

سیکلوآکسیژنازها، پیشگیری و درمان سرطان

رویا شریفی*، دکتر مهدی هدایتی**، یوسف رسمی***، محمد رحمتی یامچی***،

فائزه فاطمی***، ابوالفضل دادخواه***، دکتر عبدالامیر علامه***

* گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
** مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
*** گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

سیکلوآکسیژناز (Cox) آنزیمی کلیدی در تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین‌ها و دارای دو ایزوزیم Cox-1 و Cox-2 است. هر دو ایزوزیم به وسیله داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی نظیر ایندومتاسین و ایبوپروفن مهار می‌شوند. آنزیم Cox-1 در اکثر بافت‌ها بطور پیوسته بیان می‌شود و در عملکردهای فیزیولوژیک دخیل است، در حالی که آنزیم Cox-2 به عنوان جزئی از واکنش‌های التهابی در پاسخ به تحریکات خارج سلولی سریع‌القاء شده و در اعمال پاتولوژیکی دخالت دارد. در حقیقت، Cox-2 با التهاب، درد، رگ‌زایی، سرطان و الزایمر ارتباط دارد. با توجه به نقشی که Cox-2 ممکن است در ایجاد سرطان داشته باشد، در تحقیقات جدید به عنوان یک استراتژی امیدبخش و مؤثر برای درمان و جلوگیری از سرطان مورد توجه قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: سیکلوآکسیژناز، سرطان، پروستاگلاندین، داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی.

مقدمه

آمینهای و فعالیت آنزیمی مشابه می‌باشند ولی از لحاظ الگوی بیان و عملکرد سلولی تفاوت دارند (۵). آنزیم Cox-1 در اکثر بافت‌ها بطور پیوسته بیان می‌شود، در حالی که Cox-2 به عنوان جزئی از واکنش‌های التهابی در پاسخ به تحریکات خارج سلولی سریع‌القاء می‌گردد و میزان آن در اغلب بافت‌های طبیعی غیر قابل سنجش می‌باشد. به علاوه Cox-2 نقش مهمی در تنظیم تکثیر سلولی، تمایز زایی و سرطان‌زایی ایفاء می‌کند (۶). در واقع Cox-2 با التهاب، درد، رگ‌زایی، سرطان و بیماری الزایمر ارتباط دارد (۴). مطالعات زیادی افزایش میزان Cox-2 در سلول‌های ترانسفرم شده و اشکال مختلف سرطان را نشان داده‌اند (۸، ۷). مطالعات بالینی و اپیدمیولوژیکی حاکی از کاهش خطر ایجاد تومورهای بدخیم مثل سرطان کولون در اثر مصرف منظم داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی مثل آسپرین و سالینداک می‌باشند. بنابراین

آنزیم سیکلوآکسیژناز (Cox) یا پروستاگلاندین اندوپراکسید H سنتاز (PGHS) که ۲۰ سال پیش برای اولین بار شناخته شد، آنزیم کلیدی در تبدیل اسید آراشیدونیک به پروستاگلاندین‌ها است. در سال ۱۹۷۶ تخلیص و فعالیت آنزیمی سیکلوآکسیژناز مشخص گردید (۱). در سال ۱۹۹۱ مشخص شد در پستانداران دو ایزوفرم از این آنزیم، بنام‌های Cox-1 و Cox-2 با ژن‌های مستقل و الگوی بیان متفاوت وجود دارد (۳، ۲). داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی نظیر آسپرین، از ۱۰۰ سال پیش جهت مهار ایزوزیم‌های سیکلوآکسیژناز در اختیار همگان می‌باشند (۴). دو ایزوزیم مذکور از لحاظ اندازه، توالی اسید

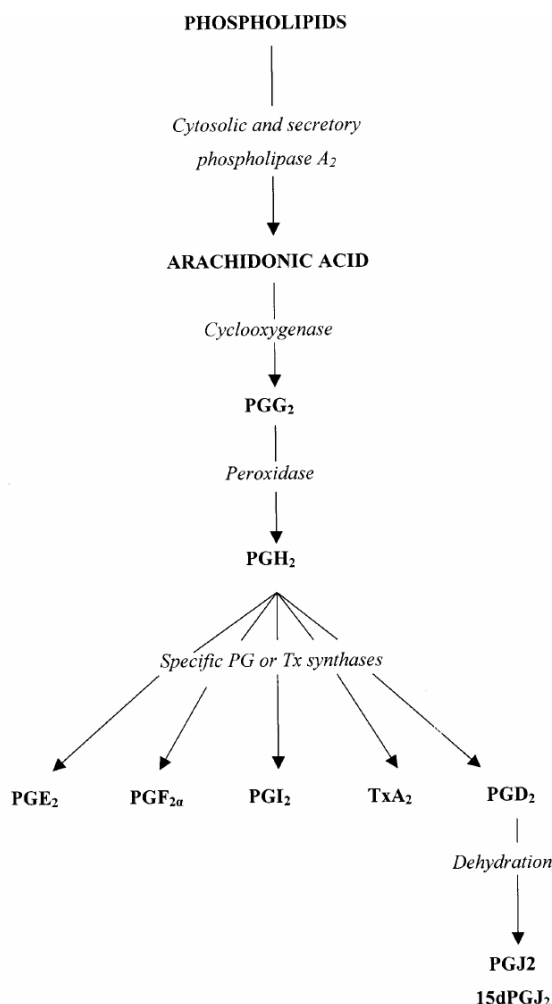
آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوشیمی بالینی، دکتر عبدالامیر علامه

(email: allameha@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۱۲

آراشیدونیک آزاد می‌باشد. در مرحله بعد آنزیم سیکلواکسیژناز که یک آنزیم محدودکننده سرعت می‌باشد، تشکیل پروستاگلاندین H₂ را از اسید آراشیدونیک کاتالیز می‌کند. این آنزیم دارای دو عملکرد آنزیمی مجزا می‌باشد: یک فعالیت سیکلواکسیژنازی که اسید آراشیدونیک را به پروستاگلاندین G₂ تبدیل می‌کند و یک خاصیت پراکسیدازی که پروستاگلاندین G₂ را به پروستاگلاندین H₂ تبدیل می‌کند (۷). فعالیت پراکسیدازی سیکلواکسیژنازها، برای حداکثر سنتز آنزیمی پروستاگلوئیدها لازم است. تنها فعالیت اکسیژنازی ایزوزیم‌ها بوسیله داروهای ضدالتهای غیراستروئیدی مهار می‌شود (۹).



