

Противоопухолевое действие кураксина CBL0137 на моделях аденокарциномы толстой кишки

Т.И. Фетисов¹, Л.Р. Тилова¹, Е.А. Лесовая^{1,2}, Е.Е. Антошина¹, Т.Г. Горькова¹, Л.С. Труханова¹,
О.В. Морозова¹, Е.В. Шипаева³, Р.В. Иванов³, А.А. Пурмаль⁴, Г.А. Белицкий¹,
М.Г. Якубовская¹, А.В. Гудков⁴, К.В. Гурова⁴, К.И. Кирсанов¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России;
Россия, 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 9;

³ООО «Инкурон»; Россия, 121069, Москва, Столовый переулок, 6;

⁴Онкологический центр Розвел Парк; США, Баффало

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов mrkir@rambler.ru

Кураксины представляют собой низкомолекулярные карбазольные производные, обладающие афинностью к ДНК, способные одновременно активировать p53-зависимый апоптоз и ингибировать NF-kB-зависимый сигнальный путь. На модели перевиваемой аденокарциномы толстой кишки (Акатол) на мышах линии BALB/c продемонстрировано противоопухолевое действие кураксина CBL0137. Наблюдалось значительное тормозящее действие CBL0137 на рост данной аллографтной опухоли: на 37-е сутки после перевивки опухоли при пероральном введении препарата в дозах 5, 10, 15 и 20 мг/кг в день торможение роста опухоли составило 53, 50, 56 и 74 % соответственно. Значимое увеличение продолжительности жизни наблюдалось во всех группах животных, получавших CBL0137. Максимальный эффект (81,7 %) был получен при введении препарата в дозе 20 мг/кг в день. В экспериментах *in vitro* при обработке клеток аденокарциномы толстой кишки человека HTC116 наблюдался значительный цитотоксический эффект. CBL0137 проявил способность ингибировать экспрессию гена COX2, обладающего антиапоптотическим действием и способностью стимулировать неоангиогенез и метастазирование. Таким образом, в системах *in vivo* и *in vitro* продемонстрировано противоопухолевое действие CBL0137 в отношении аденокарциномы толстой кишки.

Ключевые слова: аденокарцинома толстой кишки, перевиваемая опухоль, Акатол, кураксин, CBL0137, NF-kB-зависимый сигнальный путь, COX2

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-67-72

Antitumor effect of the curaxin CBL0137 on the models of colon cancer

T.I. Fetisov¹, L.R. Tilova¹, E.A. Lesovaya^{1,2}, E.E. Antoshina¹, T.G. Gor'kova¹, L.S. Trukhanova¹, O.V. Morozova¹, E.V. Shipaeva³,
R.V. Ivanov³, A.A. Purmal⁴, G.A. Belitskiy¹, M.G. Yakubovskaya¹, A.V. Gudkov⁴, K.V. Gurova⁴, K.I. Kirsanov¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Reseach Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²I.P. Pavlov Ryazan' State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vasokovol'tnaya St., Ryazan, 390026, Russia;

³LLC Incuron; 6 Stolovyy Pereulok, Moscow, 121069, Russia;

⁴Roswell Park Cancer Institute; Buffalo, USA

Curaxins represent low molecular weight carbazole derivatives, which simultaneously activate p53-dependent apoptosis and inhibit NF-kB-dependent signal transduction pathways. Antitumor activity of curaxin CBL0137 was demonstrated *in vivo* on the model of solid transplantable mouse colon adenocarcinoma Akatol. Significant tumor growth inhibition caused by CBL0137 treatment was observed. On the 37th day after tumor transplantation for CBL0137 oral doses 5, 10, 15 and 20 mg/kg the tumor growth inhibition indexes were 53, 50, 56 and 74 %, respectively. CBL0137 treatment extended life span of mice in all study groups receiving this test article. Maximum lifespan increase (81,7 %) was observed in the group of mice treated with 20 mg/kg dose of CBL0137. The cytotoxicity of CBL0137 was assessed on human colon cancer cells *in vitro*. We demonstrated that CBL0137 inhibits the expression COX2, which in its turn is known to exhibit antiapoptotic, pro-angiogenic and pro-metastatic properties. Thus, we demonstrated antitumor effect of CBL0137 against colon cancer *in vitro* and *in vivo*.

