoidler*. In: Farmakoloji-İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar. Ed. Dökmeçi İ. Nobel Tıp Kitabevleri, 1. baskı, İstanbul, 587-594, 1992.
- DeWitt D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase regulation of enzyme expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1083: 121-134, 1991.
- Kujubu D.A., Fletcher B.S., Varnum B.C., Lim R.W., Herschman H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase gen. *J. Biol. Chem.* 266: 12866-12872, 1991.
- O'Banion M.K., Sadowski H.B., Winn V., Young D.A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J. Biol. Chem.* 266: 23261-23267, 1991.
- Xie W., Chipman J.G., Robertson D.L., Erikson R.L., Simmons D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2692-2696, 1991.
- DeWitt D.L., Smith W.L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 1412-1416, 1988.
- Merlie J.P., Fagan D., Mudd J., Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* 263: 3550-3553, 1988.
- O'Banion M.K., Winn V.D., Young D.A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4888-4892, 1992.
- Kennedy B.P., Chan C.-C., Culp S.A., Cromlish W.A. Cloning and expression of rat prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-2 cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 197 (2): 494-450, 1993.
- Hla T., Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7384-7388, 1992.
- Jones D.A., Carlton D.P., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II

- and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* 268: 1-6, 1993.
12. Feng L., Sun W., Xia Y., Tang W.W., Channugam P., Soyoola E., Wilson C.B., Hwang D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 361-368, 1993.
 13. Lee S.H., Soyoola E., Channugam P., Hart S., Sun W., Zhong H., Liou S., Simmons D.L., Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolisaccharide. *J. Biol. Chem.* 267: 25934-25938, 1992.
 14. Martin M., Neumann D., Hoff T., Resch K., DeWitt D.L., Goppelt-Struebe M. Interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 expression is suppressed by cyclosporin A in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 45: 150-158, 1994.
 15. Pritchard K.A., O'Banion M.K., Miano J.M., Vlasic N., Bhatia U.G., Young D.A., Stemerman M.B. Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 269: 8504-8509, 1994.
 16. Crossford L.J., Wilder R.L., Ristimaki A.P., Sano H., Remmers E.F., Epps H.R., Hla T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. *J. Clin. Invest.* 93: 1095-1101, 1994.
 17. Mitchell M.D., Edwin S.S., Lundin-Schiller S., Silver R.M., Smotkin D., Trautman M.S. Mechanism of interleukin-1 β stimulation of human amnion prostaglandin biosynthesis: mediation via a novel inducible cyclooxygenase. *Placenta* 14: 615-625, 1993.
 18. Slater D., Berger L., Newton R., Moore G., Bennett P. The relative abundance of type 1 and type 2 cyclo-oxygenase mRNA in human amnion at term. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 198 (1): 304-308, 1994.
 19. Lecomte M., Laneuville O., Ji C., DeWitt D.L., Smith W.L. Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J. Biol. Chem.* 269: 13207-13215, 1994.
 20. Mitchell J.A., Akarasereenont P., Thiemermann C., Flower R.J., Vane J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11693-11697, 1994.
 21. Futaki N., Takahashi S., Yokoyama M., Arai I., Higuchi S., Otomo S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity *in vitro*. *Prostaglandins* 47: 55-59, 1994.
 22. Futaki N., Yoshikawa K., Hamasaki Y., Arai I., Higuchi S., Iizuka H., Otomo S. NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. *Gen. Pharmacol.* 24: 105-109, 1994.
 23. Copeland R.A., Williams J.M., Giannaras J., Nurnberg S., Covington M., Pinto D., Pick S., Trzaskos J.M. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11202-11206, 1994.
 24. Gierse J.K., Hauser S.D., Creely D.P., Koboldt C., Rangwala S.H., Isakson P.C., Seibert K. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclooxygenase. *Biochem J.* 305: 479-484, 1995.