شکل ۱- مسیر بیوسنتز پروستاگلوئیدها (۱۵). آنزیم فسفولیپاز A₂ فراهم کننده اصلی اسید آراشیدونیک است ولی اسید آراشیدونیک از طریق فسفولیپاز C و فسفولیپاز D می‌تواند تولید شود. پروتئین سیکلواکسیژناز دارای دو فعالیت آنزیمی جداگانه می‌باشد. مهار فعالیت سیکلواکسیژناز فعالیت پراکسیدازی را مهار نمی‌کند. تمام محصولات پروستاگلوئیدی دارای یک پیش‌ساز مشترک، پروستاگلاندین H₂، و آنزیم‌های سنتز جداگانه می‌باشند. ولی تنها پروستاگلاندین سنتز E₂ بوسیله تحریکاتی که سیکلواکسیژناز-۲ را القاء می‌کند، القاء می‌شود. لیگندهای پروستاگلاندین سیکلوپنتانون برای گیرنده هسته‌ای PPAR γ ، پروستاگلاندین J₂ (PGJ₂) و ۱۵-دزوکسی-دلتا ۱۲-۱۴- پروستاگلاندین J₂ (15dPGJ₂) تنها از پروستاگلاندین D₂ تشکیل می‌شوند

مهار Cox-2 به عنوان یک استراتژی امیدبخش و مؤثر برای درمان و جلوگیری از سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۹).

تاریخچه سیکلواکسیژناز

آنزیم سیکلواکسیژناز به عنوان آنزیم اصلی تنظیم‌کننده ساخت پروستاگلاندین‌ها، در دهه ۱۹۸۰ توسط Bailey و Needleman شناخته شد (۹). تا سال ۱۹۹۱، تنها یک ایزوزیم از این آنزیم (ایزوزیم Cox-1، PGHS-1 یا آنزیم دائمی Constitutive enzyme) شناخته شده بود. در سال ۱۹۹۱، Simmons و Herschman و همکارانش mRNAهایی را کشف کردند که بیانشان در فیبروبلاست‌های موش و مرغ به ترتیب در پاسخ به Src و القاء کننده تومور Phorbol ester افزایش پیدا می‌کند. ۶۰٪ از توالی اسید آمینه پروتئین کد شده توسط این mRNA با PGHS-1 یکسان بود. در تحقیقات بعدی این پروتئین جدید PGHS-2، Cox-2 یا ایزوفرم القاء‌پذیر (Inducible enzyme) نامیده شد که از لحاظ ساختاری مشابه PGHS-1 و از لحاظ الگوی بیان و بیولوژی از PGHS-1 متفاوت می‌باشد. تا کنون علت وجود دو ایزوزیم PGHS مشخص نشده است (۱۰).

ساختار پروتئینی سیکلواکسیژناز

سیکلواکسیژنازها پروتئین‌های داخل غشایی (Integral protein)، گلیکوزیله و همودیمر، متشکل از زیر واحدهای ۷۰ کیلودالتونی می‌باشند که هر کدام از زیر واحدها دارای یک مولکول هم و یک جایگاه کاتالیتیکی بوده و از طریق سطوح هیدروفوبیک هلیکس‌های آمفی پاتیک در یک لایه از غشاء فسفولیپیدی قرار می‌گیرند (۱۰). اگرچه فرض شده که هر دو زیر واحد هم‌زمان فعال هستند، تحقیقات جدید نشان داده که اتصال سوبسترا یا مهار کننده در جایگاه فعال یک زیر واحد مانع از اتصال مولکولها به زیر واحد دیگر می‌شود (۱۱). هر دو ایزوزیم Cox-1 و Cox-2 در سطوح لومنی شبکه آندوپلاسمی و غشاء داخلی و خارجی پوشش هسته وجود دارند (۱۲). همانطور که گفته شد، ۶۰٪ از توالی اسید آمینه پروتئین‌های Cox-1 و Cox-2 به هم شباهت دارند (۹). ایزوزیم‌های سیکلواکسیژناز از لحاظ ساختار جایگاه فعال نیز به هم شبیه می‌باشند (۱۳).

سیکلواکسیژنازها و سنتز پروستاگلوئیدها

اولین مرحله در سنتز پروستاگلاندین‌ها هیدرولیز فسفولیپدهای غشاء بوسیله فسفولیپاز A₂ برای تولید اسید

در سلولهای حاوی هر دو ایزوزیم، فعالیت ایزوزیمها بوسیله غلظت موضعی سوپسترا (اسید آراشیدونیک) و میزان بیان آنزیم تعیین می‌شود. برای مثال Cox-1 در غلظت‌های پایین اسید آراشیدونیک غیر فعال و Cox-2 فعال می‌باشد. در سلول‌هایی که هر دو ایزوزیم Cox-1 و Cox-2 وجود دارد، Cox-2 پروستاگلاندین سنتتازهایی را فعال می‌کند که منجر به تولید پروستاگلاندینهای E2 و پروستاگلاندین شوند (۱۳). آراشیدونیک اسید توسط ایزوفریم فسفولیپاز ترشحی ۱۴ کیلودالتونی (SPLA2) و یا ایزوفریم فسفولیپاز A2 سیتوپلاسمی (CPLA2) ۸۵ کیلودالتونی، از غشاء سلولی آزاد می‌شود. اسید آراشیدونیک تولید شده توسط فسفولیپاز سیتوپلاسمی، برای PGHS1 قابل دسترس نمی‌باشد. این اسید آراشیدونیک بوسیله PGHS2 به پروستاگلاندین H2 تبدیل می‌شود (۱۶). اما فسفولیپاز A2 محلول، اسیدآراشیدونیک لازم برای فعالیت Cox-1 را مهیا می‌سازد. بررسی‌های Herschman نشان داد که آزاد شدن فسفولیپاز محلول از سلولهای مجاور، تنظیمی برای فعالیت Cox-1 می‌باشد (۴). بنابراین، سنتز پروستاگلوئیدها بوسیله هر دو آنزیم سیلکواکسیژناز و فسفولیپاز کنترل می‌گردد (۱۳). همچنین مهار سنتز پروستاگلوئیدها بوسیله جلوگیری از آزاد شدن اسید آراشیدونیک بوسیله فسفولیپاز و یا مهار کردن فعالیت سیلکواکسیژناز از اهداف مهم فارماکولوژی می‌باشد (۴).