Key words: colon adenocarcinoma, transplantable tumor, Akatol, curaxin, CBL0137, NF-kB-signal transduction pathway, COX2

Введение

Одна из наиболее распространенных нозологических форм среди онкологических заболеваний — рак толстой кишки (РТК). Ежегодно рак этой нозологической формы возникает более чем у 1 млн человек

и более 600 тыс. человек погибают от него [1]. В связи с этим продолжается поиск новых противоопухолевых препаратов, эффективных для лечения РТК. Одним из новых направлений химиотерапии, активно разрабатываемых в последнее десятилетие, является поиск

препаратов, молекулярные механизмы действия которых связаны с ингибированием нескольких пролиферативных сигнальных путей и одновременной индукцией апоптоза [2–5]. К таким препаратам относятся кураксины – низкомолекулярные соединения, вызывающие одновременно как активацию р53-зависимого апоптоза, так ингибирование NF-κB-зависимого сигнального пути [6, 7].

Цель исследования – оценка способности кураксина CBL0137 ингибировать рост аденокарциномы толстой кишки с использованием модельных систем данного заболевания *in vivo* и *in vitro*.

Удобной моделью РТК для оценки противоопухолевой активности химиопрепаратов считается перевиваемая мышьяная аденокарцинома Акатол [8]. Опухолевый штамм Акатол характеризуется 100 % перевиваемостью и умеренной скоростью роста, что позволяет проводить оценку противоопухолевой эффективности препаратов и выбор оптимальных для лечения доз. Для оценки цитотоксического действия препарата была выбрана распространенная модель аденокарциномы толстой кишки *in vitro* – культура клеток НТС116.

Одно из ключевых событий в генезе РТК как у мышей, так и у человека – активация хронического воспаления через сигнальный путь AA/COX2 [9, 10]. Активация COX2 приводит к повышению уровня метаболизма арахидоновой кислоты в биоактивные простагландины и тромбоксаны. В частности, повышается уровень PGE₂, который обладает провоспалительным, антиапоптотическим эффектами, а также способствует метастазированию и неоангиогенезу [11, 12]. Антиапоптотический механизм действия PGE₂ реализуется через подавление экспрессии Bcl2 при активации MAPK или PI3K [13, 14]. Одним из регуляторов экспрессии гена COX2 является NF-κB [15]. Ранее было показано, что ингибирование NF-κB – одной из ключевых мишеней CBL0137 – в клетках РТК ведет к снижению экспрессии COX2 [6]. В клетках линии НТС116 уровень экспрессии гена COX2 достаточно высок, а дополнительная его активация может быть проведена при добавлении в среду фактора некроза опухоли α (tumor necrosis factor α, TNF-α).

Таким образом, для оценки противоопухолевого потенциала CBL0137 в отношении аденокарциномы толстой кишки в качестве модельной системы *in vivo* был выбран опухолевый штамм Акатол, а для изучения цитотоксического эффекта и молекулярных механизмов его действия *in vitro* использовали клетки линии аденокарциномы толстой кишки человека НТС116.

Материалы и методы

Расходные материалы. В качестве тестируемого препарата использовали соединение CBL0137 (партия 10-106-88-30), предоставленное LLC Incurgon (США). CBL0137 вводили с помощью гастрального зонда в растворе, содержащем 0,2 % гидроксипропилметилцеллюлозы (МЦ) (Sigma-Aldrich, США). Раствор 0,2 % МЦ

готовили еженедельно (хранение при температуре +4 °С), а раствор CBL0137 – ежедневно, непосредственно перед введением мышам. В качестве препарата сравнения использовали 5'-фторурацил (5-ФУ) (EBEWE, Arzneimittel Gee. m. b. H., Австрия).

