

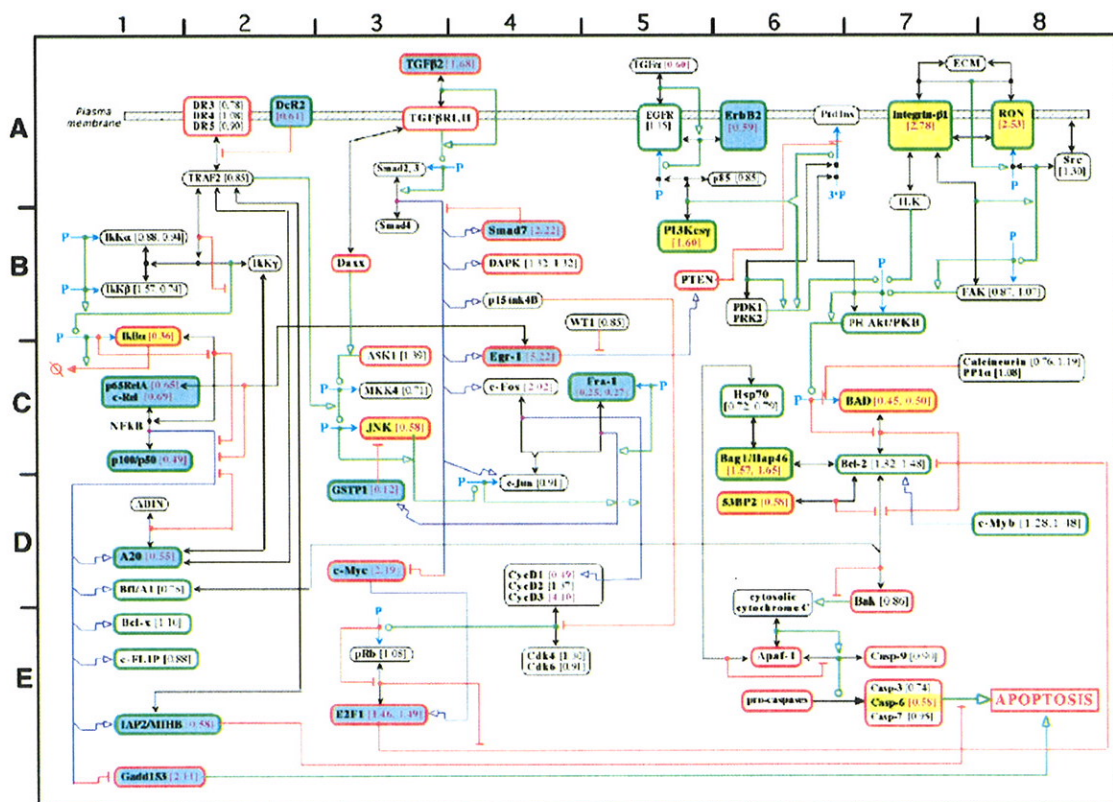
Celecoxib, NSAIDs og cancer

5. årsoppgave i Stadium IV – Medisinstudiet i Tromsø

Av Morten Juul Sundnes, medisin kull 2000.

Veileder Baldur Sveinbjörnsson, Eksperimentell patologi, Institutt for medisinsk biologi, Universitetet i Tromsø

Tromsø, 2005.



Innholdsfortegnelse

INNHOLDSFORTEGNELSE	2
RESYMÉ	3
FORORD	4
INNLEDNING	5
NSAIDS OG CANCER	7
GENERELT OM CANCER	8
CELECOXIB OG CANCER	10
CELECOXIB OG CANCER MAMMA	10
CELECOXIB OG COLORECTALCANCER	11
CELECOXIB OG HEPATOCELLULÆRT CARCINOM (LEVERCANCER)	12
CELECOXIB OG LUNGE CANCER	12
CELECOXIB OG MUNNHULECANCER	12
CELECOXIB OG NEUROBLASTOM	13
CELECOXIB OG HEMATOLOGISK CANCER	13
CELECOXIB OG PROSTATA CANCER	13
CELECOXIB OG PANCREASCANCER	14
ANDRE STUDIER	14
DISKUSJON	14
REFERANSER	16

Jo mer original en oppfinnelse er, desto mer selvfølgelig virker den etterpå. -- Arthur Koestler

Forsideillustrasjon: Reinhold et al. studerte hva som skjedde med apoptoserelaterte mekanismer når cellene utviklet resistens mot camptothecin. Figuren er et molekylært kart som viser endringene i genekspressjon for de ulike faktorene. (Reinhold WC, Kouros-Mehr H, Kohn KW, Maunakea AK, Lababidi S, Roschke A, et al. Apoptotic susceptibility of cancer cells selected for camptothecin resistance: gene expression profiling, functional analysis, and molecular interaction mapping. Cancer Res 2003 Mar 1;63(5):1000-11.)

Resymé

Medikamentet celecoxib ble opprinnelig introdusert som et antiinflammatorisk legemiddel med mindre bivirkninger enn de etablerte ikke-steroidale antiinflammatoriske legemidlene som blant andre aspirin og ibuprofen. Nærmere studier in vitro og in vivo har vist at stoffet også har andre effekter enn bare å hemme cyclooxygenase, enzymet som katalyserer reaksjonen frem til prostaglandiner. Celecoxib og varianter av dette har vist seg å hemme tumorvekst og i enkelte cellelinjer inducere apoptose, som er en form for regulert celledød. Kombinasjoner med strålebehandling og etablerte kjemoterapeutiske medikamenter eller kombinasjoner av disse har vist at celecoxib kan gi en potenserende eller sågar ha en synergistisk effekt i denne sammenheng. Dette er effekter man har sett i en rekke forskjellige kreftvarianter. Det foregår nå en intens forskning på dette området for å forsøke å forstå hvordan man best kan utnytte disse effektene i den kliniske behandlingen av kreftpasienter. Oppdagelsen av disse effektene er også et eksempel på det man har sett den siste tiden at en øket innsikt i cellulære og subcellulære mekanismer gjør at man i større grad enn tidligere er i stand til å forklare bedre hvorfor medikamenter virker slik de gjør, og også hvorfor bivirkninger oppstår.

Forord

Hensikten med denne oppgaven er å gi leseren et lite innblikk i det som har gjort at celecoxib og en del andre medikamenter som man initialt trodde utøvet farmakologisk effekt gjennom hemming av spesielle enzymer, er en av de best studerte medikamenter de siste årene. Personlig synes jeg historien som ledet fram til oppdagelsen av den kjemopreventive effekten av celecoxib i tillegg til den veksthemmende effekt på xenografts og spontane tumores er interessant. Den viser også variasjoner over et tema som vi har sett flere tilfeller av i klinisk medisin i det siste, der medikamenter som er introdusert med en gitt klinisk indikasjon senere viser seg å virke på helt andre tilstander og også cellulære og molekylære mekanismer enn det som først lå til grunn for den primære markedsføringen av medikamentet.

Celecoxib ble introdusert på markedet som en selektiv COX-2-hemmer. Dette var basert på en hypotese om at medikamenter som bare hemmet den ene cyclooxygenasevarianten ville gi mindre bivirkninger enn de eldre uselektive. Dette viste seg ikke å holde stikk. Også de selektive COX-hemmerene har bivirkninger og den siste tiden har det vært særdeles stort fokus på akkurat dette i forbindelse med at preparatet Vioxx®, som også er en selektiv COX-2-hemmer ble trukket fra markedet. Celecoxib har siden vist seg å flere spennende effekter. Til å begynne med når man studerte dette antok man at disse effektene skrev seg fra hemming av cyclooxygenase. Imidlertid har man sett at også molekylære derivater av celecoxib som ikke har noen COX-2-hemmende effekt, har virkninger på celler både in vitro og in vivo. I samband med kreft er det gjort flest forsøk med celecoxib i kombinasjon med eksisterende behandlingsregimer som strålebehandling og cytostatika, men det finnes også anekdotale historier der celecoxib i seg selv synes å ha hatt en til dels betydelige anti-tumoreffekt (1). Følgelig har celecoxib nå funnet plass i et terapeutisk panorama som ligger langt fra utgangspunktet som et rent antiinflammatorisk medikament.

