

Biological role of cyclooxygenase-2 in veterinary oncology

Badowska-Kozakiewicz A.M., Department of Biophysics and Human Physiology, Medical University of Warsaw

The purpose of this paper was to present the role of cyclooxygenase-2 in veterinary neoplastic diseases. Cyclooxygenase, and in particular prostaglandin H synthase (PGHS), was first isolated in 1976 and then cloned in 1988. Today we know that cyclooxygenase occurs in two isoenzyme forms: COX-1 and COX-2. For a long time the primary difference between these isoenzymes has been interpreted in terms of expression as COX-1 being deemed constitutive, whereas COX-2 expression being inducible during pathologic conditions. In veterinary oncology, COX-2 expression was found in dogs suffering from epithelial cutaneous carcinoma, urinary bladder carcinomas, renal carcinomas, intestine adenocarcinomas, prostatic carcinomas, mastocyte tumors and also in mammary cancer. Furthermore, studies on COX-1 and COX-2 expression were conducted on laboratory animal models of mammary gland carcinoma and on *in vitro* models in cell cultures.

Keywords: cyclooxygenase-2, neoplasms, dogs.

Rola cyklooksygenazy-2 w onkologii weterynaryjnej

Anna M. Badowska-Kozakiewicz

z Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Wiadomo, że w nowotworach nabłonkowych wzrasta synteza prostaglandyn, które m.in. poprzez działanie immunosupresyjne mogą promować powstawanie przerzutów. W ciągu ostatnich 30 lat pojawiło się wiele publikacji, z których wynika, że jednym z ważnych etapów w procesie transformacji nowotworowej jest zwiększenie ekspresji indukowalnego enzymu uczestniczącego w syntezie cyklooksygenazy-2 (COX-2). Zebrano już wiele danych na to, że nadekspresja COX-2 jest niezbędna dla przemiany nowotworowej komórek nabłonkowych, o czym świadczy m.in. powszechne występowanie wysokiej ekspresji COX-2 w komórkach transformowanych i różnych typach nowotworów pochodzenia nabłonkowego u ludzi, jak również u zwierząt. Chociaż mechanizm tej zwiększonej ekspresji nadal nie został całkowicie wyjaśniony, to fakt, iż w kolejnych stadiach progresji raków dochodzi do coraz większego

stężenia COX-2 oraz prostaglandyn w guzach, skłonił badaczy do zastosowania blokujących ten enzym niesteroidowych leków przeciwzapalnych w celu sprawdzenia ich potencjalnego wpływu chemoprewencyjnego. Obserwacje kliniczne u ludzi i zwierząt wykazały, że podawanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSAiDs), np. aspiryny lub piroksykamu hamuje wzrost niektórych nowotworów (1). NSAiDs hamują aktywność cyklooksygenaz – enzymów, które katalizują przemianę kwasu arachidonowego w prekursorzy prostaglandyn oraz tromboksanów i przez to odgrywają ważną rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i w stanach patologicznych (np. zapalenia) w organizmie.

Struktura cyklooksygenazy-2 (COX-2)

Cyklooksygenaza, a właściwie syntaza cyklicznego nadtlenku prostaglandynowego

(PGHS) została wyizolowana w 1976 r., a następnie sklonowana w 1988 r. (2). Obecnie wiadomo, że cyklooksigenaza występuje w dwóch izoformach: COX-1 i COX-2 (2,3). Wykazano, iż odmiany te pełnią zróżnicowane funkcje w procesach utrzymania homeostazy organizmu zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, np. w przebiegu odczynu zapalnego ważną rolę prozapalną odgrywają zarówno COX-1, jak i COX-2, choć izoformy te wydają się kontrolować różne etapy procesu zapalnego (4). Ostatnio odkryto nową, przeciwzapalną aktywność cyklooksigenazy, zlokalizowaną w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (5), co pozwoliło na postawienie hipotezy wskazującej istnienie trzeciej izoformy COX-3 (4).