نحوه تنظیم بیان ژن سیلکواکسیژناز

ژن‌های Cox-1 و Cox-2 به ترتیب در نواحی کروموزومی 9q32-q33.3 و 1q25.2-q25.3 قرار دارند (۱۷). ژن Cox-1 دارای ۲۲، ۱۱ اگزون و فاقد TATAbox است. در مورد نحوه تنظیم بیان ژن Cox-1 اطلاعات کمی در دسترس می‌باشد. طول ژن Cox-2، ۸ kb و دارای ۱۰ اگزون است (۱۳). ژن Cox-2 دارای یک TATAbox و عناصر افزایشنده (Enhancer) القاءپذیر، از قبیل CRE، NF-kB می‌باشد (۱۸). با اینکه Cox-2 به عنوان ایزوفریم القاءپذیر شناخته شده است، اما در مغز، سلولهای اپیتلیال نای، کلیه و ماکولاندنسا همیشه بیان می‌شود (۱۰). طبق مطالعات اخیر آنزیم سیلکواکسیژناز دارای نیمه عمر کوتاهی است، لذا تنظیم آن عمدتاً در سطح نسخه‌برداری صورت می‌گیرد (۱۰). تنظیم بیان این دو ایزوزیم در مرحله بعد از نسخه‌برداری (Post transcriptional) و ترجمه به علت تفاوت در توالی نسخه‌برداری شده ۳ ترجمه نشونده (Untranslated region)، متفاوت می‌باشد. برخلاف Cox-1، بیان Cox-2 بوسیله سیتوکین‌های پیش التهابی مثل

پس از تولید پروستاگلاندین H2 پروستاگلاندین/ترومبوکسان سنتتازهای اختصاصی هر بافت، آنرا به پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان‌ها تبدیل می‌کنند (شکل ۱). پروستاگلاندین‌های سری J2 که دارای یک گروه کربونیل غیراشباع α و β واکنش‌پذیر در حلقه سیکلوپنتانون می‌باشند، دارای اثراتی از قبیل فعالیت ضدتوموری، مهار سیکل سلولی، مهار تکثیر ویروس و تحریک استئوژنز می‌باشند (۱۴).

اعمال پروستاگلاندینها

پروستاگلاندین‌ها در عملکردهای مختلفی از قبیل انعقاد خون، تخمک‌گذاری، شروع زایمان، متابولیسم استخوان، رشد و تکامل اعصاب، بهبود زخم‌ها، عملکرد کلیه، ضربان رگ‌ها، تنظیم آب کلیه، تقسیم سلولی و پاسخ‌های ایمنی دخالت دارند. همچنین بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیکی و بالینی پروستاگلاندین‌ها نقش مهمی را در پاتوفیزیولوژی سرطان و التهاب بازی می‌کنند (۱۴).

بیولوژی سیلکواکسیژنازها

همانطور که ذکر شد محصول سیلکواکسیژناز ۱ و ۲، پروستاگلاندین H2 پیش‌ساز ترومبوکسان A2 (TXA2)، پروستاگلاندین I2 یا پروستاگلاندین (PGI2) و دیگر پروستاگلاندین‌ها می‌باشد. پاسخ‌های بیولوژیکی نهایی عمل سیلکواکسیژنازها را پروستاگلوئیدها تعیین می‌کنند. برای مثال همان ایزوفریم سیلکواکسیژناز که در پلاکت‌ها منجر به تشکیل TXA2 و انقباض عروق و تجمع پلاکت‌ها می‌شود، در سلول‌های اندوتلیال با تولید PGI2 باعث انبساط عروق شده و مانع تجمع پلاکت‌ها می‌شود. این مشاهده ناشی از عدم وجود PGI2 سنتتاز در پلاکت‌ها و TXA2 سنتتاز در سلول‌های اندوتلیال می‌باشد. اهمیت این آنزیم‌ها با تشخیص ایزوفریم قابل‌القاء پروستاگلاندین E2 سنتتاز تأیید شده است. بنابراین اثرات بیولوژیکی نهایی فعالیت Cox-2 غالباً مربوط به پروستاگلاندین E2 می‌باشد (۱۵). برخی فعالیت‌های فیزیولوژیکی پروستاگلاندین تنها توسط یک ایزوفریم سیلکواکسیژناز انجام می‌گیرد. برای مثال، Cox-1 برای تجمع پلاکت‌ها بواسطه ترومبوکسان در پلاکتهای انسانی در زمان زایمان مهم است، در حالی که Cox-2 برای تخمک‌گذاری و لانه‌گزینی اهمیت دارد. در فرآیندهایی مانند التهاب و سرطان‌زایی، هر دو ایزوفریم Cox-1 و Cox-2 دخالت دارند. در التهاب، Cox-2 نقش دو گانه‌ای را در شروع و از بین بردن التهاب ایفا می‌کند (۱۳).