Statinene er et annet eksempel. De ble opprinnelig introdusert fordi de skulle hemme 3-HMG-CoA og dermed bidra til å senke kolesterolnivået. I retrospekt viser det seg at medikamentet har mange pleiotrope effekter både immunmodulerende og stabiliserende blant annet på atherosklerotiske plaque. De er også under utprøving i behandlingen av multipel sklerose og cancer. Analogt med dette har man sett at det antiepileptiske medikamentet valproat hemmer tumorvekst og induserer tumorregresjon i forsøksdyr. Man tror at denne mekanismen er helt urelatert til den antiepileptiske effekten av medikamentet. En hypotese er at stoffet hemmer epigenetisk suppresjon av tumorsuppressorgener som normalt skulle tillatt cellen å gå i apoptose. Valproat er nå under utprøving i tumorrettet behandling i studier med mennesker.

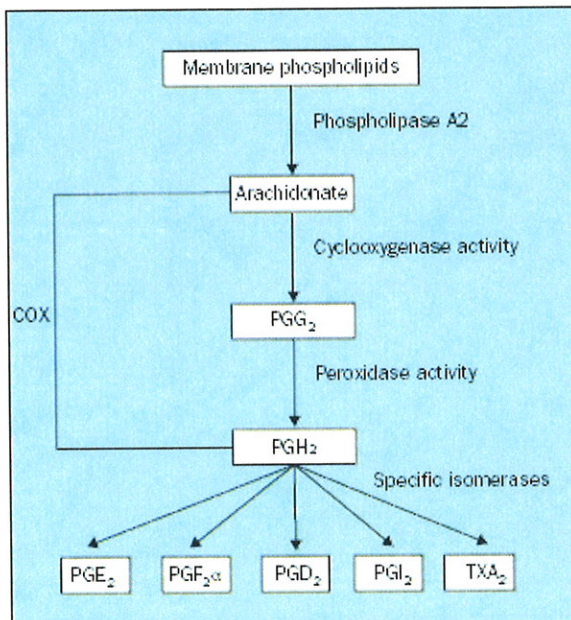
Grunnen til at mange av våre problemer er og blir uløste, er at vi frykter løsningen.

– Joao Silva

Innledning

Den tyske kjemikeren Felix Hoffman startet i 1893 en kommersiell prosess for sin arbeidsgiver Bayer, for å produsere et stoff med analgetiske egenskaper kalt acetylsalisylsyre eller aspirin. Motivasjonen for dette kom fra hans far som var plaget med alvorlig leddgikt. Fra denne vesle historiske hendelse utviklet det seg så en gruppe legemidler som vi i dag kjenner som NSAIDs¹ og over hundre år senere tilhører de fortsatt de mest forskrevne legemidler menneskeheten har sett (2). Det skulle imidlertid gå mange tiår før den molekylære mekanismen bak disse medikamentene ble klarlagt. I 1971 beskrev Vane mekanismen som inhibisjon av prostaglandinsyntesen (3), en oppdagelse han i 1982 mottok Nobelprisen i medisin eller fysiologi for sammen med Samuelsson og Bergstrom (4;5).

Senere har man blitt oppmerksom på at NSAIDs også har andre cellulære virkningsmekanismer enn bare reduksjon av prostaglandinkonsentrasjonen i vevet. I eksperimentelle studier har man funnet holdepunkter for; induksjon av et eget gen kalt NAG-1 (6), suppresjon av telomeraseaktivitetet gjennom blokkering av Akt/PKB (7), supprimering av ekspresjon av cPLA₂ mRNA (8) og "backward flow" av arakidonsyre (9). Det er dog grunn til å poengtere at flere av de effekter som er sett på cancerceller først oppstår ved høyere medikamentkonsentrasjoner enn det som normalt kreves for COX-inhibisjon og som er vanlig ved terapeutisk forskrivning i klinisk praksis (10;11).



Figur 1: – Enzymet PLA₂ spalter av arakidonsyre slik at den blir tilgjengelig for COX, disse omdanner så arakidonsyre gjennom en to-trinns prosess til PGH₂. PGH₂ metaboliseres videre til det endelige eicosanoid av den respektive isomerase som er spesifikk. Figur fra (12).

¹ Forkortelser benyttet i denne oppgaven: NSAID; ikke-steroidalt anti-inflammatorisk legemiddel (fra engelsk Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug, COX; cyclooxygenase, FDA; Federal Drug Administration (Det amerikanske legemiddelverket), NA-NSAID; ikke-aspirin NSAID (nonaspirin NSAID), KI; konfidensintervall, iNOS; induserbar nitrogenoksid syntase, HCC; hepatocellulært carcinom (hepatom), VEGF; vascular endothelial growth factor, FAP; familiær adenomatosis polyposis, MRI; magnetisk resonanstomografi – en spesiell form for billediagnostikk.

I organismen finnes to isoformer av enzymet COX (også kalt prostaglandin-endoperoksidase syntase, PGHS, PGH eller EC 1.14.99.1): COX-1 og COX-2. COX-1 uttrykkes konstitutivt i de fleste vev og synes å være et homeostaseenzym. Med det menes at det produserer prostaglandiner til regulering av normale fysiologiske funksjoner som ventrikkelmucosas integritet, regulering av renal blodforsyning og blodplateaggregasjon (2;13). Til sammenlikning er COX-2 vanligvis knapt påvisbar i normale vev. Induksjon av transkripsjonen av COX-2 kan induseres av en mengde endogene og eksogene faktorer (14;15). Begge enzymene katalyserer en cyclooxygenase(*bis*-oxygenase)-reaksjon der arakidonat pluss to oksygenmolekyler konverteres til PGG₂ (prostaglandin G₂) og en peroksidasereaksjon der PGG₂ reduseres til PGH₂ med to elektroner.

Selv om de første studiene tydet på at de to enzymene var like på det vis at de begge utførte de samme katalytiske reaksjoner og hadde tilsvarende proteinstruktur (14), viste det seg at mange av de inflammatoriske, induserbare effektene stammet fra COX-2. De to skiller seg også fra hverandre med hensyn til mRNA-spleising, stabilitet og effektivitet i translasjonen. Reguleringen av COX-2 på mRNA-nivå er en viktig mekanisme som er nøye regulert av fysiologiske mediatorer, spesielt kortikosteroidene (2). En annen viktig forskjell er deres evne til å utnytte ulike substratsamlinger. Som eksempel, i fibroblaster og immunceller var COX-2 i stand til å utnytte endogen arakidonsyre mens COX-1 ikke var det. Løselig PLA₂ kan være en alternativ kilde til substrat for COX-1 og Herschman har antydnet at i enkelte vev kan utslipp av sPLA₂ (løselig fosfolipase A₂) være den viktigste reguleringen av COX-1-aktiviteten (2;16). Andre forskjeller mellom de to er at oppreguleringen av COX-2 ofte synes å være ledsaget av oppregulering av mPGES slik at en større del av dannet PGH₂ omdannes til PGE₂ som er proinflammatorisk (17).

Arakidonsyre (5,8,11,14-eicosatetraenoinsyre) kan stamme direkte fra dietten eller den kan dannes ved modifikasjon av linolensyre. For det meste finnes den i en forestret form i cellemembranen (18). Metabolitter fra arakidonsyremetabolismen er viktige for multiple biologiske prosesser inkludert inflammasjon, ovulasjon, implantasjon, angiogenese, blodplateaggregasjon og immunologisk funksjon (19-21). Dette skjer ved at eicosanoidene interagerer med sine respektive reseptorer (22;23).

