

Przeciwnowotworowy efekt sulindaku w hodowlach komórek raka jajnika

Antitumor effects of sulindac in ovarian cell cultures

Jakubowska-Mućka Anna¹, Sieńko Jacek², Świtaj Tomasz³, Gołąb Jakub⁴, Lasek Witold⁴

¹ Zakład Immunologii, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska

² II Klinika Położnictwa i Ginekologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

³ Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich i Kości, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska

⁴ Zakład Immunologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy było zbadanie wrażliwości komórek różnych linii raka jajnika na działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ).

Materiały i metody: Wrażliwość komórek raka jajnika na cytotoksyczny efekt NLPZ oceniano metodą kolorymetryczną w teście żywotności z użyciem barwnika MTT.

Wyniki: Z grupy 6 badanych NLPZ obejmującej: sulindak, siarczek sulindaku, sulfon sulindaku, kwas acetylosalicylowy, nimesulid i rofekoksyb, żywotność komórek raka jajnika w największym stopniu ograniczał sulindak i siarczek sulindaku. Dotyczyło to wszystkich czterech badanych linii raka jajnika: SKOV-3, MDAH 2774, CAO-V-1 i OVP-10. Słaby efekt przeciwnowotworowy, ujawniający się podczas przedłużonej 72-godzinnej inkubacji wykazywał sulfon sulindaku i rofekoksyb. Kwas acetylosalicylowy i nimesulid pozbawione były istotnego działania na komórki raka jajnika.

Wnioski: Uzyskane wyniki zachęcają do przeprowadzenia badań klinicznych, mogących odpowiedzieć na pytanie czy sulindak znajdzie zastosowanie jako leczenie uzupełniające standardowej chemioterapii raka jajnika.

Słowa kluczowe: : rak jajnika / sulindak / niesteroidowe leki przeciwzapalne /

Adres do korespondencji:

Witold Lasek
Zakład Immunologii Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Banacha 1a (blok „F”), 02-097 Warszawa, Polska
tel.: 22-5992196, fax: 22-5992194
e-mail: witold.lasek@wum.edu.pl

Otrzymano: 20.06.2010
Zaakceptowano do druku: 20.02.2011

Abstract

Objective: The purpose of our study was to assess susceptibility of cells of various ovarian cell lines on different nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

Materials and methods: Cytotoxic effect of NSAIDs was tested using MTT colorimetric assay.

Results: Amongst 6 NSAIDs tested: sulindac, sulindac sulfide, sulindac sulfone, acetylsalicylic acid, nimesulide, and rofecoxib, viability of ovarian carcinoma cells was compromised most strongly by sulindac and sulindac sulfide and concerned all the cell lines tested: SKOV-3, MDAH 2774, OVCAR-1, and OVP-10. Sulindac sulfone and rofecoxib also displayed some cytotoxic effect during prolonged 72-hour incubation. Other NSAIDs tested: nimesulide and acetylsalicylic acid were devoid of cytotoxic effect on ovarian cancer cells.

Conclusion: Our results are encourage enough to conduct clinical trials that could allow to draw conclusions regarding potential application of sulindac in the adjuvant treatment of a standard chemotherapy of ovarian cancer.

Key words: **ovarian cancer / sulindac / nonsteroidal anti-inflammatory drugs /**

Wstęp

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) przyciągają od wielu lat uwagę badaczy w związku z chemoprewencyjnym działaniem w stosunku do niektórych nowotworów, przede wszystkim raka jelita grubego [1]. W tym typie nowotworu obserwuje się często nadekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2), co koreluje ze stopniem zaawansowania zmian nowotworowych [2]. Chemoprewencyjne działanie NLPZ w stosunku do raka jelita grubego wykazano między innymi u pacjentów z rodzinną polipowatością gruczolakową, stosując takie leki jak: kwas acetylosalicylowy (aspiryna), sulindak oraz specyficzne inhibitory COX-2 z grupy koksylów. W tym ostatnim przypadku w badaniach zaobserwowano wzrost powikłań sercowo-naczyniowych, w tym zawałów serca, co stawia pod znakiem zapytania użycie koksylów (w tym celekoksylu i rofekoksylu) w profilaktyce i leczeniu chorób nowotworowych [3, 4].

