

tovari.jozsef_19_22

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A tumor környezetének hatása a daganatok progressziójára

Dr. Tóvári József



Országos Onkológiai Intézet

Onkológiai Kutató Központ

Budapest, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS, ELŐZETES SAJÁT EREDMÉNYEK.....	7
1.1 A daganatos megbetegedés	7
1.2 Az áttétképzés folyamata.....	9
1.3 Tumorok beereződési mechanizmusai	10
1.3.1 Bimbózás, „sprouting” angiogenezis.....	10
1.3.2 Intusszusceptív angiogenezis	10
1.3.3 Érinkorporáció	10
1.3.4 Glomeruloid angiogenezis.....	11
1.3.5 Posztnatális vaszkulogenezis.....	11
1.3.6. Vaszkuláris mimikri.....	12
1.4 Sejtadhézió, sejtvezrendszer, sejtmozgás	13
1.4.1 A sejtek alakja, a sejtvezrendszer elemei	13
1.4.2 Adhéziós molekulák és azok kapcsolatai	15
1.4.3 A sejtmozgás alapformái	16
1.4.4 Saját eredmények a tumorsejtmozgás morfológiai leírásában	18
1.4.5 A sejtmozgás szabályozása (motogének, mitogének)	22
1.4.6 A Rho GTP-ázok szerepe a sejt migrációban.....	23
1.5 Tumorsejtek kölcsönhatásai az extracelluláris mátrixszal	24
1.5.1 Antikoagulánsok hatása a humán melanómasejtek tüdő- és májáttétképző képességére.....	25
1.5.2 A heparinok hatása a daganatsejtek proliferációjára és adhéziójára	26
1.6 A hipoxia hatása a daganatokra.....	28
1.6.1 A hipoxia szerepe az angiogenezisben	31
1.6.2 A hipoxia szerepe a Rho-Rac-Cdc42 szabályozásában normál- és daganatsejtekben	33
1.7 Hipoxia és vérszegénység korrekciója daganatos betegekben	34
1.7.1 A vérszegénység korrekciója eritropoetinnel daganatos betegekben	34
1.7.2 Vitatott klinikai és kísérletes adatok az rHuEPO-k alkalmazásáról	35
2. CÉLKITŰZÉSEK	36
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
3.1 A kísérletek során használt tumorsejtvonalak és szövettenyésztési körülmények.....	37
3.2 Sejtproliferációs vizsgálatok	38
3.3 Klonogén túlélési vizsgálat	39
3.4 Apoptotikus frakció kimutatása	39
3.5 Melanómasejtek adhéziója extracelluláris mátrix (ECM) fehérjékhez in vitro	40
3.6 Melanómasejtek adhéziója endotélsejtekhez in vitro	40
3.7 Migráció és invázió in vitro vizsgálati módszerei.....	41
3.7.1 Módosított Boyden-kamra vizsgálatok.....	41
3.7.2 “Time-lapse” videomikroszkópia.....	42
3.8 Immunhisztokémiai, immuncitokémiai vizsgálatok	44
3.8.1 A citoskeletális elemek kimutatása a sejtmozgás vizsgálatában	44
3.8.2 A proliferációs index mérése.....	44
3.8.3 A daganatasszociált erek morfometriai vizsgálata	45
3.8.4 A tumorszövet funkcionális képképzése Hoechst 33342 festék és doxorubicin felhasználásával	45

3.8.5 Az EPC-k azonosítása konfokális mikroszkóppal humán NSCLC mintákban.....	45
3.9 HT1080 sejtek transzfekciója GFP-vinkulinnal	46
3.10 Elektronmikroszkópos vizsgálatok	46
3.11 Oligoszacharid heparinszármazékok.....	47
3.12 Proteinfoszfátáz-aktivitás vizsgálata	48
3.13 Hipoxiás kultúrák	48
3.14 A HIF-1 α csendesítése	48
3.15 Valós idejű RT-PCR vizsgálatok	48
3.15.1 RNS-extrakció.....	48
3.15.2 HIF-1 α és kis G-fehérjék expressziójának meghatározása tumorsejtekből	49
3.15.3 A HIF-1 α RNS izolálása, reverz transzkripciója és expressziója valós idejű PCR-rel	49
3.15.4 A humán eritropoetinreceptor és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor expressziójának meghatározása tumorxenograftokban	50
3.15.5 Az EPOR expressziójának meghatározása NSCLC sejtekben és betegmintákban	51
3.15.6 Az EPC-markerek szintjének mérése kvantitatív valós idejű RT-PCR segítségével	52
3.16 Áramlási citometriás mérések	52
3.16.1 Eritropoetinreceptorok kimutatása tumorsejteken.....	52
3.16.2 Az EPC-k meghatározása NSCLC-betegek perifériás vérében.....	53
3.17 Az aktív RhoA meghatározása	53
3.18 Western blot vizsgálatok	53
3.19 Hemoglobinszint mérése SCID egerekben	54
3.20 Állatkísérletek	54
3.20.1 Tüdőkolonizációs vizsgálatok heparinokkal.....	54
3.20.2 A melanómasejtek kitapadásának dinamikája a tüdőben.....	55
3.20.3 Májmetasztázis-modell heparinokkal.....	55
3.20.4 Rekombináns humán eritropoetin és 5-fluorouracil-kezelés in vivo.....	55
3.20.5 Rekombináns humán eritropoetin és gemcitabin kezelés in vivo	56
3.20.6 In vivo EPO-kezelés és a daganatok besugarazása	56
3.20.7 Hipoxia hatása kísérletes daganatok progressziójára	56
3.21 Rutin hisztológiai vizsgálatok	57
3.22 Statisztikai analízisek	57
3.23 Klinikai adatok	58
3.23.1 EPC-k vizsgálata NSCLC klinikai mintákban.....	58
3.23.2 EPOR-expresszió mérése humán bronchoszkópos kefe mintákban	58
4. EREDMÉNYEK.....	60
4.1 A sejtmozgás modellezése 3D rendszerben	60
4.2 Oligoszacharid heparinszármazékok hatása humán melanómasejtek in vitro migrációjára és kísérletes metasztatizálására	67
4.3 Hipoxia hatása eltérő szöveti eredetű tumorsejtvonalak migrációjára és metasztatizálására.....	73
4.3.1 A hipoxia hatása a daganatsejtek proliferációjára.....	73
4.3.2 A hipoxiás környezet hatása a daganatsejtek in vitro motilitására	73
4.4 EPC-k diagnosztikus alkalmazása a daganatok progressziójának és a terápiák hatékonyságának követésére tüdőrákban	79
4.5 Az rHuEPO hatása a daganatok növekedésére és a kezelések hatékonyságára kísérletes rendszerekben.....	82
4.5.1 Az rHuEPO-val kiváltott érelváltozások hatása a kemoterápiára	83

4.5.2 Az rHuEPO-val kiváltott érelváltozások hatása a sugárterápiára	91
4.6 EPOR-expresszió és a betegek klinikopatológiai adatai közötti összefüggések humán bronchoszkópos tüdőrákmintákban	94
5. DISZKUSSZIÓ.....	96
5.1 A vér- és a nyirokérhálózatok	96
5.2 Posztnatális vaszkulogenezis: endoteliális progenitorsejtek szerepe a daganatok beereződésében.....	97
5.3 Az extracelluláris mátrix és a mikrokörnyezet.....	99
5.4 A sejtmozgás alapjai.....	99
5.5 A motilitás befolyásolása	102
5.6 A hipoxia szerepe a daganatok áttétképzésében.....	109
5.7 HIF-1 α -t célzó terápiás lehetőségek	111
5.8 A hipoxia korrekciója.....	112
5.9 Az EPOR szerepe tüdőrákban: klinikai eredmények	115
6. KÖVETKEZTETÉS	117
7. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	118
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	120
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	122
10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	148
10.1 Az értekezés alapját képező, a PhD fokozat elnyerése (1999) után született közlemények.....	148
10.1.1 Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények	148
10.1.2 Magyar nyelvű közlemények.....	149
10.2 Egyéb, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények	150
10.2.1 Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények	150
10.2.2 Magyar nyelvű közlemények.....	158
10.3 Egyéb, a PhD fokozat elnyerése előtt született közlemények	159
10.4 Tudományometriai adatok.....	161

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC133: másképp CD133, prominin (mouse)-like 1 fehérje, őssejtmarker
ADM: adrenomedullin
Ang-1/2: angiopoetin-1/2
ANOVA: varianciaanalízis
Arp2/3: actin-related protein 2/3
bFGF-FGFR: bázikus fibroblaszt növekedési faktor / receptor
CAC: keringő angiogén sejtek
CD31: vérlemezke/endotél sejtadhéziós molekula (PECAM-1)
CD34: sejtfelszíni molekula, elsősorban őssejteken, endoteliális sejteken,
CD44: sejtfelszíni molekula, hialuronsav receptor
CD44v3: a CD44 3-as splice variánsát tartalmazó izoforma
Cdc42: Cell division control protein 42 homolog kis G-fehérje,
c-Met: a hepatocytá növekedési faktor receptorát meghatározó protoonkogén és annak terméke
ECM: extracelluláris mátrix
EGF/EGFR: epidermális növekedési faktor / receptor
EMT: epiteliális-mezenchimális tranzíció
EPC: csontvelői eredetű endoteliális progenitor sejtek
FAK: fokális adhéziós kináz
FCS: főtális borjúsavó
FCS-: savómentes körülmények
FCS+: főtális borjúsavót tartalmazó körülmények
FITC: fluoreszcein-izotiocianát
Flt-1 = fms-related tyrosine kinase 1
GAG: glukóz-aminoglikán
GalNAc: N-acetil-galaktozamin
GlcNAc: N-acetil-glukozamin
GlcNS: N-szulfatált glukozamin
GPCR: G-protein-kapcsolt receptor
GRE-modell: graded radial extension modell a sejtmozgásra
HA: hialuronsav
FIH: faktor inhibitor HIF-1 α
HNSCC: fej-nyaki laphámrák
HRE: hipoxia felelős elemek
HS/HSGAG: heparán-szulfát / glukóz-amino glikán
HSPG: heparán-szulfát-proteoglikán
HGF: hepatocytá növekedési faktor
IC50: 50%-os gátlási koncentráció
IdoA: iduronsav
LMWH: alacsony molekulásúlyú heparin
MAPK: mitogén aktivált protein kináz
MLC/MLCK/ MLCP miozin könnyű lánc / kináz / foszfatáz

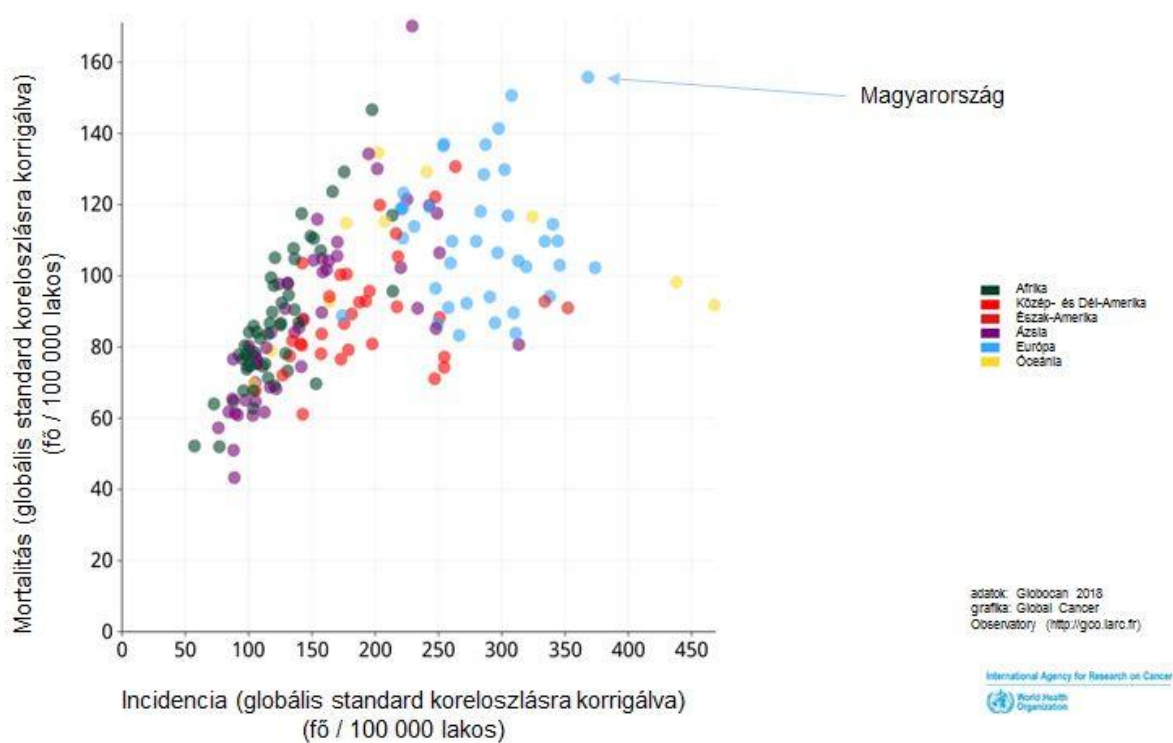
MMP: mátrix metalloproteáz
NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák
PBS: fiziológias só tartalmazó foszfát puffer
PDGF/PDGFR: trombocita eredetű növekedési faktor / receptor
PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIP₃: foszfatidil-inozitol-triszfoszfát
PHD1-PHD3: prolil-hidroxilázok
PKC: protein-kináz C
PP1c: protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, kis G-fehérje,
RGD: arginin-glicin-aszparaginsav
RhoA: Ras homolog family member A;
RNS: ribonukleinsav
RTK: receptor tirozin-kináz
ROS: reaktív oxigén származékok
Scar: Supressor of cAR
SCID: súlyos kombinált immunhiány
SD: standard deviáció, szórás
SEM: standard hiba
sh-RNS: rövid hajtű RNS
STAT: signal transducer and activator of transcription (transzkripció jeltovábbító és aktivátor)
TFPI: szöveti faktor útvonal inhibitor
TGFβ/TbetaR: tumor növekedési faktor béta / receptor
TME: szöveti mikrokörnyezete
TK/TKR/TKI: tirozin-kináz / receptor / inhibitor
UFH: nem frakcionált heparin
VCAM: Vaszkuláris sejtadhéziós fehérje 1
VEGF/VEGFR: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor / receptor
VE-Cadherin: vaszkuláris endoteliális cadherin
vWF: von Willebrand faktor
WASP: Wiskott–Aldrich szindróma fehérje

1. BEVEZETÉS, ELŐZETES SAJÁT EREDMÉNYEK

1.1 A daganatos megbetegedés

A rosszindulatú daganatos megbetegedések és az azok miatt bekövetkező halálesetek gyakorisága évek óta a második-harmadik helyet foglalják el a globális statisztikákban. Sőt a 40-80 év közötti populációban az Egyesült Államokban a vezető halálok a különböző malignus elváltozások [1]. A 2020-as adatok szerint a több mint 19,2 millió új diagnosztizált beteg mellett 9,9 millió páciens halálát okozták az eltérő szöveti eredetű daganatok [2]. Sajnos Magyarország mind az incidencia, mind a mortalitás tekintetében kifejezetten rossz mutatókkal rendelkezik (1. ábra).

1. ábra. A malignus megbetegedések és halálozások gyakorisága országonként



Az incidencia és a mortalitás értékei 100 000 lakosra vetítve (Global Cancer Observatory, 2018 [2])

A Nemzeti Rákregiszter adatai szerint 2018-ban 94 340 páciens (48 282 nő és 46 058 férfi) szenvedett valamilyen malignus elváltozásban [3]. A Központi Statisztikai Hivatal utolsó tíz éves statisztikai adatai alapján hazánkban évente mintegy 32-33 ezer fő hal meg malignus kórkép következtében, mely szám az évek során jelentősen nem változott [4].

tovari.jozsef_19_22

A dolgozatomban érintett daganatfélések 2018-as incidencia- és 2019-es mortalitási adatait az **1. táblázatban** foglaltam össze.

1. táblázat. A dolgozat témájában szereplő daganatok hazai előfordulási (2018) és halálozási (2019) adatai [4]

Daganat fajtája	Incidencia		Mortalitás	
	Nő	Férfi	Nő	Férfi
Hörgő- és tüdőrák	4 381	5 968	3 450	4 997
Melanóma (bőr)	1 442	1 335	143	193
Vastagbélrák	4 785	5 765	2 096	2 837
Fej-nyaki daganatok (ajak-, száj-, garat- és gégetumorok)	980	2 942	345	1 489

A malignus betegségeket ugyan alapvetően genetikai betegségként azonosítjuk, azonban a daganatsejtek szaporodása és a betegség előrehaladása elválaszthatatlan a tumorsejtek és azok környezetének kapcsolatai nélkül. A tumorsejtek proliferációjában, anyagcseréjük sajátosságaiban, sejthalálában számos genetikai eltérést (mutációk, expressziós változások), valamint szabályozási-szignalizációs zavart írtak már le, de az olyan jelenségek hatása a tumorok progressziójára, mint a tumorok beereződése, tápanyag- és oxigénellátottsága, adhéziós és migrációs tulajdonságai, valamint kapcsolataik az extracelluláris mátrixszal (ECM) és a környezetben található sejtekkel ma még kevésbé ismert folyamatok. Pedig ezek jobb megismerése elengedhetetlen lenne a hatékonyabb terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez.

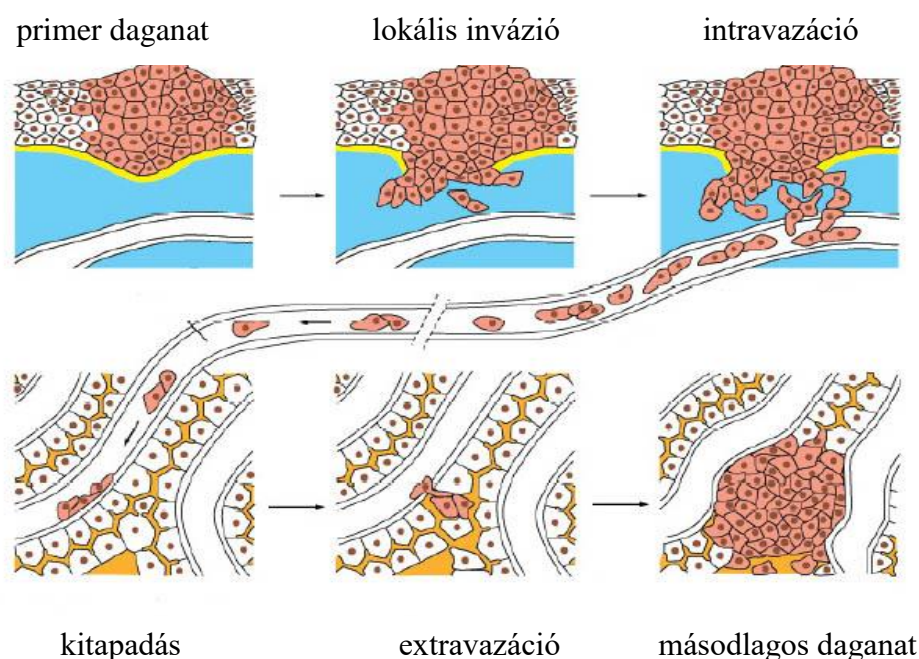
Az utóbbi két-három évtizedben az innovatív terápiás fejlesztéseknek köszönhetően számtalan új, targetspecifikus hatóanyag került be a klinikai gyakorlatba. Ezek nagy része egy-egy, a tumorsejtekben expresszálandó, azok proliferációját fokozottan támogató célmolekulát támad, amelyek az eltérő szöveti eredetű daganatokban más és más fehérjét jelentenek [5, 6]. Az újfajta kemoterápiás megközelítésnek köszönhetően több, addig nagyon rossz terápiás választ adó daganat esetében (melanóma, tüdőrák) jogos remények keletkeztek a kezelések hatékonyságának növekedésével kapcsolatosan, azonban a klinikai lefolyások gyakran cáfolják azokat. Ennek legfőbb oka az, hogy a terápiák alkalmazása szinte kizárólag a primer daganat

biológiai sajátosságain alapszik, ugyanakkor a malignus halálozások kimagasló többsége az áttétek kialakulása miatt következik be. Ezért az áttétképzés folyamata, az azokban szereplő molekuláris események mind jobb megismerése lehet az egyik kulcsa a sikerebb terápiák fejlesztésének.

1.2 Az áttétképzés folyamata

A daganatok disszeminációja első lépéseként a primer helyen növekvő tumor a környező szövetbe inváziót hajt végre, és egy bizonyos méret felett a tápanyagellátás és az oxigén biztosítása miatt valamilyen módon vérkeringésre tesz szert. Az áttétképzés során egyedi tumorsejtek vagy tumorsejtcsoportok válnak le a daganatról, és belépnek a vér- vagy a nyirokkeringésbe (intravazáció). A keringésben találkoznak az ott megjelenő alakos és szolubilis elemekkel, majd a célszervben kitapadnak. Ezután a keringést elhagyva (extravazáció) szaporodásnak indulnak a célszervben (2. ábra). A folyamat megismétlődhet, ami másod-, illetve harmadlagos metasztázisok megjelenéséhez vezethet [7].

2. ábra. A metasztázisképzés lépései (Molecular Biology of the Cell, 4. kiadása nyomán [8])



Látható, hogy csak a kezdeti és a másodlagos helyen történő tumornövekedés során van daganatsejt-osztódás a metasztázisképzés folyamatában, az összes többi lépésben annak nincs szerepe. Sokkal inkább a tumorsejtek adhéziós (sejt-sejt, sejt-ECM), mátrixdegradációs és

motilitási képességei a fontosak, valamint az, hogy a tumor képes legyen a saját, funkcionális érhálózatát kialakítani.

1.3 Tumorok beereződési mechanizmusai

A szervezetben új erek képződése kétféle módon történhet: az embrionális korban játszódó vaszkulogenezis és a későbbi angiogenezis folyamataival [9]. Az embriókban endotélsejt-prekurzorok (angioblasztok) összeolvadásával egy kezdetleges hálózat jön létre, ami később az angiogenezis folyamata során érik a végső formájára [10–13].

A daganatok ereződésének hatféle alapmechanizmusát írták le. Ezek az érbimbózás (sprouting), az intusszuszeptív érképződés, az érinkorporáció, a glomeruloid érképződés, a vaszkuláris mimikri és a posztnatális vaszkulogenezis. Azonban ezen folyamatok közül gyakran több is megfigyelhető egy daganatszövetben, ráadásul eltérő formáik is lehetnek többüknek [11].

1.3.1 Bimbózás, „sprouting” angiogenezis

A sprouting, vagy más néven bimbózó angiogenezis az 1970-ben Folkman és Ausprunk által elsőként leírt beereződési forma a daganatokban, ezért máig ez a legismertebb is. A nevét arról kapta, hogy a tumorok új oldalágakat, bimbókat indukálnak a szövetben már jelen levő kapillárisokból, venulákból. Ma már két formáját különböztetjük meg attól függően, hogy a „bimbózó” endotélsejtek a kötőszöveti vándorlásuk során a bazális membránjukat és a sejtkapcsolataikat megtartják-e, vagy időlegesen elvesztik [14, 15].

1.3.2 Intusszuszeptív angiogenezis

A bimbózó angiogenezis mellett a második leggyakrabban megfigyelt érképződési forma a tumorokban [14]. Ez az érképzési forma is erősen függ a kötőszövetes környezettől, és gyakorlatilag az érlumen kettéosztódását jelenti. Emiatt új erek nem is képződnek, csak a meglévő kapilláris hálózat komplexitását fokozza. Az intusszuszeptív angiogenezisnek is több formáját írták már le [16–18].

1.3.3 Érinkorporáció

Az érinkorporáció során a daganatok a növekedésük alatt egyszerűen bekebelezik a környezetükben található ereket [19]. Ez gyakran együtt jár a bimbózással, ahol a daganat szélein sprouting angiogenezissel keletkező ereket (és a régebbi gazdaszöveti kapillárisokat is) a tumorok később inkorporálják [20].