Bruk av NSAIDs, spesielt over lengre tid, er assosiert med tildels alvorlige bivirkninger. Av størst betydning er bivirkningene relatert gastrointestinaltraktus (GIT). NSAID-relaterte GIT-komplikasjoner bidrar trolig med det største antall dødsfall som kan tilskrives en enkelt klasse av legemidler. FDA som er legemiddelmyndighet i USA har estimert at ulcera og alvorlige komplikasjoner som blødninger og perforasjoner opptrer hos så mange som 2-4 % per år hos pasienter med et langvarig inntak av disse (24). En antok at mange av bivirkningene kunne tilskrives at medikamentene ikke inhiberte COX-2 spesifikt, og det ble derfor sett på som en gunstig tilnærming å utvikle selektive COX-2 hemmere som i minimal grad skulle hemme COX-1. Disse gikk man ut fra ville være uten toksisk påvirkning på ventrikkelmukosa, nyrene og heller ikke hemme blodplatefunksjonen (25). Disse legemidlene ble godkjent etter en meget hurtig prosess i FDA. Dessverre har også disse medikamentene har vist seg å ha bivirkninger. Etter at en større studie viste at medikamentet rofecoxib (Vioxx®) økte risikoen for en alvorlig tromboembolisk hendelse med en faktor på 3,9 valgte produsenten Merck å trekke den tilbake fra markedet (26).

NSAIDs og cancer

På nittitallet kom det epidemiologiske rapporter som indikerte at inntak av NSAIDs over lengre tid syntes å ha en effekt på prevalensen av kreftsykdommer, og allerede i 1993 forelå det data som tydet på at inntak av aspirin reduserte risikoen for å utvikle og å dø av coloncancer (27). Siden coloncancer er en sykdom som rammer ca. 4-5 % av normale individer, uavhengig av genetisk risiko, er det svært ønskelig med metoder for å forebygge (28). Dyrestudier kan tyde på at deler av den beskyttende effekten skyldes en hemming av translokasjonen av β -catenin inn i cellekjernen (29). Andre studier indikerer at det er hemming av angiogenese (nydannelse av blodkar i tumor) som er av betydning for den kjemopreventive effekten (30).

Andre undersøkelser viste at COX-2 ofte var oppregulert i mange forskjellige kreftformer som lymfom (31), hepatocellulært carcinom (32-34), coloncancer (35;36), munnhulecancer (10), endometriecancer (37), prostatacancer, mammacancer, lungecancer (36), cervixcancer (38) og i mange andre solide tumores (39). I tillegg til ekspresjon i selve tumorvevet ser ekspresjon av COX-2 i neovaskulatur til epiteliale tumores ut til å være et generelt trekk. Ekspresjon av COX-2 er ofte samtidig assosiert med en øket konsentrasjon av PGE₂ i tumor, sett i forhold til omkringliggende ikke-transformert vev (36).

En prospektiv studie i USA viste at den relative risikoen for å utvikle leukemi blant kvinner som rapporterte at de brukte aspirin to eller flere ganger per uke var 0,45 (95 % KI: 0,27-0,75) sammenliknet med de som ikke brukte aspirin. Derimot, for de kvinnene som rapporterte at de brukte NA-NSAIDs var den relative risikoen 1,31 (95 % KI: 0,77-2,22) (40). At det er forskjeller i virkningsmekanisme også innad i gruppen kalt NSAIDs er godt kjent og har vært studert. Variabel evne til å virke inn på andre faktorer i cellene som blant annet NF- κ B og AP-1 bidrar til pleiotrope effekter av disse medikamentene (41).

En sjelden og arvelig form for coloncancer, kalt familiær adenomatøs polypose (FAP), viste seg i en musemodell å kunne hemmes betydelig ved å lage en knockoutmus som ikke uttrykte *Ptgs2* som er det homologe musenzymet til det humane COX-2 (42). Gruppen som sto bak studien konkluderte med at dette var genetisk bevis for at COX-2 spiller en viktig rolle i tumorgenese. En så for seg at COX-2 i cancersykdommer kunne bidra gjennom prosesser som xenobiotisk metabolisme, angiogenese, apoptose, inflammasjon, immunsuppresjon og invasivitet (12). Tsujii og Dubois demonstrerte at enterocytter fra rotte som overuttrykte COX-2 viste øket motstand mot apoptose (43).

Cianchi og medarbeidere har vist at COX formidler den proangiogene effekten som NO utøver (44). De postulerte at dette skjedde fordi iNOS og COX sammen stimulerte produksjonen av VEGF. En studie gjort på ikke-transformerte endotelialceller i kultur (HUVEC) viste at selektiv hemming av COX-2 ga stans i G₁ i cellesyklus, men ledet ikke til apoptose (45).

Det er grunn til å merke seg at det ikke er gjort noen systematiske studier av hvilke prostaglandinsyntaser og prostaglandinreseptorer som er uttrykt i colorectalcancer (5). En immunhistokjemisk studie utført på prøver av lungecancer viste at ekspresjon av tromboxan syntase i normalt lungevev ikke var påvisbart, mens det ble påvist en svak ekspresjon i platecellecarcinomer og sterk ekspresjon i vaskulære endotelceller tumorforsynende kar. De fant også en uttalt forskjell i fargingsintensitet med hensyn på prostacyclin syntase som viste

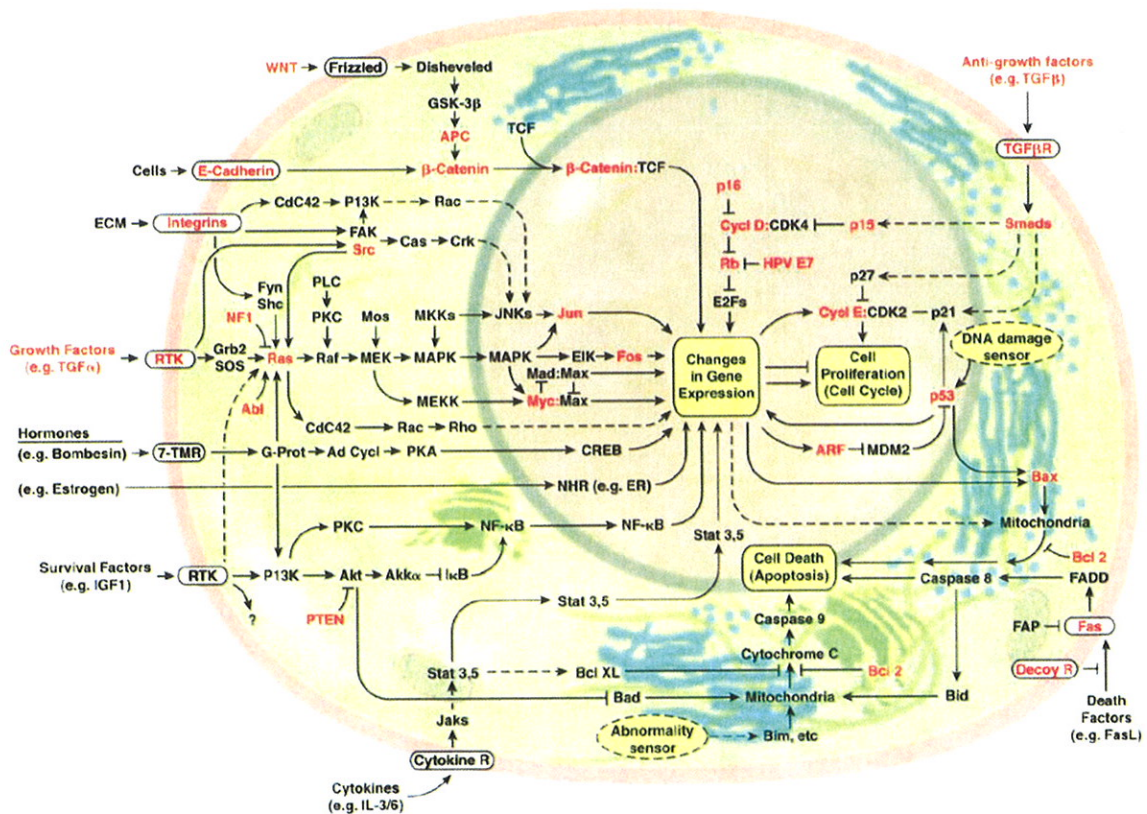
en moderat ekspresjon i normalt vev, men var totalt fraværende i tumorassosierte vaskulære endotelialceller (46).