W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na bezpośrednie przeciwnowotworowe działanie NLPZ. Efekt ten często nie jest związany z właściwością hamowania COX-1 i/lub COX-2 [5], lecz wynika z indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych [6, 7].

Cel pracy

W niniejszej pracy zbadano bezpośredni wpływ NLPZ, zarówno specyficznych blokerów COX-2 (rofekoksyl, nimesulid) jak i działających niewybiórczo na cyklooksygenazy (kwas acetylosalicylowy, sulindak, siarczek sulindaku, sulfon sulindaku), na komórki ustalonych linii raka jajnika: CAOV-1, SKOV-3, MDAH 2774, OVP-10.

Materiały i metody

Komórki nowotworowe

W pracy badano następujące linie komórek raka jajnika: CAOV-1, OVP-10, SKOV-3 oraz MDAH 2774. Linia CAOV-1 pochodziła od dr Macieja Siedlara z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Linię OVP-10 udostępniła dr Barbara Szaniawska z Zakładu Biologii Komórki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Linie SKOV-3 i MDAH 2774 pochodziły z ATCC (*American Type Culture Collection*).

Komórki hodowane były w mediach: Dulbecco's MEM (wysokoglukozowe - 4,5g/l glukozy) (Gibco BRL) (linie: SKOV-3, MDAH 2774, CAOV-1) bądź RPMI-1640 (Gibco BRL) (linia OVP-10) z dodatkiem antybiotyków (penicylina + streptomycyna + amfoterycyna), 2-merkaptetanolu (2-ME, stężenie 50 µM) i 10% płodowej surowicy cielęcej (FCS) (wszystkie odczynniki z Gibco BRL) w butelkach hodowlanych (Nunc) w warunkach 37°C, 5% CO₂. Komórki pasażowane były co 3-5 dni po uprzedniej trypsinizacji.

Odczynniki

W pracy badano następujące NLPZ: sulindak (Biomol), siarczek (sulfid) sulindaku (Biomol) - metabolit sulindaku wykazujący hamujące działanie na cyklooksygenazy *in vitro*, sulfon sulindaku (Biomol) - metabolit pozbawiony działania hamującego na cyklooksygenazy *in vitro*, kwas acetylosalicylowy (Sigma), rofekoksyl (Merc), nimesulid (Biomol). Roztwory wyjściowe (200 mM) uzyskiwano rozpuszczając odpowiednie związki w DMSO (Sigma).

Ocena żywotności komórek w hodowlach z NLPZ

– test z MTT

Bezpośredni wpływ NLPZ na wzrost badanych linii nowotworowych oceniany był *in vitro* przy użyciu standardowego testu MTT. Komórki do testu zawieszano w pożywce hodowlanej (RPMI-1640 lub Dulbecco's) w stężeniu 2 x 10⁵/ml (do 24 godzinnej inkubacji) i 0,6 x 10⁵/ml (do 72 godzinnej inkubacji). Następnie porcje 2 x 10⁴ bądź 6 x 10³ komórek w 100 µl pożywki rozlewano do studzienek (płaskodennych) płytki 96-studzienkowej (Corning), po czym dodawano do komórek na płytce odpowiednie rozcieńczenia NLPZ w pożywce hodowlanej do łącznej objętości 200 µl na studzienkę. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂, następnie wykonywano test z MTT. Stosowano trzykrotne powtórzenia dla każdego z badanych stężeń.

W celu wykonania testu z MTT do każdej studzienki z hodowanymi komórkami dodawano po 25 µl (stężenie 2,5mg/ml) roztworu MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium] (Sigma). Po 4-godzinnej inkubacji komórki wirowano przez 10 minut w warunkach 350xg, usuwano 200 µl supernatantu i dodawano roztwór DMSO z 1 N HCl (zmieszane w stosunku 25:1).

Przeciwnowotworowy efekt sulindaku w hodowlach komórek raka jajnika.

Spektrofotometryczny odczyt absorbancji wykonywano przy długości fali 550nm. Wartości średnie i odchylenia standardowe liczone z trzykrotnych powtórzeń dla poszczególnych stężeń. Efekt cytotoksyczny/cytostatyczny badanych substancji przedstawiony został jako względna żywotność (% kontroli) komórek i obliczany był na podstawie wzoru:

$$\text{Względna żywotność} = \frac{\text{Odczyt studzienki z komórkami i badanym lekiem} - \text{Odczyt tła}}{\text{Odczyt kontroli (bez leku)} - \text{Odczyt tła}} \times 100\%$$

Analiza statystyczna

W celu określenia znamienności statystycznej różnic w otrzymanych wynikach stosowano test *t* Studenta.