1.3.4 Glomeruloid angiogenezis

A glomeruloid testek érgomolyagokból felépült jellegzetes érstruktúrák, amelyeket leginkább a központi idegrendszer daganataiban (metasztázisaiban) írták le [21]. Nem teljesen ismert még a kialakulásuk mikéntje [14], de kétféle lehetséges folyamatot is leírtak már. Az egyik szerint a glomeruloid angiogenezis elején tág „anyaerek” alakulnak ki az agyszövetben, melyek falában az endoteliális sejtek és az ereket borító periciták is osztódásnak indulnak. Ezzel párhuzamosan az anyaerek kitágulnak, és a proliferáló endotélsejtek annak lumenébe nyomulnak, ahol számos további lumeneket formálnak. Később szelektív apoptózis útján ezek a lumenek egymástól elkülönülnek, de az eredeti erekkel összeköttetésben maradnak, így különálló csatornák alakulnak ki [22]. A másik, jelenleg szintén elfogadott modell szerint agyi mikrometasztázisokban a glomeruloid testek kialakulása már közvetlenül a tumorsejt keringésből történő kilépése (extravazációja) után megkezdődik. A szöveti térbe került tumorsejtek a kapillárisok bazális membránjának külső felszínéhez tapadnak és azokat húzni kezdik, miáltal hurkok jönnek létre a kapillárisokból. A tumor növekedésével párhuzamosan elvékonyodott afferens és efferens érrel rendelkező glomerulusok jönnek létre, amelyek szerves részei az eredeti keringésnek [23].

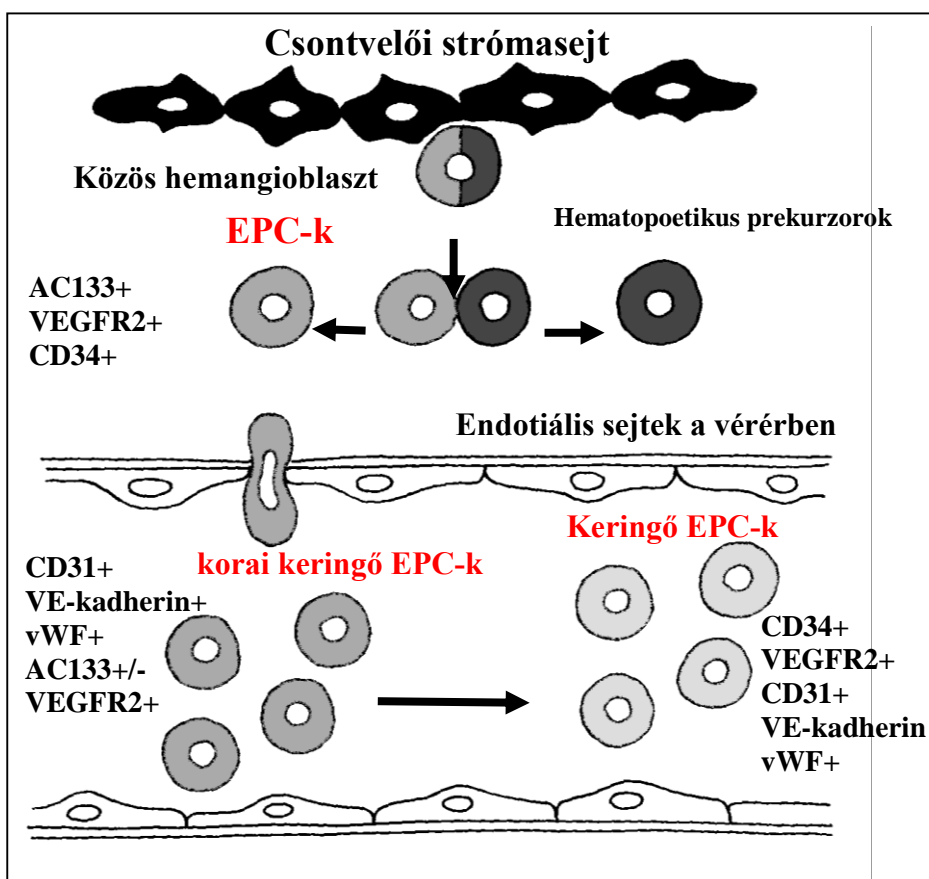
1.3.5 Posztnatális vaszkulogenezis

A kutatómunkám során a posztnatális vaszkulogenezis folyamatával a tüdőrákokban foglalkoztam részletesebben.

Korábban úgy tartották, hogy a vaszkulogenezis csupán a korai embrionális élet során jelentkezik, a felnőtt szervezetben nem fordul elő, ott már csak inkább az angiogenezis folyamatai játszódnak [24]. Ugyanakkor később igazolták, hogy a posztnatális vaszkulogenezis létező folyamat a felnőtt szervezetben is, aminek a legfontosabb szereplői a csontvelői eredetű endoteliális progenitorsejtek (EPC-k). Először ilyen sejteket az iszkémia és a szövetkárosodás utáni neovaszularizáció folyamatában mutattak ki [25], később azonban többféle szöveti eredetű daganatok esetében is leírták lehetséges szerepüket [26]. Ezek a speciális sejtek különleges sejtfelszíni antigénmintázatot expresszálnak, amelyek egyes elemei megléte vagy hiánya alapján lehet kategorizálni azokat. Ráadásul a sejtek egyfajta érési folyamaton mennek keresztül, amelyek stádiumait a markerek mintázatával lehet jellemezni [27] (**3. ábra**). Elsőként VEGFR2+/CD34+ kettős pozitív endoteliális prekursorokat izoláltak daganatos betegek keringéséből, és a mai napig elfogadott, hogy az ilyen kettős pozitív sejtek meghatározásával jellemezhető az EPC-k mennyisége a keringésben. A csontvelőből az EPC-keket a tumor által

termelt citokinek mobilizálják, melyek a keringésen keresztül eljutnak mind a primer daganathoz, mind a metasztázisokhoz, ahol elősegíthetik az új erek formálását [28].

3. ábra. A posztnatális vaszkulogenezis sejtjeinek kialakulása



Az endoteliális progenitorsejtek (EPC-k) a csontvelői hemangioblasztokból fejlődnek többféle érési szakaszon keresztül, amelyeket sejtfelszíni markereik alapján különíthetünk el [11].

1.3.6. Vaszkuláris mimikri

A vaszkuláris mimikri folyamatát először primer és metasztatikus melanómákban írták le. Olyan, az eredeti szövet érhálózatával összeköttetésben álló csatornákat azonosítottak, amelyek falát tumorsejtek határolták [29]. A tumorsejtek jellemzésekor azt találták, hogy azok „endotél” fenotípussal rendelkeznek, endotélsejtekre jellemző gének expressziója fokozódik bennük. A vaszkuláris mimikri jelenségét más daganatokban is megfigyelték már (pl. tüdő-, emlő-, petefészek-, prosztaták, illetve szarkómák esetében) [11].

1.4 Sejtadhézió, sejtvezérlés, sejtmotilitás

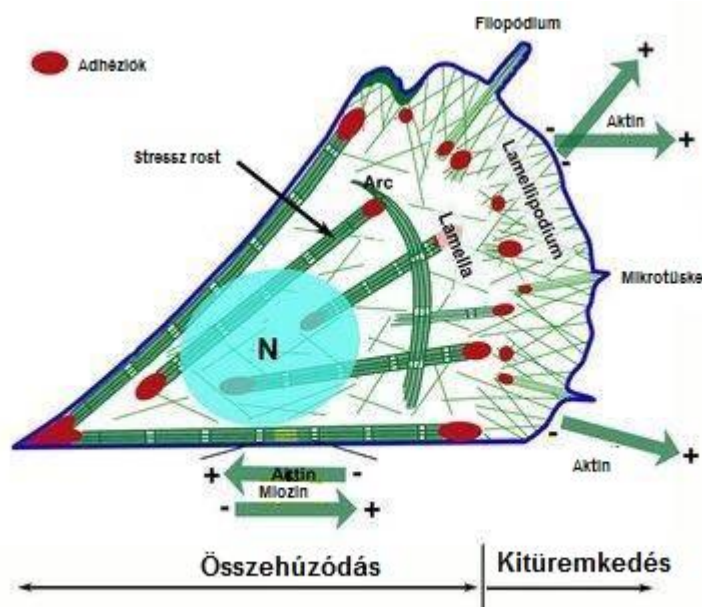
A sejtmotilitásra való képesség valamennyi sejtfeleségre általánosan jellemző, ugyanakkor az egészséges szervezetben a mozgás a sejtek meghatározott életszakaszára (embrionális kor, differenciáció), vagy csak néhány féle sejtre korlátozódik (limfociták, makrofágok, neutrofilek) [30, 31]. A sejtek mozgása az egészséges szervezetben térben és időben szigorú szabályozottság alatt áll. Ezzel szemben daganatok esetében a lokális invázió és a metasztázisképzés további lépései során a tumorsejtek motilitási képessége megnő, kiszabadulnak az addig meglévő szabályozási mechanizmusok alól [32].

1.4.1 A sejtek alakja, a sejtvezérlés elemei

A sejtek alakjának fenntartásában, valamint a mozgás végrehajtásában a sejtvezérlés három különböző filamentumrendszere játszik szerepet. A mikrofilamentumok (aktinhálózat) biztosítják a kontraktilis erőt a miozin motorfehérjével (aktin-aktivált ATP-áz), ezáltal a legfőbb felelősei a mozgásjelenségek kivitelezésének. A mikrotubulusok egyfajta polarizált hálózatba szerveződnek, amelyek nem miozin típusú motorfehérjék (dineinek, kinezinek, dinaminok) segítségével biztosítják egyes organellek sejtben belüli mozgását. A harmadik rendszer az intermedier filamentumok hálózata, amelyek elsősorban a sejtek alakjának fenntartásáért felelősek [33–35]. A sejtek alakjának fenntartásában elengedhetetlenek az adhéziók is, azok a fehérjekomplexekből álló pontok, amiken keresztül a sejtek valamilyen külső mátrixhoz (és más sejtekhez) kapcsolódnak. Az adhéziókon keresztül van összekötve és rögzülve a sejtvezérlés a külvilággal. Hámsejtekben a sejtek apikális részén található szoros kapcsolatok („tight junctions”, okkludinok és klaudinok a fő alkotói) alatt található az úgynevezett adhéziós öv, amelynek fő adhéziós molekulái a kadherineik. Ezekhez intracellulárisan aktinszálak rögzülnek, a β -katenin keresztül fontos szabályozói a sejt helyváltoztatásának: a tumorsejt kialakulása során jelentős változás áll be az expressziójukban és az aktivitásukban egyaránt. A másik adhéziós képződmény a folszerűen elhelyezkedő úgynevezett dezmoszóma (bennük főleg dezoglein és dezokollin fehérjékkel), amelyekben belül kateninokat találunk, és amikhez intermedier filamentumok rögzülnek. A hemidezmoszóma az eddigiektől eltérő, mert a sejtek bazális részén található, és nem sejt-sejt, hanem a sejt-mátrix kapcsolatok kialakításában fontosak. Ezeknek a fő alkotóelemei az integrinek, amelyek a sejtben belül a citoskeletális elemekkel kapcsolatosak. Szerepük a sejt mozgásában elengedhetetlen [36–38].

A sejtek mozgásának általános jellemzője, hogy kezdeti lépésként a sejteken a mozgás irányába eső oldalon egy kitüremkedés jelenik meg, amelyet két részre oszthatunk: lamellipódiumra (amiből filopódiumok nyúlnak ki) és lamellára, amelyek mérete és egymáshoz viszonyított aránya sejtenként eltérő. Az előbbi egy keskeny, de lapos része a sejtnak, amelyben sejtorganellum gyakorlatilag nem található, viszont rengeteg aktinfilamentum helyezkedik el itt. A mögötte található lamella kicsit vastagabb, már megjelennek benne sejtszervecskék, és az aktinszálak erősebb kötegekké szerveződnek, amik a sejt alsó részén található adhéziókba futnak. Ezt a részt követi a sejttest a sejtmaggal, majd különösen a fibroblasztok esetében gyakran megfigyelt farokrész (4. ábra) [39, 40].

4. ábra. Mozgó sejt sematikus ábrája (fibroblaszt típusú sejtmozgás) (Small JV és Rottner K alapján [41])

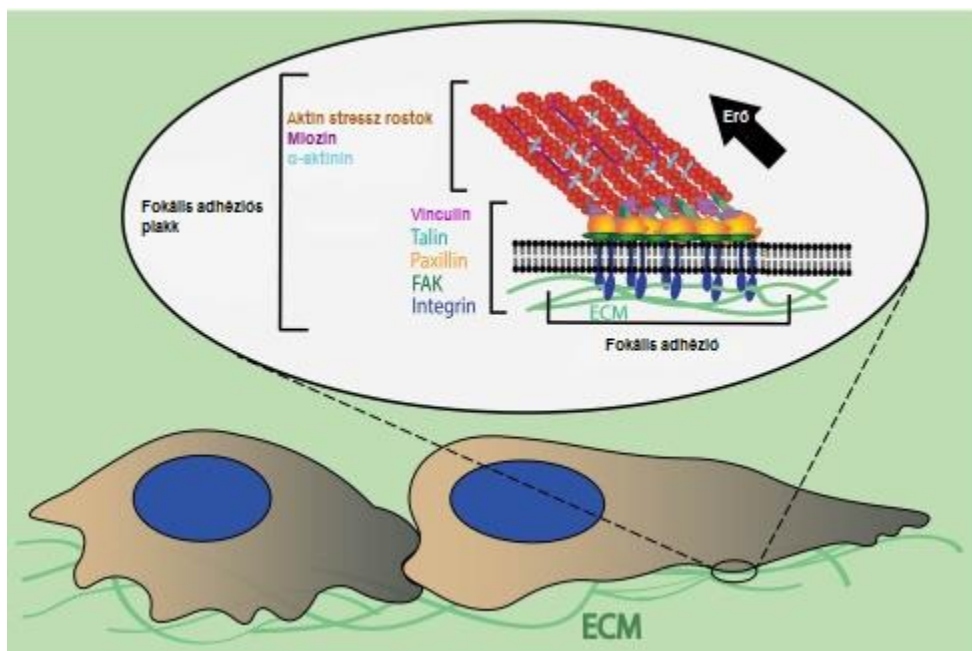


Ahhoz, hogy egy sejt el tudjon mozdulni, szükséges, hogy valamilyen felülethez tudjon kapcsolódni, és a mozgás ehhez a felszínhez képest történik meg. Az erőt az aktomiozin-komplex adja, amit a két végén rögzített aktinkötegek (melyekben alternáló polaritású aktinszálak helyezkednek el) rövidülése biztosít. A mikrofilamentum-rendszert alkotó aktin globuláris (G) aktinmonomerekből polimerizálódik F-aktin szálakká. Ezek a filamentumok a lamellipódiában a pozitív, gyorsan növvő végükkel a membrán felé néznek, és növekedésük felelős a mozgás irányába eső membránkitüremkedésért. Az aktinszálak növekedésért, elágazások keletkezéséért, a későbbi szerveződéséért, valamint a negatív végükön a

lebontásukért számos fehérje felelős (WASP/Scar, capping fehérjék, ADF/kofilin, Arp2/3) [42–46].

Az aktinszálak mindig bekötnek a letapadási pontokba, amikben számos „váz” fehérje (talin, vinkulin) és jelátviteli molekula (FAK, integrinek) alakítja ki az úgynevezett fokális adhéziókat (**5. ábra**) [47–49].

5. ábra. Az aktinhálózat és a fokális adhéziók szerveződése (Collins KL és mtsai alapján [50])



1.4.2 Adhéziós molekulák és azok kapcsolatai

A speciális sejtalkotókkal (ostor, csillók) nem rendelkező sejtek mozgása mindig valamilyen rögzített felülethez képest történik. Ezekhez a felületekhez a sejtek az adhéziós helyeken keresztül kapcsolódnak. A daganatsejtek metasztatizálása során különféle szöveti környezetekbe kerülnek, ahol a sejt-kapcsolatok és a sejt-mátrix kapcsolatok is eltérőek. Így a daganatsejtek adhéziói is folyamatosan változnak, akár molekuláris összetételükben is. A mozgásban fontos adhéziók legjellemzőbb molekulái a heterodimer integrinek, amelyek a kötődési funkció felül (α -alegység) jelátviteli molekulák is (β -alegység, **2. táblázat**) [51]. A sejtmozgáson felül leírták szerepüket a proliferációban, a differenciációban és az apoptózisban is. Gyakori jelenség, hogy az egyes integrinek expressziós szintje megváltozik, vagy akár másfajta, szövetidegen molekulák jelennek meg a daganatsejtek felszínén a progresszió során [52, 53].

2. táblázat. *Integrinek és azok ligandumai*

<i>Alegységek</i>		<i>Ligandumok</i>
$\beta 1$	$\alpha 1$	kollagének, lamininek
	$\alpha 2$	kollagének, lamininek
	$\alpha 3$	fibronectin, kollagén, laminin
	$\alpha 4$	fibronectin, VCAM
	$\alpha 5$	fibronectin
	$\alpha 6$	lamininek
	$\alpha 7$	lamininek
	$\alpha 8$	fibronectin
	$\alpha 9$	tebascin, oszteopontin
	Av	fibronectin, vitronektin
$\beta 2$	AL	ICAM-ok
	αM	fibrinogén
	AX	fibrinogén
$\beta 3$	lib	fibrinogén, vitronektin, fibronectin
	Av	fibrinogén, vitronektin, fibronectin
$\beta 4$	$\alpha 6$	laminin
$\beta 5$	Av	vitronektin

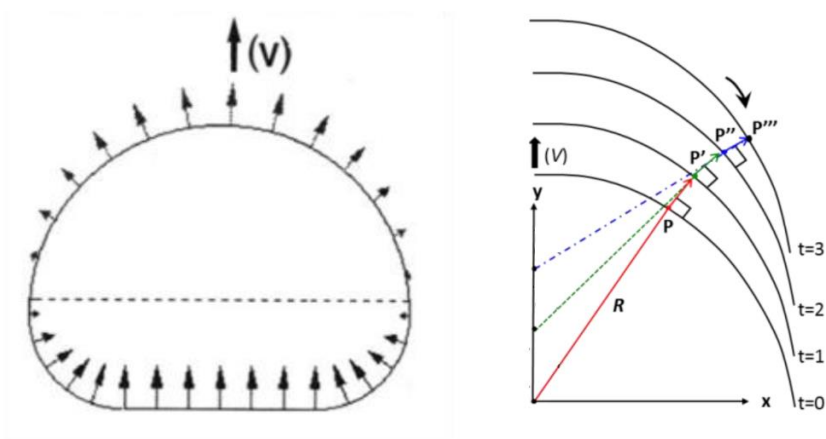
1.4.3 *A sejtmozgás alapformái*

A sejtmozgás morfológiai és molekuláris leírásakor legelterjedtebben kétféle modellt használnak [54]. A **fibroblasztok mozgása** során elfogadott, hogy a mozgás megindításához és fenntartásához szükséges erőket biztosító aktinkötegek párhuzamosan futnak az elmozdulás irányával [39], míg az adhéziók a lamella területén helyezkednek el a sejtek alatt. Ezenfelül a farki részben is található néhány letapadási pont, az aktinkötegek az elmozdulással párhuzamosan az első és a hátsó adhéziók között feszülnek ki. Ez az elrendeződés azt feltételezi, hogy az aktinkötegek úgynevezett taposómalomszerű növekedést mutatnak a mozgás során (**4. ábra**). Ez a modell azonban nem ad kielégítő magyarázatot arra, hogy mi lesz a sorsa a farkok

behúzása után megszűnő aktinkábeleknél, amelyek innét a vezető élig futnak, valamint a lamella alatti adhéziók sorsa is bizonytalan a mozgás során.

A másik modellt a **halak epidermiszsejtjeinek mozgása** során írták le. Ezek a sejtek sokkal nagyobb sebességgel (10-30 $\mu\text{m}/\text{perc}$) képesek mozogni, mint a fibroblasztok (0,5-1 $\mu\text{m}/\text{perc}$) [55–58]. Az alakja egy jellegzetes félkör, amibe a sejttest és a lamella is tartozik. Farki részt ebben a mozgásformában nem figyelhetünk meg. Aktinkótegeket szinte kizárólag csak a lamella/sejttest határon lehet megfigyelni, az orientációjuk merőleges az elmozdulás irányára. Az ilyen típusú sejtmozgás leírására az úgynevezett GRE-modellt használjuk (graded radial extension [56, 59]), amely azt mondja, hogy a sejt frontjának minden pontja (beleértve az itt létrejövő új adhéziókat is) a sejtélre merőlegesen mozdul el, a sejt hátsó részéhez közeledve egyre kisebb mértékben. Ez a fajta elmozdulás egy virtuális görbét eredményez a szubsztráthoz képest, amin mozog a sejt (**6. ábra**).

6. ábra. A hal epidermiszsejt mozgása, a GRE-modell

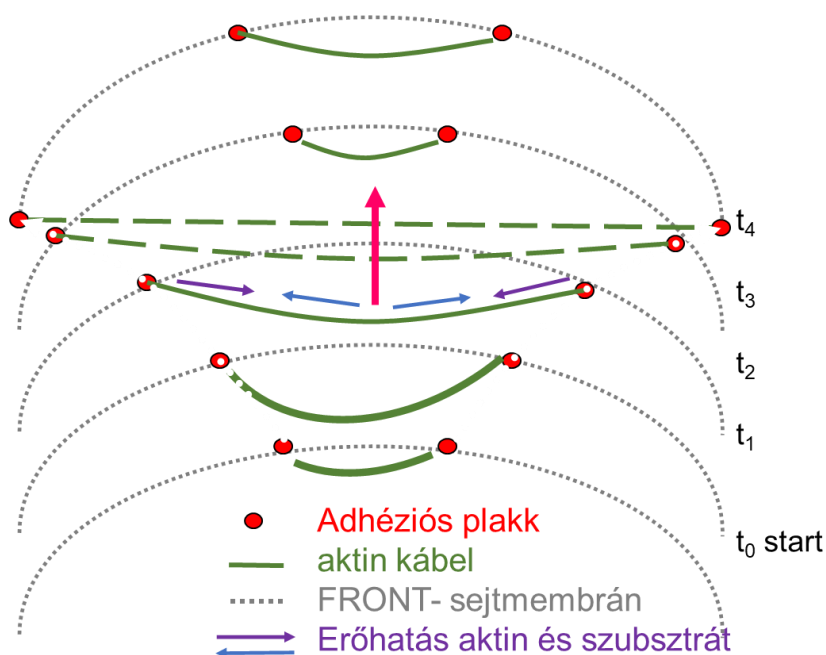


A GRE-modell a sejtek felszínén található pontok elmozdulására vonatkozik. **Bal ábra:** nagy nyíl (v): a sejt mozgásának iránya. Kis nyilak: a sejt felszín egyes pontjainak elmozdulása (irány és nagyság). **Jobb ábra:** $p-p''''$: a mozgó sejt felszínén egy pont látszólagos elmozdulása az aljzathoz képest az idő előrehaladtával ($t=0-3$) [56]

1.4.4 Saját eredmények a tumorsejtmozgás morfológiai leírásában

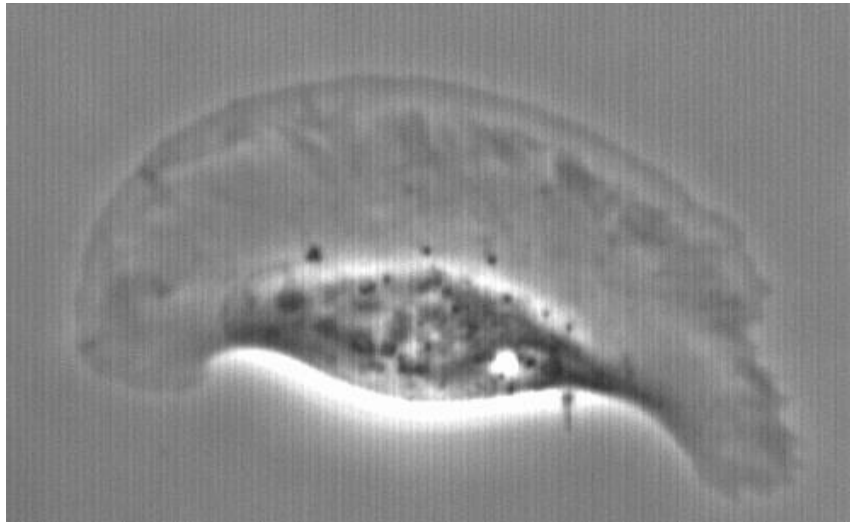
Kísérletes munkáink során HT1080 humán fibroszarkómasejtek mozgását, azon belül is az adhéziós plakkok és az aktinhálózat dinamikáját, valamint a miozin eloszlását vizsgálva leírtunk egy modellt a sejtek kétdimenziós mozgására (7. ábra) [60].