Generelt om cancer

Cancer er en sykdom som utgjør en betydelig belastning både for den enkelte pasient, hans eller hennes nærmeste og ikke minst for samfunnet i form av tapt levetid. Statistiske beregninger fra USA viser at det i løpet av 2005 vil oppstå 1,4 millioner nye tilfeller av cancer og i den samme perioden vil over 500.000 mennesker dø av cancersykdommer (47). På verdensbasis har en anslått at mer enn seks millioner mennesker dør av kreft hvert år (48).

Sykdommen cancer, eller kreft som den omtales som i dagligtale, skyldes at enkelte celler har tilegnet seg egenskaper i forhold til det cellulære utgangspunkt de stammer fra. På den måten omgår de reguleringsmekanismene i sitt lokale homeostatiske miljø. De seks viktigste egenskapene er (49):

1. Evne til å klare seg uten tilførte vekstsignaler
2. Evne til unngå apoptose (programmert celledød)
3. Insensitivitet for anti-vekst signaler
4. Evne til vevsinvasjon og metastasering
5. Opprettholdt angiogenese (kardannelse)
6. Ubegrenset replikativt potensiale



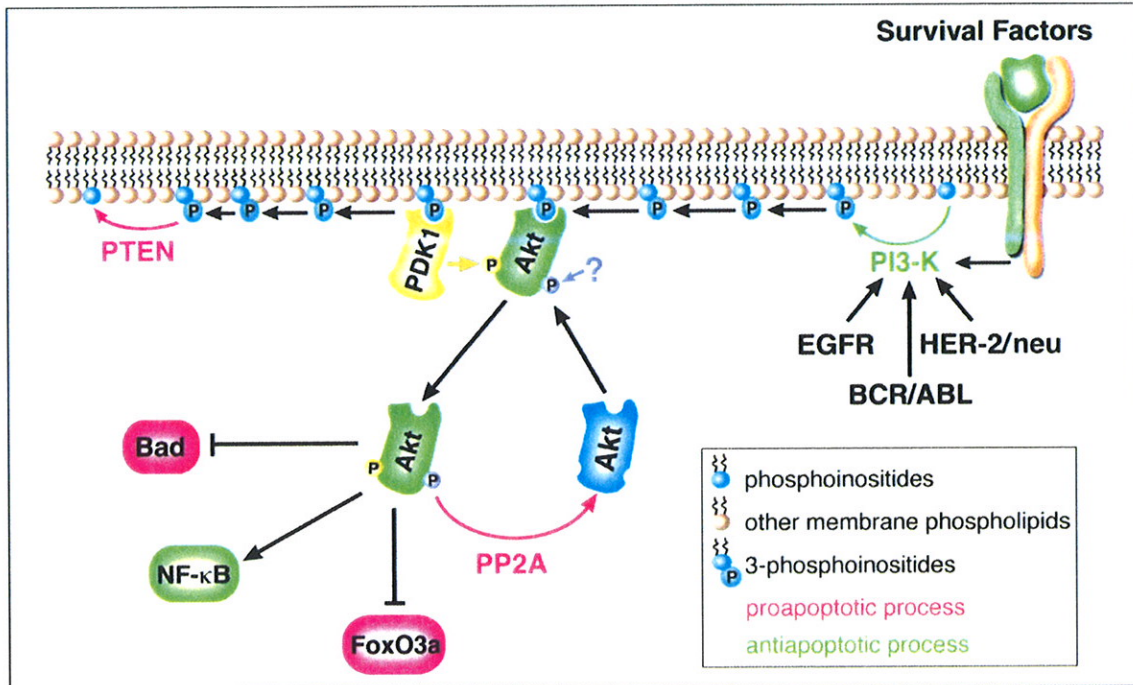
Figur 2: - En oversikt over en del av de mekanismer som man vet cancerceller kan ha defekter i. Disse gjør at cellene får de egenskapene som er nevnt i teksten ovenfor. Figur fra (49).

Uttrykk av COX i vevet, av cellene selv eller av omkringliggende stromale celler, synes å bidra til flere av disse egenskapene (50). Ut fra dette er det utformet en hypotese om at hemming av COX-2 kan forsterke responsen på cytotoxisk behandling ved inhibisjon av tumor angiogenese, promosjon av apoptose eller andre mulige mekanismer (51). Det er fra før kjent at apoptose som respons på behandling leder til redusert tumorvolum og at resistens mot apoptose leder til medikamentresistens (52). Imidlertid må det og bemerkes at medikamenter kan tenkes å lede til celledød gjennom andre mekanismer enn apoptose (53;54).

En pattedyr-celle er uhyre kompleks og all metabolisme i den er regulert langs de fleste reaksjonsveger, i ulike retninger og på forskjellige nivå. For å bli transformert til en malign cancer-celle må cellen trinn for trinn tilegne seg en eller flere av de ovennevnte egenskapene. På tilsvarende vis vil behandling av cancersykdom måtte ta utgangspunkt i de samme egenskapene og sørge for å ramme cellene på en slik måte at de slokkes helt ut (49). Optimal cancerterapi må samtidig være designet slik at den ikke rammer friske celler. Dagens cancerbehandling tar i all hovedsak sikte på å få cellene til å gå i apoptose (55). Apoptose er et velregulert program som til slutt leder til at cellen går til grunne, uten at det vekker noen betennelsesreaksjon i omkringliggende vev. I cellen finnes forskjellige mekanismer som alle kan lede fram til cellens undergang. Noen mekanismer krever at mitokondriene deltar i prosessen, mens andre krever at det endoplasmatiske retikulum deltar (55-59).

En reaksjonsveg som synes ofte å være implisert i apoptoseresistens er PI3K/PKB/PTEN-vegen (oversikt i referansene (60;61),(34)). Konstitutiv aktivering av Akt, kromosomal amplifikasjon av Akt eller PI3K, eller delesjon av PTEN synes å bli selektert ved tumordannelse i forskjellige vev, og spiller trolig en rolle i den tumorigene prosess. PI3K er en lipidkinase som aktiveres av mange forskjellige vekstfaktorer (se nederst til venstre i figur 2). Aktivering av Akt/PKB skjer ved at enzymet fosforyleres i Thr³⁰⁸ og Ser⁴⁷⁸ (62). Aktivert PI3K danner så membranbundne fosfoinositider, som igjen fungerer som sekundære budbringere og rekrutterer proteiner, som Akt. Etter at Akt ankommer plasmamembranen aktiveres den ved fosforylering (62) og den fosforylerer igjen multiple målproteiner i cellen (60). PI3Ks evne til å aktivere Akt motvirkes av PTEN som er en lipidfosfatase og som er et proteinprodukt av et kjent tumor suppressorgen som er deletert i en del cancertyper (63). Akt beskytter cellene mot apoptose ved å fosforylere og inaktivere flere viktige apoptoseproteiner som blant andre Bad, procaspase-9 og FKHR1 (se figur 2 og 3) (52). Også aktivering og oppregulering av NF-κB kan oppstå som en konsekvens av PI3K/Akt/PKB-aktivering (se figur 3). Med dette som utgangspunkt er utfordringen nå å utvikle hemmere av PI3K, PDK1 og ILK (integrin linked kinase) (64).