Лабораторные животные. Все эксперименты на животных выполняли в соответствии с требованиями этического комитета РОНЦ им. Н.Н. Блохина по работе с животными. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде (стерильная питьевая вода). В качестве основного корма использовали стандартизованные брикетированные гранулированные корма для мышей. Показатели массы тела регистрировали ежедневно на протяжении всего эксперимента.

Опыты проводили на 150 самцах мышей линии BALB/c, которые были получены из разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина в возрасте 1 мес (масса тела 21–22 г). Животные были рандомизированы на 6 групп: 1–4-я (экспериментальные) с введением различных доз CBL0137 (5, 10, 15 и 20 мг/кг соответственно, 5-я (экспериментальная) с введением известного антиметаболита 5-ФУ, 6-я (контрольная) с введением лишь 0,2 % МЦ. Перед началом эксперимента все животные были помечены, взвешены и рассажены в клетки по 10 мышей в каждой.

Перевиваемая опухоль аденокарциномы толстой кишки Акатол. Исследования выполняли на перевиваемой мышьяной опухоли Акатол по стандартной методике [8]. Для получения достаточного количества перевиваемого материала образец опухолевой ткани был взят из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина и перевит подкожно мышам-самцам линии BALB/c. Через 3 нед для проведения эксперимента опухолевую массу измельчали, разводили из расчета 1 г в 10 мл физиологического раствора и вводили по 0,5 мл подкожно животным всех групп. После развития видимых опухолевых узлов измеряли их длину, ширину и глубину и рассчитывали объем опухоли.

Оценка экспериментальных данных.

- **Время появления первых узелков.** Для определения времени появления первых опухолевых узелков проводили ежедневную пальпацию мышей в течение 1-й недели после перевивки опухоли. Процент увеличения времени до появления первых узелков определяли по формуле:

$$\text{Процент увеличения времени до появления первых узелков} = \frac{(\text{Среднее время появления узелков в опыте}) - (\text{Среднее время появления узелков в контроле})}{(\text{Среднее время появления узелков в контроле})} \times 100 \%$$

- **Торможение роста опухоли.** О противоопухолевом действии исследуемых препаратов судили также по результатам сопоставления среднего объема опухолей в контрольной и опытных группах. Объ-

ем вычисляли как произведение величин 3 взаимно перпендикулярных размеров опухоли. Измерение опухолей проводили 3 раза в неделю. Процент торможения роста опухоли по объему определяли на каждое ее измерение и вычисляли по формуле:

$$\text{Процент торможения роста опухоли по объему} = \frac{(\text{Средний объем опухоли в контроле}) - (\text{Средний объем опухоли в опыте})}{(\text{Средний объем опухоли в контроле})} \times 100 \%$$

- **Продолжительность жизни животных.** Критерием эффективности действия препаратов служила также продолжительность жизни животных. Согласно различным зарубежным документам, регламентирующим работу с экспериментальными животными [16], размер перевиваемой опухоли определяет выбывание экспериментального животного из группы. При этом учитывают 2 фактора: отсутствие влияния опухоли на жизненные функции организма и соотношение массы опухоли и массы организма. В связи с этим при обработке результатов использовали подход, при котором животное выбывало из экспериментальной группы при достижении опухолью объема, равного 10 см³. Процент увеличения продолжительности жизни животных вычисляли по формуле:

$$\text{Процент увеличения продолжительности жизни} = \frac{(\text{Средняя продолжительность жизни в опыте}) - (\text{Средняя продолжительность жизни в контроле})}{(\text{Средняя продолжительность жизни в контроле})} \times 100 \%$$

Клеточные линии. В качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека HCT116. Клетки культивировали в стандартных условиях (+37 °С, 5 % CO₂) в культуральной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, двойная модификация среды Игла) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %) и смеси антибиотиков пенициллина-стрептомицина и L-глутамина. В эксперименте использовали TNF-α (1 мкМ) и CBL0137 (0,25 мкМ). Обработку клеток проводили в нескольких режимах:

- инкубация с TNF-α в течение 24 ч;
- инкубация с CBL0137 в течение 24 ч;
- инкубация с TNF-α и CBL0137 в течение 24 ч;
- инкубация с TNF-α в течение 12 ч, а затем с CBL0137 в течение 12 ч.