7. ábra. Tumorsejtmozgás kétdimenziós modellje (HT1080 fibroszarkómasejtek alapján)



Ez a modell alapvetően a korábban leírt GRE-modellen alapszik, és eltér a szintén már ismertetett fibroblaszt-típusú mozgástól. A HT1080 sejtek a kiterülést követően nagy sebességgel ($1,5 \mu\text{m}/\text{perc}$) hosszú ideig mozogtak a szubsztrát felszínén. Ez a sejtvonal fibroblaszt eredettel rendelkezik, motilis formájuk mégis a hal epidermiszsejtekhez hasonló morfológiát mutatott (8. ábra). A vándorlás során félkör alakot vettek fel, hossz tengelyük a mozgás irányára merőleges volt.

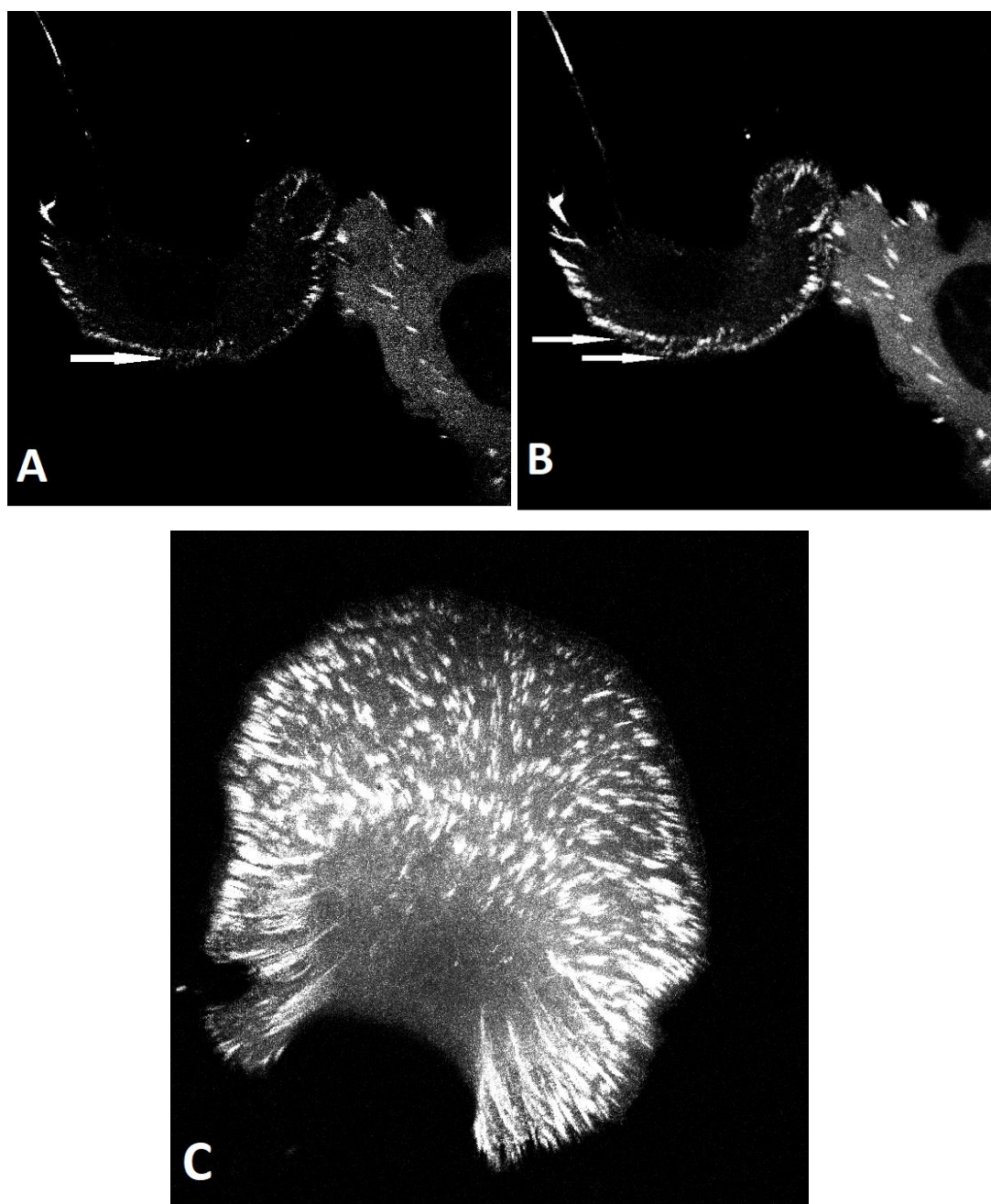
8. ábra. Mozgó HT1080 humán fibroszarkómasejt morfológiája



Fáziskontraszt kép a mozgó HT1080 sejtről. A sejt alakja a hal epidermiszsejtekére hasonlít

Adhéziós pontok kizárólag a vezető lamella peremén találhatóak egy-két sorban (a hosszabb adhéziók merőlegesek a sejt peremére), és tartalmaztak minden komponenst (vinkulin, FAK, talin, integrinek), amelyek a fokális adhéziókra jellemzőek (az adatokat nem mutatom). Az adhéziók a migráció során a GRE-modellnek megfelelően előre és oldalra haladnak, majd elérve a sejtek egyenlítői síkját a sejt belseje felé mozdulnak, és eltűnnek. Így egy látszólagos elmozdulást végeznek egy görbe pálya mentén a sejt mindkét oldalán. Új adhéziók diszkrét pontokként keletkeztek egy sorban a vezető élen néhány mikrométerre a már meglévő letapadásokhoz képest (**9. ábra**).

9. ábra. Az adhéziók dinamikája a mozgó tumorsejtben

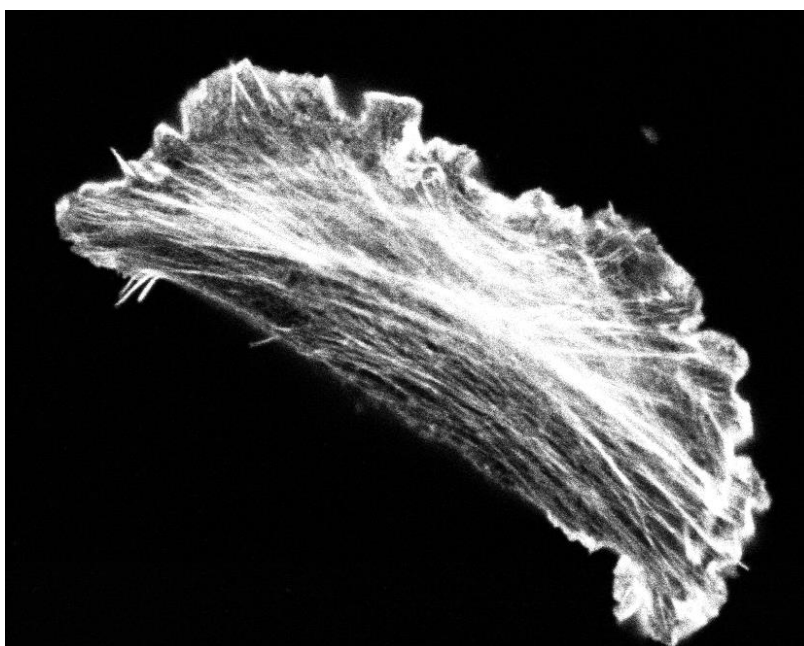


A GFP-vinkulinnal jelölt adhéziók a sejtek frontján kis pontokként tűnnek elő (A, nyíl), a mozgás során az újak (3–5 perc) szintén itt keletkeznek egy új sorban (B, alsó nyíl). C) 20 perces mozgás során készült képek egymásra vetítése. Az adhéziók a GRE-modellnek megfelelően „mozognak” a sejt frontján. A sejtek hátsó feléhez közeledve az adhéziók egyre nagyobbak és elnyújtottak (az egyre nagyobb, aktin által generált húzóerő miatt) a sejtek hossz tengelyébe érve az adhéziók elszakadnak a szubsztráttól és a sejtek belsejébe kerülnek

A sejt szélén található letapadási pontokba futó aktinkötegek az elmozdulás irányára merőlegesek voltak, és enyhén ívelt formát vettek fel (a homorú oldaluk mutatott a mozgás irányába). Ez az alak biztosítja, hogy a kötegben elcsúszó aktinszálak a haladás irányába

fejtsenek ki erőt a szubsztráthoz képest. Az ívelt aktinkötegek hossza a mozgás előrehaladtával fokozatosan nő, és az egyenlítői síkban elveszítik konkáv alakjukat. A sejt csúcsán folyamatosan új adhéziók és konkáv aktinkábelek jelennek meg (**10. ábra**). A modellben (**7. ábra**) a kék és lila nyilak mutatják az aktinköteg és a szubsztrát által kifejtett erő irányát, az ebből származó eredő erő (piros nyíl) biztosítja a sejt saját hossz tengelyére merőleges irányba történő elmozdulását. Végül az aktinkötegek maximális méretüket a sejt hossz tengelyénél érik el, az adhéziók a sejt két oldalán szimultán szűnnek meg, ami az aktinkötegek lebomlásával is jár.

10. ábra. Aktinhálózat szerveződése a mozgó tumorsejtekben



Az aktinszálakat rodamin-falloidinnel jelöltük. Az ívek a mozgás irányára konkáv állásúak

A tumorsejtek esetén is néha megfigyelhető a fibroblasztokhoz hasonlóan a farok jelenléte, ebben egyetlen adhéziós pont detektálható, melyből szintén fut aktinköteg a vezető lamellába. Azonban ez az aktinköteg nem vesz részt az előre tartó mozgáshoz szükséges erő kifejtésében. Feltehetően a lamellában működő rendszer önállóan képes az előre haladást biztosítani. Valószínű, hogy a HT1080 sejteknél ritkán előforduló farokban az adhéziós pontot egy hiba folytán a migráció kezdetén a sejt nem volt képes felszakítani, így az hátráltatja a mozgásban. A folyamat valószínűleg a tumorsejthez hasonlóan játszódik le valamennyi sejt típusnál, így a fibroblasztoknál is.

Ez a kétdimenziós modell magyarázni tudott számos ellentmondást, ami a fibroblasztok mozgási modelljében van. 1. A letapadási pontok dinamikáját valójában a GRE-modellben leírtak jellemzik a legjobban. 2. Nincs szükség az aktinkötegek polaritásának változására a mozgás során. 3. A lebomló adhéziók és az azokat összekötő aktinkötegek nem befolyásolják a többi adhézió és az azokat összekötő aktinszálak stabilitását. Ugyanakkor érdekes kérdés, hogy háromdimenziós rendszerben hogyan mozognak az adhéziók és a sejtváz elemei.

1.4.5 A sejtmozgás szabályozása (motogének, mitogének)

A sejtmozgás szabályozásában autokrin és parakrin szignálok, sejtfelszíni receptorok és intracelluláris szignálútvonalak vesznek részt. Számos citokint és kemokint (köztük olyanokat is, amelyeket korábban a sejtosztódás szabályozásában ismertünk meg), valamint azok receptorait azonosították, amelyek a normális és a patológiás sejtmozgás fontos szabályozói [61–63]. A receptorok egy részéről bebizonyosodott, hogy proto-onkogénként is funkcionálhatnak (**3. táblázat**).

3. táblázat. A sejtmozgást befolyásoló citokinek, kemokinek

<i>Kemokin/citokin</i>	<i>Kemokin/citokin receptor</i>
<i>Kemokin CC család</i>	
CCL3, CCL5, CCL7, CCL14	CCR1
CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16	CCR2
CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13	CCR3
CCL17, CCL22,	CCR4
CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL14, CCL16	CCR5
CCL20	CCR6
CCL19, CCL21,	CCR7
CCL25	CCR9
CCL27, CCL28	CCR10
<i>CXC család</i>	
CXCL6, CXCL8	CXCR1
CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8	CXCR2
CXCL11, CXCL10, CXCL11	CXCR3-A
CXCL4, CXCL9 CXCL10, CXCL11	CXCR3-B
CXCL12	CXCR4
CXCL13	CXCR5
CXCL16	CXCR6
<i>CX3C család</i>	
CX3CL1	CX3CR1
<i>XC család</i>	
XCL1, XCL2	XCR1
HGF	cMET
IGF-I, IGF-II	IGFR
TGFβ	TbetaR1, TbetaR2
IL-6	IL-6R
bFGF	FGFR
VEGF	VEGFR
PDGF	PDGFR

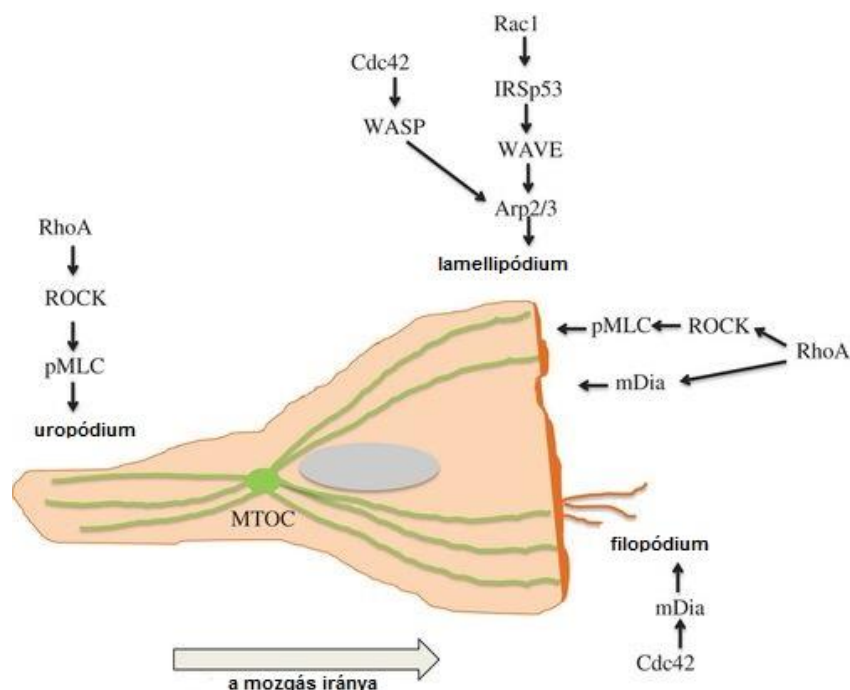
1.4.6 A Rho GTP-ázok szerepe a sejt migrációban

A különböző receptorokról induló, a sejtek alakját és a sejtmozgást befolyásoló szignalizációs útvonalak eltérő eredetűek lehetnek, de közös jellemzőjük, hogy a Ras szupercsalád kis G-fehérje alcsaládjába tartozó Rho GTP-ázokon (Rho, Rac, Cdc42) keresztül fejtik ki hatásukat [64–66]. Ezeknek a fehérjéknek alapvető szerepük van számos sejt folyamat, elsősorban az aktin citoszkeleton szabályozásában, de befolyásolják a sejt polaritását, a mikrotubulusok működését, a membrántranszport útvonalakat és jelentőségük van a transzkripciós faktorok aktivitásában is [67–69]. A fehérjék rendkívül konzerváltak az evolúcióban és szinte minden eddig szekvenált eukariótában megtalálhatók. Az emberekben 20 Rho GTPáz gén van, amelyek többsége 20–28 kDa fehérjét kódol. A Rho GTPáz expresszió szövetenként változik, és többféle effektor célfehérje (proteinkinázok, foszfolipázok, adapter fehérjék, aktinnukleátorok) működését is befolyásolják [70]. A biológiai komplexitásuk azon alapszik, hogy egyetlen GTPáz bekapcsolásával több különálló jelátviteli útvonal lehet koordináltan aktiválva. Ugyan a célfehérjéken nem található olyan felismerhető szekvenciamotívumok, amelyek adatbázis-keresésekben használhatók lennének, de a Rho-család három legismertebb tagjának (Rho, Rac és Cdc42) eddig több mint 60 célmolekuláját azonosították kísérletileg [71, 72].

A Rho GTPázok térben és időben is szabályozzák a sejtmozgás egyes folyamatait. A Rac szabályozza az aktin polimerizációját a sejt vezető élén és integrinadhéziós komplexet indukál, ezzel elősegíti a protrúziók kiemelkedését és a megnyúlását [73, 74]. A Rac1 a WAVE komplex aktiválásán keresztül szabályozza az Arp2/3 komplexet, mely az elágazódó aktinhálózat kialakulásáért felelős, *de novo* aktinpolimerizációt és új filamentumok kialakulását katalizálja [75, 76]. A Cdc42 szintén a sejt elejében működik, és a mozgást az irány stabilizálásával szabályozza az extracelluláris jeleknek megfelelően. A Cdc42 aktiválja az aktinasszociált fehérjéket, beleértve a faszint, a formint (mDia2), valamint indukálja az Ena/VASP-t és az F-aktin kötegek képződését [77, 78].

Az invázió és az áttétképzés során a hámeredetű daganatsejtek citoszkeletonja átprogramozódik, a merev, mozdulatlan hámsejtek mozgó, invazív ráksejteké alakulnak. Ezt a folyamatot epiteliális-mezenhimális tranzíciónak (EMT) is nevezik [79, 80]. A GTPázok Rho-családjának tagjai központi szerepet játszanak ebben a folyamatban azáltal, hogy molekuláris kapcsolókként működnek, amelyek szabályozzák a morfogenezist és a mozgást [81, 82](**11. ábra**).

11. ábra. A *Rho*-család kis *G*-fehérjéinek szerepe a sejtmozgás szabályozásában (Infante E alapján [64])



1.5 Tumorsejtek kölcsönhatásai az extracelluláris mátrixszal

A tumorsejtek mozgása mindig valamilyen extracelluláris mátrixban történik az élő szervezetben. A folyamatot számtalan külső stimulus befolyásolja, amelyeket a tumorsejtek felszínén található receptorok közvetítenek a sejten belülre (citokin/kemokin receptorok, integrinek, egyéb adhéziós molekulák).

Az extracelluláris mátrix egy összetett hálózat, amely fő alkotói a különböző kötőszöveti rostok (kollagén, fibronektin, laminin), különböző proteoglikánok és glikoproteinek [83–88]. A proteoglikánok speciális szerkezetű fehérjék, amelyekhez kovalens kötéssel különböző poliszacharidok, úgynevezett glükózaminoglikánok (GAG-ok) kapcsolódnak [89, 90]. A szerkezetükből adódóan (több szulfát- és karboxilcsoport található rajtuk) negatív töltésűek, amelyek alkalmasak több növekedési faktor megkötésére. Ezek a faktorok a tumorsejtek mátrixban történő mozgása során felszabadulnak (a degradáció miatt), amik befolyásolják a sejtek biológiai működését [91, 92]. A GAG-ok egyik nagy csoportja a heparánszulfát-glükózaminoglikánok (HSGAG-ok), amelyek mind extracellulárisan, mind a sejt felszínén is megtalálhatók, és szinte mindenütt jelen vannak a természetben [93, 94]. A HSGAG-ok is kapcsolatba lépnek extracelluláris szignálmolekulákkal, és többféle

tumorasszociált folyamatban (autokrin szignálútvonalak befolyásolása, angiogenezisindukció, fibrinköpeny és vérlemezke-aggregáció a tumorsejtek körül, immuneffektorsejtek mozgósítása) is leírták potenciális hatásukat [95]. A heparinok is a HSGAG család tagjai, amelyek a Ram Sasisekharan és munkatársai által alkotott modell szerint az áttétképzésben gátolják a heparanázok működését, kapcsolatba lépnek az integrinokkal, módosítják a lokális alvadási paramétereket, befolyásolják a fibrinháló kialakulását és módosítják különböző növekedési faktorok (VEGF, FGF) hatását, amelyek szabályozzák a tumorsejtek proliferációját, motilitását és az angiogenezist is [96–98]. A fentiekhez kapcsolódva az is ismert, hogy mind a nem frakcionált heparinnak (UFH), mind a kis molekulásúlyú heparinoknak (LMWH-k) antitumorális és antimetasztatikus hatásuk lehet [99–103]. Ezt a potenciális áttétképzést csökkentő hatást mi is vizsgáltuk, tesztelve, hogy az vajon független-e az antikoaguláns hatásoktól, illetve kerestük a molekuláris mechanizmusokat a folyamat mögött [104].

1.5.1 Antikoagulánsok hatása a humán melanómasejtek tüdő- és májáttétképző képességére

A heparinokkal (UFH, LMWH) előkezelt, majd a tumorsejtek intravénás beadását követő 3 napban napi egyszer kezelt SCID egerekben a HT168-M1 melanómasejtek tüdőkolonizációs képessége szignifikánsan csökkent a kontroll egerekhez képest (**12. ábra**). Ez a megfigyelés nem az antikoagulációs hatásnak volt köszönhető, mert a rekombináns hirudin nem mutatott ilyen eredményt. Ráadásul a kis molekulatömegű heparin a tüdőáttétek incidenciáját is csökkentette, ami a nem frakcionált heparin esetében nem volt kimutatható.

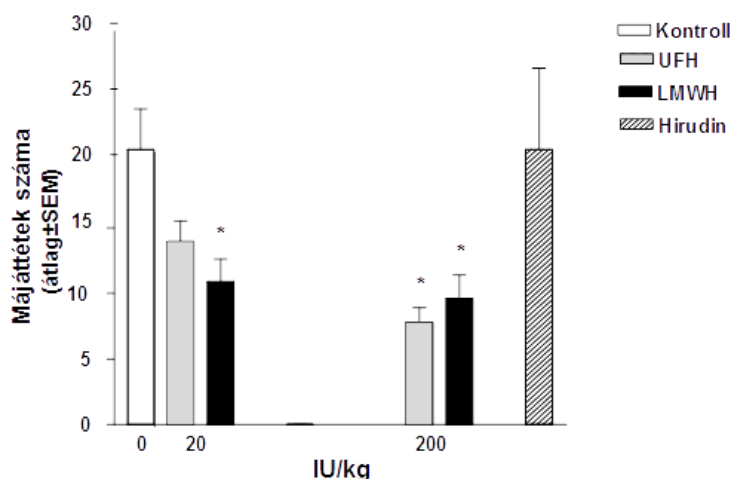
12. ábra. Heparinok és hirudin hatása HT168-M1 humán melanómasejtek tüdőkolonizációjára



*A heparinok (20-63-200 IU/kg) gátolják a farokvénába oltott melanómasejtek tüdőkolonizációját (n=9-10, *p<0,05)*

Egy másik *in vivo* tesztrendszerben (májkolonizációs modell) is hasonló eredményeket kaptunk: az LMWH már viszonylag alacsony dózisban (a humán-ekvivalens dózis 1/10-nél) is szignifikánsan csökkentette a májkolóniák kialakulását (**13. ábra**), míg a heparin a humán dózisnak megfelelő értéknél mutatta ezt a gátlást. A hirudinnak itt sem volt kolóniaszám-csökkentő hatása.