Leng og medarbeidere demonstrerte en mulig sammenheng mellom COX-2 og PI3K/Akt/PKB i en studie på HCC-celler der de viste at overekspresjon av COX-2 ledet til en fosforylering av Akt (Thr³⁰⁸) i cellene, imidlertid var konsentrasjonen av Akt (Ser⁴⁷³) og ufosforylert Akt uforandret (34).



Figur 3: - Grafisk fremstilling av hvordan PI3-K, Akt og PTEN interagerer i cellen. Se teksten for detaljer. Figur fra (60).

Celecoxib og cancer

Celecoxibs plass i cancerprevensjon startet med en randomisert, placebokontrollert studie der 77 personer med FAP² i en periode på seks måneder fikk celecoxib (100 eller 400 mg daglig) eller placebo. Bivirkningsprofilen var lik mellom de to gruppene som fikk 100 mg og 400 mg. I gruppen som hadde fått 400 mg/dag var gjennomsnittlig reduksjon i antall tumores 28,0 % (P=0,003 sammenliknet med placebo), og gjennomsnittlig reduksjon i tumorbyrde (summen av polyppdiametre) var 30,7 % (P=0,0001 sammenliknet med placebo) (65).

Enkelte grupper har pekt på celecoxibs evne til å hemme angiogenese som en forklaring på den uttalte antimetastatiske aktiviteten det har vist i enkelte gnagermodeller (36).

Celecoxib og cancer mamma

Awara og medarbeidere studerte Ehrlichs solid carcinoma (66), som er en dyremodell for cancer mamma. De fant at celecoxib i seg selv ikke hadde noen anti-tumor effekt, men at kombinasjonen med cytostatikumet doxorubicin hadde en potenserende effekt. Basu og medarbeidere studerte en in vivo modell for cancer mamma og fant at celecoxib reduserte tumorbyrde og proliferasjon i tumor, i tillegg påviste de øket apoptoseaktivitet i tumorcellene

² FAP (Familiær Adenomatosis Polyposis); En arvelig tykktarmssykdom der pasienten utvikler benigne polypper i stort antall. Disse kan siden utvikle seg til maligne tumores, noe de vanligvis gjør når pasienten når en viss alder.

(67). De studerte også mekanismene bak dette og så en sammenheng mellom aktiviteten i PKB/Akt og induksjon av apoptose.

En pilotstudie utført av Chow og medarbeidere (68) der de kombinerte celecoxib med aromatasehemmeren exemestane ga oppløftende resultater. Bare i gruppen som fikk både celecoxib og exemestane så man komplett klinisk remisjon. Det ble også observert fall i konsentrasjonene av tumorantigenene CEA og CA 15.3, men disse var ikke signifikant forskjellige mellom de ulike gruppene.

Celecoxib og colorectalcancer

Blanke og medarbeidere gjorde en fase I-studie med pasienter med inkurabel colorectal cancer der de ble behandlet med 5-FU og leukovorin i kombinasjon med celecoxib. Det ble ikke observert bivirkninger utover det en forventet fra cytostatikabehandlingen i seg selv (69). Wang og medarbeidere viste at PGE₂, gjennom PI3K/Akt-mekanismer, transaktiverte PPARδ som igjen fremmer overlevelse og dannelse av adenomer i tarmen. Tilsatt PGE₂ øket tumorbyrden, men denne effekten var opphevet hos mus som ikke uttrykte PPARδ. De pekte på at PPARδ syntes å være et sted for krysskommunikasjon med Wnt-vegen, som forskyver balansen fra celledød til overlevelse (70).

Undersøkelser gjort av Williams og medarbeidere viste at det var et sprik mellom in vitro og in vivo studier med celecoxib. Celecoxib syntes ikke å ha noen effekt på celler in vitro i konsentrasjoner <10 μM, mens in vivo hemmet celecoxib også under denne konsentrasjonen veksten av xenograften av HCA-7 implantert på mus (71). De konkluderte med at denne observasjonen skyldes interaksjoner mellom de faktorer som normalt påvirker tumorceller som ekstracellulær matrix, stromalceller og andre vertsfaktorer.

Davis og medarbeidere undersøkte den potenserende effekten av celecoxib på strålebehandling av tumorer av typene Col26, 1483 HNSCC og HT-29 (humant coloncarcinom). Musene fikk celecoxib i dosene 250, 25 eller 5 mg/kg. Deretter fikk de en engangs stråledose på 6 Gy. Videre ble konsentrasjonen av ulike prostanoider i tumorvevet målt etter behandlingen. Sammen med nøytraliserende antistoffer mot PGE₂ viste celecoxib en synergistisk effekt. Følgelig kunne det argumenteres for at noe av den strålepotenserende effekten av celecoxib skriver seg fra andre mekanismer enn COX-2-inhibisjon. Hemming av den selektive COX-1-hemmeren SC-560 ga en reduksjon på 40 % i PGE₂-nivået i tumor, men hadde ingen effekt på tumorvekst i seg selv og heller ingen forsterkende effekt på stråleterapi. Col26 musene ble undersøkt med MRI med kontrast for å visualisere tumorvaskulær funksjon og integritet, og de observerte da at kombinasjonen av celecoxib og stråling ga en signifikant økning i vaskulær permeabilitet i forhold til enkeltmodaliteter alene eller vehikkelbehandlede dyr (72).

Arico og medarbeidere (73) fant at celecoxib induserte apoptose i HT-29 celler i kultur gjennom å hemme PDK-1. De dokumenterte videre at induksjon av apoptose falt sammen med redusert fosforylering av Thr³⁰⁸ og Ser⁴⁷³ på Akt.

Buecher og medarbeidere undersøkte femten forskjellige colorectal-cellelinjer og fant at celecoxib var sterkt veksthemmende, spesielt i høyere konsentrasjoner (74). De demonstrerte også at den veksthemmende evnen var uavhengig av COX-2 ekspresjonen.

Celecoxib og hepatocellulært carcinom (levercancer)

Leng og medarbeidere brukte HCC-linjene Hep3B og Hep3G i kultur og dokumenterte at tilsatt PGE₂ fremmet veksten av tumorcellene (34). Videre viste de at veksten kunne hemmes med PI3K-hemmeren LY294002. Denne effekten kunne delvis reverseres med tilsetning av PGE₂. Følgelig konkluderte de med at Akt-aktivering inngår i COX-2- og PGE₂-indusert HCC cellevekst. Behandling med celecoxib reduserte aktiveringen av Akt og induerte apoptose gjennom caspase-9 og caspase-3, og nærmere undersøkelser viste at fosforyleringen av både PDK1 og PTEN var redusert.

Kern og medarbeidere fant, som Leng og medarbeidere, at caspase -9 og -3 var involvert i apoptoseinduksjonen, men dokumenterte i tillegg at nivåene av Bcl-2 og Bax var uendret i cellene. De påviste videre en forbigående økning i P^{473Ser}Akt på mellom fem og 60 minutter, men etter to timer skjedde en nedregulering som nådde laveste konsentrasjoner etter fire timer (33).