МТТ-тест. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (BD Micro-Fine Plus, США) (3×10³ клеток в 190 мкл культуральной среды) и инкубировали 24 ч. В день экспериментов приготавливали серийные разведения CBL0137. Клетки инкубировали с CBL0137, затем вно-

сили 20 мкл раствора МТТ-реагента (5 мг/мл, ПанЭко, Россия) в солевом растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) и инкубировали 2 ч при температуре +37 °С до появления фиолетовой окраски. Образовавшийся формазан растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия) и инкубировали при температуре +37 °С. После полного растворения кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре MultiScan MCC 340 (Labsystems, США) при длине волны 570 нм. Данные представляли в виде оптической плотности экспериментальных образцов относительно контроля. За 100 % принимали оптическую плотность в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие соединения, но с растворителем ДМСО.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Общую РНК выделяли с использованием набора реагентов GeneJET™ в соответствии с инструкцией изготовителя. Анализ уровня экспрессии гена *COX2* проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Для количественной оценки изменений уровня экспрессии применяли метод определения по пороговому циклу [17]. Нормализацию образцов выполняли по отношению к количеству матричной РНК гена домашнего хозяйства *Rpl27* [18].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Время появления первых узелков на месте перевивки опухоли. В эксперименте время появления первых опухолевых узелков во всех группах достоверно не различалось и составило около 6 сут. Пероральное введение CBL0137 начинали на следующий день после перевивки опухоли. Следует отметить, что в 4-й группе (доза CBL0137 20 мг/кг) наблюдалась некоторая тенденция к задержке появления первых опухолевых узелков по сравнению с остальными группами (табл. 1).

Таблица 1. Время появления первых узелков у мышей на месте перевивки опухоли

Группа	Среднее время появления первых опухолевых узелков, сутки	Увеличение времени появления первых узелков, %
1-я (CBL0137, 5 мг/кг)	6,04 ± 0,17*	-0,7
2-я (CBL0137, 10 мг/кг)	6,04 ± 0,20*	-0,7
3-я (CBL0137, 15 мг/кг)	6,40 ± 0,20*	5,0
4-я (CBL0137, 20 мг/кг)	6,64 ± 0,23*	8,4
5-я (5'-фторурацил, 25 мг/кг)	6,36 ± 0,24*	4,4
6-я (контрольная)	6,08 ± 0,20	-

*Различия экспериментальных и контрольной групп статистически незначимы, $p > 0,05$.

Торможение роста опухоли. Сравнительный анализ данных по объему показал, что в течение первых 9 сут статистически значимых различий между экспериментальными и контрольной группами не наблюдалось. К 12-м суткам достоверное торможение роста опухоли по объему отмечали у мышей 4-й (43 %) и 5-й (84 %) групп. Начиная с 19-х суток и до завершения эксперимента у мышей, получавших CBL0137, наблюдалось достоверное торможение роста опухоли по объему. При этом наибольшую задержку в росте опухолевого узла в период 12–54-е сутки отмечали в 4-й группе (на 37-е сутки зарегистрировано максимальное торможение роста опухоли на 74 %) (рис. 1).

Максимальный (84 %) эффект торможения роста опухоли при воздействии 5-ФУ (5-я группа) проявился на 12-е сутки после перевивки (4-е сутки после начала введения 5-ФУ), и уже начиная с 14-х суток (сразу после окончания введения 5-ФУ) происходило постепенное снижение торможения роста опухолевого узла. С 35-х суток и до завершения эксперимента