13. ábra. Heparinok hatása a májkolóniák kialakulására

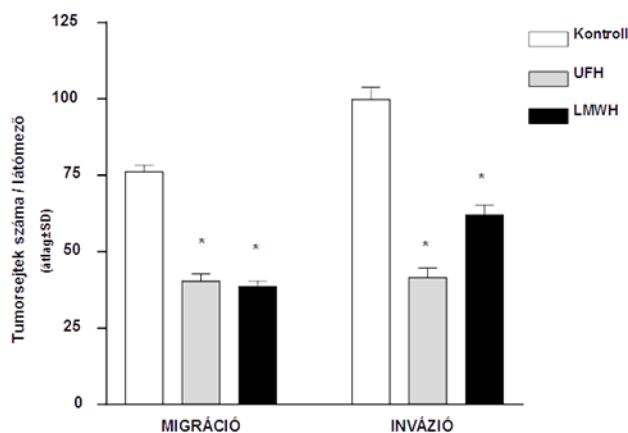


*A heparinok (20-200 IU/kg) gátolják a lépbe oltott melanómasejtek májkolonizációját. De ebben nem a véralvadás gátlása játszik szerepet, mert a hirudin (3 mg/kg) nem befolyásolta a folyamatot (n=9-10, *p<0,05)*

1.5.2 A heparinok hatása a daganatsejtek proliferációjára és adhéziójára

Sem az UFH, sem az LMWH nem volt hatással a humán melanómasejtek *in vitro* proliferációjára, vagy a szubkután daganatok *in vivo* növekedésére (az adatokat nem mutatom). Ugyanakkor a heparinok szignifikánsan csökkentették a daganatsejtek *in vitro* motilitását és inváziós képességét (**14. ábra**).

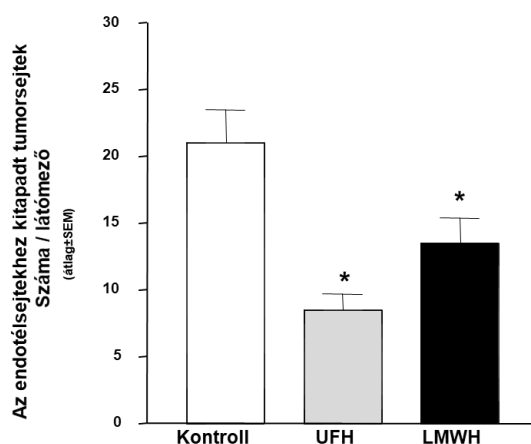
14. ábra. Heparinok hatása a HT168-M1 humán melanómasejtek migrációjára és inváziójára



A heparinok (1 IU/ml) szignifikánsan csökkentik a HT168-M1 sejtek in vitro motilitását és inváziós képességét. Boyden-kamrás vizsgálatok, migráció: 4 óra, invázió: 24 óra. n=6, több ismételt vizsgálat eredménye ($p < 0,05$)*

A sejtek adhéziójának befolyásolásakor azt tapasztaltuk, hogy a heparinoknak nincs hatása a humán melanómasejtek adhéziójára különféle extracelluláris mátrix (fibrinogén, Matrigel) komponensekhez (az eredményt nem mutatom), azonban szignifikánsan csökkentik a sejtek kitapadását endoteliális sejtekhez (15. ábra).

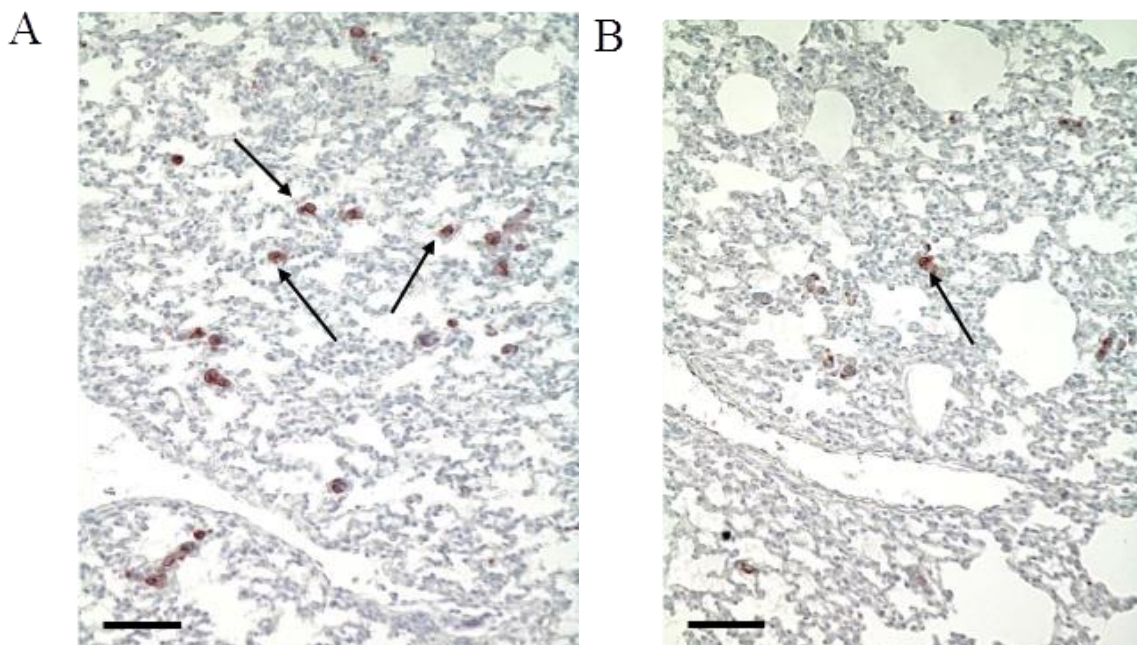
15. ábra. Heparinok hatása a humán melanómasejtek adhéziójára endoteliális sejtekhez



*HT168-M1 humán melanómasejtek adhéziója endoteliális (KS-Imm) sejtekhez (n=4, 60 perc, az UFH és LMWH koncentrációja is 1 U/ml; * $p < 0,05$)*

Az adhézió blokkolását *in vivo* is megfigyeltük. A daganatsejtek a heparinkezelés hatására sokkal kisebb mértékben tapadtak ki a tüdőszövetben (**16. ábra**), a kezelés a keringésben tartotta a sejteket, ahol elpusztultak.

16. ábra. Heparinok hatása a HT168-M1 humán melanómasejtek kitapadására a tüdőszövetben



Reprezentatív immunhisztokémia a melanómasejtek kimutatására (HMB45/MART-1 jelölés) a tüdőben. A farokvénába oltás után több időpontban vett mintákban látható volt, hogy a kontrollhoz képest (A) jelentősen csökkent a kitapadt sejtek száma a heparinkezelés (B) hatására. Heparinkezelés (LMWH): 200 IU/kg 1 nappal a tumorsejtek oltása előtt. Inkubáció: 5 perc. Nyilak: jelzett melanómasejtek. Mércse: 250 μ m

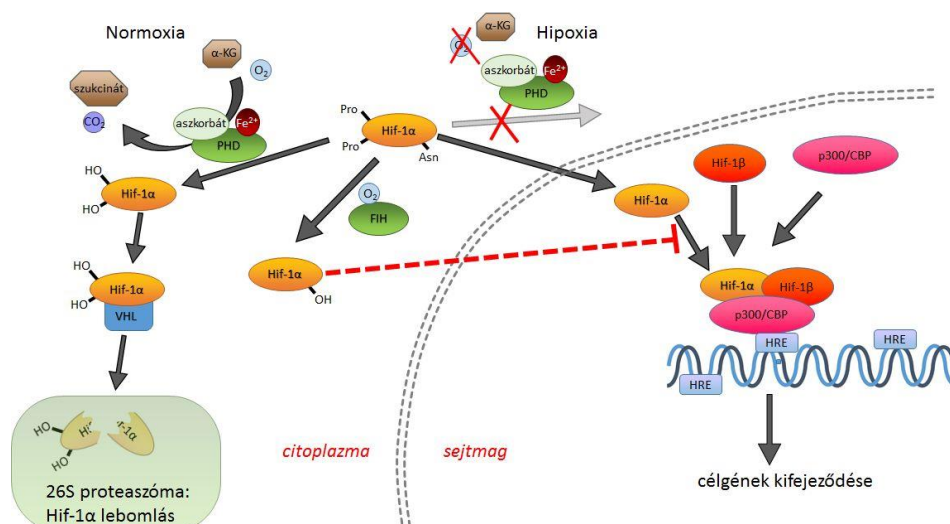
1.6 A hipoxia hatása a daganatokra

A daganatokat befolyásoló környezeti hatások között említhetjük a tumorsejtek oxigén- és tápanyag-ellátottságát is. Számos klinikai megfigyelés sugallja, hogy a csökkent szöveti oxigénellátottság (hipoxia) fokozza a daganatok agresszivitást és elősegíti a rosszindulatú progressziót [105, 106]. A lokálisan előrehaladott szolid daganatok ötven-hatvan százalékában, beleértve a melanómákat, vastagbél-, tüdő- és fej-nyaki rákokat (HNSCC), a hipoxia/anoxia nagy területeit is érinti a daganatszövetnek. Ezen kívül a hipoxiát független prognosztikai faktorként írták le többféle szöveti eredetű rosszindulatú daganatokban, például méhnyakrákban és HNSCC-ben [107].

A hipoxia a szövetek oxigénellátása és -fogyasztásának megbomlott egyensúlyhiánya miatt alakul ki. Szolid daganatokban számos mechanizmus létezik, amelyek hipoxiához vezetnek: az intratumorális erek szerkezeti/funkcionális rendellenességei (csökkent perfúzió miatt csökkent az O₂ szállítása), diffúziós rendellenességek (O₂ rossz diffúziója) és a tumor vagy terápia által indukált anémia (anémiás hipoxia) [108].

Modellek számításai szerint a véredényekből az oxigén diffúziója körülbelül 100-200 µm távolságig elégséges, ennél nagyobb távolságban lévő sejtek már erős hipoxiának vannak kitéve [108]. A hipoxiára a sejtek reagálnak, az úgynevezett oxigénszenzorról induló jelek számos hipoxiával kapcsolatos gént irányítanak, amelyek közös jellemzője a gének promotorszakaszában található „hipoxiafelelős elemek (HRE)” szekvencia [109]. Ehhez a szekvenciához kapcsolódnak a hipoxia-indukálható transzkripció faktorok (HIF-ek, elsősorban a HIF-1). A HIF-ek egy α- és egy β-alegységet tartalmazó dimerek, de csak az α/β komplex együttesen képes a hipoxiával kapcsolatos gének szabályozására [110]. Mindkét alegység folyamatosan expresszálódik a sejtekben, azonban a α-alegység normoxiában lebomlik. Először prolin-hidroxiláz (PHD1-PHD3) és a faktor inhibitor HIF-1α (FIH) proteinek hidroxilálják a fehérjét, majd a Von Hippel-Lindau fehérje kötődése után a hozzá kapcsolódó 26S ubikvitin fehérje ligáz komplex segítségével az α-alegység lebomlik. Ezáltal normoxiás körülmények között nem tud felhalmozódni, és a sejtmagba transzlokálódni a HIF-1α [111]. Csökkent oxigénszint mellett a hidroxiláció elmarad, ezáltal az α-alegység nem degradálódik, és gyors felhalmozódása figyelhető meg a citoplazmában. Ezután az alegység a sejtmagba transzlokálódik, ahol különböző koaktivátorok segítségével (p300 és CBP) komplexet alkot a β-alegységgel, így válva transzkripció faktorrá (**17. ábra**) [113, 114].

17. ábra A HIF-1 α fehérje sejtben belüli szabályozása normoxiás és hipoxiás körülmények között [115]



A HIF-1 célgénjei között számos, gyakran nagyon eltérő biológiai folyamatban résztvevő fehérje szerepel (4. táblázat). Ezek között megtalálhatóak az angiogenezis serkentését, az extracelluláris tér szabályozását, a sejtek energiaháztartását, glükóz- és nukleotid- anyagcseréjét, valamint osztódását és túlélését befolyásoló fehérjék egyaránt [116–118]. Ezeken felül a HIF-1 a sejtek mozgását (ezzel párhuzamosan az inváziót és a metasztázist), valamint a terápiás modalitások (sugár-, kemoterápia) hatásosságát is befolyásolja [119–122].

4. táblázat. Hipoxia hatására aktiválódó gének

Biológiai funkció	Gén szimbóluma/ alias	Referenciák (az idézett cikkben)
Transzkripció faktorok	Twist1, Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, E12/E47, ID2, EWS-FLI1, β -katenin, CDX2, SMAD7	[13-16, 20-24]
Hisztonmódosítók	JMJD2B, JMJD2C, MLL1	[25-28]
Enzimek	MMP1, MMP3, MT1-MMP, LOX, ADAMTS1, ACE, ACE2, Hsulf-1, IDH2, XPA	[29-33,35-39]
Receptorok, receptorasszociált kinázok	CXCR4, CX3CR1, Notch, uPAR, PAI-1, 67-kDa lamininreceptor, TLR4, c-Met, RON tirozinkináz, EPOR	[40-51]
Kis GTPázok, intracelluláris szignálmolekulák	Cdc42, Rac1, RhoA, RhoE, IRS-2	[52-54]
Transzporterek	glut-1, MDR1, VDAC1	[55-57]
Membránproteinek	ANGPTL4, L1CAM, α 5 integrin, CD151, CD24, CD147, galektin-1, MUC1, szemaforin 4D, kaveolin-1	[58-66]
Scaffold proteinek, citoplazmatikus fehérjék	HEF1, liprin- α 4	[67,68]
mikroRNS-ek	miR-210, miR-15b/16, miR-21, miR-372/373, miR-34a, miR-17/20a, miR-103/107, miR-126	[73-80]

Tsai and Wu, Journal of Biomedical Science 2012, 19:102 nyomán [119]

1.6.1 A hipoxia szerepe az angiogenezisben

A hipoxia szerepe az angiogenezis szabályozásában alapvető. Számos, az angiogenezisben kitüntetett szerepet játszó molekula (gátlók és serkentők egyaránt, receptorok, citokinek stb.) expressziója áll HIF-szabályozás alatt (**5. táblázat**) [123–125].

5. táblázat. Az angiogenezisben meghatározó, HIF által szabályozott molekulák

Pro-angiogén	Anti-angiogén
VEGF, Flt-1 (VEGF-R1), Kdr (VEGF-R2)	DLL1-4, vasohibin-1, trombospondin-1
Angiopoetin-1/2 (Ang-1/2), Tie-2	Carbonic anhydrase-9 (CA-9)
ADM, FGF, PLGF, SCF	Regulator of G-protein signaling 5
Oszteopontin, PAI-1	Angiosztatin, endosztatin, kansztatin
MMP, TIMP, NOS, COX-2	Interferonok (IFN- α , IFN- β , IFN- γ)
Endoglin, α 1B-adrenerg receptor, endotelin-1	
Szemaforin 4D, integrinek, leptin, endoszialin	
Adenozin A2A receptor	
Oxygen-regulated protein-150	
SDF-1	
Interleukinek (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10)	

Ezek a molekulák fontos szerepet játszanak az endotélsejtek proliferációjában és migrációjában, az erek érésében, átépülésében, stabilizációjában és permeabilitásuk szabályozásában, a periciták és a simaizomsejtek toborzásában, az extracelluláris mátrix lebontásában, valamint a keringő angiogén sejtek (CAC) és az endoteliális progenitorsejtek (EPC-k) mobilizálásban a csontvelőből [11, 126]. Az EPC-k szerepe az embrionális angiogenezisben jól ismert, a funkciójuk ott is HIF-szabályozás alatt áll. Arra is sok irodalmi adat van (bár egy részük ellentmondásos), hogy a CAC sejtekkel együtt iszkémiában elősegítik az érrendszer javulását és az ér átépülését. A csontvelőből származó sejtek egyértelműen a hipoxiás területre vándorolnak, még hozzá SDF-1- és CXCR4-függő módon [127, 128]. A megnövekedett HIF-1 α elősegíti a CAC-ok és az EPC-k beépülését, míg a HIF-1 α gátlása csökkenti a CAC és az EPC felvételét az alsó végtag érrendszerébe iszkémia után [129]. Tumorokban is leírták már az EPC-k lehetséges érintettségét [130], de korábban klinikai adatok

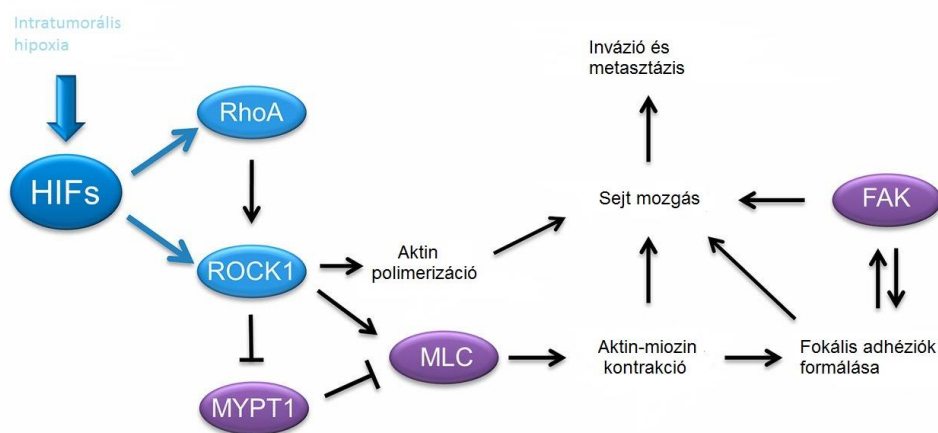
kisebb számban álltak rendelkezésre ezen sejtek lehetséges szerepéről a daganatos megbetegedés progressziójában.

1.6.2 A hipoxia szerepe a Rho-Rac-Cdc42 szabályozásában normál- és daganatsejtekben

Jól dokumentált, hogy a hipoxia szabályozza a Rho-szerű G-fehérjék működését különböző normális sejtekben [131]. A hipoxia és a reoxigenizáció az endotélpermeabilitás változásait indukálja, amelyek a Rac1 és RhoA összehangolt tevékenységeinek eredményei [132]. A Rac1 és RhoA gyorsan reagál az oxigénszint változásaira, és aktivitásuk függ a NADPH-oxidáz- és PI3-kináz-függő ROS termelésétől. Az akut hipoxia a RhoA aktiválódásához vezet, amelyet stresszrostok képződése, az adherens kötések lazulása és az endotél permeabilitásának fokozása követ. A reoxigenizálás erősen aktiválja a Rac1-et, és helyreállítja az F-aktin és a VE-kadherin kortikális lokalizációját. Ez a hatás a RhoA által közvetített gátlás eredménye, és a RhoA-aktivátorokkal megakadályozható [133–136].

Daganatsejtekben is leírták a RhoA hipoxia-indukált aktivitásváltozását. Egy emlőtumorokon végzett tanulmány szerint a RHOA és ROCK1 gének hipoxia-indukált HIF-függő gének, melyek fokozott expressziója a MYPT gátlását eredményezi és növeli az MLC foszforilációját, ezáltal befolyásolja az aktinpolimerizációt, az aktomiozin-összehúzódást és fokozott sejtmozgást indukál (18. ábra) [137].

18. ábra. A RHOA és a ROCK1 HIF-ek általi aktiválásának következményei (Gilkes DM alapján [138])



Több korábbi munka bizonyítja, hogy a különböző sejt felszíni receptorokról (GPCR-ek, TK-receptorok, integrinek, amelyek HIF-1 célgénnek) induló szignálok is befolyásolják a

Rho GTP-ázok aktivitását, ezáltal az aktinhálózat dinamikáját. Ezek általában hipoxiában stimulálják a kis G-fehérjék szabályozásában résztvevő guanin kicserélő faktorokat (GEF-ek) [139–142].

A Rac1 és a Cdc42 expressziója és aktivitása is befolyásolható hipoxiával daganatsejtekben. A RhoA-hoz hasonlóan a Rac1 és Cdc42 aktiválása is időüggő, a hipoxiás indukciót követő órákban éri el a csúcát. Ugyanakkor a szabályozás egyfajta kölcsönösségére is van irodalmi adat. Megfigyelték, hogy a Rac1 és Cdc42 domináns-negatív formáival végzett kísérletekben a HIF-1 α stabilizációja és a HIF-1-célgénnek expressziója szignifikáns csökkenést mutattak, tehát a Rac1 és Cdc42 hozzájárulnak a HIF-1 szabályozásához. Ezt ugyanakkor nem közvetlenül teszik, hanem a prolin-hidroxiláz domén enzimek (PHD-k) hatásának szabályozásán keresztül [143, 144].

1.7 Hipoxia és vérszegénység korrekciója daganatos betegekben

A daganatos betegekben vagy magától a tumortól, vagy a kezelés miatt gyakran alakul ki anémia, ami a daganatszövetben is fokozza a hipoxia mértékét. Az anémia függ a daganatok szöveti típusától, a tumorok stádiumától, a kezelési protokolloktól és a csontvelő épségétől is. Egy európai felmérésben azt találták, hogy a vérszegénység előfordulása összességében a vizsgált populációban 54% volt, kemoterápiában részesülő betegek körében 63%, az egyidejű kemoradioterápiában részesülőknél 42%, a csak sugárterápiában részesülők esetében pedig 19,5% [145–148].

1.7.1 A vérszegénység korrekciója eritropoetinnel daganatos betegekben

A daganatos megbetegedéssel összefüggő anémia korrekciójára tüneti kezelésként a vörösvértestek transzfúziója és a rekombináns humán eritropoetinek (rHuEPO-k) beadása alkalmazható [148–150]. Ezek azonban nem eredményezik a valódi kiváltó okok megszüntetését. Az eritropoetin egy glikoprotein hormon (EPO, MW 30,4 kDa), az I. osztályú citokinek családjába tartozik. Az endogén EPO fő célpontjai a „burst forming unit” (BFU-E) és a „colony forming unit” (CFU-E) eritroid őssejtek a csontvelőben. Az EPO elsősorban ezen őssejtek proliferációját serkenti és különösen a sejthaláluk (apoptózis) gátlását eredményezi. Hatását az EPO-receptoron (EPOR) keresztül fejti ki, aminek a fő downstream jelátviteli útvonala a JAK2/STAT5. A foszfo-STAT5 molekulák dimerizáció után a magba transzlokálódnak, ahol transzkripciós faktorként olyan célgéneket aktiválnak, amelyek az eritroid differenciálódást serkentik [151–154].

A klinikai gyakorlatban többféle rekombináns humán eritropoetikus fehérjét (az alfa-epoetin, a béta-epoetin és az alfa-darbepoetin) is alkalmaznak a hemoglobinszint növelésére (10 g/dl alatti értékek esetében, kemoterápia mellett) [155–157].

1.7.2 Vitatott klinikai és kísérletes adatok az rHuEPO-k alkalmazásáról

A rekombináns EPO-k alkalmazása a kezdeti lelkesedés után komoly kritikát is kapott. Kiderült, hogy az EPOR nem csak az eritropoézisben szerepet játszó sejteken jelenik meg, hanem más, köztük tumorsejtek is expresszálják [158–160]. Ezért jogos a feltételezés, hogy a külső EPO módosíthatja ezeknek a sejteknek is a biológiai viselkedését. Számos *in vitro* és *in vivo* preklinikai kísérletben leírták, hogy az rHuEPO-kezelés modulálja a tumorok növekedését és a daganatellenes terápiák hatékonyságát. Azonban ezek az adatok ellentmondásosak és gyakran megmagyarázhatatlanok voltak [161, 162]. Többféle tumortípusban mutatták ki az EPO és EPOR mRNS-eket, különösen hipoxiás körülmények között. Néhányukban (pl. emlő- és vesesejtes karcinóma) az exogén rHuEPO fokozta a daganatsejtek *in vitro* proliferációját [159, 160]. Ugyanakkor, mások azt mutatták ki, hogy az exogén rHuEPO-nak nincs növekedést moduláló hatása nem hematopoetikus tumorsejtvonalra, köztük tüdőráksejtekre [162–166]. Más kutatások hasonlóképpen találták, hogy az EPOR+ melanóma- és emlőkarcinóma-sejtvonalak, valamint hat másik EPOR-pozitív tumorsejtvonal nem szaporodtak rHuEPO jelenlétében. Ezenkívül az rHuEPO fokozta az egerekben alkalmazott fotodinamikai terápia tumorellenes hatékonyságát és helyreállította a patkánydaganatokban a ciklofoszfamid citotoxicitás anémia által kiváltott csökkentését és a kísérleti daganatok sugárérzékenységét. Egy tanulmányban 31 *in vivo* állatmodell eredményeit foglalták össze, amelyben 14-ben nem volt hatása az EPO-kezelésnek, 2-2-ben önmagában fokozta vagy csökkentette a tumorok növekedését, és 13-ban fokozta a kezelőszerek daganatellenes hatását [161].