Wyniki

Jak pokazano na rycinie 1, inkubacja komórek raka jajnika CAOV-1 z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi: sulindakiem, sulfonem sulindaku, siarczkiem sulindaku, aspiryną (kwasem acetylosalicylowym) i nimesulidem, nie powodowała znaczących zahamowań we wzroście komórek. Wyjątek stanowił sulindak i siarczek sulindaku, które w najwyższych stężeniach (200 µM) obniżały żywotność komórek CAOV-1 już po 24-godzinnej inkubacji. Po 72 godzinach hodowli z sulindakiem i siarczkiem sulindaku, przy zastosowaniu najwyższych dawek 200 µM dochodziło do obniżenia żywotności o prawie 100% w przypadku sulindaku i 90% w hodowlach z siarczkiem sulindaku. Sulindak jako jedyny działał statystycznie istotnie również w stężeniu 100 µM, chociaż już nie tak silnie jak podczas inkubacji w stężeniu 200 µM.

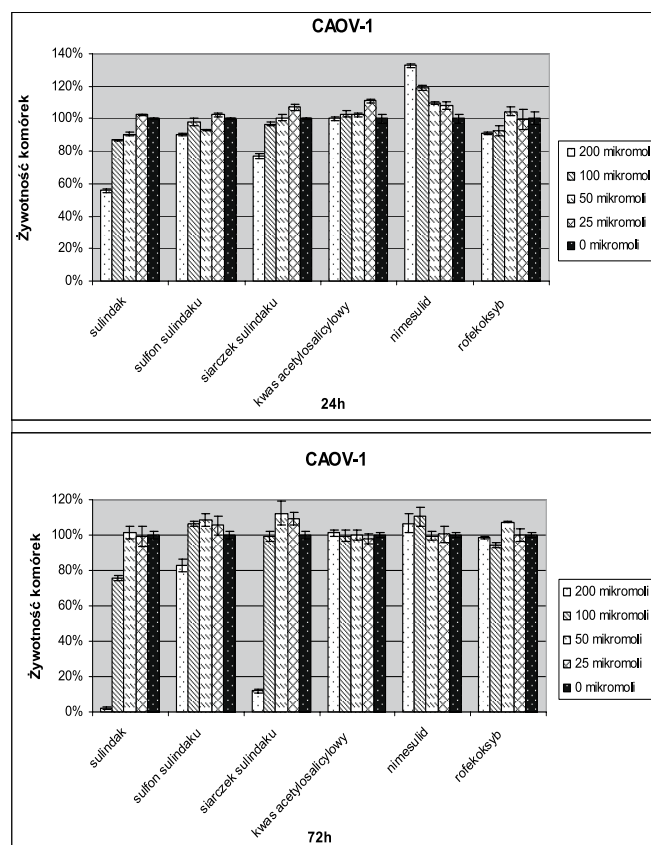
Linia ludzkiego raka jajnika SKOV-3 była podobnie wrażliwa na działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych jak CAOV-1: wyraźnie na obniżenie żywotności oddziałuje sulindak. (Rycina 2).

Efekt działania sulindaku był zauważalny już po 24 godzinach i pogłębiał się po 72 godzinach. Natomiast działanie siarczku sulindaku było widoczne dopiero po 72 godzinach hodowli. W przypadku sulindaku, podczas inkubacji przedłużonej stężenia 50 µM i 25 µM również obniżały żywotność komórek, aczkolwiek w znacznie mniejszym stopniu.