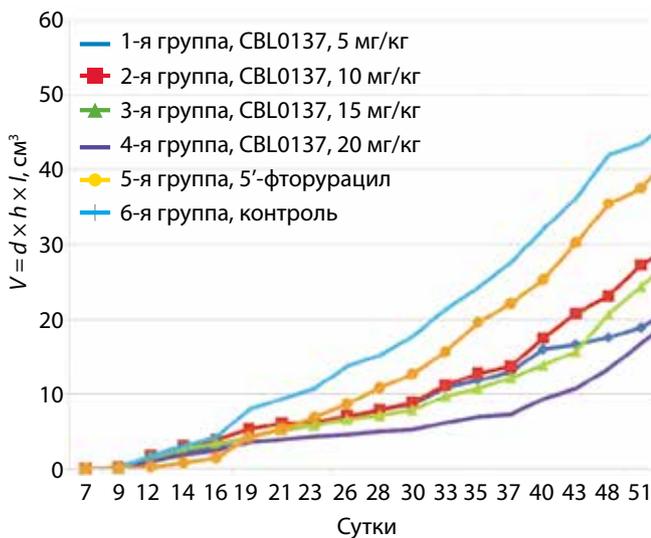


Рис. 1. Динамика роста перевиваемых опухолей у экспериментальных животных

достоверных отличий в средних размерах опухолевого узла у мышей 5-й и 6-й групп не отмечалось.

Продолжительность жизни животных. Животное выбывало из экспериментальной группы при достижении опухолью объема 10 см³. Статистически значимое увеличение времени достижения опухолью такого объема наблюдалось во всех экспериментальных группах (рис. 2).

Максимальное увеличение (81,7 %) продолжительности жизни отмечено у мышей 4-й группы. Даже при использовании наименьшей дозы CBL0137 (5 мг/кг) зафиксировано значительное увеличение продолжительности жизни. Эффект 5-ФУ в данном эксперименте оказался заметно слабее (табл. 2).

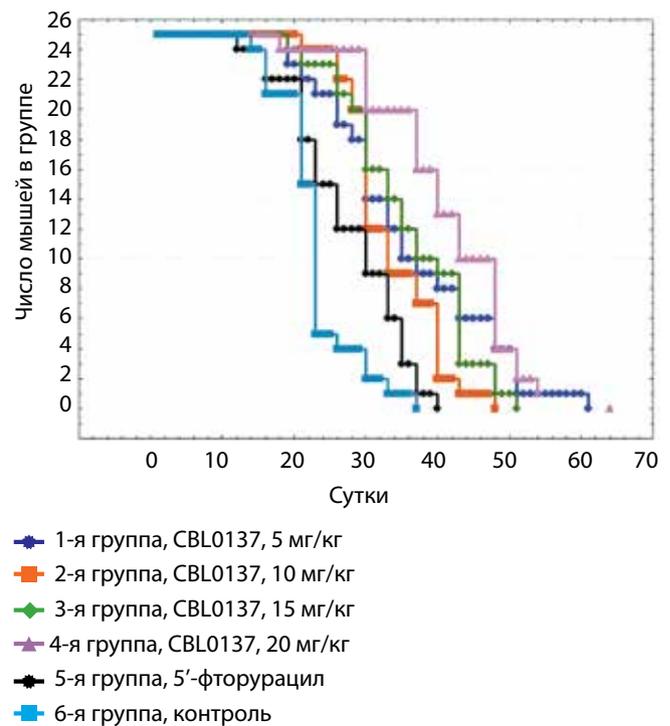


Рис. 2. Продолжительность жизни животного при выбывании его из группы по достижении объема опухоли 10 см³

Таблица 2. Показатели продолжительности жизни животного при выбывании его из группы по достижении объема опухоли 10 см³

Группа	Средняя продолжительность жизни ± стандартная ошибка среднего, сутки	Увеличение продолжительности жизни, %	Медианная продолжительность жизни, сутки	Log-rank-тест
1-я (CBL0137, 5 мг/кг)	35,64 ± 2,23**	55,22	33	$p < 0,001$
2-я (CBL0137, 10 мг/кг)	33,32 ± 1,24**	45,12	30	$p < 0,001$
3-я (CBL0137, 15 мг/кг)	35,68 ± 1,71**	55,40	35	$p < 0,001$
4-я (CBL0137, 20 мг/кг)	41,72 ± 1,90**	81,70	43	$p < 0,001$
5-я (5'-фторурацил, 25 мг/кг)	27,32 ± 1,47*	18,99	26	$p < 0,05$
6-я (контрольная)	22,96 ± 1,02	—	23	—

Примечание. Log-rank-тест — логарифмический ранговый тест, указана статистическая значимость при сравнении кривой выживания данной группы с кривой выживания 6-й (контрольной) группы. *Статистически значимые различия по отношению к контрольной группе, $p < 0,05$. **Статистически значимые различия по отношению к контрольной группе, $p < 0,01$.