Cyklooksigenazy są homodimerami zarówno pod względem struktury, jak i funkcji. Każdy monomer składa się z trzech strukturalnych domen: domeny homologicznej do czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor – EGF), sąsiadującej z nim domeny wiążącej się z błoną (membrane binding domain) i dużej C-końcowej, globularnej domeny katalitycznej (globular catalytic domain). Każda cząsteczka COX ma centrum katalityczne dioksygenazy i peroksydazy, połączone ze sobą funkcjonalnie i strukturalnie. Centrum katalityczne dioksygenazy zlokalizowane jest w rdzeniu enzymu, w kanale hydrofobowym, a centrum katalityczne peroksydazy znajduje się w pobliżu powierzchni cząsteczki (6). Wszystkie izoenzymy COX są umiejscowione na wewnętrznej powierzchni siateczki śródplazmatycznej, a także na wewnętrznej i zewnętrznej powierzchni otoczki jądrowej (7). Strukturę cyklooksigenazy można sobie wyobrazić jako bańkę tkwiącą otwartym końcem w siateczce śródplazmatycznej. Przez otwór do wnętrza enzymu dostaje się kwas arachidonowy, służący jako materiał do syntezy prostaglandyn. Kiedy jednak do wnętrza dostanie się cząsteczka aspiryny, odłącza się od niej reszta acetylowa i przyłącza do jednego z aminokwasów budujących cyklooksigenazę. W ten sposób enzym zostaje zablokowany i nie może już syntetyzować. Obie izoformy mają zbliżoną budowę pod względem masy cząsteczkowej. Zgodność sekwencji między ludzkim białkiem COX a białkiem COX innych gatunków ssaków wynosi około 85% (8).

Biologiczne właściwości cyklooksigenazy-2

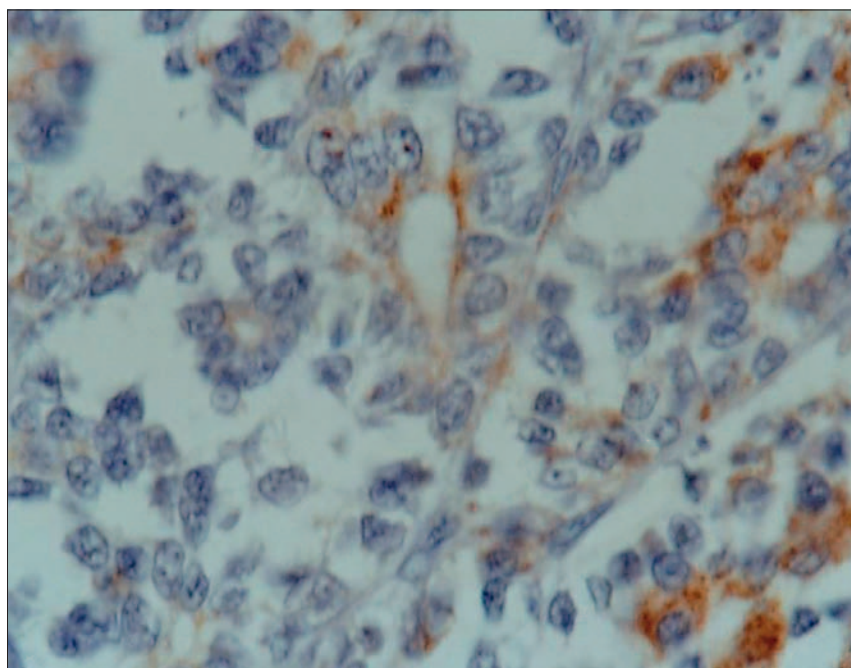
Przez dłuższy czas za podstawową różnicę pomiędzy izoformami uważano fakt, iż ekspresja COX-1 jest konstytutywna, tj. zachodzi w sposób ciągły, zarówno