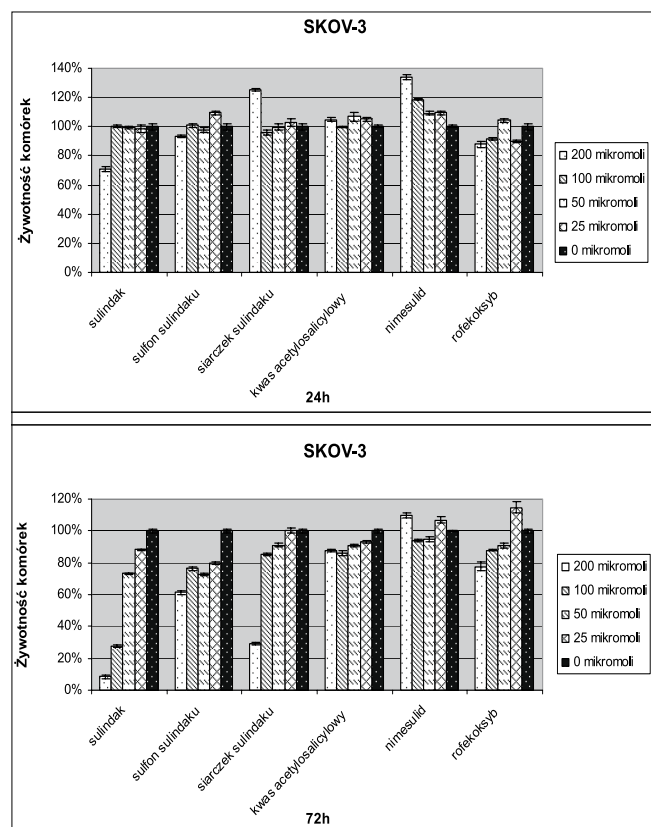
Prócz sulindaku i siarczku sulindaku, statystycznie istotnie ograniczając na żywotność komórek SKOV-3 podczas 72-godzinnej inkubacji działały najwyższe stężenia sulfonu sulindaku oraz rofekoksybu.

Jak przedstawiono na rycinie 3, tak jak w przypadku dwóch poprzednich linii ludzkiego raka jajnika, cytotoksycznie na komórki MDAH 2774 działał szczególnie silnie siarczek sulindaku i sulindak, ograniczając żywotność już po 24 godzinach hodowli. Po 72 godzinach inkubacji z MDAH 2774, w przypadku czterech z sześciu badanych związków zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie żywotności komórek nowotworowych. Były to: siarczek sulindaku, sulindak, sulfon sulindaku oraz rofekoksyb. Najsilniej z tej czwórki działał siarczek sulindaku, który w dawkach 200 i 100 µM redukował żywotność komórek do wartości 10-20%.

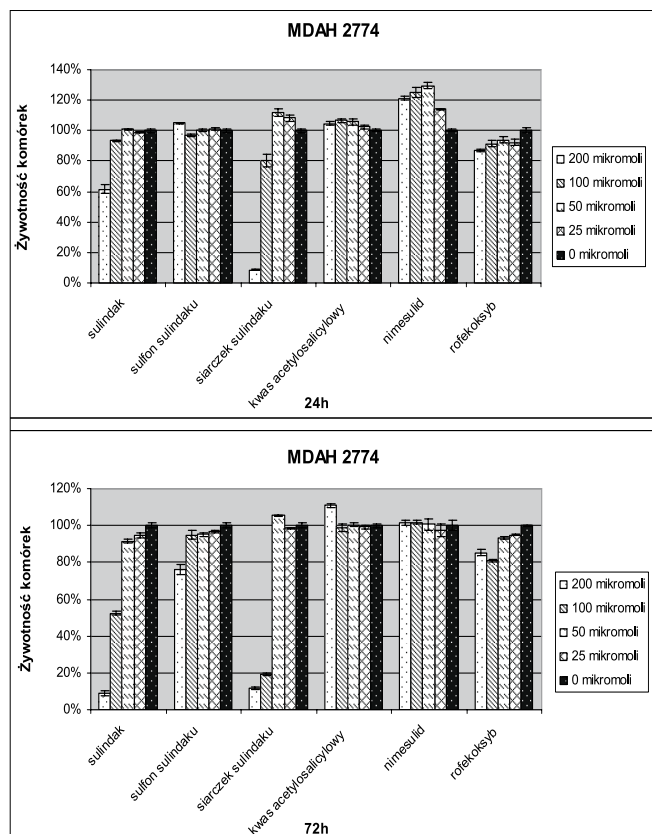
Wydaje się, że linia OVP-10 jest bardziej wrażliwa na działanie NLPZ niż wyżej omówione linie komórkowe. (Rycina 4).