A klinikai tapasztalatok is hasonlóan ellentmondásosak voltak [167]. Volt, hogy fázis III-as vizsgálatot állítottak le amiatt, hogy az rHuEPO-t kapó karon magasabb volt a mortalitás emlőrák esetében [168], vagy csökkent a progressziómentes túlélés fej-nyaki daganatok esetében [169]. Ugyanakkor más vizsgálatokban azt találták, hogy a kemoterápia által indukált anémiában szenvedő betegeknek beadott epoetinek javíthatják a daganatos betegek túlélését [170], vagy nincs hatásbeli különbség az rHuEPO-t nem kapó karral összehasonlítva [171–174].

Mindezen ellentmondásos előzetes adatok miatt a mi csoportunkban is kutatásokat kezdeményeztünk az exogén rHuEPO hatásának vizsgálatára kísérletes daganatmodellekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaim főleg a daganatsejtek mozgásának jobb megismerésére irányultak, vizsgálva a mozgás befolyásolását és annak hatását az áttétképzésre. Mivel a daganatsejteket az inváziójuk során többféle környezeti hatás éri, a kutatások közel két évtizede alatt többféle külső körülményt vizsgáltunk, melyek hatással lehetnek a daganatok áttétképzésére. Ezek között célként szerepeltek

1. a daganatsejtek mozgásának vizsgálata háromdimenziós modellben, fókuszálva az aktinhálózat és az adhéziók dinamikájára
2. a heparinkezelésekkel kapott eredményeink alapján még kisebb oligoszacharidok hatásának vizsgálata a tumorsejtek mozgására és metasztatizálására
3. hipoxia hatásainak vizsgálata a daganatsejtek *in vitro* mozgására és *in vivo* kísérletes áttétképzésére
4. a daganatszövet növekedése során a főleg a hipoxia indukciója miatt kialakuló egyik angiogenezistípus, a vaszkulogenezis vizsgálata klinikai mintákban
5. hipoxia/anémia korrekciójára alkalmazott rekombináns eritropoetin (rHuEPO) hatásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* kísérletes tumormodellekben, valamint az EPO-receptor (EPOR) expressziója esetleges klinikai relevanciáinak leírása.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A kísérletek során használt tumorsejtvonalak és szövettenyésztési körülmények

Kísérleteinkben számos, különböző szöveti eredetű tumorsejtvonalat használtunk az *in vitro* és az *in vivo* vizsgálatainkhoz (**6. táblázat**). A sejteket 5-10% főtális borjúsavót (FCS, Sigma, St Louis, MO, USA), 1% penicillin-sztreptomicint (PS, Sigma) tartalmazó szövettenyésztési tápfolyadékokban (lásd alább) 5% széndioxidos, telített páratartalmú 37°C-os inkubátorban tenyésztettük.

6. táblázat. A dolgozat témájában használt sejtvonalak

Sejtvonal kódja	Szöveti eredet	Származás
HT1080	humán fibroszarkóma	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)
HT168-M1	humán melanóma	A2058 sejtvonalból a laboratóriumunkban korábban szelektált magas metasztatizáló képességű sejtvonal [175]
LX2	immortalizált humán máj sztellátsejt	ATCC
HT29	humán kolonkarcinóma	ATCC
HT25	humán kolonkarcinóma	ATCC
H358	tüdő-adenokarcinóma	ATCC
H1975	tüdő-adenokarcinóma	ATCC
H1650	tüdő-adenokarcinóma	ATCC
K562	humán eritroleukémia	ATCC
A431	humán epidermoid (vulva-) karcinóma	ATCC
B16a	amelanotikus egér melanóma	Animal and Human Tumor Bank of National Cancer Institute (Frederick, MD, USA)
KS-Imm	Kaposi-szarkóma eredetű, endoteliális fenotípust mutató sejtvonal	Albini A. ajándéka [176]

RPMI, 10% FCS: HT1080, HT29, HT25, H358, H1975, H1650, K562; RPMI, 5% FCS: HT168-M1, B16a; DMEM (Sigma), 10% FCS, 4500 mg/L glükóz: LX2, A431; Iscove's MEM (Sigma), 10% FCS: PE/CA-PJ15

3.2 *Sejtproliferációs vizsgálatok*

A proliferációs vizsgálatok általános jellemzője volt, hogy 96-lyukú szövettenyésztő edénybe tettük ki a sejteket (az adott vizsgálatnak és tumorsejtnek megfelelően) FCS-t (Sigma) tartalmazó médiumban, majd 24 óra elteltével kezeltük azokat szérumos (5-10 % FCS, Se+), vagy szérummentes (Se-) közegben. Az inkubáció végén (48-72 óra) kolorimetrikus vizsgálatot (metil-tetrazólium – MTT, vagy szulforodamin B – SRB, Sigma) végeztünk [177]. Az MTT-vizsgálatokban az inkubáció végén 20 μ L 5 mg/ml 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólium-bromidot (Sigma) adtunk a sejtekhez 4 órán át 37 °C-on, majd a kialakult tetrazóliumkristályokat 100 μ L DMSO/etanol (Sigma) 1:1 arányú keverékében feloldottuk. Az SRB detekciójakor a sejteket az inkubáció végén 10%-os triklór-ecetsavval fixáltuk (60 perc), majd 0,4% szulforamid-B-vel festettük 15 percig. A festék feleslegét többszöri mosással 1% ecetsavval távolítottuk el. Végül a fehérjékhez kötött festéket feloldottuk 10 mM Tris pufferben. A jelölés végén kapott színes lyukak abszorbanciáját 570 nm-en mikrotiterlemez-leolvasóval (550. modell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mértük 4-6 párhuzamos mintában. A kontrollok általában az oldószerrel kezelt sejtek voltak.

A heparinos vizsgálatokban RPMI-1640 + 5% FCS tápközegben voltak a HT168-M1 humán melanómasejtek (2×10^3 /well kiindulási sejtszámmal), és a kezeléshez 0,01–1 NE/ml UFH-t (Richter Gedeor Rt, Budapest, Magyarország), vagy LMWH-t (Mw: 5000 Da, Fragmin®, Pharmacia/Pfizer, Stockholm, Svédország) használtunk 72 órán át 37 °C-on.

Az oligoszacharidos kísérletekben a HT168-M1 sejteket (5×10^3 /well kiindulási sejtszám) szérummentes közegben kezeltük a különböző oligoszacharidokkal (10 μ g/ml) 48 órán keresztül. A hatásokat ezekben a kísérletekben is MTT-vel detektáltuk.

A hipoxia sejtproliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatokor $1-5 \times 10^3$ volt a kiindulási sejtszám, és a 72 órás inkubációs periódust követően (1 vagy 5% O₂) a sejtsűrűséget SRB-festéssel határoztuk meg. A kontroll sejteket (amelyeket 72 órán át normoxiában (21% O₂) tenyésztettünk) szintén megmértük és összehasonlítottuk. Az eredményeket a kontroll (normoxiában tartott) tenyészetekben kapott értékekhez viszonyított átlagos százalékban fejeztük ki.

Az rHuEPO α -kísérletekben lyukanként kétezer A431 és HT25 tumorsejtet szélesztettünk 5% szérumot tartalmazó közegben, majd 24 órával később humán rekombináns eritropoetin alfával (rHuEPO α , epoetinum α ; Janssen-Cilag, Shaffhausen, Svájc) inkubáltuk különböző koncentrációkban (0,1-10 NE/ml) 72 órán át 200 μ L szérumtartalmú vagy szérummentes közegben. A detektálást MTT-vel végeztük.

Az 5-fluorouracil (5-FU, TEVA, Pharmachemie BV, Haarlem, Hollandia) és az rHuEPO α (Janssen-Cilag) kombinációk sejtproliferációra gyakorolt hatásának kimutatására az A431 tumorsejteket különböző dózisokban kezeltük 5-FU-val (0,2-20 $\mu\text{g/ml}$) és epoetinum α -val (0,1-10 NE/ml) egyszerre. A hatások detektálásához MTT-tesztet alkalmaztunk.

A besugárzás sejtproliferációra gyakorolt hatásának kimutatására kétezer A431 sejtet szélesztettünk lyukanként a szövettenyésztő edényekbe, majd 24 órás inkubáció után egyetlen adaggal (1,85 Gy/perc, összesen 5 Gy) besugarztuk egy terápiás röntgenforrással (THX-250, Medicor, Budapest, Magyarország) 200 kV, 15 mA, 0,5 mm-es Cu szűrővel. Az antiproliferatív hatást 48 óra múlva MTT-teszttel határoztuk meg.

Az rHuEPO α - és gemcitabinkezelés *in vitro* hatásának vizsgálata során a humán tüdőadenokarcinóma sejteket (H358, H1975 és H1650) 5×10^3 sejttszámmal raktuk ki a 96 lyukú sejttenyésztő edénybe 10% FBS-t (Sigma) tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban. 24 órás inkubálás után a kezelőszereket 3% FBS-ben adtuk a sejtekhez a következő koncentrációkban: rHuEPO α 1 és 3 IU/ml, gemcitabin 1 és 10 $\mu\text{g/ml}$, illetve ezek kombinációja. A hatásokat SRB-teszttel mértük.

3.3 Klonogén túlélési vizsgálat

Az A431 daganatsejteket (1000/lyuk, körülbelül 100–200 túlélő kolónia előállítására a cél a besugárzás után) hatlyukú szövettenyésztő lemezekre szélesztettük szérumszéntartalmú DMEM-ben, és különböző koncentrációkban (0,1-1-10 NE/ml) kezeltük rHuEPO α -val. 24 órás inkubáció után a sejteket besugarztuk (5 Gy) az rHuEPO α -tartalmú tápközegben, és a lemezeket 2 hétig inkubáltuk (37°C). A hat párhuzamos lyukban kialakult telepeket metanolban fixáltuk, Giemsa-val (Chroma, Köngen, Németország) megfestettük és sztereomikroszkóppal megszámloltuk (MSZ5600, A. Krüss Optronik GmbH, Hamburg, Németország).

3.4 Apoptotikus frakció kimutatása

Az rHuEPO α -val kezelt (48 óra) és a besugárzott tumorsejteket etanolban fixáltuk. Két órás propidium-jodid és RNáz-os inkubációs periódus után (CyStain PI Absolute T, Partec, Görlitz, Németország) a sejtek DNS-tartalmának mennyiségi meghatározását áramlási citometriával (CyFlow, Partec, Németország) végeztük. Az apoptotikus sejtek (szub-G1 frakció) százalékos arányát a FlowMax szoftverrel határoztuk meg (Partec).

3.5 Melanómasejtek adhéziója extracelluláris mátrix (ECM) fehérjékhez in vitro

96-lyukú szövettenyészeti edényben a lyukakat 5 µg/lyuk mennyiségben ECM-fehérjékkel borítottuk egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten: fibronectin, laminin (Sigma), Matrigel (Collaborative Research, Bedford, MA), kollagén I–III (patkány farkából izolált), fibrinogén (I. frakció a humán plazmából, Sigma), mindegyik 50 µl PBS-ben hígítva.

A HT168-M1 tumorsejteket előkezeltük 0,1– NE/ml UFH-val vagy LMWH-val 1 órán át 37 °C-on. A kezelés után a tumorsejteket hagytuk kitapadni a mátrixfehérjékhez 35–60 percig, szérumentes közegben (SFM). A nem tapadó sejteket ezután lemostuk, a kitapadt sejtek arányát – összehasonlítva az összes lemezen használt kontroll, natív felszínű lyukakkal – SRB-festés után határoztuk meg.

3.6 Melanómasejtek adhéziója endotélsejtekhez in vitro

Tizenkét-lyukú lemezt (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA) befedtünk fibronectinnel (FN, 50 µg/ml, Sigma), PBS-ben hígítva 1 órán át 37° C-on. Emberi endotél-eredetű sejteket (KS-Imm, 10⁵/lyuk) 5% FCS-t tartalmazó RPMI táptalajban hagytuk 2 órán át 37 °C hőmérsékleten kitapadni az FN-hez. A konfluens KS-Imm sejtekre heparinnal előkezelt (1 NE/ml UFH vagy LMWH) HT168-M1 humán melanómasejteket (10⁴/lyuk) adheráltattunk Se- médiumban 60 percig, 37°C-on. A sejteket végül 4%-os paraformaldehiddel (PFA, Sigma) fixáltuk, majd 0,2% szaponinnal (Sigma) végzett permeabilizálás után a melanómasejtek kimutatására immunhisztokémiát végeztük, amihez monoklonális anti-gp100 (HMB45, DAKO, Glostrup, Dánia; 1:100 hígítás PBS-ben) és anti-MART-1 (M2-7 C10 hibridóma felülűszó; 1:10 PBS-ben) antitestek 1:1 arányú keverékét használtuk. A negatív kontroll lyukakat PBS-sel inkubáltuk a primer antitestek helyett. A kötött antitestek detektálásához biotinizált anti-egér IgG-t (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), sztreptavidin–peroxidázt (DAKO) és 3-amino-9-etil-karbazolt (AEC, Shandon, Nottingham, Egyesült Királyság) alkalmaztunk. A lemezek háttérfestéséhez hematoxilint használtunk. A kitapadt melanómasejteket fénymikroszkóppal (200× nagyítás) számoltuk, és az adatokat statisztikailag 4 párhuzamos mintában elemeztük.

3.7 Migráció és invázió in vitro vizsgálati módszerei

3.7.1 Módosított Boyden-kamra vizsgálatok

A migrációs (kemotaxis) vizsgálatokat módosított Boyden-kamrákban (48-96-lyukú variánsok, Neuroprobe, Pleaston, CA) végeztük az Albini és munkatársai által leírt módon [178]. Ennek a lényege, hogy a tumorsejteket a kamra felső részébe tesszük (szérummentes, vagy maximum 3% FCS-t tartalmazó médiumban), ahonnan az alsóba migrálnak általában valamilyen kemoattraktáns irányába, miközben áthaladnak egy 10 μ m vastag bevonat nélküli (migrációs vizsgálat), vagy valamilyen fehérjeréteggel bevont (inváziós vizsgálat) polivinil-pirrolidon-mentes polikarbonát membránon (Neuroprobe Inc., Cabin John, MD, USA), amelynek pórusátmérője tumorsejtek esetében 8 μ m (Neuroprobe). Az inkubációs idő változatos (20 perctől 24 óráig), a sejtek motilitási képességétől és a kísérletek céljától függően. A teszt végén a felső részből eltávolítjuk a nem migrált sejteket, az alsó részre kitapadt, a membránon átjutott sejteket lefixáljuk, megfestjük (általában toluidinkékkel) és mikroszkóp alatt leszámoljuk azokat.

A motilitás 3D modellezésekor a HT1080 humán fibroszarkómasejteket 2×10^5 /ml koncentrációban, 50 μ l-es térfogatban, 1% FCS-tartalmú tápközegben adtuk a felső kamrafélbe (48-lyukas kamra). Kemoattraktánsként az alsó kamrafelekben fibronektint (50 mg/ml Sigma), Matrigelt és kollagén I-et (100 mg/ml, Collaborative Research, Bedford, MA) használtunk, PBS-sel hígítva (27,5 μ l/lyuk). A sejteket 20–45 percig inkubáltuk 37°C hőmérsékleten 5% szén-dioxid-atmoszférában a kamra összeszerelése után, hogy elegendő számú sejt legyen a pórusokon belül, vagy csak épp elérjék a membrán alsó felületét a kísérlet befejezésekor. A kontrollként használt LX2 immortalizált humán májsejteket 90 percig hagytuk migrálni, fibronektint (50 mg/ml, Sigma) használva kemoattraktánsként.

A heparinok vizsgálatokor a migrációs és az inváziós vizsgálatokat 96-lyukú CFX8 lemezen hajtottuk végre. A membránokat egy éjszakán át 4°C hőmérsékleten PBS-sel (migrációs assay) vagy Matrigellel (Sigma, 50 μ g/ml, inváziós teszt) borítottuk. A CFX8 lemez alsó kamrájába 30 μ l 10% FCS-sel (mint kemoattraktáns) kiegészített RPMI-t tettünk. A tumorsejteket 30 percig előkezeltük 1 NE/ml UFH-val, vagy LMWH-val. A HT168-M1 sejteket ezután RPMI-ben szuszpendáltuk, és 20 μ l sejtuszpenziót adtunk a membrán felső részére (2×10^4 /lyuk). 4-6 órán át hagytuk migrálni a sejteket 37°C-on. Inkubálás után a felső kamrában levő sejteket eltávolítottuk, a szűrőhöz az alsó felén kitapadt, átmigrált sejteket metanolban fixáltuk 5 percig, majd 1% toluidinkékkel festettük újabb 5 percen át. A migrált

tumorsejtek számát (6 párhuzamos mintában) fénymikroszkóppal mindegyik lyukhoz három különálló mezőben megszámláltuk $400\times$ nagyítással, és statisztikailag elemeztük.

Az oligoszacharidok vizsgálatokor annyi módosítást végeztünk, hogy a sejteket 10^6 sejt/ml koncentrációban, 0,1% szarvasmarha-szérumalbumint (BSA) tartalmazó médiumban adtuk a kamrába LMWH vagy oligoszacharidok jelenlétében, vagy hiányában, és kemoattraktánsként 30 μ l fibronektinnel (100 μ g/ml, Sigma) töltöttük fel az alsó kamrarészt. A CD44 variáns exonjait szelektíven felismerő antitesteket 20 μ g/ml koncentrációban alkalmaztuk. A sejteket 6 órán át hagytuk vándorolni 37°C-on. Az inváziós vizsgálathoz ugyanezt a módszert alkalmaztuk, de a membránszűrőt korábban ECM-EHS Matrigellel (1 mg/ml, Sigma) fedtük be.

A hipoxia sejtmotilitásra gyakorolt hatásának vizsgálatokor a 48-lyukú módosított Boyden-kamrát betettük egy hipoxiás kamrába (1 és 5% O_2 -koncentráció mellett, lásd alább). A sejteket (2×10^4 /lyuk) 4 órán át (HT168-M1, HT1080), vagy 20 órán át (HT25, HT29, PE/CA-PJ15, H1975) hagytuk migrálni, fibronektint használva kemoattraktánsként. Az egyes tenyésztési körülményekre vonatkozó eredményeket hat egyedi lyuk átlag \pm SD értékeként fejeztük ki.

3.7.2 “Time-lapse” videomikroszkópia

Amennyiben a mozgás időbeni dinamikájáról is szeretnénk információt, ahhoz a statikus végeredményt adó Boyden-kamra nem megfelelő. Ehhez olyan videomikroszkópiát alkalmaztunk, ahol a mozgást időben “folyamatosan” nyomon lehetett követni. A kísérletek során bizonyos időközönként (0,5-5 perc) sorozatfelvételeket készítettünk ugyanarról a területről (vagy ugyanarról a sejtről), majd egy szoftveres rekonstrukcióval folyamatos mozgóképpé alakítottuk a felvételeket.

A HT1080 humán fibroszarkómasejtek esetében 6-lyukú szövettényesztő edényben (Greiner, Németország) 10^5 sejt/lyuk koncentrációban, szérum jelenlétében (10% FCS az RPMI 1640 médiumban) szélesztettük a sejteket 50–100 μ g/ml Matrigellel (Collaborative Research) bevont fedőlemezekre. A tumorsejteket hagytuk kitapadni és kiterülni 30–60 percig, miután a sejtek gyors mozgást mutattak 1–2 órán keresztül. A kiterülés után a fedőlemezek felületének egy részét “gumirendőrrel” megtisztítottuk, és egy gyémánt ceruzával azonosító jelet helyeztünk a tiszta felületre közel a sejtek frontjához. Ezután a sejteket egy fordított állású, fűtött asztallal rendelkező mikroszkópban vizsgáltuk (Axiovert 35, Zeiss, Németország) ahol a mozgó sejtek későbbi azonosításához fotót készítettünk a vizsgált területről. A kísérlet végén a

sejteket azonnal fixáltuk 4%-os paraformaldehidben és a fedőlemezen mozgó sejteket (amelyek közül a ténylegesen mozgók aránya általában 5% körüli volt) a fixálás után immunfluoreszcens technikákkal jelöltük. Meghatároztuk a foszfortirozin, a vinkulin, a talin, a fokális adhéziós kináz, az $\alpha 6$ -integrin, a miozin és az aktin eloszlását a jellegzetes félkör alakot felvett mozgó sejtekben.

A HT1080 sejtek átlagos sebességének meghatározásához a fedőlemezeket melegíthető asztallal kiegészített (MP10DM, Kitazato, Japán) konfokális mikroszkóp alá helyeztük (MRC 1024, Bio-Rad, Hercules, CA), ahol a fáziskontraszt képeket ezután 30–60 másodpercenként készítettük 20 \times -os objektívvel. Meghatározzuk az egyes sejtek sejtmagjának nettó elmozdulását (n=31). Ugyanezt a konfokális mikroszkópos rendszert alkalmaztuk a GFP-vinkulin-transzfektált sejtek adhéziói dinamikájának meghatározására is. A képeket 30 másodpercenként készítettük 100 \times -os objektívvel. Az adhéziók elmozdulásának időbeli dinamikáját bemutató képet (a megfigyelési időszak alatt készített összes kép egyesített képe) a Bio-Rad Lasersharp Processing szoftverrel készítettük.

A hipoxiás kísérletekben a videomikroszkópos méréseket egy korábban leírt eszköz és technika segítségével végeztük [179, 180]. A tumorsejteket 24-lyukú szövettenyésztő edény (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) 8 belső lyukába tettük a sejteknek megfelelő, 10% FBS-t tartalmazó (Sigma) médiumba. Másnap a médiumot szén-dioxid-független táptalajra cseréltük (Gibco-BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA), 10% FBS-sel és 4 mM glutaminnal kiegészítve. A belső lyukakból történő párolgás csökkentése érdekében a külső lyukakat is feltöltöttük médiummal. A sejteket egy egyedi tervezésű inkubátorban tartottuk, fordított fáziskontraszt-mikroszkóp körül (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) 37°C-on. Három, nem átfedő mikroszkópos nézetű területről képeket készítettünk 5 percenként, egy nappal az oxigéntenzió megváltoztatása előtt (21% O₂) és 3 napig utána (hipoxia, 1 és 5% O₂). A migrációs aktivitás meghatározásához a fáziskontraszt-mikroszkópos képeket külön-külön elemeztük egy egyedi sejt követő szoftver segítségével, amely lehetővé teszi az egyes sejtek kézi jelölését. A migrált távolság paramétert az egymást követő 4 napban úgy határoztuk meg, hogy a sejtek elmozdulását átlagoltuk minden egyes 24 órás intervallumban, az egyes sejtvonalakon két független kísérletben és 3 mikroszkopikus mezőben. Az eredményeket a sejtek relatív vándorlásában fejeztük ki a 72-96 órás időszakban (hipoxia harmadik napja) az első 24 órában megfigyelthez viszonyítva (normoxia).

3.8 Immunhisztokémiai, immuncitokémiai vizsgálatok

3.8.1 A citoszeletális elemek kimutatása a sejtmozgás vizsgálataiban

A 2D-rendszerben mozgó HT1080 humán fibroszarkóma sejteket 4%-os paraformaldehidben fixáltuk 10 percig, majd 0,2% Triton X-100-zal permeabilizáltuk 5 percig. A vinkulint anti-vinkulin (VIN-11-5 klón, Sigma) primer antitesttel jelöltük. Az aktin festésére alkalmas rodamin-falloidint a Molecular Probes (Eugene, OR, USA) cégtől szereztük be. A sejteket az antitestekkel 60 percig inkubáltuk, majd biotinilezett szekunder antitesttel 30 percig, ezután sztreptavidin-DTAF-fel (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) újabb 30 percig.