Celecoxib og lungecancer

Lin og medarbeidere viste med utgangspunkt i en human adenocarcinomlinje i kultur at celecoxib NS-398 hemmet induksjon av Mcl-1, som igjen var forårsaket av oppregulert COX-2. Ved å transfektere celler med COX-2 eller tilføre PGE₂ eksogent oppnådde de en økning i mengden Mcl-1. Blokkering av PI3K-vegen med LY294002 eller Wortmannin svekket økningen av Mcl-1 og de konkluderte derfor med at COX-2 fremmer overlevelse ved å oppregulere mengden proapoptotiske proteiner (Mcl-1) gjennom å aktivere PI3K/Akt-vegen (se figur 2) (75).

En amerikansk multisenter fase II studie viste at kombinasjon av docetaxel og celecoxib til pasienter med fremskreden NSCLC (76). Studien viste at frekvens og grad av bivirkninger ikke endret seg fra monoterapi med docetaxel. En annen klinisk studie på tidlig stadium av NSCLC viste, sammenliknet med forventet respons uten celecoxib, at tillegg av celecoxib til preoperativ docetaxel og carboplatin ga en forbedret respons. Videre fant de at pasientene fikk normalisert PGE₂-nivåene i tumor ved en dose på 400 mg celecoxib daglig (77).

Masferrer og medarbeidere fant at celecoxib reduserte antall metastaser i en modell med Lewis lungecancer hos mus. Celecoxib tilsatt føret fra og med implantasjonsdagen hemmet veksten av implanterte carcinomaceller i poten (36).

Chen og medarbeidere (78) studerte flere forskjellige cellelinjer, inkludert NSCLC-linjer og fant at graden av ekspresjon av IL-8-mRNA korrelerte med in vitro grad av metastasering. Videre undersøkte de flere substanser og fant at blant annet celecoxib reduserte nivået av IL-8-mRNA med over 90 %.

Celecoxib og munnhulecancer

Ding og medarbeidere karakteriserte celecoxibs evne til å inducere apoptose i kulturerte celler fra premaligne og maligne epiteliale lesjoner. De demonstrerte at kjemiske varianter av celecoxib som mangler COX-2-inhiberende evne. Videre viste de at apoptose ble induert

gjennom aktivering av caspase-9 og caspase-3, men ikke caspase-8 – noe som tyder på at den mitokondriale vegen er implisert (se figur 2). Hemmere av caspase-3 og caspase-9, samt cyclosporin A som stabiliserer membranpotensialet i mitokondrier, svekket celecoxib-derivatenes evne til å indusere apoptose (79).

Celecoxib og nevroblastom

Johnsen og medarbeidere dokumenterte ekspresjon av COX-2 i nevroblastomalinjer og viste i xenograftforsøk på mus at COX-2-hemmerne diclofenac og celecoxib hemmet tumorveksten in vivo. In vitro fant de at apoptose ble induisert på caspaseavhengig basis. Med proton magnetisk resonans spektroskopi kunne de også vise at cellene behandlet med COX-2 hemmere viste en opphopning av flerumettede fettsyrer og en reduksjon i mengden kolinforbindelser i cellene (80).

Celecoxib og hematologisk cancer

Subhashini og medarbeidere studerte effekten av celecoxib på flere hematopoietiske cancer cellelinjer og fant en doseavhengig stans i cellesyklus i G₀/G₁-fase og induksjon av apoptose. I cellelinjen K562 undersøkte de apoptosemekanismen og påviste aktivering av PARP-1, reduksjon i Bcl-2-nivået uten endring i Bax-nivå. De fant også at celecoxib hemmet NF-κB (48).

Celecoxib og prostatacancer

Kulp og medarbeidere laget en kjemisk variant av celecoxib som ikke hemmet COX-2. De demonstrerte at både varianten og celecoxib selv, hemmet enzymet phosphoinositid-avhengig kinase-1 (PDK-1), noe som igjen hemmer Akt/PKB (se figur 3). Imidlertid var effekten på Akt/PKB større ved lavere konsentrasjon enn maksimal inhibisjon av PDK-1, noe de tilskriver en mulig effekt av en parallell defosforylering av PP2A (81). En annen studie fra den samme gruppen viste at i en tetracyclininduserbar COX-2 cellelinje av PC-3 celler, ga ikke hemmet ekspresjon av COX-2 apoptose. Følsomheten for celecoxib-indusert apoptose var også uavhengig av COX-2-ekspresjonen (82).

Dandekar og medarbeidere studerte PC-3ML-celler dyrket sammen med osteoblaster og viste at celecoxib opphevet den stromainduserte reduksjonen i apoptosefølsomhet for cellegiftene docetaxel og COL-3. Denne reduksjonen var ledsaget av nedsatt PGE₂, og cytotoxisiteten var assosiert med caspase-3- og -9- aktivering, PARP-spalting, øket BAD-konsentrasjon, men redusert nivå av XIAP og BCL-xL (50). Kulp og medarbeidere gjorde en studie med kjemiske derivater av celecoxib som manglet de COX-2-hemmende egenskapene. De demonstrerte at evnen til å hemme PDK-1 og derigjennom Akt/PKB korrelerte med induksjonen av apoptose i PC-3-celler (83). De viste og at overekspresjon av konstitutivt aktive former av PDK-1 og Akt delvis beskyttet mot de aktuelle medikamentene.

En in vitro studie av PC-3- og LNCaP-celler, som ikke uttrykker COX-2, viste at celecoxib i kliniske doser (2,5-5,0 μM) hemmet veksten av begge linjene. En annen selektiv COX-2

hemmer, rofecoxib, hadde ingen effekt. In vivo ga celecoxib en dose-avhengig vekstreduksjon av et PC-3 xenograft uten en ledsagende PGE₂ reduksjon i tumor (84).

Celecoxib og pancreascancer

Wei og medarbeidere studerte adenocarcinom fra pancreas og viste at celecoxib hemmet ekspresjonen av VEGF. Celecoxib påvirket VEGF gjennom å hemme transkripsjonsfaktoren Sp1s evne både til å binde seg til DNA og til å transaktivere transkripsjonen (85). De dokumenterte også at celecoxib gitt til mus implantert med FG-celler hadde en doseavhengig veksthemming på tumor. I en fase I studie med gemcitabin, celecoxib og stråleterapi rapporterte Crane og medarbeidere (86) at de opplevde betydelige problemer med toksisitet av kombinasjonen.

Andre studier

Celecoxib har også vært studert som mulig behandling for å hindre restenosering etter invasive coronarintervensjoner. In vivo studier på rotter viste at celecoxib tre dager etter intervensjon hindret proliferasjon av glatte muskelceller i karveggen, øket caspase-3 aktiveringen og øket antallet glatte muskelceller som gikk i apoptose. Studien demonstrerte også at mengden fosforylert Akt og fosforylert GSK-3 β (se figur 3) ble redusert av celecoxib-behandling. To uker etter intervensjon var det redusert intima-til-media ratio. Aspirin derimot hadde ingen effekt (87).

Niederberger og medarbeidere brukte en in vivo modell på rotte for å vise at celecoxib i store doser (200mg/kg) ikke ga inhibisjon av COX-2, men gjennom en aktivering og oppregulering av NF- κ B ledet til oppregulering av COX-2 proteinet (88).

Diskusjon

De mange studiene som er gjort både in vitro og in vivo tyder på at celecoxib kan ha en misjon i behandlingen av cancersykdommer. Om ikke som monoterapi så synes celecoxib å ha en potenserende effekt på etablerte behandlingsformer som cytostatika og strålebehandling. Spørsmålet er dog om de effekter man ønsker seg og som man hovedsakelig har observert på celler i kultur eller på xenografts på mus, lar seg reproducere i mennesker. Videre må det klarlegges bedre om disse medikamentene har alvorlige bivirkninger slik som ble klart med rofecoxib først etter lengre tids bruk. Det er en kjensgjerning av cancerpasienters fysiologi ofte er i ubalanse spesielt med tanke på metabolisme og katabolisme og derfor bør nye medikamenter følges med argusøyne i denne spesielle pasientpopulasjonen. Som motargument kan man selvfølgelig føre at de etablerte behandlingsregimene langt fra er uten bivirkninger. Unntakene til dette er få og tilhører de nytilkomne molekylære intervensjoner som monoklonale antistoffer mot signalmolekyler og hemmere av tyrosinkinaser og liknende. Disse omtales nå som "Targeted therapy". Eksempler inkluderer rituximab, cetuximab, bevazicumab, imatinib og gefitinib for å nevne noen.