w warunkach fizjologicznych, jak i w stanach chorobowych, podczas gdy ekspresja COX-2 jest indukowana w stanach patologicznych. Doświadczalnie udowodniono, że ekspresja genu kodującego COX-1 jest stała i podlega niewielkiej regulacji przez czynniki wewnątrzkomórkowe. Izoforma konstytutywna cyklooksigenazy została wyizolowana z większości komórek. COX-1 to błonowy enzym występujący w wielu tkankach i narządach, biorący udział m.in. w syntezie tromboksanu (TXA₂) i prostacykliny (6). Jednakże zwiększona ekspresja COX-1 została potwierdzona także w stanach patologicznych. Nasiloną ekspresję COX-1 zaobserwowano w komórkach śródbłonna naczyniowego i miocytach w bezpośrednim sąsiedztwie blaszek miażdżycowych, a także w obrębie samych zmian (9). Postać konstytutywną wykryto także w komórkach maziówki w przebiegu choroby reumatoidalnej (10). Poza tym w pewnych przypadkach może zachodzić indukowana ekspresja COX-1. Wykazano, iż indukcja COX-1 towarzyszyła różnicowaniu się ludzkiej linii białaczki monocytowej wywołanej przez ester forbolu, a czynnik komórki macierzystej (stem cell factor – SCF) i deksametazon wywoływały ekspresję COX-1 w mastocytach pozyskanych ze szpiku kostnego myszy (11). Izoforma indukowalna COX-2 była do niedawna utożsamiana tylko z odpowiedzią na stres i czynniki inicjujące zapalenie. Jej fizjologiczną obecność potwierdzono jednak m.in. w mózgu, rdzeniu kręgowym, nerce osobników dorosłych, łożysku, a także chrząstce, sercu, płucach i skórze płodu (12).

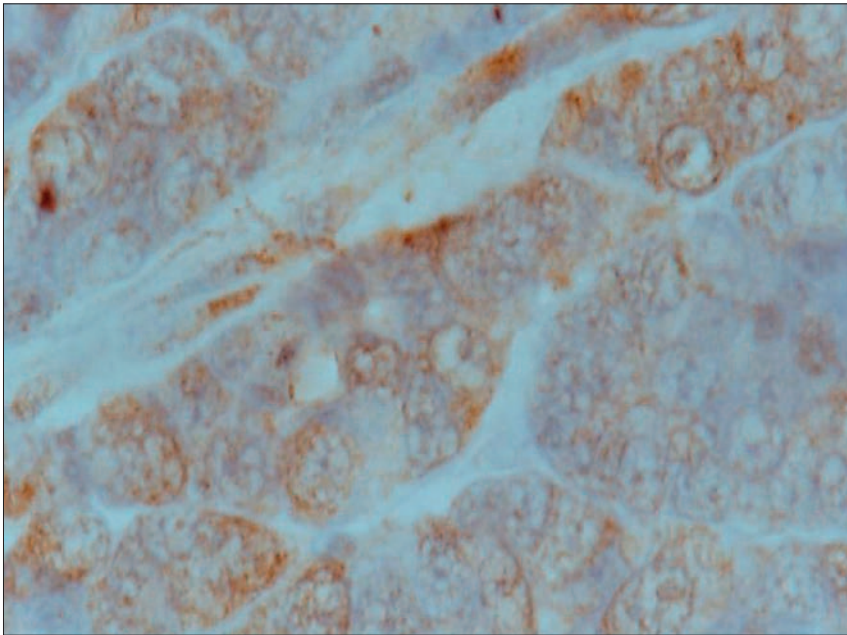
Obecny stan wiedzy dotyczący cyklooksigenazy-2 w onkologii weterynaryjnej

W medycynie ludzkiej stwierdzono ekspresję COX-2 w wielu nowotworach, głównie w raku gruczołowym jelita grubego, niektórych rakach gruczołowych sutka, jak i w raku przewodowym *in situ* w sutku. Przy zastosowaniu techniki RT-PCR stwierdzono zwiększoną ekspresję mRNA COX-2 w guzach sutka w porównaniu z prawidłową tkanką (13). Ponadto ekspresję cyklooksigenazy-2 stwierdzono w raku sutka (14), w raku gruczołowym płuc (15), raku płaskonabłonkowym i gruczołowym przełyku oraz w pierwotnym czerniaku złośliwym (16). Ostatnie lata przyniosły wiele nowych danych na ten temat także w onkologii weterynaryjnej. Stwierdzono ekspresję COX-2 u psów w raku płaskonabłonkowym (17), raku pęcherza moczowego (18), raku nerki (19), gruczolakorakach jelita (20) i w raku gruczołu krokowego (21), w guzach komórek tucznych (22) oraz w nowotworach gruczołu sutkowego (22, 23, 24, 25, 26) (ryc. 1, ryc. 2). Badania ekspresji COX-1 i COX-2 prowadzone były także w rakach sutka na modelu zwierząt laboratoryjnych (27) oraz w hodowlach komórkowych (28). Z tych ostatnich badań wynika, że ekspresję COX-2 wiąże się ze złą prognozą.