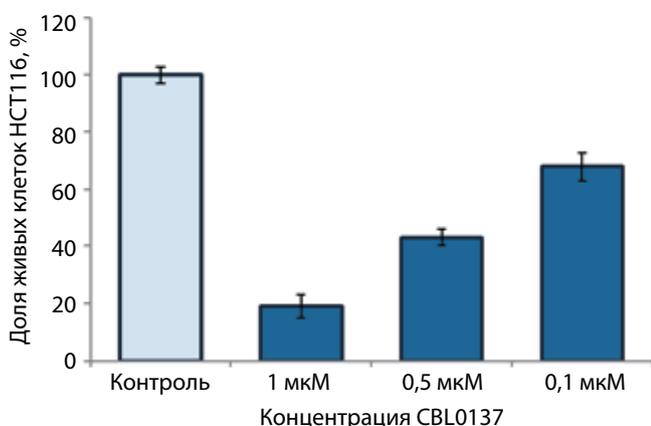


Рис. 3. Цитотоксическое действие CBL0137 на клетки линии HCT116

Цитотоксический эффект на клетках линии рака толстой кишки человека. Полученные на линии клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 данные свидетельствуют о значительном цитотоксическом эффекте CBL0137 (рис. 3). При использовании МТТ-теста было обнаружено, что в результате 72-часовой инкубации в концентрации 1 мкМ CBL0137 уменьшал число живых клеток HCT116 на 81 % по сравнению с контролем. При обработке клеток более низкими концентрациями CBL0137 наблюдалась четкая дозовая зависимость. Концентрация препарата, вызывающая гибель 50 % клеток (IC50) при данном времени обработки, составила 0,4 мкМ.

Влияние CBL0137 на экспрессию COX2 in vitro. Продукт гена COX2 обладает антиапоптотическими свойствами и участвует в метастазировании и неоангиогенезе. При исследовании на клеточной линии HCT116 влияния CBL0137 на экспрессию гена COX2, мы продемонстрировали, что он воздействует как на конститутивный, так и на индуцированный уровень экспрессии COX2 (рис. 4). Так, при действии CBL0137 в концентрации 0,25 мкМ в течение 24 ч уровень матричной РНК гена COX2 уменьшился в 2 раза по сравнению с конститутивным уровнем. Индукция экспрессии гена COX2 провоспалительным цитокином TNF-α (1 мкМ в течение 24 ч) привела к увеличению экспрессии гена в 5 раз. При совместном действии TNF-α (1 мкМ) и CBL0137 (0,25 мкМ) в течение 24 ч мы наблюдали уменьшение экспрессии гена COX2 в 2 раза по сравнению с индуцированным уровнем. При последовательной обработке (сначала 12 ч TNF-α, а затем 12 ч CBL0137) уровень экспрессии гена COX2 снизился примерно в 5 раз

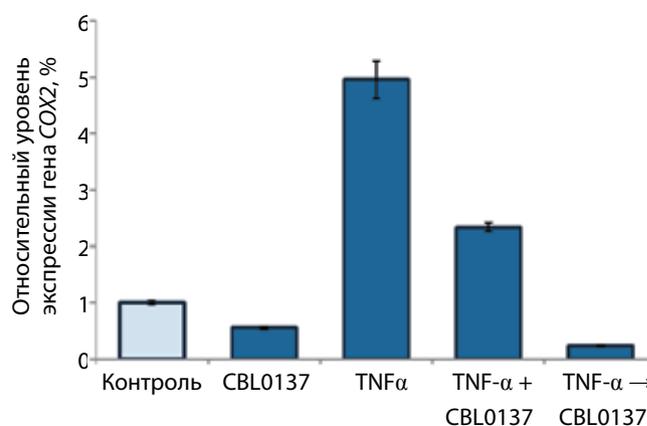


Рис. 4. Влияние CBL0137 на экспрессию гена COX2

относительно конститутивного уровня и более чем в 20 раз относительно индуцированного.