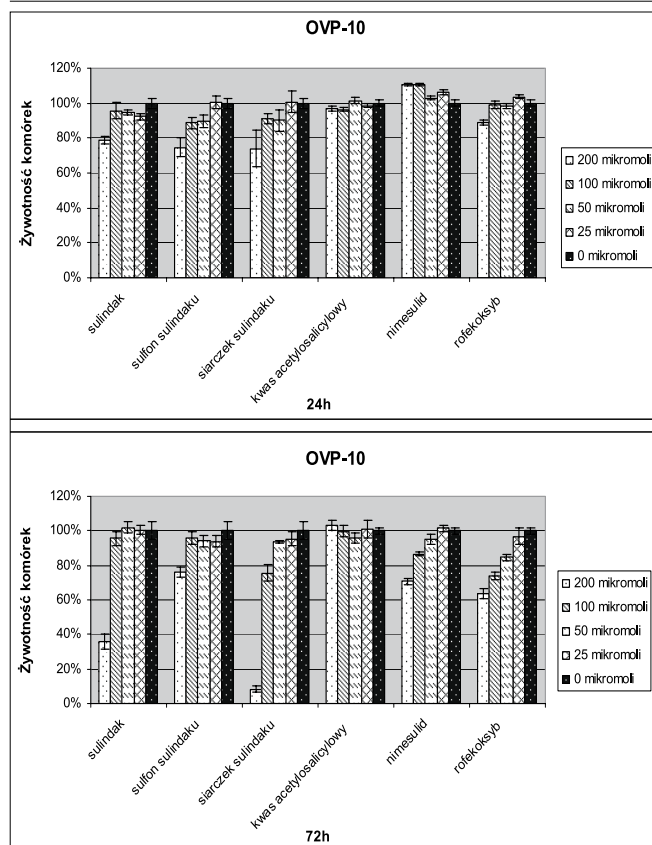
Rycina 1. Przeżywalność komórek ludzkiego raka jajnika CAOV-1 po 24 i 72 godzinach hodowli z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Podano wartości średnie z 3 powtórzeń ± 1 SD.



Rycina 2. Przeżywalność komórek ludzkiego raka jajnika SKOV-3 po 24 i 72 godzinach hodowli z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Podano wartości średnie z 3 powtórzeń ± 1 SD.



Rycina 3. Przeżywalność komórek ludzkiego raka jajnika MDAH 2774 po 24 i 72 godzinach hodowli z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Podano wartości średnie z 3 powtórzeń ± 1 SD.



Rycina 4. Przeżywalność komórek ludzkiego raka jajnika OVP-10 po 24 i 72 godzinach hodowli z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Podano wartości średnie z 3 powtórzeń ± 1 SD.

Efekt ten uwidocznił się zwłaszcza po 72 godzinach inkubacji z lekami. Dwudziestoczęterogodzinna hodowla ujawniła, że sulindak i jego metabolity oraz – w niewielkim stopniu – rofekoksyb wpływają hamująco na żywotność badanej linii nowotworowej. Natomiast przedłużona inkubacja z badanymi związkami spowodowała istotne nasilenie efektu cytotoksycznego. Dotyczyło to wszystkich NLPZ, z wyjątkiem kwasu acetylosalicylowego. Najsilniej działał, podobnie jak w przypadku wcześniej przedstawionych linii komórek raka jajnika, sulindak i siarczek sulindaku.

Co ciekawe, zaobserwowano nieznaczne stymulowanie wzrostu komórek nowotworowych wszystkich badanych linii raka jajnika w 24-godzinnej hodowli z najwyższymi stężeniami nimesulidu.

Dyskusja

Wydaje się, że obecne metody leczenia nowotworów, zarówno chemioterapia jak i radioterapia, osiągają już kres możliwości terapeutycznych w stosunku do większości nowotworów. Dotyczy to również raka jajnika, który w stopniu IV zaawansowania klinicznego staje się coraz bardziej odporny na kolejne kursy chemioterapii i jest praktycznie nieuleczalny [8, 9].

Od ponad 20 lat intensywnie prowadzone są badania nad wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) na procesy karcynogenezy i nowotworzenia. Wykazano, że niektóre NLPZ hamują rozwój indukowanych nowotworów u zwierząt [10, 11].