A 3D vizsgálatokban a migráció után a sejteket a Boyden-kamra membránjával együtt 4%-os paraformaldehidben fixáltuk 10 percig, és permeabilizáltuk 0,2% Triton X-100-zal 5 percig. A 3% BSA-val történő blokkolást követően a szűrőket anti-vinkulin (egér, VIN-11-5 klón, Sigma, 1:20) és anti-vimentin (egér, 3B4 klón, DakoCytomation, 1:100) antitestekkel inkubáltuk 60 percig. Mosás után a membránokat biotinilezett szekunder antitestekkel (anti-egér Ig-k, 1:100, Vector Laboratories) és sztreptavidin-fluoreszceinnel (Vector Laboratories, 1:100) inkubáltuk, mindegyikkel 45 percig. Az antitesteket 1% BSA/PBS oldatban hígítottuk. Az aktin jelölését tetrametil-rodamin (TRITC)-falloidin (1:500, 30 perc, Sigma) alkalmazásával végeztük. A sejteket ezután konfokális lézer-szkenning mikroszkóp alatt (MRC 1024, BIO-RAD; NIKON Eclipse E6000, Nikon Optoteam, Bécs, Ausztria) vizsgáltuk.

3.8.2 A proliferációs index mérése

A tumort hordozó állatokba a terminálás előtt 5-bróm-2'-deoxiuridint (BrdU, 200 mg/kg; Sigma) injektáltunk intravénásan. Egy órás inkubálás után a frissen archivált daganatokból 5-7 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk, majd a BrdU-pozitív (proliferáló) sejteket anti-BrdU monoklonális ellenanyaggal (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, USA) és TRITC-konjugált anti-egér IgG-vel (1:100, Sigma) tettük láthatóvá. A tumorsejtek és az endoteliális sejtek megkülönböztetése érdekében az ereket patkány anti-egér CD31 antitesttel (1:20, Becton Dickinson Bioscience), majd biotinált anti-patkány IgG-vel és sztreptavidin-FITC-cel (Vector Laboratories) festettük, és a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel (Molecular Probes) jelöltük. A tumorsejtek és az egér endoteliális sejtek jelölési indexét a tumorasszociált erekben öt különböző daganat 10 független területén határoztuk meg.

3.8.3 A daganatasszociált erek morfológiai vizsgálata

Szubkután növekvő A431 daganatokat frissen gyűjtöttünk (a daganatok beoltása után a 7., 10., 14., 17., 21. és 24. napon), majd 5–7 µm vastag fagyasztott metszeteket használtunk az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. A metszeteket monoklonális patkány anti-egér CD31 antitesttel (1:20, Becton Dickinson) inkubáltuk, majd biotinilezett anti-patkány IgG-vel és sztreptavidin-FITC-cel (Vector Laboratories). A magokat propidium-jodiddal (Sigma) jelöltük. Metszetenként öt 300×400 µm méretű, élő daganatsejteket tartalmazó felületet fényképeztünk és analizáltunk konfokális mikroszkóppal (MRC 1024, Bio-Rad) és számítógépes morfológiával (CUE2 szoftver, Olympus Vanox, Tokió, Japán). Csoportonként öt tumorban meghatároztuk az átlagos Feret-átmérőt (amelyet két pont közötti lehető legnagyobb távolságként határoznak meg az érdeklődésre számot tartó régió határa mentén, és a szoftver az egyes erek mérésének átlagolásával számolja 0°, 45°, 90° a 135°-os vetületekben), az erek kerületét és a sűrűséget. A CD31+/propidium-jodid+ endoteliális sejtek számát 100 µm érkerületre számolva határoztuk meg az egyes daganatok öt különböző területén. Az érfal pericitáit immunhisztokémiai jelöléssel azonosítottuk anti-simaizomaktin ellenanyaggal (DakoCytomation), és anti-egér TRITC-cel (Sigma).

3.8.4 A tumorszövet funkcionális képződése Hoechst 33342 festék és doxorubicin felhasználásával

Egy mg/ml Hoechst 33342 festéket (Molecular Probes, kék) vagy 2 mg/ml doxorubicint (Adriablastina PFS, Pharmacia Italia, SpA, Olaszország, piros) 0,2 ml térfogatban oltottunk be rHuEPO α -val kezelt és kontroll állatokba intravénásan a tumoroltás utáni 21. napon. 15 perces inkubálás után a daganatokat eltávolítottuk, és 5-7 µm vastag fagyasztott metszeteket készítettünk, amiket vagy az azonnali, vagy Hoechst 33342-vel végzett magfestés után fluoreszcens mikroszkóppal (Eclipse E6000, Nikon Optoteam, Bécs, Ausztria) vizsgáltuk. Tíz festett területet elemeztünk morfológiai szoftverrel (ImageTool, University of Texas, San Antonio, TX, USA), hogy meghatározzuk a perfundált területet az élő tumorszövetben.

3.8.5 Az EPC-k azonosítása konfokális mikroszkóppal humán NSCLC mintákban

Az immunfluoreszcens jelöléseket frissen fagyasztott NSCLC-mintákon végeztük. A 10 µm-es metszeteket -20°C-os metanolban fixáltuk 10 percig. PBS-mosás után a következő primer antitesteket használtuk: nyúl poliklonális anti-humán CD31 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), FITC-konjugált anti-humán CD34 (1:50; BD Biosciences), egér anti-humán VEGFR2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) és biotinnel

konjugált anti-humán CD133 (1:50; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország). Negatív kontrollként normál egér- és nyúl-IgG-ket (Sigma) használtunk ugyanolyan koncentrációban, mint a tesztantitesteket. PBS-ben történő mosás után a metszeteket egyidejűleg inkubáltuk a megfelelő szekunder antitestekkel, vagy sztreptavidin-konjugátumokkal (FITC-konjugált kecske anti-nyúl IgG, rodaminnal konjugált kecske anti-egér IgG, sztreptavidin-konjugált rodamin és sztreptavidin-konjugált Cy5; 1:100; mindegyik; Jackson ImmunoResearch) TOTO-3 (1: 1000; Molecular Probes) magfestéssel vagy anélkül. A morfometriás elemzést úgy végeztük, hogy a CD133+ és a VEGFR2+/CD133+ kettős pozitív sejtek számát megszámláltuk tíz véletlenszerűen kiválasztott 1 mm²-es mezőben. A metszeteket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal vizsgáltuk, és a digitális képeket SPOT digitális fényképezőgép (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) vagy a Bio-Rad MRC-1024 konfokális mikroszkóppal (Bio-Rad) készítettük.

3.9 HT1080 sejtek transzfekciója GFP-vinkulinnal

A HT1080 sejteket (10⁶) GFP-vinkulin fúziós gént kifejező plazmiddal transzfektáltuk, amit Dr. Benjamin Geigertől (Weizmann Tudományos Intézet, Rehovot, Izrael) kaptunk. A transzfekciót FuGENE 6 transzfekciós reagens (Roche Diagnostic, Mannheim, Németország) felhasználásával végeztük a gyártó útmutatásait követve. A transzfektált sejtek aránya maximálisan 20% volt, és a tenyészeteket 3 napig használtuk migrációs tesztekre. A transzfekció negatívan befolyásolta a mozgás aktivitását: mind a mozgó sejtek arányát (~1%), mind a sebességet csökkentették.

3.10 Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A Boyden-kamrás migrációs teszt befejezése után a membránt eltávolítottuk, CSK-pufferrel (20 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH=7) mostuk és extraháltuk 1% CSK-oldattal ami Triton X-100-at, 4% PEG-et és TRITC-falloidint tartalmazott (1:100-as hígításban). Ezt követően a miozin S1 (HMM) dekorációt TRIS-KCl oldattal végeztük, amely 1 mg/ml HMM-et tartalmazott (30 perc). Köszönettel tartozom Dr. Hegyi Györgynek (ELTE Biokémia Tanszék), aki a miozin S1 fragmenst rendelkezésünkre bocsátotta. A mintákat 30 percig 2,5% glutáraldehidet és 0,2% tannint tartalmazó PBS-ben fixáltuk, majd 1 órán át 2% OsO₄-be (PBS-ben) merítettük. A mintákat felszálló alkoholsorban dehidratáltuk (50%, 75% [2% uranil-acetátot tartalmaz], 90%, 100%, majd 30 perc 1:1 arányú alkohol-gyanta keverék), végül Spurr keverékben inkubáltuk 60°C-on 24 órán keresztül. Az ultravékony

metszeteket Ni-gridre úsztatva ólom-citráttal kontrasztoltuk, majd elektronmikroszkóppal (Philips CM10) vizsgáltuk.

3.11 Oligoszacharid heparinszármazékok

A 4-22 monoszacharid egységből álló oligoszacharidláncokat (dp4–dp22) John T. Gallagher-től kaptuk (Paterson Institute for Cancer Research, Manchester M20 4BX, UK). A szintézisük menetét korábban a csoport publikálta [181]. Röviden: a heparin-oligoszacharidokat méret szerinti szétválasztás után depolimerizálták, majd a láncok diszacharidkomponenseit anioncserélő folyadékkromatográfiával azonosították (**7. táblázat**). Vizsgálatainkban kontrollként kis molekulású dalteparint (LMWH, Pharmacia/Pfizer) használtunk.

7. táblázat. A humán melanóma-sejtvonalakkal folytatott kísérletekben felhasznált oligoszacharid heparinszármazékok

Oligoszacharid láncosság										
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Az oligoszacharidok diszacharid összetevői (%)										
IdoA-GlcNAc	1,9	3,1	3,0	1,5	4,1	7,3	7,3	0	0	0
Ido-GlcNS	0	0	0,9	1,3	1,8	3,2	4,0	4,0	5,4	5,3
Ido-GlcNAc(6S)	0	0	1,6	1,2	1,5	3,5	3,9	3,9	4,2	4,7
Ido-GlcNS(6S)	7,7	11,0	8,7	9,2	8,8	8,5	9,7	11,5	11,6	12,1
Ido(2S)-GlcNS	8,9	7,5	8,3	8,3	7,1	7,9	9,5	9,3	9,7	9,7
Ido(2S)-GlcNS(6S)	81,5	78,0	77,0	78,4	76,6	69,6	65,5	67,3	66,0	65,1
A diszacharidok szulfatáltsága (%)										
N-szulfatáltság	98,1	96,5	94,9	97,2	94,3	92,7	88,7	92,0	92,0	92,0
2-O-szulfatáltság	90,4	85,5	85,5	86,7	83,7	77,5	75,0	77,0	76,0	75,0
6-O-szulfatáltság	89,2	89,0	87,3	88,8	86,9	81,6	79,1	82,0	82,0	82,0

Sorok: azonosított diszacharid-komponensek; oszlopok: a kísérletesen felhasznált oligoszacharidok láncossága (dp4-dp22). IdoA, iduronsav; GlcNAc, N-acetil-glükózamin; GlcNS, N-szulfatált glükózamin; 6S, 6-O-szulfát; 2S, 2-O-szulfát

3.12 Proteinfoszfatáz-aktivitás vizsgálata

A protein-foszfatáz 1c (PP1c) katalitikus alegységét nyúl vázizmokból állították elő, a protein-foszfatáz 2A katalitikus alegységét (PP2Ac) heparin-szefaróz kromatográfiával választották el [182]. A foszfatázaktivitást 30°C-on 2 μ M 32 P-jelölt miozin könnyűláncon vizsgáltuk (32 P-MLC20), melyet pulyka zúzógyomorból állítottak elő. A különböző heparinszármazékokkal 10 μ g/ml koncentrációban inkubáltuk a foszfatáz enzimet 5 percig, majd a reakciót szubsztrát hozzáadásával indítottuk el. 10 perces inkubálás után a reakciót 200 μ l 100% TCA és 200 μ l 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A kicsapódott fehérjéket centrifugálással összegyűjtöttük, és a felszabadult 32 P izotópot szcintillációs számlálóval (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) határoztuk meg a felülúszóból. A foszfatázaktivitást a kezeletlen kontrollokban 100% -nak tekintettük.

3.13 Hipoxiás kultúrák

A csökkentett oxigéntartalmú közeget egy hipoxiás kamrában (Billups-Rothenberg, San Diego, CA, USA) hoztuk létre *in vitro*, amiben 5% CO₂, 90% vagy 94% N₂ és 1% vagy 5% O₂ gázkeveréket használtunk. A hipoxiakamrában a sejteket 37°C-on inkubáltuk 72 órán át. Az inkubáció után molekuláris biológiai vizsgálatokat (mRNS-izolálás, kvantitatív RT-PCR), Western-blot analízist, enzimaktivitási tesztek, valamint Boyden-kamrás migrációs vizsgálatokat végeztünk.

3.14 A HIF-1 α csendesítése

A HIF-1 α expressziójának csendesítéséhez HT168-M1 és HT29 sejtvonalakban shRNS-t (Gene ID 3091) használtunk MegaTran1.0 transzfekciós reagenssel (OriGene, Rockville, MD, USA). A transzfekciót a gyártó utasításai szerint hajtottuk végre. A transzfekció után puromicint használtunk a szelekciós folyamatban.

3.15 Valós idejű RT-PCR vizsgálatok

3.15.1 RNS-extrakció

A teljes RNS-t TRIzol reagenssel (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) izoláltuk a gyártó protokollja szerint. Az RNS tisztaságát és koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg 260 nm hullámhosszon (NanoDrop, Wilmington, DE, USA).

3.15.2 HIF-1 α és kis G-fehérjék expressziójának meghatározása tumorsejtekből

Az RNS átírását nagy kapacitású cDNS reverz transzkripcióval végeztük (Invitrogen, Life Technologies) a gyártó utasításai szerint. A reverz transzkripció után a cDNS-mintákat -70°C-on tároltuk a további feldolgozásig. A kvantitatív valós idejű PCR reakciókat iCycler iQ (Bio-Rad) gépben végeztük. A kvantitatív PCR-hez a reakcióelegyet úgy készítettük, hogy mindegyik mintához 10 μ l 2 \times TaqMan master mixet, 1 μ l primereket (Invitrogen, Life Technologies) és 7 μ l DEPC vizet adtunk. A primerek a következők voltak: humán HIF-1 α (Hs00936366_m1), Rac1 (Hs01902432_s1), Cdc42 (Hs00741586_mH), RhoA (Hs00236938_m1), β -aktin (FAM/MGB 4333762, mint endogén kontroll). A reakcióelegyet (18 μ l/lyuk) 96 lyukú lemezen (Bio-Rad) osztottuk el, és mindegyik lyukhoz hozzáadtunk 2 μ l cDNS-mintát (300 ng). A PCR reakciót három párhuzamosban hajtottuk végre a gyártó ajánlása szerint, azonos hőprofilal. A relatív mRNS-expresszió meghatározása a PCR reakciót jellemző (Ct) küszöbértékek felhasználásával történt.

3.15.3 A HIF-1 α RNS izolálása, reverz transzkripciója és expressziója valós idejű PCR-rel

Teljes RNS-t izoláltuk, és a cDNS-t a gyártó utasításainak megfelelően állítottuk elő (Invitrogen). Minden 25 μ l-es reakcióelegy 12,5 μ l 2 \times iQ SYBR Green Supermix-et (Bio-Rad), 0,5–0,5 μ l HIF-1 α primereket (AAC-TTC-TGG-ATG-CTG-GTG-ATT és TGTTCA-TAG-TTC-TTC-CTC-GGC; végső koncentrációja 200 nM), és 11,5 μ l hígított cDNS-t tartalmazott. A ciklus körülményei: 3 perc iTaq™ DNS-polimeráz aktiváció 95°C-on, 40 ciklus 95°C-on 30 másodpercig, 55°C-on 30 másodpercig és 72°C-on 1 percig. A kiindulási mennyiségeket a K562 humán leukémiasejtekből származó kontroll cDNS standard ötszörös hígítási sorozatai (1 \times –625 \times) alapján határoztuk meg. A HIF-1 α relatív expresszióját úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási mennyiségeket a β -aktinra normalizáltuk (primerek: GTG-GGG-CGC-CCC-AGG-CAC-CA és CTC-CTTAAT-GTC-ACG-CAC-GAT-TTC) ugyanazon cDNS-mintából. A 2%-os agaróz gélen elválasztott PCR-termékeket újra elkülönítettük a gélből (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Mannheim, Németország). A DNS-szekvenciák meghatározását Big Dye Terminátorral végeztük az Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer készüléken (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.15.4 A humán eritropoetinreceptor és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor expressziójának meghatározása tumorxenograftokban

Az eritropoetinreceptor valós idejű PCR-jéhez teljes RNS-t izoláltunk *in vitro* növekvő sejtvonalakból TRI reagens (Sigma) alkalmazásával a gyártó utasításai szerint. A lehetséges DNS-szennyeződés kiküszöbölésére TURBO kivet használtunk (Ambion, Austin, TX, USA). A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGFA) expresszióját a kezelt és a kontroll állatok tumormintáiból izolált RNS-ből határoztuk meg, amihez NucleoSpin RNAII készlettel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) izoláltuk az RNS-t.

A reverz transzkripcióhoz 1 µl 10 mmol/l koncentrációjú dezoxinukleotid-trifoszfát keveréket (Finnzyme, Espoo, Finnország) és 1 µl random primer oligo(dT) kombinációt adtunk, hogy a végkoncentráció 2,5 µmol/l legyen, és mindkét esetben 2 µg-ot használtunk a tisztított teljes RNS-ből. 70°C hőmérsékleten 10 percen át végzett inkubálás után 2 µl 10× M-MLV reverz transzkriptáz puffert (Finnzyme), 1 µl M-MLV reverz transzkriptázt (200 egység/reakció, Finnzyme), 0,5 µL RNáz-inhibítort (40 egység/µl, Promega, Madison, WI, USA) és 6,5 µl dietil-pirokarbonáttal kezelt vizet mértünk össze, hogy a végtérfogat 20 µl legyen, majd 37°C-on 50 percig és 85°C-on 10 percig inkubáltuk. A reverz transzkripció megtörténtét PCR-rel ellenőriztük a β-aktin háztartási gén primereinek használatával. Ugyanazon minta RNS-ét használtuk negatív kontrollként a DNS-szennyeződés kimutatására, dietil-pirokarbonáttal kezelt vizet pedig mintamentes kontrollként.

A kvantitatív PCR-mérésekhez mindegyik 25 µl térfogatú reakcióelegy 12,5 µl 2× iQ SYBR Green Supermix-et (Bio-Rad), és 0,5–0,5 µl-t tartalmazott minden egyes primerből, 200 nmol/l végkoncentrációban, valamint 11,5 µl kihígított cDNS-t. A PCR-kondíciók a következők: 3 perc iTaq DNS-polimeráz-aktiváció 95°C-on, majd 40 ciklus 95°C-on 30 másodpercig, 60°C (eritropoetin) vagy 64°C (VEGF) 30 másodpercig, 72°C 1 percig. A kiindulási mennyiségeket a kontroll cDNS-sel elvégzett standard ötszörös hígítási sorozat (1×-625×) alapján határoztuk meg. A VEGF-vizsgálat során a kontrollok a következők voltak: A431 az emberi eritropoetinreceptorhoz, eger B16a az egérspecifikus primerekhez, valamint humán Kaposi-szarkóma (KS-Imm) sejtvonalak a humánspecifikus primerekhez. A humán eritropoetinreceptor (primerek: TCT GGC ATC TCA ACT GAC TAC A és CCA TCC CTG TTC CAT AAG TCT TG) és a VEGF (humánspecifikus primerek: CTT GCC TTG CTG TC TAC CT és TGA TGT TGG ACT CCT CAG TGG, egérspecifikus primerek: CTA CTG CCG TCC GAT TGA GA és CAT CTG CTG TGC TGT AGG AAG) relatív expresszióját úgy határoztuk meg, hogy a kiindulási mennyiségeket normalizáltuk ugyanazon cDNS-minta β-

aktin háztartási génjére. β -aktin primerek az emberi eritropoetinreceptor meghatározására: GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA és CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC, valamint VEGF meghatározásokhoz: AGA CAA CAT TGG CAT GGC TT és AAT GAA GTA TTA AGG CGG AAG ATT). A VEGF-primerek fajspecifitását a humán minta – egér primer és az egér minta – humán primer kombinációk reakcióinak elvégzésével bizonyítottuk. A valós idejű PCR-eket Bio-Rad MyiQ egyszínű valós idejű PCR-detektáló rendszerrel mértük.

3.15.5 Az EPOR expressziójának meghatározása NSCLC sejtekben és betegmintákban

A mintáinkból Trizol reagenssel (Invitrogen) izoláltuk az összes RNS-t, RNase-free DNase kitet használva (Ambion) a gyártó leírásának megfelelően. Minden minta esetében 12,5 μ l RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk az alábbi reakcióeleggyel: dezoxi-NTP (0,5 mM), oligo-dT és random primer keveréke (3 μ M végkoncentráció, Applied Biosystems), RNasin ribonukleáz-inhibitor (20 U/reakció; Promega, Madison, WI, USA), reverz transzkripció puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂ és 50 mM ditiotritol), M-MLV reverz transzkriptáz (200 U/reakció; Sigma) és DEPC-kezelt víz. Az átírás eredményét és az RNS-minták tisztaságát β -aktin amplifikálásával ellenőriztük (primerek: GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA és CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC).

A cDNS-minták qRT-PCR-analíziséhez Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System készüléket használtunk. TaqMan EPOR (Hs000181092_m1), β -aktin (Hs03023880_g1), valamint GAPDH (Hs02786624_g1) génexpressziós esszét végeztünk (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) TaqMan Universal PCR Master mixben a következő paraméterekkel: 50°C (2 perc), 40 ciklusban 95°C (10 mp), 60°C (1 perc) és 72°C (1 perc). A kiindulási mRNS relatív mennyiségét egy ismert koncentrációjú DNS-minta hígítási sorához viszonyítva állapítottuk meg és normalizáltuk a saját β -aktin-, illetve a sejtvonalak esetében GAPDH-expressziójához. A tumorszövet EPOR-expresszióját egy következő lépésben normalizáltuk az ugyanazon beteghez tartozó normális endobronchiális szövet EPOR-expressziójával (tumor/normál, T/N).

3.15.6 Az EPC-markerek szintjének mérése kvantitatív valós idejű RT-PCR segítségével

NSCLC-s betegek perifériás véréből 10 percig inkubáltuk vörösvérsejt-lizáló pufferrel (Sigma, München, Németország), és 20 másodpercig teljes sebességgel centrifugáltuk egy mikrocentrifugában. A teljes RNS-t Qiagen RNeasy Mini kit segítségével extraháltuk, és a gyártó protokollja szerint RNáz-mentes DNáz-készlettel emésztettük. Mindegyik mintából 3 µg teljes RNS-t írtunk át cDNS-re dezoxinukleotid-trifoszfátokkal (mindegyik 0,5 mmol/l), véletlenszerű primer és oligo dT keverékével (végső koncentráció: 3 µmol/l), RNasin RNáz-inhibitorral (Promega, Madison, WI, 20 egység/reakció) reverz transzkriptáz pufferben MMLV reverz transzkriptáz (Sigma; 200 egység/reakció) segítségével. A mintákat (30 µl) 50 percig inkubáltuk 37°C-on, majd 85°C-on 10 percig. A következő primerszekvenciákat használtuk [183]:

AC133: TGGATGCAGAACTTGACAACGT és ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT; VEGFR2: CACCACTCAAACGCTGACATGTA és GCTCGTTGGCGCACTCTT; VE-kadherin: TTCCAGCAGCCTTTCTACCA és GGAAGAACTGGCCCTTGTC; CD34: TTGACAACAACGGTACTGCTAC és TGGTGAACACTGTGCTGATTAC. A valós idejű PCR-analízist úgy standardizáltuk, hogy a kérdéses géneket a β-aktin háztartási génnel együttesen amplifikáltuk (primerek, TCTGGCACACACCTTCTAC és CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC). A valós idejű PCR reakciót iCycler iQ-n (Bio-Rad) szokásos körülmények között végeztük: a primerek 200 nmol/l, iQ SYBR Green Supermix és 2 µl cDNS. Negatív kontrollként vizet használtunk minden egyes primerpárhoz. A ciklusparaméterek a következők voltak: 95°C (3 perc), 50 ciklus 95°C (30 másodperc), 64°C (30 másodperc) és 72°C (1 perc). A mintában levő génexpresszió kiindulási mennyiségét az ismert koncentrációjú templát DNS hígítási sorozatából előállított és a saját β-aktin expressziójára normalizált standard görbe összehasonlításával határoztuk meg.