Полученный более интенсивный эффект ингибирования экспрессии гена COX2 при последовательной обработке TNF-α, а затем CBL0137 может объясняться различиями во времени обработки CBL0137 (12 ч). Кроме этого, если произошла некоторая адаптация к стимулирующему действию TNF-α, то его отмена могла привести к снижению экспрессии COX2 ниже конститутивного уровня, что, вероятно, обусловило более значимый эффект последующей обработки CBL0137.

Таким образом, в представленном исследовании продемонстрирован значимый противоопухолевый эффект кураксина CBL0137, проявляющийся в замедлении роста опухоли и увеличении продолжительности жизни животных с перевитыми опухолями. На культуре клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 показан цитотоксический эффект препарата. Одним из возможных молекулярных механизмов действия CBL0137 является его ингибирующее влияние на экспрессию гена COX2, обладающего антиапоптотической активностью и способностью стимулировать ангиогенез опухолей толстой кишки. Способность CBL0137 ингибировать циклооксигеназу дает основание для исследования данного препарата в качестве нестероидного противовоспалительного средства, а также для изучения его антиканцерогенных свойств и возможного использования в противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-09216А.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65(2):87–108.

2. Dey A., Tergaonkar V., Lane D.P. Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53

and NF-kappaB pathways. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(12): 1031–40.

3. Guo C., Gasparian A.V., Zhuang Z. et al. 9-Aminoacridine-based anticancer drugs target the PI3K/AKT/mTOR, NF-kappaB and p53 pathways. *Oncogene* 2009;28(8):1151–61.
4. Gurova K. New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. *Future Oncol* 2009;5(10):1685–704.
5. Dermawan J.K., Gurova K., Pink J. Quinacrine overcomes resistance to erlotinib by inhibiting FACT, NF-κB, and cell-cycle progression in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2014;13(9):2203–14.
6. Gasparian A.V., Burkhart C.A., Purnal A.A. et al. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-κB and activate p53 by targeting FACT. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra74.
7. Barone T.A., Burkhart C.A., Safina A. et al. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and -resistant glioblastoma. *Neuro Oncol* 2016.
8. Герасимова Г.К., Маркова Н.П., Голубева И.С. и др. Противоопухолевая активность препарата Стелланин на перевиваемых опухолях мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;(1): 43–8. [Gerasimova G.K., Markova N.P., Golubeva I.S. et al. Antitumor activity of the drug Stellanin on transplantable mice tumors. *Russiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2014;(1):43–48. (In Russ.)].
9. Eberhart C.E., Coffey R.J., Radhika A. et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107(4):1183–8.
10. Taketo M.M. COX-2 and colon cancer. *Inflamm Res* 1998;47(Suppl 2):S112–6.
11. Jones M.K., Wang H., Peskar B.M. et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999;5(12):1418–23.
12. Tsujii M., Kawano S., DuBois R.N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(7):3336–40.
13. Tessner T.G., Muhale F., Riehl T.E. et al. Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J Clin Invest* 2004;114(11):1676–85.
14. Pozzi A., Yan X., Macias-Perez I. et al. Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem* 2004;279(28):29797–804.
15. Plummer S.M., Holloway K.A., Manson M.M. et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-κB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999;18(44):6013–20.
16. Olfert E., Bhasin J., Latt R. et al. The CCAC guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing were developed by the ad hoc subcommittee on endpoints of the CCAC Guidelines Committee: Ernest O. et al. 1998.
17. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
18. de Jonge H.J., Fehrmann R.S., de Bont E.S. et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* 2007;2(9):e898.