W ostatnim dziesięcioleciu wykazano ponadto w wielu badaniach, że NLPZ wykazują bezpośredni efekt przeciwnowotworowy *in vitro* w stosunku do komórek różnych ustalonych linii nowotworów [7, 12, 13].

W niniejszych badaniach wykazano, że sulindak i jego czynny metabolit *in vitro* siarczek sulindaku (hamujący aktywność cyklooksygenazy) wywierają powtarzalne cytotoksyczne działanie w stosunku do komórek różnych linii raka jajnika. W dostępnej literaturze wpływ NLPZ na komórki raka jajnika nie był badany w porównywalnym zakresie – pojedyncze prace pokazują wpływ wyselekcjonowanych NLPZ. W jednej z prac wykazano między innymi brak istotnego wpływu kwasu acetylosalicylowego na komórki linii CAOV-3 [14], co jest zgodne z naszymi wynikami na wszystkich czterech badanych liniach raka jajnika. W innej z prac, podobnie jak w niniejszym opracowaniu, ujawniono wrażliwość linii SKOV-3 na siarczek sulindaku. Wykazano, że zjawisko to było związane z indukcją proapoptotycznego białka NAG-1 [15]. Siarczek sulindaku działał cytotoksycznie również na komórki raka jajnika linii 2008 [16].

W naszych badaniach selektywny inhibitor COX-2 rofekoksyb wykazywał umiarkowany, zależny od zastosowanej linii raka jajnika efekt cytotoksyczny, co jest zgodne z wynikami badań testujących inne leki z tej grupy: celekoksyb i NS-398 [5, 16]. Wskazuje to jednoznacznie, że bezpośrednie działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych nie wiąże się z właściwościami hamowania COX-2.

Mechanizm działania sulindaku i siarczku sulindaku na różne komórki nowotworowe jest wielokierunkowy. W przypadku testowanych w niniejszej pracy linii raka jajnika, efekt cytotoksyczny nie wydaje się być zależny od hamowania cyklooksygenazy, ponieważ w żadnej z badanych linii nie stwierdzono ekspresji COX-1 i COX-2 (dane nieprezentowane).

W wielu pracach pokazano, że sulindak bądź siarczek sulindaku oddziałują na białka odgrywające ważną rolę w cyklu komórkowym. Ujawniono na przykład, że sulindak zwiększa w komórkach ilość białek p53 i p21^{Waf/Cip1}, przez co dochodzi do zahamowania progresji cyklu komórkowego, a następnie do apoptozy [7, 17]. Zaobserwowano również, że sulindak wykazuje właściwości zwiększania w komórkach nowotworowych stężenia proapoptotycznego białka Bak [18], a zmniejsza ilość antyapoptotycznego białka Bcl-2 [13]. Za cytotoksyczny efekt sulindaku, a także siarczku sulindaku, może również odpowiadać właściwość tych związków do blokowania β -kateniny [13, 17], ograniczania ekspresji surwiwiny [19] oraz hamowania aktywacji drogi sygnałowej czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [18, 20].

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań *in vitro* mogą mieć implikacje *in vivo*. Wskazują na potencjalną użyteczność sulindaku jako dodatku do konwencjonalnej chemioterapii raka jajnika, zwłaszcza że lek ten hamuje w komórkach nowotworowych ekspresję białek odpowiedzialnych za lekooporność [21], a siarczek sulindaku wykazuje synergizm z oksaliplatyną [22].

W warunkach *in vivo*, przeciwnowotworowe działanie sulindaku mogłoby być ponadto spotęgowane o działanie antyangiogenne, ponieważ w dużym odsetku raków jajnika obserwuje się nadekspresję COX-2 [23] – czynnika sprzyjającego rozwojowi naczyń krwionośnych [24]. Na świecie zostały podjęte badania I i II fazy nad zastosowaniem sulindaku w prewencji raka płuc [25], raka okrężnicy [26] i raka piersi [27] oraz w terapii kombinowanej (z docetakselem) raka piersi [28]. Poza pojedynczym przypadkiem [21], w literaturze brak jest danych, co do zastosowania sulindaku w leczeniu raka jajnika.