جدول ۱- مقایسه مشخصات سیکلوکسیژنازها (۲۲)

خصوصیت	سیکلوکسیژناز ۱ (انسان)	سیکلوکسیژناز ۲ (انسان)	سیکلوکسیژناز ۳ (سگ)
اندازه ژن	۲۲ کیلو باز	۸/۳ کیلو باز	نامشخص
کروموزوم	۹	۱	نامشخص
mRNA	۲/۸ کیلو باز	۴/۱ کیلو باز	۵/۲ کیلو باز
تنظیم mRNA	دائمی	دائمی، القایی	دائمی، القایی؟
اسید آمینه	۵۹۹	۶۰۴	۶۳۳
وزن مولکولی	۷۰ کیلو دالتون	۷۲-۷۰ کیلو دالتون	۶۵ کیلو دالتون
جایگاه	غشاء، شبکه اندوپلاسمی	غشاء، شبکه اندوپلاسمی، سیتوپلاسم	غشاء، شبکه اندوپلاسمی
گلیکوزیلاسیون	n- ترمینال	n- ترمینال	n- ترمینال
جایگاه استیلاسیون با آسپرین	سرین ۵۲۹	سرین ۵۱۶	نامشخص
سوبسترای اختصاصی	اسید آراشیدونیک	اسید آراشیدونیک	اسید آراشیدونیک
	گاما- لینولنیک اسید	گاما- لینولنیک اسید	نامشخص
آلفا- لینولنیک ایکوزاپنتانویک اسید			

اینترلوکین ۱ و فاکتورهای رشد مثل فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، P53 و آنتی اکسیدانها کاهش می یابد. هم چنین از بین رفتن اثر مهاری P53 باعث بیان بیش از حد iNOS شده که احتمالاً بیان Cox-2 را تحریک می کند. نیمی از سرطان های کلون دارای آنکوژن ras موتانت یافته می باشند. آنکوژن فعال ras فیبروبلاست های رت را ترانسفرم، Cox-2 را القاء کرده و تکثیر را تحریک می کند. بنزوپیرن که یک هیدروکربن آروماتیک پلی سیکلیک در دود سیگار می باشد، نسخه برداری Cox-2 و سنتز پروستاگلندین E2 را در محیط کشت سلول های اپی تلیال دهان افزایش می دهد. رتینوئیدها القاء Cox-2 را مهار می کنند، در حالی که بیان رسپتور EGF بدون تغییر باقی می ماند. اشعه ماوراء بنفش B یک فاکتور خطر در سرطان پوست می باشد. تاباندن ۳۰ میلی ژول بر سانتی متر مربع از این اشعه به سلول های کراتینی پوست باعث افزایش Cox-2 و پروستاگلندین E2 به میزان شش برابر سلول های کنترل می شود (۱۹).

طور طبیعی در اغلب سلول ها (به جز مغز و کلیه) وجود ندارد و در عرض ۴-۲ ساعت به میزان زیادی در شرایط پاتولوژی (اغلب التهاب) بیان می شود (۱۳،۱۰). آنزیم Cox-1 باعث تولید پروستاگلندین هایی می شود که در عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی مثل نگهداری موکوس معده و تنظیم جریان خون کلیوی دخیل می باشند (۷). در حالی که Cox-2 ساخت پروستاگلندین ها را در بافت های نئوپلاستیک و التهابی افزایش می دهد و در ساخت پروستاگلندین ها در رابطه با درد و تب نقش دارد. البته اکنون مشخص شده که دارای اعمال فیزیولوژیکی در مغز، کلیه، و سیستم قلبی-عروقی نیز می باشد (۷، ۲۰، ۲۱). تفاوت دیگر Cox-1 و Cox-2 در پایداری mRNA، بازدهی ترجمه و مصرف ذخایر سوبسترای اسیدآراشیدونیک می باشد (۴). تفاوت های سیکلوکسیژنازها به طور خلاصه در جدول ۱ آمده است.

مهارکننده های سیکلوکسیژناز و نحوه عمل آنها

داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی نظیر ایندومتاسین و ایبوپروفن به کانال هیدروفوبی ایزوزیم های سیکلوکسیژناز متصل شده و باعث مهار آن می شوند (۲۳، ۲۴). آسپرین تنها مهار کننده سیکلوکسیژناز است که با آن اتصال کووالانسی (استیلاسیون) برقرار می کند. استیلاسیون اسید آمینه سرین ۵۳۰ مانع از اتصال اسید آراشیدونیک به جایگاه فعال و در نتیجه مهار برگشت ناپذیر آنزیم می شود (۵۵، ۲۵). سایر داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی با اسیدآراشیدونیک برای اتصال به جایگاه فعال رقابت می کنند و باعث مهار برگشت پذیر دو ایزوزیم می شوند. داروهای مذکور دو ایزوزیم را بطور یکسان

تفاوت ها و شباهت های ایزوزیم های سیکلوکسیژناز

همان طور که ذکر شد، ژن های کد کننده این دو ایزوزیم بر روی کروموزوم های متفاوتی قرار دارند (۵). نوع سوبسترا، محصول تولیدی، مراحل واکنش، ساختار سوم و ساختار جایگاه فعال Cox-1 و Cox-2 مشابه یکدیگر می باشد. تفاوت مهم بیولوژیکی بین ایزوزیم ها این است که Cox-1 به طور طبیعی در بیشتر سلول ها وجود داشته و یک آنزیم دائمی محسوب می شود و مقدار پروتئین Cox-1 در شرایط پاتولوژی و فیزیولوژی ثابت باقی می ماند. در مقابل، پروتئین Cox-2 به

مهار می کنند، بطوری که دوز کافی برای کاهش التهاب، خطر تحریک معده را نیز افزایش می دهد. لذا تحقیقات معطوف به تولید داروهایی با مهار اختصاصی سیکلواکسیژناز-۲ می باشد (۲۶، ۲۷). چنین داروهایی تحت عنوان C2Is (Selective inhibitors of Cox-2) شناخته می شوند (۱۳، ۱۵). داروی Coxibs یک مهارکننده انتخابی سیکلواکسیژناز-۲ می باشد و اتصال آن به سیکلواکسیژناز-۱ ضعیف و برگشت پذیر است. مهار شدن ترجیحی Cox-2 ناشی از فضای اضافی در کانال هیدروفوبی Cox-2 است. داروهایی مانند Dup697، Sc52125، L-745-337، Ns398، Meloxicam، Diclofenac، Nimesulide مهارکنندگان انتخابی سیکلواکسیژناز-۲ می باشند. همان طور که قبلاً ذکر شد، این داروها فعالیت پراکسیدازی سیکلواکسیژنازها را مهار نمی کنند ولی گلوکورتیکوئیدها فعالیت پراکسیدازی را هم مهار می کنند (۱۰).