Mimo licznych badań dotyczących ekspresji COX-2 w nowotworach, nadal jest znany mechanizm działania tego enzymu. Wiadomo z badań u ludzi, że ekspresja COX-2 wiąże się ze złą prognozą (14). Wysoka ekspresja COX-2 jest powszechna w nowotworach pochodzenia



Ryc. 1. Gruczolakorak złośliwy (*adenocarcinoma complex*) u psa, IHC, obraz komórek wykazujących ekspresję cyklooksigenazy – 2 (zabarwione na brązowo), pow. 100×



Ryc. 2. Gruczolakorak prosty (*adenocarcinoma simplex*) u psa, IHC, obraz komórek wykazujących ekspresję cyklooksygenazy – 2 (zabarwione na brązowo), pow. 100×

nabłonkowego i przypuszcza się, że może brać udział w karcynogenezie poprzez blokowanie apoptozy i promowanie ekspresji antyapoptotycznego białka bcl-2 (29). Ponadto COX-2 ma wpływ na angiogenezę nowotworową i ekspresję metaloproteinaz, przez co promuje wzrost raków sutka, a także ich inwazyjność (14, 30). Stwierdzono także, że gen HER-2 aktywuje ekspresję COX-2 w komórkach raka jelita grubego u ludzi, co wzmacnia proliferację komórek i podnosi ich potencjał przerzutowy (31). Wykazano wpływ prostaglandyn produkowanych przy udziale COX-2 na aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych w nowotworach sutka u kobiet (32). Dotychczasowe badania prowadzone w nowotworach gruczołu sutkowego suki wykazały ekspresję COX-2, lecz nie uzyskano odpowiedzi, co do związku tej ekspresji z innymi czynnikami uważanymi za markery prognostyczne, jak aktywność proliferacyjna, stopień histologicznej złośliwości czy ekspresja receptorów estrogenowych.

Cyklooksygenaza-2 wydaje się niezwykle interesująca z punktu widzenia nowego markera w diagnostyce patomorfologicznej nowotworów u zwierząt towarzyszących człowiekowi (ryc. 1, 2). Dane literaturowe na temat cyklooksygenazy-2 i jej diagnostycznej wartości w różnicowej ocenie histopatologicznej nowotworów u zwierząt są skąpe. W związku z tym istnieje potrzeba kontynuowania badań w tym zakresie celem potwierdzenia dotychczasowych doniesień literaturowych, że cyklooksygenaza-2 może być przydatnym markerem w diagnostyce nowotworów. Potwierdzenie dotychczasowej wiedzy na temat cyklooksygenazy-2 jako przydatnego markera mogłoby pozwolić na włączenie

COX-2 w poczet obecnie uznanych i oznaczanych czynników prognostycznych, takich jak: antygen jądrowy Ki-67, PCNA, białko p53 w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej.