Blant annet på lungekreftfronten har det vært gjort minimale fremskritt på behandlingsfronten de siste årene. Med tanke på at epidemiologiske data tyder på at befolkningen blir eldre og

med den en større insidens og prevalens av kreftsykdommer, er det grunn til å sette opp farten og få flere medikamenter både i pipelines og i kliniske studier.

Den seneste tiden har man også sett en spennende utvikling i retning av at medikamenter som har vært i bruk i lang tid og som man har antatt at man har kjent virkningsmekanismen på, har dukket opp på helt andre indikasjoner og vist seg å virke på mål fjernt fra det som opprinnelig var kjent eller teorien bak. Kartleggingen av det humane genom og en styrket forståelse av molekylære mekanismer på subcellulært nivå vil også bidra til at man kommer over flere slike forståelsesmodeller etter hvert.

Celecoxib, statiner, valproat og ACE-hemmere har alle fått "utvidet sin horisont" og på den måten bidratt til bedret forståelse av fysiologi og patofysiologi. Celecoxib som opprinnelig var utviklet som en selektiv COX-2-hemmer kan synes å være et proapoptotisk medikament som muligens har en plass i behandling av cancer. Statinene som opprinnelig skulle være lipidsenkende og bidra til en mer gunstig kolesterolprofil synes å ha en plass i cancerbehandlingen gjennom sin virkning på farnesylering og geranylgeranylisering. Valproat som synes å hemme epigenetisk medikamentrefraksjon kan ha en plass i behandlingen av tumores som er kjent som kjemoterapieresistente. Sist, men ikke minst synes ACE-hemmeren captopril å kunne bidra på sitt vis, også i cancerbehandlingen.

Det er neppe grunn til å tro at disse "incidental therapeutics" skal revolusjonere kreftbehandlingen på kort sikt. Dette til tross er de viktige bidrag siden de kan tenkes å potensere og gi synergistiske effekter i kombinasjon med eksisterende regimer. Et stort problem med forskning på cancer og cancersykdommer er at det er ualminnelig heterogene sykdommer, ofte også innenfor en og samme diagnostiske kategori. En må ha klart for seg hva man egentlig driver med for å kunne trekke riktig konklusjoner ut fra studier som er gjort og studier som vil komme. Det er grunn til å tro at en behandling som passer for kjemoterapinaive pasienter³ ikke nødvendigvis vil ha den samme effekt hos pasienter som har fått kjemoterapi. Tilsvarende viser molekylærgenetiske studier av tumorlinjer at de lar seg prognostisere og kategorisere etter hvilke gener som er opp- eller nedregulert. Det er ingen grunn til å tro at dette ikke også influerer på terapivalg. Innenfor feltet proteomics som studerer hvilke proteiner en celle uttrykker har en oppdaget at epigenetiske mekanismer også er viktige og prognostiske faktorer i progresjonen av cancersykdommer. En konsekvens av det er at Knudsons "two-hit" hypotese ikke bare gjelder for mutasjoner på gennivå, men også på reguleringen av selve genekspressjonen. Dermed står vi ovenfor et ekstremt komplisert bilde. Fremtidens kreftbehandling kan tenkes å være avhengig av: 1. hvilket vev tumor har oppstått i, 2. hvilke molekylærgenetiske kjennetegn den har (hvilke proteiner den uttrykker), 3. hvor langt tumor har progrediert (stadielinndeling), 4. hvilken behandling pasienten har fått tidligere, 5. hvilke sykdommer pasienten har fra før som kan tilsi kontraindikasjon for medikamenter, 6. hvilken tumorrettet behandling som tidligere er gitt og eventuelt i hvilken rekkefølge den er gitt. Med tanke på at klinisk onkologi i utgangspunktet er et fagfelt der en ofte kombinerer medikamenter i regimer, av og til også kombinert med strålebehandling, sier det seg selv at dette er en formidabel oppgave å ta fatt på. Vi snakker altså om "tailored therapy" i begrepets mest omfattende forstand.

Hva så med fremtiden? Ser den lys ut? Vanskelig å si. Det er et gjennomgående problem at en stadig større andel av forskningen finansieres og derigjennom styres av legemiddelindustrien. De er, som en dyd av nødvendighet selvfølgelig, avhengig av å tjene penger for å drive sin

³ Kjemoterapinaive pasienter; pasienter som ikke har mottatt kjemoterapi som ledd i behandlingen.

forretning. Det kan være et høyt spill fordi deres fokus alltid vil være på nye medikamenter fordi det er der patentene og pengene ligger. Mange sykdommer er i dag så sjeldne, eller affiserer grupper av mennesker med liten betalingsevne, at det finansielle potensiale er minimalt. Som konsekvens forskes det derfor også lite på disse lidelsene. Skal medisinsk forskning komme fellesskapet tilgode må også fellesskapet ta ansvar for at kunnskap koster.

Hver generasjon innbillen seg at den er mer intelligent enn den foregående, og klokere enn den som kommer etter.
– George Orwell

Referanser

- (1) Malka D, Pacault V, De BT, Ducreux M, Boige V. Antitumoral effect of celecoxib in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2005 Jul 20;23(21):4805-6.
- (2) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998 Sep;12(12):1063-73.
- (3) Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971 Jun 23;231(25):232-5.
- (4) Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 2004 Nov 8;215(1):1-20.
- (5) Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001 Oct;1(1):11-21.
- (6) Baek SJ, Wilson LC, Lee CH, Eling TE. Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 Jun;301(3):1126-31.
- (7) Baoping Y, Guoyong H, Jieping Y, Zongxue R, Hesheng L. Cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide suppresses telomerase activity by blocking Akt/PKB activation in gastric cancer cell line. *Dig Dis Sci* 2004 Jun;49(6):948-53.
- (8) Yuan CJ, Mandal AK, Zhang Z, Mukherjee AB. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene expression: novel effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 2000 Feb 15;60(4):1084-91.
- (9) Pompeia C, Lima T, Curi R. Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochem Funct* 2003 Jun;21(2):97-104.
- (10) Minter HA, Eveson JW, Huntley S, Elder DJ, Hague A. The cyclooxygenase 2-selective inhibitor NS398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E2 synthesis. *Clin Cancer Res* 2003 May;9(5):1885-97.

- (11) Marx J. Cancer research. Anti-inflammatories inhibit cancer growth--but how? *Science* 2001 Jan 26;291(5504):581-2.
- (12) Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, et al. Cyclooxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001 Sep;2(9):544-51.
- (13) Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003 Dec;4(6):431-6.
- (14) Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82.
- (15) Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2004 Sep 15;68(6):1089-100.
- (16) Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996 Jan 5;1299(1):125-40.
- (17) Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000 Oct 20;275(42):32783-92.
- (18) Brown JR, Dubois RN. COX-2: A Molecular Target for Colorectal Cancer Prevention. *J Clin Oncol* 2005 Apr 20;23:2840-55.
- (19) Williams CS, Mann M, Dubois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999 Dec 20;18(55):7908-16.
- (20) Helliwell RJ, Adams LF, Mitchell MD. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 Feb;70(2):101-13.
- (21) Stoehmacher J, Lenz H-J. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Colorectal Cancer. *Semin Oncol* 2003 Jun 1;30(3 Suppl 6):10-6.
- (22) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999 Oct;79(4):1193-226.
- (23) Müller R. Crosstalk of oncogenic and prostanoid signaling pathways. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004 Jun 15;130:429-44.
- (24) Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. *Cancer Detect Prev* 2004;28(2):127-42.
- (25) Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999 Jan 23;353(9149):307-14.
- (26) FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001 Aug 9;345(6):433-42.