سیکلواکسیژناز-۲ و بیماری ها

التهاب و آرتريت

مشاهده شده که سیکلواکسیژناز-۲ در غضروف مبتلایان به استئوآرتريت و بافت مفصل بیماران مبتلا به آرتريت روماتوئید القاء می شود. از طرف دیگر سیتوکین های ضدالتهابی اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۳ مثل گلوکوکورتیکوئیدها بیان Cox-2 را کم می کنند. طبق گزارشات، Cox-2 نقش مهمی در مرحله التهاب دارد و مهار Cox-2 برای درمان کافی است. بر اساس گزارشات علمی celecoxibe (مهارکننده اختصاصی Cox-2) بطور مؤثری دردهای استئوآرتريت یا روماتوئید آرتريت را بدون هیچ اثر منفی بر دستگاه گوارش از بین می برد (۴).

الزایمر

مصرف NSAIDها خطر ابتلاء به بیماری الزایمر را به میزان ۵۰ درصد کاهش می دهد. از طرف دیگر فعالیت ضدترومبوزی پروستاگلاندین ها ممکن است برای حفاظت در برابر بیماری الزایمر مهم باشد. این احتمال وجود دارد که ایجاد لخته در داخل رگ، منجر به ایسکمی در مغز شود که می تواند باعث ایجاد بیماری الزایمر شود. به هر حال در مورد نقش سیکلواکسیژناز در اتیولوژی بیماری الزایمر مطالعات کمی صورت گرفته است (۴).

سرطان

مطالعات جمعیتی نشان می دهند، افرادی که به طور منظم از آسپرین یا دیگر NSAIDها استفاده می کنند ۵۰-۴۰ درصد

کمتر به سرطان کولورکتال مبتلا می شوند. همچنین مطالعاتی که روی مدل های حیوانی در مورد سرطان کولون بدست آمده نشان می دهد که با مصرف NSAIDها کاهش قابل توجهی در تعداد تومور مشاهده می شود. تلاش های اولیه برای شناخت اساس مولکولی این مشاهدات نشان داد که میزان سیکلواکسیژناز-۲ در تومورهای کولورکتال بالاست در حالی که میزان آن در موکوس طبیعی بسیار ناچیز است (۴). ارتباط میان سیکلواکسیژناز-۲ و سرطان بیشتر در سرطان کولورکتال و به میزان کمتر در سرطان معده و مری مورد بررسی قرار گرفته است. اخیراً Hla و همکارانش موشهای ترانسژنیکی تولید کردند که قادرند ژن Cox-2 انسانی را به میزان زیادی، بخصوص در غدد پستانی بیان کنند. این عمل سبب بروز فرکانس بالایی از هیپرپلازی، دیسپلازی و ترانسفورماسیون غدد پستانی در موشهای ماده شد. این مشاهدات حاکی از تاثیر بیان Cox-2 در القاء تومور می شود. همچنین موش های فاقد Cox-2، ۷۵ درصد کمتر به پاپیلومای پوستی القاء شده با مواد شیمیایی مبتلا می شوند.

شواهد فارماکولوژی نیز نقش Cox-2 را در تومورزایی نشان می دهند. مهارکننده های انتخابی Cox-2 مثل Celecoxib و Rofecoxib تشکیل تومورهای زبان، مثانه، ریه، پوست، سینه و روده را در حیوانات کم می کنند (۷). با استفاده از موش های APC^{Δ716} (یک مدل حیوانی پولیپ های آدنومای فامیلی انسان)، اطلاعات زیادی در مورد نقش Cox-2 و سرطان زایی بدست آمده است (۲۸). حذف ژن Cox-2 در موش های APC^{Δ716} تعداد و اندازه پولیپ های روده ای به طریق وابسته به دوز کاهش می دهد. بنابراین تعداد پولیپ های روده در موش های فاقد Cox-2 ۸۶ درصد کاهش می یابد، ولی حذف یک کپی از ژن Cox-2 منجر به ۶۶ درصد کاهش در تعداد پولیپ ها می شود (۲۹). FAP یک بیماری اتوزومی غالب ناشی از جهش در ژن سرکوبگر APC می باشد. درمان بیماری مذکور با سالینداک (مهارکننده های اختصاصی Cox-2) موجب کاهش تعداد و اندازه پولیپ ها می شود (۲۸). در آزمایشاتی که روی حیوانات انجام شده، مهارکننده های انتخابی Cox-2 مانند Celecoxib تشکیل، رشد، و متاستاز انواع تومورهای مختلف را مهار می کنند (۳۰). نشان داده شده که Celecoxib به طور قابل توجهی شیوع پولیپ های کولون را کم می کند (۳۱، ۳۲). در مطالعه Chane و همکارانش میزان mRNA سیکلواکسیژناز در کارسینومای سلولهای سنگفرشی سر و گردن ۱۵۰ و در بافت طبیعی مجاور ۵۰ برابر افزایش می یابد

جدول ۲- رابطه بین التهاب و سرطان (۲۱).

بیماری التهابی	پیامدهای بدخیمی	اثرات ضد التهابی
کولیت اولسرو بیش از ۸ سال	افزایش خطر ابتلاء به سرطان کولون	سولفاسالازین خطر ابتلاء را نرمال می‌کند
التهاب پانکراس	افزایش خطر ابتلاء به سرطان پانکراس	آزمایش نشده
آسم	افزایش خطر ابتلاء به سرطان ریه	آزمایش نشده
	کاهش خطر چندین سرطان بجز سرطان ریه	
التهاب انوزینوفیلیک مثانه	افزایش خطر ابتلاء به سرطان مثانه	داروهای ضد انگل التهاب را بهبود بخشیده و تشکیل micronucleus را کم می‌کند
فیروزیس و التهاب حشفه	مرتبط با سرطان آلت تناسلی	آزمایش نشده
لیکن پلان زخم شونده	افزایش خطر سرطان زگیلی شکل	آزمایش نشده
التهاب مزمن لگن	افزایش خطر ابتلاء به سرطان تخمدان	آزمایش نشده
مری بارت	افزایش خطر دیسپلازی مری	آزمایش نشده
لوپوس اریتماتو	افزایش خطر ابتلاء به سرطان ریه و پستان	میزان خطر ابتلاء با مصرف دارو برای درمان لوپوس اریتماتو سیستمیک رابطه‌ای ندارد

(۷). هم‌چنین در مطالعه بیرامی جمال و همکاران نشان داده شد که میزان سیکلواکسیژناز-۲ در کارسینومای سلول‌های سنگفرشی مری بیماران ایرانی افزایش می‌یابد و افزایش سیکلواکسیژناز-۲ با موتاسیون در ژن p53 همراه است (۸).