Piśmiennictwo

- Schmidt J., Stoffels B., Azir A., Dehaven-Hudkins D.L., Bauer A.J.: Alvimopan and COX-2 inhibition reverse opioid and inflammatory components of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2008, **20**, 689-699.
- Katori M., Majima M.: Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application if its selective inhibitors. *Inflamm Res* 2000, **49**, 367-392.
- Smith W.L., Garavito R.M., Dewitt D.L.: Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 33157-33160.
- Willoughby D.A., Moore A.R., Colville-Nash P.R., Gilroy D.: Resolution of inflammation. *Int. J. Immunopharmacol.* 2000, **22**, 1131-1135.
- Busse W.W.: Leukotrienes and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998, **157**, S210-213; discussion S247-218.
- Anderson G.D., Hauser S.D., Mcgarity K.L., Bremer M.E., Isakson P.C., Gregory S.A.: Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J. Clin. Invest.* 1996, **97**, 2672-2679.
- Tomlinson A., Appleton I., Moore A.R., Gilroy D.W., Willis D., Mitchell J.A., Willoughby D.A.: Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br. J. Pharmacol.* 1994, **113**, 693-698.
- Colville-Nash P.R., Gilroy D.W.: COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins-a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins Lipid Mediat.* 2000, **62**, 33-43.
- Smith W.L., Dewitt D.L., Garavito R.M.: Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 2000, **69**, 145-182.
- Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willis D., Chivers J., Paul-Clark M.J., Willoughby D.A.: Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* 1999, **5**, 698-701.
- Gilroy D.W., Colville-Nash P.R.: New insights into the role of COX2 in inflammation. *J. Mol. Med.* 2000, **78**, 121-129.
- Yasojima K., Schwab C., McGeer E.G., McGeer P.L.: Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res.* 1999, **830**, 226-236.
- Cocconi F., Akarsu E.S.: Prostaglandin E2 in the pathogenesis of fever. An update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998, **856**, 76-82.

- Ristimäki A., Nieminen O., en K., Hotakainen K., Nordling S., Haglund C.: Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am. J. Pathol.* 2001, **158**, 849-853.
- Crofford L.J.: COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.* 1997, **24**, 15-19.
- Dean A.M., Dean F.M.: Carbocations in the synthesis of prostaglandins by the cyclooxygenase of PGH synthase? A radical departure! *Protein Sci.* 1999, **8**, 1087-1098.
- Pestili de Almeida E.M., Piché C., Sirois J., Doré M.: Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J. Histochem. Cytochem.* 2001, **49**, 867-875.
- Khan K.M., Stanfield K.M., Trajkovic D., Knapp D.W.: Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet. Pathol.* 2001, **38**, 116-119.
- Khan K.N., Knapp D.W., Denicola D.B., Harris R.K.: Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2000, **61**, 478-481.
- McEntee M.F., Cates J.M., Neilsen N.: Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet. Pathol.* 2002, **39**, 428-436.
- Tremblay C., Doré M., Bochsler P.N., Sirois J.: Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 1999, **91**, 1398-1403.
- Heller D.A., Clifford C.A., Goldschmidt M.H., Holt D.E., Manfredi M.J., Soren K.U.: Assessment of cyclooxygenase-2 expression in canine hemangiosarcoma, histiocytic sarcoma, and mast cell tumor. *Vet. Pathol.* 2005, **42**, 350-353.
- Doré M., Lanthier I., Sirois J.: Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2003, **40**, 207-212.
- Nowak M., Madej J.A., Dziegiel P.: Immunohistochemical localization of cox-2 in cells of mammary adenocarcinomas in bitches as related to tumour malignancy grade. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2005, **49**, 433-437.
- Nowak M., Dziegiel P., Dzimira S., Madej J.A.: Immunohistochemiczna lokalizacja HER-2 i COX-2 w komórkach nowotworów nabłonkowych gruczołu sutkowego suki. *Medycyna Wet.* 2005, **61**, 1284-1287.
- Queiroga E.L., Alves A., Pires I., Lopes C.: Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *J. Comp. Path.* 2007, **136**, 177-185.
- Lanza-Jacoby S., Burd R., Rosato F.E. Jr, McGuire K., Little J., Noughbilly N., Miller S.: Effect of simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in HER-2/neu-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006, **12**, 6161-6169.
- Liu X.H., Rose D.P.: Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1996, **56**, 5125-5127.
- Gatley S.: The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2000, **19**, 19-27.
- Dempke W., Rie C., Grothey A., Schmol H.J.: Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001, **127**, 411-417.
- Kozłowski W., Szacikowska E.: Wielokierunkowe działanie herceptynu w komórkach raka z nadekspresją receptora HER2 (białka p185). *Współcz. Onkol.* 2001, **6**, 254-259.
- Costa C., Soares R., Reis-Filho J.S., Leitão D., Amendoeira I., Schmitt F.C.: Cyclooxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002, **55**, 429-434.

Dr Anna M. Badowska-Kozakiewicz, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, e-mail: abadowska@wum.edu.pl