- (27) Suh O, Mettlin C, Petrelli NJ. Aspirin use, cancer, and polyps of the large bowel. *Cancer* 1993 Aug 15;72(4):1171-7.
- (28) Haller DG. COX-2 inhibitors in oncology. *Semin Oncol* 2003 Aug;30(4 Suppl 12):2-8.
- (29) Brown WA, Skinner SA, Vogiagis D, O'Brien PE. Inhibition of beta-catenin translocation in rodent colorectal tumors: a novel explanation for the protective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2001 Nov;46(11):2314-21.
- (30) Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999 Dec;5(12):1418-23.
- (31) Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk Res* 2004 Feb;28(2):179-90.
- (32) Bae SH, Jung ES, Park YM, Kim BS, Kim BK, Kim DG, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001 May;7(5):1410-8.
- (33) Kern MA, Schubert D, Sahi D, Schoneweiss MM, Moll I, Haugg AM, et al. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology* 2002 Oct;36(4 Pt 1):885-94.
- (34) Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 2003 Sep;38(3):756-68.
- (35) Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001 Dec;121(6):1339-47.
- (36) Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000 Mar 1;60(5):1306-11.
- (37) Ohno Y, Ohno S, Suzuki N, Kamei T, Inagawa H, Soma G, et al. Role of cyclooxygenase-2 in immunomodulation and prognosis of endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2005 May 1;114(5):696-701.
- (38) Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, Zannoni GF, Gessi M, Legge F, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *J Clin Oncol* 2002 Feb 15;20(4):973-81.
- (39) Koki A.T., Leahy K.M., Harmon J.M., Masferrer J.L. Cyclooxygenase-2 and cancer. In: Harris RE, editor. *COX-2 blockade in cancer prevention and therapy*. Totowa: Humana Press; 2003. p. 185-203.

- (40) Kasum CM, Blair CK, Folsom AR, Ross JA. Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Use and Risk of Adult Leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Jun 1;12:534-7.
- (41) Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* 2001 Oct;15(12):2057-72.
- (42) Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996 Nov 29;87(5):803-9.
- (43) Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxidase synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
- (44) Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, et al. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Apr 15;10(8):2694-704.
- (45) Yazawa K, Tsuno NH, Kitayama J, Kawai K, Okaji Y, Asakage M, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 inhibits endothelial cell proliferation by induction of cell cycle arrest. *Int J Cancer* 2005 Feb 10;113(4):541-8.
- (46) Ermert L, Dierkes C, Ermert M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors. *Clin Cancer Res* 2003 May;9(5):1604-10.
- (47) Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005 Jan;55(1):10-30.
- (48) Subhashini J, Mahipal SVK, Reddanna P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. *Cancer Lett*. In press 2004.
- (49) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer. *Cell* 2000 Jul 1;100:57-70.
- (50) Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, Lokeshwar BL. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2005 Jun 20;115(3):484-92.
- (51) Dmitrovsky E. Combining cytotoxic chemotherapy with cyclooxygenase-2 inhibition. *J Clin Oncol* 2003 Jul 15;21(14):2631-2.
- (52) Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2934-49.
- (53) Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 2005 Apr 15;103(8):1551-60.
- (54) Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 Dec;36(12):2405-19.

- (55) Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 2002 Jan 25;108:153-64.
- (56) Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 2001 Mar 26;15:1022-32.
- (57) Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998 Mar 25;254:439-59.
- (58) Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000 Aug 1;14:2035-44.
- (59) Green DR. Apoptotic pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors. *Cell* 2000 Jul 7;102:1-4.
- (60) Thompson JE, Thompson CB. Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol* 2004 Oct 15;22(20):4217-26.
- (61) Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002 Jul;2(7):489-501.
- (62) Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996 Dec 2;15(23):6541-51.
- (63) Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998 Oct 2;95(1):29-39.
- (64) Perona R, Sanchez-Perez I. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Br J Cancer* 2004 Feb 9;90(3):573-7.
- (65) Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000 Jun 29;342(26):1946-52.
- (66) Awara WM, El-Sisi AE, El-Sayad ME, Goda AE. The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? *Pharmacol Res* 2004 Nov;50(5):487-98.
- (67) Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res* 2004 Nov;2(11):632-42.
- (68) Chow LW, Wong JL, Toi M. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer: preliminary report. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003 Sep;86(3-5):443-7.

- (69) Blanke CD, Mattek NC, Deloughery TG, Koop DR. A phase I study of 5-fluorouracil, leucovorin, and celecoxib in patients with incurable colorectal cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005 Jan;75(1-4):169-72.
- (70) Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, et al. Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell* 2004 Sep;6(3):285-95.
- (71) Williams CS, Watson AJ, Sheng H, Helou R, Shao J, Dubois RN. Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. *Cancer Res* 2000 Nov 1;60(21):6045-51.
- (72) Davis TW, O'Neal JM, Pagel MD, Zweifel BS, Mehta PP, Heuvelman DM, et al. Synergy between celecoxib and radiotherapy results from inhibition of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2, a survival factor for tumor and associated vasculature. *Cancer Res* 2004 Jan 1;64(1):279-85.
- (73) Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, et al. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-I activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* 2002 Aug 2;277(31):27613-21.
- (74) Buecher B, Bouancheau D, Broquet A, Bezieau S, Denis MG, Bonnet C, et al. Growth inhibitory effect of celecoxib and rofecoxib on human colorectal carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2005 Jan;25(1A):225-33.
- (75) Lin MT, Lee RC, Yang PC, Ho FM, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2001 Dec 28;276(52):48997-9002.
- (76) Nugent FW, Mertens WC, Graziano S, Levitan N, Collea R, Gajra A, et al. Docetaxel and cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib for advanced non-small cell lung cancer progressing after platinum-based chemotherapy: a multicenter phase II trial. *Lung Cancer* 2005 May;48(2):267-73.
- (77) Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, et al. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003 Jul 15;21(14):2645-50.
- (78) Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML, et al. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003 Feb;9(2):729-37.
- (79) Ding H, Han C, Zhu J, Chen CS, D'Ambrosio SM. Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int J Cancer* 2005 Feb 20;113(5):803-10.
- (80) Johnsen JJ, Lindskog M, Ponthan F, Pettersen I, Elfman L, Orrego A, et al. Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory

- drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2004 Oct 15;64(20):7210-5.
- (81) Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, et al. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004 Feb 15;64(4):1444-51.
- (82) Song X, Lin HP, Johnson AJ, Tseng PH, Yang YT, Kulp SK, et al. Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002 Apr 17;94(8):585-91.
- (83) Zhu J, Huang JW, Tseng PH, Yang YT, Fowble J, Shiao CW, et al. From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res* 2004 Jun 15;64(12):4309-18.
- (84) Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, et al. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 2005 Mar 1;11(5):1999-2007.
- (85) Wei D, Wang L, He Y, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res* 2004 Mar 15;64(6):2030-8.
- (86) Crane CH, Mason K, Janjan NA, Milas L. Initial experience combining cyclooxygenase-2 inhibition with chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer. *Am J Clin Oncol* 2003 Aug;26(4):S81-S84.
- (87) Yang HM, Kim HS, Park KW, You HJ, Jeon SI, Youn SW, et al. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling. *Circulation* 2004 Jul 20;110(3):301-8.
- (88) Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schmidtko A, Schmidt H, Euchenhofer C, et al. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J* 2001 Jul;15(9):1622-4.