التهاب و سرطان

بر اساس گزارشات علمی، التهاب‌های مزمن مثل کولیت‌های زخمی یک فاکتور خطر برای انواع مختلف سرطان می‌باشند. بیمارانی که دارای کولیت‌های زخمی می‌باشند، ۷-۵ برابر بیشتر از بقیه افراد در معرض سرطان کولون قرار دارند. خطر سرطان کولون برای کولیت‌هایی در سنین ۴۰-۳۵ سال، ۳۵-۲۰ درصد می‌باشد. کولیت‌های زخمی خطر ابتلاء به سرطان‌های دیگر را افزایش نمی‌دهند. این امر نظریه ایجاد نئوپلازی بوسیله التهاب موضعی را تأیید می‌کند. درمان کولیت با داروهای ضدالتهابی Sulfasalazine میزان ابتلا سرطان کولون را کاهش می‌دهد. رابطه بین التهاب و ایجاد برخی سرطان‌ها در جدول ۲ آمده است (۲۱).

احتمالاً افزایش میزان سیکلواکسیژناز-۲ میزان اسید آراشیدونیک آزاد داخل سلولی را پایین آورده و از آپوپتوز جلوگیری می‌کند. به عبارتی سیکلواکسیژناز-۲ موجب حذف سیگنال‌های آپوپتوزی می‌شود. شاید محصولات واکنش آنزیمی Cox-2 منجر به تغییر در رشد سلولی، آپوپتوز، رگ‌زایی و دیگر مراحل منجر به سرطان می‌شود. مکانیسم دقیق بیان Cox-2 و محصولات واکنش آن در تشکیل تومور کاملاً مشخص نیست (۲۱). در کل، مکانیسم‌های وابسته به Cox-2 و وابسته به پروستاگلاندین در پیشرفت از حالت طبیعی به نئوپلازی تأثیر می‌گذارند (۱۵).

آپوپتوز

اندازه یک جمعیت سلولی به تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی بستگی دارد. کاهش آپوپتوز در نئوپلاسم‌های بدخیم و پیش بدخیم مشاهده شده است. فاکتورهای زیادی آپوپتوز را تنظیم می‌کنند. رابطه معکوسی بین میزان BCL-2 و آپوپتوز وجود دارد. سلول‌های اپی تلیال روده رت با بیان بیش از حد Cox-2 دارای مقدار زیادی BCL-2 می‌باشند و به آپوپتوز تحریک شده با بوتیرات مقاوم می‌باشند.

درمان با داروی سولفید سالینداک، مقاومت ناشی از بیان سیکلواکسیژناز-۲ به آپوپتوز را برمی‌گرداند. کاهش مقدار پروتئین‌های پیش آپوپتوزی، BAX و BCL x1 و افزایش پروتئین ضدآپوپتوزی BCL2 در بافت تومور پستان مشاهده شده است. احتمالاً افزایش بیان Cox-2 سبب طول عمر سلول‌های غیر طبیعی و تجمع تغییرات ژنتیکی متوالی و ازدیاد خطر تومورزایی می‌شود (۷).

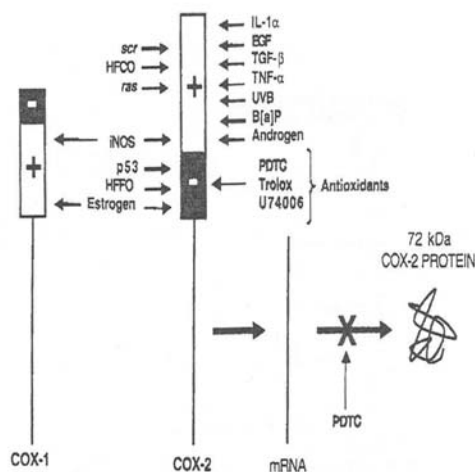
رگ‌زایی (Angiogenesis)

بیشتر تومورهای سفت برای فراهم کردن مواد غذایی ضروری برای رشد و زنده ماندن نیاز به رگ‌های خونی جدید دارند (۱۵). از این نظر آنزیم Cox-2 به خوبی در سرطان‌زایی دخالت دارد، زیرا بیان بیش از حد Cox-2 در سرطان کولون سبب ازدیاد تولید فاکتورهای رشد رگ‌زا می‌شود. افزایش بیان Cox-2 در سرطان کولون، تولید فاکتورهای رشد رگی را زیاد و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را از طریق ماتریکس کلاژن و تشکیل شبکه‌های شبه مویرگی (Capillary-like networks) را در آزمایشگاه افزایش می‌دهد. این اثرات با NS-398 (مهارکننده انتخابی Cox-2) متوقف می‌شود (۷).

benzo [a] pyrene-7,8-dio-9,10-epoxide به 7,8-diol می‌شود. این محصول قادر به اتصال به DNA می‌باشد (۷).