Wnioski

Podsumowując: uzyskane w przedstawionej pracy wyniki zachęcają do przeprowadzenia badań klinicznych, mogących odpowiedzieć na pytanie czy sulindak znajdzie zastosowanie jako leczenie uzupełniające standardowej chemioterapii raka jajnika.

Piśmiennictwo

- Half E, Arber N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opin Pharmacother*. 2009, 10, 211-219.
- Sheehan K, Sheahan K, O'Donoghue D, [et al.]. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA*. 1999, 282, 1254-1257.
- Stelmazuk T, Jaloča Ł, Wojtuś S, Gil J. Chemoprewencja raka jelita grubego. *Pol Merk Lek*. 2009, XXVI, 155, 565-568.
- Cuzick J, Otto F, Baron J, [et al.]. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol*. 2009, 10, 501-507.
- Andrews P, Zhao X, Allen J, [et al.]. A comparison of the effectiveness of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives against cancer cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008, 61, 203-214.
- Chen S-T, Thomas S, Gaffney K, [et al.]. Cytotoxic effects of celecoxib on Raji lymphoma cells correlate with aggravated endoplasmic reticulum stress but not with inhibition of cyclooxygenase-2. *Leukemia Res*. 2010, 34, 250-253.
- Bock J, Menon S, Goswami P, [et al.]. Differential activity of sulindac metabolites against squamous cell carcinoma of the head and neck is mediated by p21waf1/cip1 induction and cell cycle inhibition. *Cancer Biol Ther*. 2007, 6, 30-39.
- Gubbels J, Claussen N, Kapur A, [et al.]. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2010, 3, 8.
- Nowak-Markwitz E. Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer treatment (in Polish). *Ginekol Pol*. 2009, 80, 615-619. Polish.
- Rioux N, Castonguay A. Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res*. 1998, 58, 5354-5360.
- Thompson H, Jiang C, Lu J, [et al.]. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res*. 1997, 57, 267-271.
- Loveridge C, MacDonald A, Thoms H, [et al.]. The proapoptotic effects of sulindac, sulindac sulfone and indomethacin are mediated by nucleolar translocation of the RelA(p65) subunit of NF-KappaB. *Oncogene*. 2008, 27, 2648-2655.
- Gardner S, Hawcroft G, Hull M. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on β -catenin protein levels and catenin-related transcription in human colorectal cancer cell. *Br J Cancer*. 2004, 91, 153-163.
- Rodriguez-Burford C, Barnes M, Oelschlagel D, [et al.]. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) on ovarian carcinoma cell lines: preclinical evaluation of NSAIDs as chemopreventive agents. *Clin Cancer Res*. 2002, 8, 202-209.
- Kim J-S, Baek S, Sali T, Eling T. The conventional nonsteroidal anti-inflammatory drug sulindac sulfide arrests ovarian cancer cell growth via the expression of NAG-1/MIC-1/GDF-15. *Mol Cancer Ther*. 2005, 4, 487-493.
- Barnes A, Miller B, Kucera G. Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2007, 104, 443-450.
- Han A, Song Z, Tong C, [et al.]. Sulindac suppresses beta-catenin expression in human cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2008, 583, 26-31.
- Yamamoto Y, Yin M-J, Lin K-M, [et al.]. Sulindac inhibition activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*. 1999, 274, 27307-27314.
- Scheper M, Nikitakis N, Sauk J. Survivin is a downstream target and effector of sulindac-sensitive oncogenic Stat3 signalling in head and neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007, 36, 632-639.
- Seo A-M, Hong S-W, Shin J-S, [et al.]. Sulindac induces apoptotic cell death in susceptible human breast cancer cells through, at least in part, inhibition of IKKbeta. *Apoptosis*. 2009, 14, 913-922.
- O'Connor R, O'Leary M, Ballot J, [et al.]. A phase I clinical and pharmacokinetic study of the multi-drug resistance protein-1 (MRP-1) inhibitor sulindac, in combination with epirubicin in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007, 59, 79-87.
- Filis S, Splawiński J. Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Res*. 2009, 29, 435-442.
- Uddin S, Ahmed M, Hussain A, [et al.]. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2010, 126, 382-394.
- Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, [et al.]. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998, 93, 705-716.
- <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00368927> (15 lipca 2010)
- <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00062023> (15 lipca 2010)
- <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00245024> (15 lipca 2010)
- <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00039520> (15 lipca 2010)