3.16 Áramlási citometriás mérések

3.16.1 Eritropoetinreceptorok kimutatása tumorsejteken

A tumorsejteket EDTA-val (Sigma) leválasztottuk, szérumentes RPMI-vel mostuk és metanollal 20 percig fixáltuk. A fixálás után a nem specifikus kötőhelyeket 3% szarvasmarhaszérumalbumin/PBS-sel (Sigma) blokkoltuk 30 percig, majd a sejteket anti-humán eritropoetinreceptor monoklonális antitesttel (1:20 PBS-ben, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), vagy kontroll egér IgG2b antitesttel inkubáltuk (Sigma). A megkötött primer ellenanyagot R-fikoeritrinnel konjugált kecske anti-egér immunglobulinnal (1:10 PBS-ben,

DakoCytomation) detektáltuk. A jelölt sejtek fluoreszcenciáját CyFlow flow citométerrel (Partec, Münster, Németország) mértük és meghatároztuk a pozitív sejtek százalékos arányát.

3.16.2 Az EPC-k meghatározása NSCLC-betegek perifériás vérében

A keringő endoteliális progenitorsejteket NSCLC-s betegek 90 µl perifériás véréből határoztuk meg, amelyet 30 percig inkubáltunk 4°C-on PE-Cy5-konjugált anti-humán CD34 (BD Biosciences) és PE-konjugált anti-humán VEGFR2 (R&D Systems) antitestekkel, vagy biotinnel konjugált anti-humán CD133 (Miltenyi Biotec) és PE-konjugált anti-humán VEGFR2-vel (R&D Systems). A biotinnel konjugált anti-CD133-at sztreptavidin-PE-Cy5 (BD Biosciences) alkalmazásával tettük mérhetővé. Minden festési eljárásához megfelelő fluorkróm-konjugált izotípuskontollokat használtunk. A mérések után (CyFlow SL flow citométer, Partec, Münster, Németország) a CD34+/VEGFR2+ és a CD133+/VEGFR2+ sejtek számát a FlowMax szoftver (Partec) segítségével határoztuk meg és 1 ml vértérfogatra eső sejtszámban fejeztük ki.

3.17 Az aktív RhoA meghatározása

A RhoA aktív, GTP-hez kötött formáját a gyártó utasításai szerint G-LISA kittel (Cytoskeleton, Denver, CO, USA) határoztuk meg.

3.18 Western blot vizsgálatok

A kis G-fehérjék meghatározásához a 72 órás inkubálás után a sejteket kétszer mostuk Tris-pufferben, majd MLB (Millipore, Billerica, MA, USA) oldattal lizáltuk, amely 10 µg/ml aprotinint és 10 µg/ml leupeptint tartalmazott. A mintákat ezután homogenizáltuk úgy, hogy a lizátumokat 26-as és 28-os méretű tűkön ötször átpréseltük, majd 2 percig centrifugáltuk 14 000 g-vel. A felülúszót használtuk az elemzéshez. A mintákat 1:1 arányban hígítottuk 2x Laemmli-pufferrel (Sigma-Aldrich), és -80°C-on tároltuk a további felhasználásig. Az egész eljárást jégen hajtottuk végre a fehérjebomlás elkerülése érdekében. A fehérjéket (mintánként 40 µg összfehérjét, a fehérje koncentrációt Lowry-módszerrel határoztuk meg) 10% SDS-poliakrilamid gélben választottuk el, majd PVDF membránra (Bio-Rad) vittük át, a gyártó protokolljainak megfelelő nedves elektroblot készülékkel. A Rho-t anti-Rho (-A, -B, -C; clone55, Millipore) antitesttel detektáltuk 3 mg/ml koncentrációra hígítva. A Rac1-et anti-Rac1, 23A8 klón egér monoklonális antitest (Millipore) alkalmazásával detektáltuk 1 mg/ml koncentrációban. A Cdc42-et anti-Cdc42 egér monoklonális antitesttel (Millipore)

azonosítottuk, 1 mg/ml koncentrációra hígítva az antitestet. Mindhárom primer antitestet HRP-vel konjugált kecske anti-egér IgG szekunder antitesttel detektáltuk (Jackson ImmunoResearch). Az immunoblotokat kemilumineszcens rendszerrel (Millipore) hívtuk elő. A sávokat a GelAnalyzer 2010a szoftver (Lazar Software, Debrecen, Magyarország) felhasználásával értékeltük, a mennyiségi meghatározáshoz a fehérjeexpressziót normalizáltuk a béta-aktin szintjére.

3.19 Hemoglobinszint mérése SCID egerekben

A szívből vett friss vért (a 8., 15., 19. és 22. napon) üvegcsövekben tartottuk 3,8% nátrium-citrátban (citrát:vér arány = 1:10 v/v). A mintákat 4000 fordulat/perc sebességgel 15 percig centrifugáltuk, és a hemoglobinszintet a SYSMEX-SF-3000 hematológiai műszerrel határoztuk meg.

3.20 Állatkísérletek

A kísérletekben felhasznált állatok az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályán (Budapest, Magyarország) működő speciális patogénmentes (SPF) állatház tenyészetéből származtak. Az állatok gondozása a "Guiding Principles for the Care and Use of Animals" vonatkozó alapelvek szerint, valamint a "Helsinki nyilatkozat" alapján történtek [184]. Az állatok sterilizált tápot kaptak (SDF, Akronom Kft, Budapest, Magyarország,) és szabadon hozzáfértek a sterilizált ivóvízhez. Az állatokat steril, egyedileg szellőztetett makrolon dobozokban (IVC) helyeztük el, 23-25°C-on, 40%-50% páratartalom mellett, 12/12 órás (világos/sötét) megvilágítással. Kísérleteinkben 5-10 egeret vontunk be csoportonként.

Az összes *in vivo* vizsgálat az állatkísérletekre vonatkozó aktuális nemzeti és intézményi szabályoknak [185, 186], a nemzeti szakhatósági engedélyeknek megfelelően (legutolsó engedélyek számai: 22.1/722/3/2010, PEI/001/2574-6/2015), az Országos Onkológiai Intézet Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával történtek.

3.20.1 Tüdőkolonizációs vizsgálatok heparinokkal

Két-három hónapos, súlyosan immunhiányos (SCID, CB17/Icr-Prkdc^{scid}) nőtény egereket használtunk, amelyekbe intravénásan (farokvénán keresztül) injektáltuk a szövettenyészetből származó HT168-M1 humán, vagy a B16 egér melanómasejteket (5×10^5 – 1×10^6 állatonként, 200 μ l szérumentes Medium-199 tápfolyadékban). Az UFH-t, LMWH-t

(20-200 NE/kg, 100 µl 0,9% NaCl-ban hígítva minden állaton), a hirudint (3 mg/kg), míg az oligoszacharidokat (640 µg/kg-1,8 mg/kg) intraperitoneálisan adtuk a tumorsejtek oltása előtti naptól a tumorsejtoltás utáni 1-3 napig naponta egyszer (3-5 kezelés). A kontrollok 100 µl sóoldatot kaptak. Az állatokat 7 hétig követtük, és Nembutal (Serva, Heidelberg, Németország) túladagolással feláldoztuk amikor vagy a súlycsökkenés elérte a maximum 20% -ot, vagy a kontrollcsoportban lévő állatok hiperventilációt mutattak., de legkésőbb az 50. napon a tüdőket eltávolítottuk, 4% PFA-ban fixáltuk, és a felszíni tumorkolóniákat sztereomikroszkóppal megszámláltuk.

3.20.2 A melanómasejtek kitapadásának dinamikája a tüdőben

A saját tenyészetünkből származó nőstény SCID egereket heparinnal, LMWH-val (200 NE/kg), vagy fiziológiás sóoldattal (kontroll) kezeltük intraperitoneálisan (ip.) 1 nappal a HT168-M1 tumorsejtek intravénás (iv.) oltása előtt (10⁶/állat). Az állatokat Nembutal (Serva) túladagolással termináltuk 5 perc, 1 vagy 4 óra után, majd az eltávolított tüdőket PFA-ban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk és 3 µm-es metszeteket használtunk a további vizsgálatokhoz. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a metszeteken mikrohullámú antigénfeltárás és az endogén peroxidáz-aktivitás blokkolása után (3% H₂O₂ metanolban) a nonspecifikus kötőhelyeket 20% kecskeszérummal blokkoltuk. A melanómasejtek megfestéséhez monoklonális HMB45 és anti-MART-1 antitesteket használtunk. Az emberi melanómasejteket fénymikroszkóppal (400× nagyítás) számoltuk, és az adatokat statisztikailag három párhuzamos mintában elemeztük.

3.20.3 Májmetasztázis-modell heparinokkal

10⁵ daganatsejtet injektáltunk nőstény SCID egerek lépébe 20 µl térfogatban Nembutal-érzéstelenítés alatt. A napi kezeléseket UFH-val és LMWH-val (20–200 NE/kg), hirudinnal (3 mg/kg) vagy fiziológiás sóoldattal (kontroll) a 8. napon kezdtük a tumoroltást követően, és 2 hétig folytattuk. Az állatokat Nembutal túladagolással termináltuk a 31. napon, amikor a kontrollcsoportokban a súlyvesztés elérte a maximum 20% -ot. A lépeket és a májat eltávolítottuk, megmértük és 4% PFA-ban rögzítettük. 10 állat/csoport felszíni májattéteit sztereomikroszkóppal határoztuk meg.

3.20.4 Rekombináns humán eritropoetin és 5-fluorouracil-kezelés in vivo

A tumorhordozó állatokat rHuEPO α -val kezeltük humán-ekvivalens dózisban (150 NE/kg fiziológiás sóoldatban, végső térfogata 0,1 ml) hetente háromszor ip. a tumoroltás utáni első naptól az 5-fluorouracil (5-FU) kezelés végéig (16. nap). Az egereket 5-FU-val kezeltük

ip. a 12. naptól kezdve a tumorsejtek oltását követően, napi 750 mg/m² dózisban, 5 napig (az átlagos tumortérfogat 50-70 mm³ volt a kemoterápia kezdetén). A kontroll állatokat fiziológias sóoldattal kezeltük. A daganatok térfogatát két átmérő méréseiből (heti háromszor) a következő képlettel határoztuk meg: hosszúság × szélesség² × π/6.

3.20.5 Rekombináns humán eritropoetin és gemcitabin kezelés in vivo

A H1795 NSCLC tumorsejtek oltását követő 5. napon az egereket négy csoportba osztottuk: 1. rHuEPO α -kezelés (150 IU/kg, fiziológias sóoldatban, 0,1 ml végső térfogatban) ip. háromszor egy héten az 5. naptól kezdve a 33. napig; 2. gemcitabin 100 mg/kg ip. összesen négy alkalommal a 20., 24., 27. és 31. napokon; 3. rHuEPO α és gemcitabin (mindkettőt úgy adva, ahogy külön-külön); 4. kontrollcsoport: fiziológias sóoldat minden alkalommal. A tumorok méretét kaliperrel mértük a 19. naptól kezdődően, háromszor egy héten a térfogatokat a korábban leírt képlettel határoztuk meg.

3.20.6 In vivo EPO-kezelés és a daganatok besugárzása

A tumorhordozó állatokat rHuEPO α -val kezeltük humán-ekvivalens dózisban (150 NE/kg) hetente háromszor intraperitoneálisan, az 1. naptól a besugárzásig (14. nap), amikor az átlagos tumortérfogat 50–70 mm³ volt. A daganatokat egy 1 cm²-es kör alakú mezőbe helyeztük. A röntgenbesugárzás egyetlen 5 Gy adagját helyileg adtuk be 1,85 Gy/perc dózis mellett, egyedileg előállított ólomvédő alkalmazásával, terápiás röntgenforrás (THX-250, Medicor, Budapest, Magyarország) felhasználásával (200 kV, 15 mA, 0,5 mm-es Cu szűrővel). 8 napos inkubálás után az állatokat termináltuk és meghatároztuk a tumorok tömegét.

3.20.7 Hipoxia hatása kísérletes daganatok progressziójára

A kísérlethez hím SCID egereket használtunk. A hipoxiás körülményeknek az áttétek képződésére gyakorolt hatásának elemzésére *in vivo* kétféle kolonizációs és metasztázis modellt alkalmaztunk. Egysejtes szuszpenziókat készítettünk a HT168-M1 humán melanómasejtekből, és 1×10⁵/állat töménységben, 20 μ l térfogatban Médiium 199 tápfolyadékban (Sigma). Injektáltuk az egerek lépébe, ahonnan a májban kolóniák képződtek. A HT29 humán kolonkarcinóma esetében a szubkután növekvő daganatokból fragmenseket transzplantáltunk ortotopikusan a bélfalra az appendix régióban, ahonnan metasztázisok alakulnak ki a májban és a tüdőben is. A kezeléseket a tumorok oltása utáni 6. napon kezdtük meg (10-11 egér/csoportot használtunk a HT168-M1 esetében és 8 egér/csoportot a HT29 esetében). A kezelési karon lévő állatokat véletlenszerűen három csoportra osztottuk: kontroll (6,25% DMSO PBS-ben

intraperitoneálisan, hetente kétszer 4 héten át), CoCl_2 (a hipoxia legismertebb kémiai “mimikálója”, 260 mg/l ivóvíz *per os*, 4 hétig) és chetomin (Sigma-Aldrich, 1 mg/kg DMSO-ban feloldva intraperitoneálisan, hetente kétszer, 4 hétig). A chetomin a HIF-1 α szelektív inhibitoraként ismert, amely a HIF-1 α /p300 komplex kialakulásának gátlásával blokkolja a hipoxia-indukálható génextpressziót. A kísérleteket a tumor beoltása után a 34. napon fejeztük be. A májakat és a tüdőt formalinban fixáltuk, és a makrometasztázisokat sztereómikroszkóp alatt számoltuk meg.

3.21 Rutin hisztológiai vizsgálatok

Az eltávolított és formalinban fixált szövetmintákat felszálló alkoholsorban dehidratáltuk, xilollal infiltráltuk majd paraffinba ágyasztuk. A szövettani metszeteket Harris-féle hematoxilinnel és eozinnal (10:1, térfogatarány, 1% végkoncentráció) megfestettük 70% -os savanyított etanolban, és lefedtük. A szövettani mintákat fénymikroszkóppal vizsgáltuk (Olympus CH30, Olympus Optical, Japán).

3.22 Statisztikai analízisek

A normalitás ellenőrzésére Shapiro–Wilks-próbát használtunk. Normáeloszlás esetén (pl. *in vitro* sejtes vizsgálatok, morfometriai elemzések) két csoport közötti statisztikai különbség kimutatására Student-féle t-próbát, több csoport esetén ANOVA-t, kiegészítve *post hoc* Scheffé-teszttel, vagy Bonferroni-, vagy Dunn-teszteket használtunk. Az *in vivo* adatokat nem paraméteres tesztekkel elemeztük: két csoport összehasonlításához Mann–Whitney U-tesztet, több csoport esetében Kruskal–Wallis-tesztet *post hoc* elemzéssel kiegészítve használtunk.

A kategorikus adatokat Fisher-féle egzakt teszttel és khi-négyzet-próbával számoltuk. A teljes túlélést (OS), mint időintervallumot a diagnózis pillanatától a halál időpontjáig határoztuk meg. A betegek teljes túlélési analízisét Kaplan–Meier módszerrel végeztük el és log-rank teszttel határoztuk meg a különbségek szignifikanciáját. A klinikai paraméterek multivariációs analízisét Cox regressziós modellel készítettük.

Statisztikailag szignifikáns különbségnek azokat az eseteket tüntettük fel, ahol $p < 0,05$. A statisztikai elemzéseket CSTAT, PASW Statistics 18.0 (Predictive Analytics Software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) és Statistica 7.0-11.0 szoftverekkel végeztük el (StatSoft, USA, Tulsa, OK).

3.23 Klinikai adatok

3.23.1 EPC-k vizsgálata NSCLC klinikai mintákban

A keringő EPC-k számának és az EPC-specifikus gének szintjének mérésére a diagnózis időpontjában és a megfelelő daganatellenes kezelések után 53 NSCLC-s betegből perifériás vért gyűjtöttünk EDTA-csővekben. Az újonnan diagnosztizált NSCLC-betegek mentesek voltak további rosszindulatú, gyulladásos vagy iszkémiás betegségektől, tüdőfibrózistól, sebektől és fekélyektől, amelyek befolyásolhatják az EPC-k számát. Ennek megfelelően a kemoterápia, vagy a sebészeti sebgyógyulásnak az EPC-számra gyakorolt közvetlen hatásainak elkerülése érdekében a második vérmintákat 21 nappal az utolsó citotoxikus infúzió után és 3 hónappal a torakotómia után vettük. 28 férfi és 25 női beteg volt, medián életkora 58 év (tartomány: 45–67 év). Az NSCLC-s betegeket radiológiai és patológiai vizsgálatok alapján soroltuk csoportokba (American Joint Committee on Cancer/Unio Internationale Contra Cancrum tumor-node-metastasis classification). Kontroll vérmintákat 14 egészséges önkéntestől vettünk. 23 laphámsejtes, 26 adenokarcinóma és 4 adenoszkvamózus karcinómás beteg volt a bevont populációban. Huszonkét betegnél műtétet végeztek. Huszonnyolc, inoperabilis beteg részesült kemoterápiában gemcitabinnal és ciszplatinnal, ebből 10 lokálisan előrehaladott beteg radioterápiában is részesült a kemoterápiával kombinálva. Minden betegről és egészséges önkéntestől beszereztük a beleegyezést, és a vizsgálatot az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet Etikai Bizottságának jóváhagyásával, az Egészségügyi Világszövetség Helsinki Nyilatkozatában előírt etikai normákkal összhangban végeztük el. 22 NSCLC-s beteg műtétieltávolított fagyasztott mintáiban is meghatároztuk az EPC-k jelenlétét a tumorok érrendszerében.

3.23.2 EPOR-expresszió mérése humán bronchoszkópos kefe mintákban

Klinikai vizsgálatunk során 43 előrehaladott stádiumú (stage III-IV) adenokarcinómás beteg bronchoszkópos kefe mintájában határoztuk meg az EPOR expresszióját. A betegeket 2009. január és 2010. december között diagnosztizálták az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézetben. A minták felhasználhatóságához minden beteg beleegyező nyilatkozatot tett valamint a vizsgálatot a helyi etikai bizottság engedélyével végeztük (153/PI/10; 2521-0/2010-1018EKU). A diagnózis felállításához használt bronchoszkópos kefe mintákat -80°C tároltuk az RNS izolálásáig. Minden betegről két mintát vettünk, egyet a tumorszövetből, egyet pedig a tumortól távolabb eső, normál endobronchiális felszínről. Minden mintát, a felhasználást megelőzően citológus elemzett. A kohorszunkba 19 férfi- és 24

tovari.jozsef_19_22

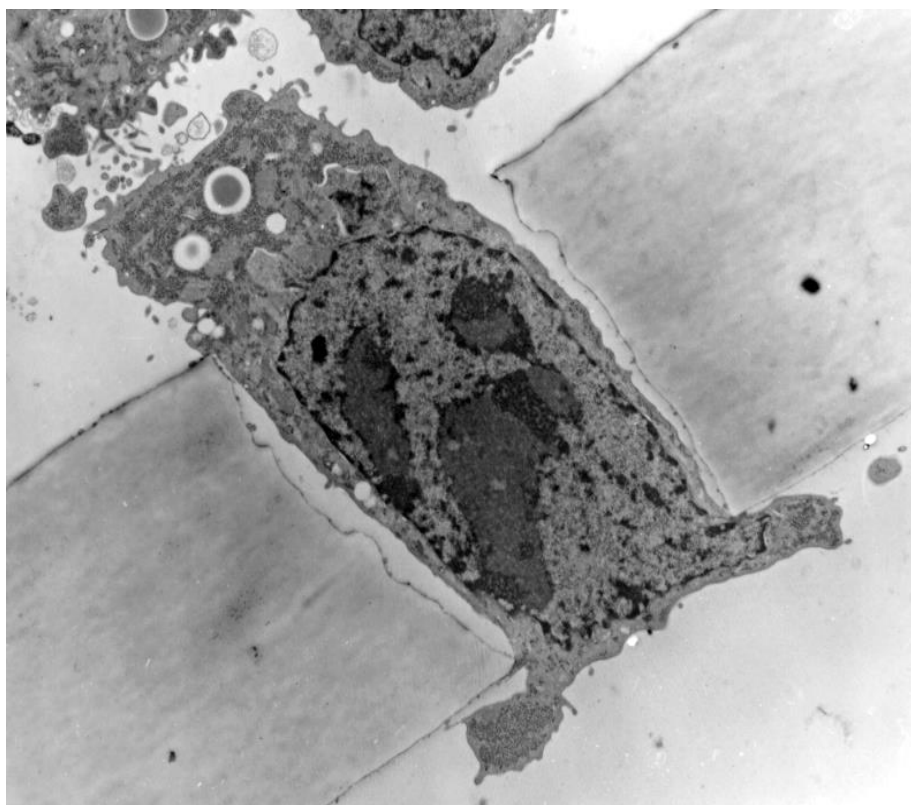
nőbeteget vontunk be, átlagéletkoruk 61 év. Stádiumukat az American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer TNM klasszifikáció VII. kiadása alapján határoztuk meg [187].

4. EREDMÉNYEK

4.1 A sejtmozgás modellezése 3D rendszerben

A bevezetőben ismertetett HT1080 humán fibroszarkóma-sejtvonal hipotetikus mozgási modellje kétdimenziós vizsgálatokon alapult. A modell alkalmazhatóságát 3D mozgás leírására Boyden-kamrában történő kemotaktikus migráció során vizsgáltuk. A Boyden-kamrában egy 10 μm vastagságú membránon keresztül migrálnak a sejtek 8 μm átmérőjű pórusokban (**19. ábra**). Kemoattraktánsként leggyakrabban fibronektint használtunk. A mozgást különböző időpillanatokban állítottuk meg, így vizsgálható volt az egyes fázisokban a migrációban fontos elemek lokalizációja. Ultrastrukturális és kettős lokalizációs immunhisztokémiai vizsgálatokat terveztünk, nyomon követve a letapadási pontok sorsát és a különböző citoskeletális elemek (mikro- és intermedier filamentumok) elrendeződését.

19. ábra. A Boyden-kamra membránján áthaladó HT1080 tumorsejt

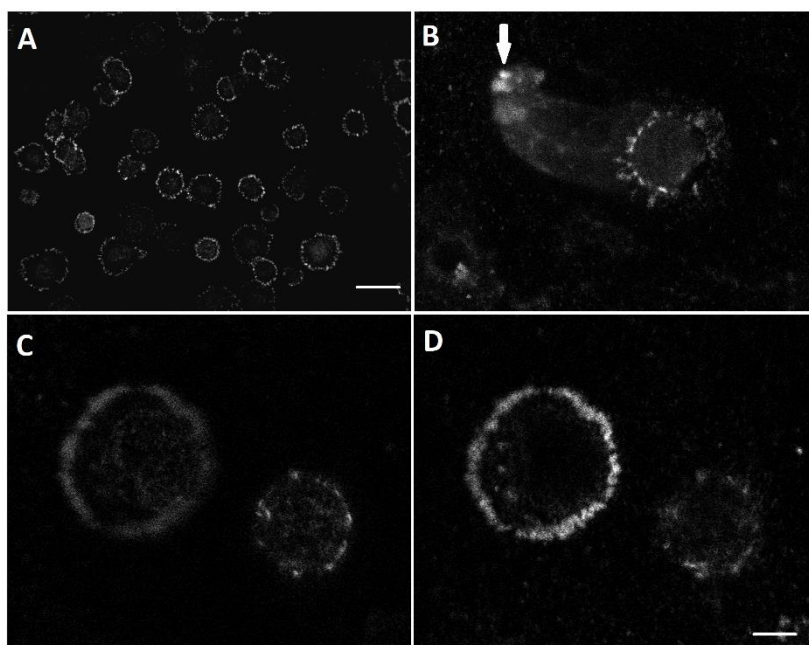


Boyden-kamrában migráló sejt elektronmikroszkópos képe. A HT1080 tumorsejt a membrán indulási oldaláról (kép felső része) áthalad a membrán pórusán, majd megérkezve a túloldalra kiterülésbe kezd (kép alsó része)

A letapadási pontok a 2D modellben tapasztaltakhoz hasonlóan a háromdimenziós rendszerben is kizárólag a sejtek vezető élén, a membránfilter pórusainak megfelelően, gyűrűt formálva jelentek meg (**20. ábra**). A sejtek farki részén általában nincsenek letapadási pontok,

azok lebegnek a kiindulási oldalon a médiumban. Ez alól akkor van kivétel, amikor a sejtek a mozgás megkezdése előtt letapadnak a kiindulási oldalon. A pórusban mozgó sejtek oldalnézeti képein jól megfigyelhető a sejtek frontján található, intenzív fluoreszcenciát mutató adhéziós sor (**21A-B ábra**). Az adhéziók alakjában is változások figyelhetők meg a mozgás során. A pórusokban kis pöttyökként jelennek meg, a membrán túloldalán viszont nagyobbak és elnyújtottak. A membránfilter túloldalára érve a jellegzetes adhéziós pontokból álló gyűrű átmérője fokozatosan nőtt, mely a sejt kiterülési folyamatával magyarázható (**21C ábra**). Hasonló elrendezést tapasztaltunk akkor is, amikor Matrigel vagy kollagén 1 volt a kemoattraktáns, illetve LX2 humán máj csillagsejtvonal esetében is (az eredményeket nem mutatom).