ایزوفرمد جدید سیکلواکسیژناز

بر اساس مطالعه Flower و Vane، استامینوفن فعالیت سیکلواکسیژناز مغز سگ را بیشتر از سیکلواکسیژناز طحال مهار می‌کند. این امر فرضیه وجود واریانته از آنزیم سیکلواکسیژناز با حساسیتی متفاوت نسبت به استامینوفن را مطرح می‌کند. اخیراً، Simmons و همکارانش با تشخیص سیکلواکسیژنازی جدید در سگ تحت عنوان Cox-3 و مجزا از Cox-1 و Cox-2، مرحله‌ای به سوی درک اساس مولکولی اثر استامینوفن و مهار تشکیل پروستاگلندین‌های مغز را گشودند. از آنجایی که استامینوفن فاقد اثرات ضدالتهابی است و مستقیماً Cox-1 و Cox-2 را مهار نمی‌کند، احتمال وجود یک سیکلواکسیژناز اضافی و مسئول تولید پروستاگلوئیدهای حساس به استامینوفن در سیستم عصبی را مطرح می‌سازد.



شکل ۲- ژن‌های سیکلواکسیژناز (۱۹). تفاوت اصلی بین ژن‌های Cox-1 و Cox-2 این است که Cox-2 دارای ناحیه تنظیمی بزرگتری است. القاء کننده‌های Cox-2 شامل نیتریک اکسید تولید شده بوسیله نیتریک اکسید سنتاز (iNOS)، روغن دانه‌های پرچرب (HFCO)، انکوژن‌های ras و scr، اینترلوکین آلفا ۱ (IL-1α)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد تغییر شکل بتا (TGF-β)، فاکتور توموری نکروزی آلفا، اشعه فرابنفش B (UVB)، بنزو [a] پیرن (B[a]P) و آندروژنها می‌باشد. مهار کننده‌های Cox-2 پروتئین سرکوب کننده تومور p53، روغن ماهی پرچرب، استروژن و آنتی‌اکسیدان‌های مختلف (PDT, Trolox, U74006) است. در برخی سلول‌ها، مهار شدن بوسیله PDT (PDTC, Trolox, U74006) بعد از نسخه‌برداری صورت می‌گیرد. Cox-1 بوسیله استروژن و iNOS القاء پذیر است. فسفولیپاز سینوزولی ۲ (cPLA2) که در همان ناحیه کروموزومی Cox-2 قرار دارد ممکن است با Cox-2 همزمان تنظیم شود.

قدرت تهاجمی (Invasiveness)

آنزیم Cox-2 توانایی سلول‌های سرطانی را برای حمله به بافت‌های اطراف افزایش می‌دهد (۲۸). وقتی Cox-2 در رده‌های سلول سرطانی به میزان زیادی بیان می‌شود، تولید پروستاگلندین‌ها افزایش یافته و قدرت تهاجمی سلول‌ها افزایش می‌یابد (۷). افزایش قدرت تهاجمی از افزایش تولید و فعال شدن آنزیم‌های قادر به تخریب غشاء پایه ناشی می‌شود (۲۸). افزایش قدرت تهاجمی با فعال شدن متالوپروتئیناز ۲ غشاء و افزایش مقدار mRNA متالوپروتئیناز ۱- غشایی همراه می‌باشد. این آنزیم‌ها کلاژن ماتریکس غشاء پایه را تخریب و قدرت تهاجمی و حرکت سلول‌های توموری را تحریک می‌کنند.

تکثیر سلولی (Cell proliferation)

پروستاگلندین‌هایی مانند پروستاگلندین E2 و پروستاگلندین F2α که در اثر افزایش سیکلواکسیژناز-۲ وجود می‌آیند، در تحریک رشد سلولی دخالت دارند. شواهد زیادی حاکی از افزایش رشد سلول‌های اپی‌تلیال پستان توسط پروستاگلندین E2 در حضور EGF می‌باشد (۲۸). در سال ۱۹۹۵، shift و همکارانش نشان دادند که سالینداک و سولفیدسالینداک باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطان کولون انسانی (HT-29) در آزمایشگاه می‌شوند. مطالعات بعدی نشان داد که NSAIDهای غیرانتخابی نظیر آسپرین، ایندومتاسین، ناپروکسن و پیروکسیکام، مشابه مهارکننده‌های انتخابی Cox-2، باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطان کولون می‌شوند (۳۳).

سرکوب سیستم/ایمنی (Immune suppression)

بیشتر سرطان‌ها با کاهش قدرت سیستم ایمنی مانند تغییر در ترشح سیتوکین‌های فعال ایمنی همراه می‌باشند (۶). در سرطان، میزان اینترلوکین ۱۰ افزایش و میزان اینترلوکین ۱۲، فاکتور نکروز تومور (TNF) و اینترلوکین ۱ کاهش می‌یابد. این تغییرات با افزایش ساخت پروستاگلندین E2 و فعالیت Cox-2 همراه است (۲۸). ترکیب پروستاگلندین E2 تولید فاکتور نکروز توموری α را مهار و تولید اینترلوکین ۱۰ را القاء می‌کند. محققان معتقدند که مهار شدن انتخابی Cox-2 اثرات ضدتوموری را بوسیله بازگرداندن تعادل اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۱۲ در محیط بدن (In vivo) ایجاد می‌کند.

همچنین پروکارسینوژن‌ها نیز قادر به القای سیکلواکسیژناز هستند. برای مثال بنزوپیرن، هیدروکربن آروماتیک حلقوی در دود تنباکو و غذاهای دود اندوده، نسخه‌برداری Cox-2 را القاء می‌کند. در حقیقت، Cox-2 باعث تبدیل benzo [a] pyrene

ندارد، تعیین چگونگی القاء Cox-2 در سلولهای اپی تلیال یا سلولهای مزانشیال اهمیت خواهد داشت (۲۱). سوال دیگر آن که، آیا Cox-1 می تواند باعث ایجاد سرطان شود؟ احتمال دارد که Cox-1 نیز در ایجاد بدخیمی دخالت داشته باشد. اما اغلب ایجاد تومور با القاء میزان بالای Cox-2 همراه است و Cox-1 در چنین شرایطی بدون تغییر باقی می ماند (۲۱).

در مورد این که کدام مکانیسم های مولکولی واسطه اثرات Cox-2 می باشند، باید ذکر کرد که تغییرات دقیق در سلول هایی که حداقل یکبار آنزیم Cox-2 در آنها القاء شده مشخص نیست و روشن شدن این موضوع اهمیت زیادی خواهد داشت (۲۱).

نتیجه گیری

به طور کلی سیکلواکسیژناز-۱ در سنتز پروستاگلاندین های دخیل در هموستاز نقش دارد، در حالی که سیکلواکسیژناز-۲ مسئول ساخت پروستاگلاندین های القاء شده توسط تحریکات داخلی و عوامل محیطی می باشد. شواهد بدست آمده از مطالعات نشان می دهد که احتمالاً مهار سیکلواکسیژناز-۲ روش مفیدی در پیشگیری و درمان سرطان می باشد. با این وجود سوالات زیادی در زمینه مکانیزم مولکولی این مشاهده باقی مانده است و پاسخ به آنها تحقیقات بیشتری را در زمینه نقش سیکلواکسیژناز-۲ در درمان سرطان می طلبد.

در انسان وجود یک تغییر قالب (fram shift) در واریانت عملکردی Cox-1 باعث تولید Cox-3 می شود. آنزیم Cox-3 سگ یک پروتئین غشایی با ۶۱۳ اسید آمینه و وزن مولکولی ۶۵ کیلودالتون است (۲۲).

ژن های Cox-1 و Cox-2 در اینترون ۱ متفاوت هستند (شکل ۲). ژن Cox-1 دارای ۱۰ اینترون و Cox-2 دارای ۹ اینترون می باشد. اینترون اضافی ژن Cox-1 در Cox-3 باقی می ماند. باقی ماندن اینترون مذکور، تاخوردگی پروتئین و ساختار جایگاه فعال را تغییر داده و بر دimer شدن آن اثر می گذارد. با اینکه Cox-3 سگ حاوی تمامی اطلاعات پروتئین Cox-1 می باشد، باقی ماندن اینترون ۱ به طور قابل توجهی خصوصیات آنزیمی آن را تغییر داده و توانایی تولید پروستاگلاندین E2 را کم می کند. هم چنین یافته های اخیر حاکی از تفاوت جنبه های فارماکولوژی پروتئین Cox-3 سگ در فعالیت سیکلواکسیژنازی نسبت به Cox-1 و Cox-2 می باشد (۲۲).

لازم است آزمایشات بیشتری صورت گیرد که نشان دهد، آیا Cox-3 انسان در سیستم محیط بدن مستقل از Cox-1 و Cox-2 عمل می کند یا نه؟ به این سوال در آینده باید پاسخ داده شود.

در پاسخ به این سوال که چگونه Cox-2 در مراحل اولیه سرطان القاء می شود، باید ذکر کرد که سیگنال های مولکولی مسبب القاء بیان ژن مذکور در مسیر سرطان مشخص نیستند. در مواردی مانند سندرم APC وراثتی که مرحله التهاب وجود

REFERENCES

1. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 1976;251:2629-36.
2. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simms DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthetase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2692-96.
3. Kujubut DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991;266:12866-72.
4. Dubios RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Putte L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-73.
5. Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *Cell Mol Med J* 2003;7:207-22.
6. Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T. Enhanced expression of cyclooxygenase (Cox)-2 in human skin epidermal cancer cells: Evidence for growth suppression by inhibiting Cox-2 expression. *Int J Cancer* 2000;86:667-71.
7. Dannenberg AJ, Altork NK, Boyle Jo, Dang C, Howe LR, weksler BB, et al. Cyclooxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet oncol* 2001;2:544-51.
8. Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Res* 2001;61:3119-23.

9. Hla T, Bailey DB, Liu CH, Schaefer HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and-2 isoenzymes. *IYBCB* 1999;31:551-57.
10. Smith WL, Garavito M, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (Cyclooxygenase)-1 and -2. *Biolchem J* 1996;52:33157-60.
11. Yuan C, Rieke CJ, Rimon G, Wingerd BA, Smith WL. Parterning between monomers of cyclooxygenase-2 homodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103: 6142-47.
12. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. Different intracellular location for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995;270:10902-908.
13. Cronstein BN. Cyclooxygenase-2-selective inhibitors: Translating pharmacology into clinical utility. *Cleveland clinic J* 2003;69: 13-19.
14. Na HK, Surh Yy. peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochem Pharma* 2003;66:1381-91.
15. Bakhle YS. Cox-2 and cancer: a new approach to an old problem. *British J Phamacol* 2001;134:1137-50.
16. Reddy ST, Herschaman HR. Transcellualr prostaglandin production following mast cell activation is mediated by proximal secretory phospholipase A2 and distal prostaglandin synthase 1. *J Biol Chem* 1996;271:189-91.
17. Vane JR, Bakhle YS, Botring RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
18. Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994;302:723-27.
19. Fossline E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin lab Sci* 2000;30:3-16.
20. Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Med Chem* 2007;50:1425-41.
21. Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 2000;1470:M69-M78.
22. Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R, Serhan CN. Cox-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pthways and precision therapeutics? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty acids* 2003;69:33.
23. Ferreria SH, Moneada S, Vane JR. Aspirin selectivity inhibits prostaglandin production in dog spleen. *Nature New Biol* 1971;231:237-39.
24. Smith JB, Willis AL. Aspirin selectivity inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature New Biol* 1971;231:235-37.
25. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *Biol Chem* 1999;274:22903-6.
26. Smith WL, Dewitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenase: Structural cellular, and nolecular biology. *Ann Rev Biochem* 2000;69:145-82.
27. Marnett LJ, Kalgutkar AS. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Ann. Rev Biochem* 2000;69:145-82.
28. Singh B, Lucci A. Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Surg Res* 2002;108:173-79.
29. 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;87:803-9.
30. Kagitani S, Ueno H, Hirade S, Takahashi T, Takata M Jnoue H. Tranilast attenuates myocardial fibrosis in association with suppression of monocyte/macrophage infiltration in DOCA/salt hypertensive rats. *J Hypertens* 2004;22:1007-15.
31. Arber N, Eagle CJ, Spicak J, Racz I, Dite P, Hajer J, et al. CeleCoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med* 2006;355:885-95.
32. Betagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K, et al. CeleCoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2006;355:950-52.
33. Husain SS, Szabo IL, Tamawski AS. NSAID inhibition in GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action. *Am J Gastroenterol* 2002;97:542-53.