20. ábra. Adhéziók a Boyden-kamra pórusán áthaladva mozgó tumorsejtekben



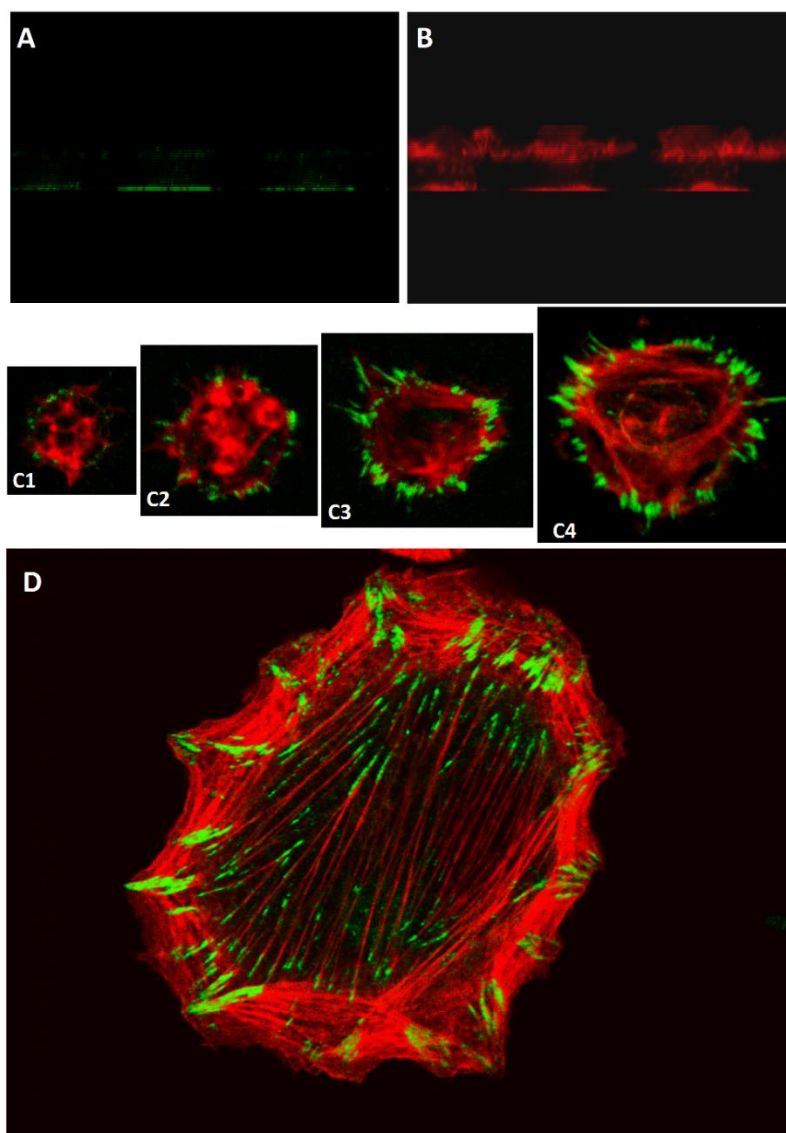
A) Boyden-kamra filterének alsó, érkezési oldala. Számos kör alakú, vinkulin-jelzett adhéziós pont látható, amelyek a migrációs folyamat különböző szakaszaiban reprezentálják a sejteket. A legkisebb átmérőjű körök azokat a sejteket mutatják a pórusokban, amelyek épp elérik a szűrő alsó felületét. Mércse: 20 μ m. **(B)** Vízszintes nézet a 30 darab optikai síkból (~30 μ m) rekonstruált, póruson áthaladó sejtről. A sejt éppen elérte az alsó oldalon a membrán szélét. Jól látható, hogy csak a sejtek frontján található adhéziók, a sejtek hátsó részén (ami szabadon lebeg, nyíl) és a pórusban sem lehet adhéziót megfigyelni. **C és D)** Két különböző optikai sík két sejtről (az optikai síkok 2 mikronra vannak egymástól), melyek a szűrőn keresztüli vándorlás különböző szakaszaiban vannak. A jobb oldali sejt még a pórusban van, és kis pontszerű adhéziók jellemzik a sejt frontján. A bal oldali sejt már elérte a membrán túloldalát, és megkezdte a kiterülést, amit elnyújtott alakú, nagyobb méretű adhéziók jellemeznek. Mércse: 5 μ m

A sejtek a pórusokban minimális aktinjelölést mutattak, és a fronton is addig, amíg az adhéziónak nem kezdtek el erőteljesebbek lenni a pórus túloldalán, egy szerkezet nélküli struktúrát ábrázoltak. A kétdimenziós modellben megfigyelt aktinhálózat és az ívelt kábelek a pórus túloldalára ért sejtek esetében voltak kifejezettek. Ez a hálózat a sejtek kiterülésekor megfigyelt elrendezésre hasonlított (**21C ábra**).

Kolokalizációs kísérleteinkben a membrán túloldalára ért, kiterülésbe kezdő sejtek vezető oldalán fokozatosan tűntek elő az aktinívek. A letapadási folyamat kiteljesedésével az adhéziónak pontokból álló gyűrű átmérője és az aktinívek hossza is fokozatosan nőtt (**21D ábra**).

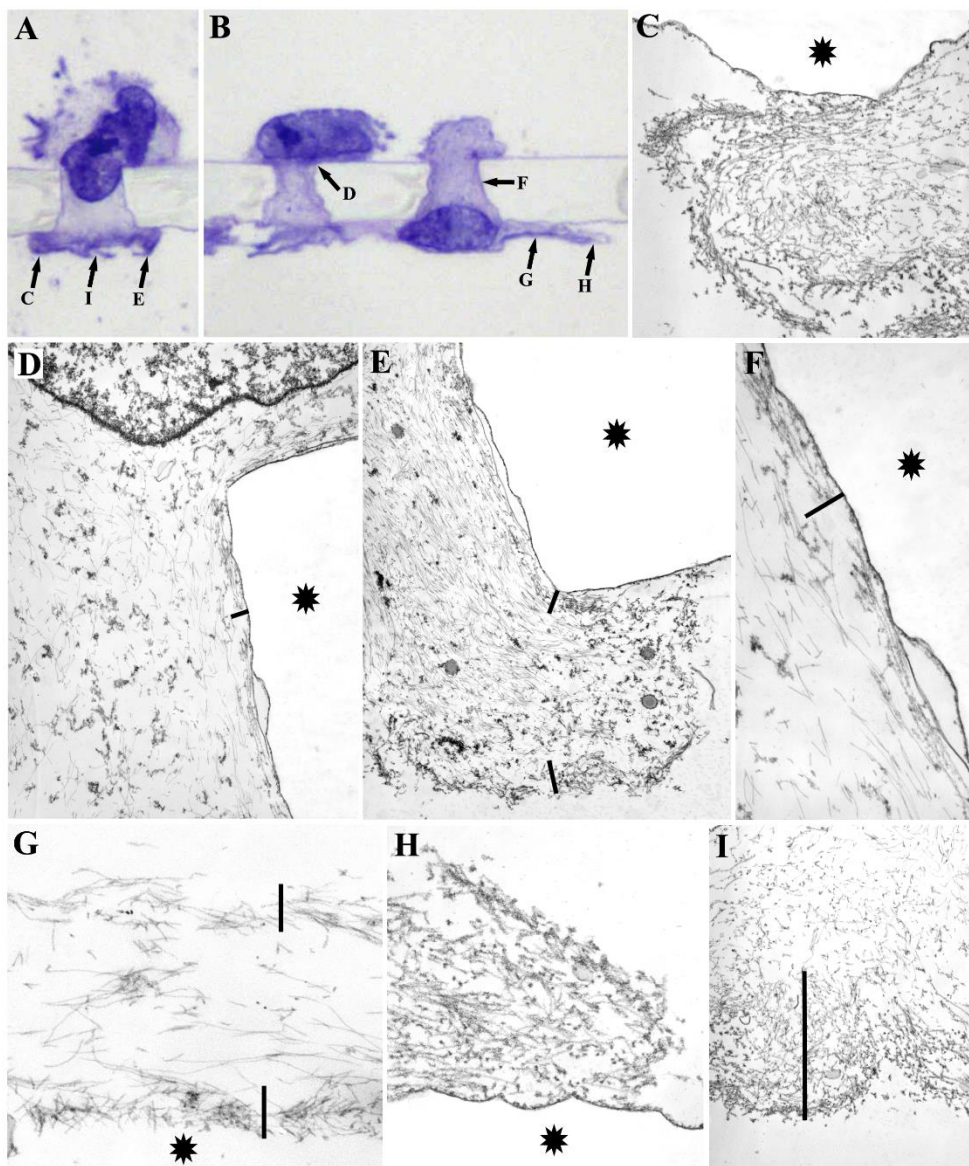
Az aktinfilamentumok szerveződését a migráció során elektronmikroszkóppal is vizsgáltuk. Az eredmények alapján elmondható, hogy aktinszálok kizárólag a plazmamembránhoz közeli zónában voltak megfigyelhetők a pórus belsejében éppen áthaladó, és a filter túloldalára ért, már kiterült sejtekben (**22. ábra**) is. A legvastagabb, aktinnal gazdagon behálózott citoplazmaterület a protrúziókra lokalizálódott.

21. ábra. Az adhéziók és az aktinszálak kapcsolata a 3D migráció során



A) Az oldalnézeti képen három sejt halad át a membránon (28 optikai sík rekonstrukciója, $\sim 20 \mu\text{m}$). A membránt kettősen jelöltük vinkulinra (A, zöld) és aktinra (B, piros). A sejtek még a pórusban vannak, az adhéziók a frontra lokalizálódnak (A). Az aktinszálak a sejt elején és a membrán tetején (indulási oldal) figyelhetők meg. C) Kettős immunfluoreszcencia-vizsgálat vinkulinra (zöld) és aktinszálakra (piros). A membrán érzékesi oldala felől nézünk bele a pórusokba, ahol a migráció különböző szakaszaiban levő sejtek figyelhetők meg. C1) A sejt frontja a pórus csúcsán található. A pontszerű, vinkulinjelölt adhéziók kör alakban vannak elrendezve. Az aktinjel nem mutat szervezett elrendeződést. Nincsenek szervezett aktinkábelek, de az aktinjelek elérik az adhéziókat. C2) A vinkulinjelölt adhéziók már hosszúságú alakúak, ami azt jelenti, hogy a sejt frontja elhagyta a pórust. Aktinkábelek még itt sem láthatók. C3) A kiterülő sejtben az adhéziók a C2-höz hasonlóak, de itt már megfigyelhetünk formálódó ívelt aktinszálakat. C4) A mozgás még előrehaladottabb az érzékesi oldalon, a hosszúságú adhéziókat kifejezett, ívelt aktinkötegek kötik össze. D) Teljesen kiterült HT1080 tumorsejt Matrigellel bevont üvegfelületen. A perifériás aktinszálak ívekbe rendezettek, hasonló módon, mint C4-en látható. A sejt közepén áthaladó masszív aktinkábelek a kiterülés egy korábbi fázisából visszamaradt kifejlesztett ívek. Mércé (A–D): $10 \mu\text{m}$

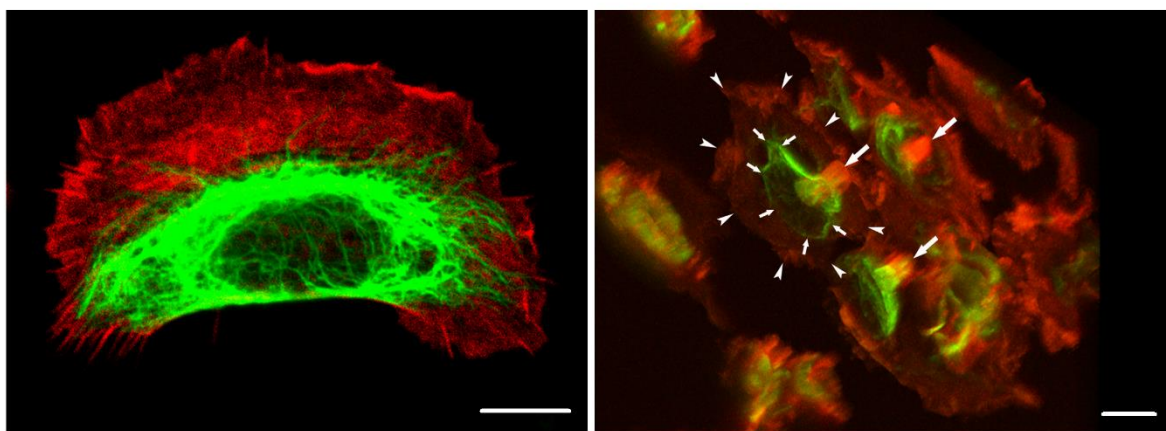
22. ábra. Ultrastrukturális vizsgálat az aktinszálak elrendeződésére 3D mozgó tumorsejtekben



HMM-dekoráció az aktinszálak lokalizációjának vizsgálatára. A fotók teteje a membrán felső részének (indulási oldal) felel meg a Boyden-kamrában. **A** és **B**) A migráció különböző fázisában levő sejtek félvékony metszetei. A betűkkel jelölt nyilak az elektronmikroszkópos képeken látható sejtek különböző részeire mutatnak. **C** és **H**) Az aktinszálakban gazdag sejfrontokat mutatja. A sejtek különböző részei különböző mennyiségű aktinszálakat tartalmaznak a sejtmembrán alatt (**D–G**, **I**). Az aktinszálak mennyisége a póruson belüli membrán alatt a legkisebb (**D–F**). A nem dekorált szálak intermedier (vimentin) filamentumok, melyek a sejt testében a maghoz közelebb helyezkednek el. A csillag jelzi a membránt. A sejtmembránra merőleges vonalak az aktinszálakban gazdag membrán alatti réteg hozzávetőleges vastagságát mutatják. Mércék: (**A** és **B**): 10 μm , (**C**, **D**, **E** és **I**): 1 μm , (**F–H**): 0,5 μm

Az intermedier (vimentin) és a mikrofilamentumrendszer (aktin) együttes vizsgálata azt mutatta, hogy vimentinszálak a sejtek frontján található aktinhálózat mögött, a sejtmagot körülölelve érik el a membrán túloldalát (**23. ábra**). A háromdimenziós vizsgálati modell a vimentin elrendeződése esetében is alátámasztotta a kétdimenziós tesztekben kapott eredményeket. Ez az elrendeződés általánosnak mondható, mert más tumorsejtvonalon (HT168-M1 humán melanóma) végzett *in vitro* vizsgálatok során ugyan eltérő sebesség mellett, de hasonló morfológia volt megfigyelhető a sejtek mozgása során (az adatokat nem mutatom).

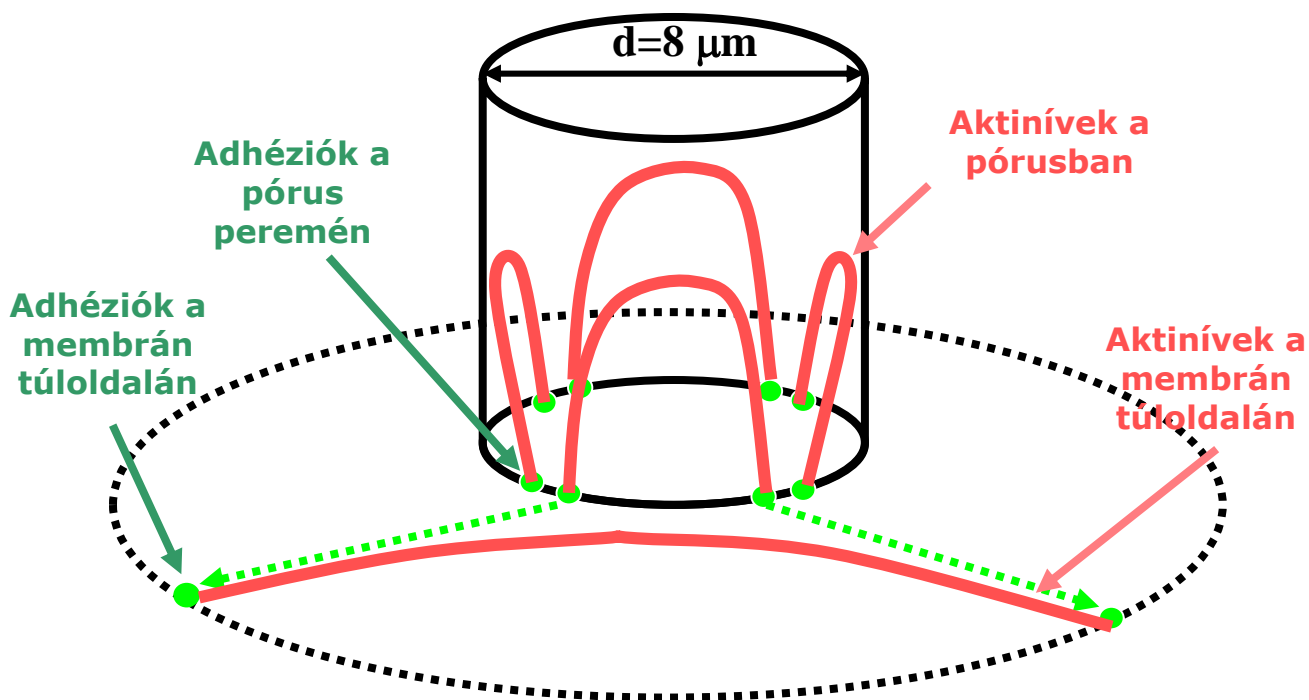
23. ábra. Vimentinfilamentumok szerveződése a migráció során



A) 2D migráció során a vimentinfilamentumok körbevonják a sejtmagot, és az aktinban gazdag vezető lamella mögött helyezkednek el. Mércse: 10 μm . **B)** 3D migráció után a szűrő első oldala, 30 optikai képből rekonstruálva és elforgatva 45 fokos szögben. A membránokat vimentinre és aktinra jelöltük. Három sejt (nagy nyilak) a membránon történő áthaladás befejező szakaszában van, a sejtestek egy része még a pórusokon belül található. A kis nyílhegyek az aktin, míg a kis nyilak a vimentin legnagyobb kiterjedésére mutatnak. Jól látható a két terület eltérő kiterjedése. Mércse: 20 μm

A fluoreszcens mikroszkópos és az ultrastrukturális vizsgálataink alapján a korábbi, kétdimenziós modellünket háromdimenziós rendszerre is kiterjesztettük. Az adhéziók a 3D rendszerben is a sejtek vezető élén voltak megfigyelhetők, és ezekhez kapcsolódtak az ívelt aktinkötegek, melyek a mozgáshoz szükséges erőt szolgáltatják. A 3D rendszerben kapott eredmények tehát megerősítették a 2D modellben megfigyelteket. Ez a 3D modell is az adhéziók és az azokhoz kapcsolódó aktinszálak elrendeződésén és a mozgás során tapasztalható dinamikán alapszik (**24. ábra**). Az adhéziók a sejtek frontján találhatóak, amikbe kezdetben strukturálatlan aktinszálak kapcsolódnak. A mozgás befejezéseként a sejtek kiterülnek, ami egy kör alakban, minden irányba történő motilitást jelent, és a kétdimenziós modellünk alapján történik az adhéziójuk és a mikrofilamentumrendszer dinamikája.

24. ábra. Az adhéziók és az aktinszálak elrendeződésének 3D modellje mozgó tumorsejtben



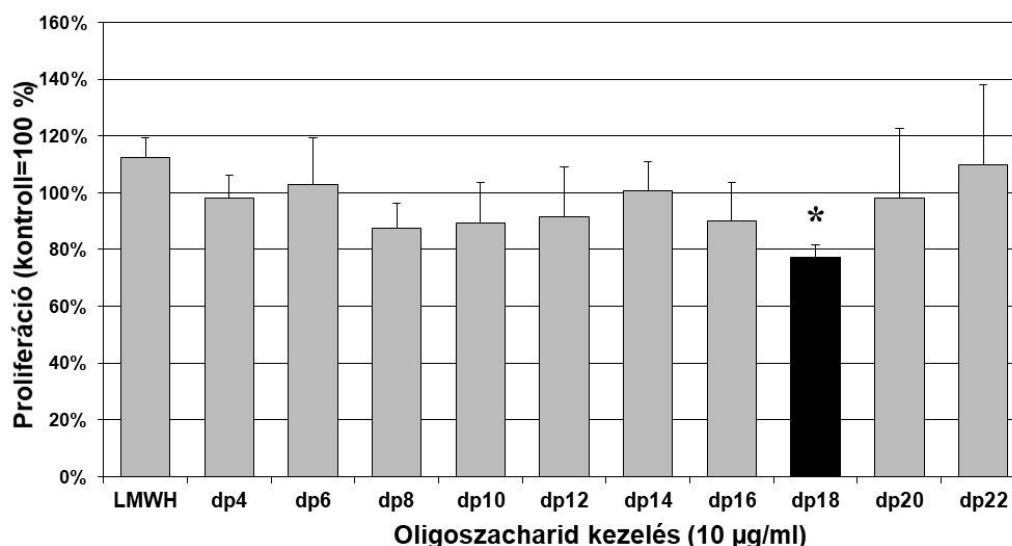
A vázlatos rajzon a fekete folytonos vonallal jelölt henger azt a lyukat jelöli, amelyen keresztül a sejt vándorol, és maga a sejt a lyukon belül van és pont eléri a lyuk peremét. A szaggatott fekete terület a membrán túloldalán szétterülő sejt széleit jelöli. A rózsaszín ívek az aktinkábelek, a zöld pöttyök a letapadási pontok, és a zöld nyilak mutatják ezek útját. A sejtest transzlokációját biztosító kontraktilis erőt a sejtek elülső részén megfigyelhető, adhézióhoz rögzült aktinívek adják. Amikor a sejt áthalad a lyuk peremén, az aktinívek elkezdenek hosszabbodni, az ívek végén található adhéziók pedig egyenes vonalban mozognak. Az aktinkábelek fenntartják az íveltségüket és az általuk kifejtett erő kihúzza a sejtet a lyukból

4.2 Oligoszacharid heparinszármazékok hatása humán melanómasejtek *in vitro* migrációjára és kísérletes metasztatizálására

A korábbi nem frakcionált heparin (UFH)- és kis-mólsúlyú heparin (LMWH)-kezelésekkel kapott eredményeinkből kiindulva, ahol azok gátolták a HT168-M1 humán melanómasejtek *in vitro* migrációját és *in vivo* metasztatikus potenciálját, vizsgálatainkba még kisebb (4-22 tagú), a heparinból származó oligoszacharid fragmenseket vontunk be.

Először megnéztük ezen oligoszacharidok (dp4-dp22) hatását a HT168-M1 sejtek proliferációjára, összehasonlítva az LMWH-ével. Azt tapasztaltuk, hogy 10 µg/ml-es koncentrációban a vizsgált oligoszacharidok közül csak a dp18-nak volt szignifikáns proliferációgátló hatása (30%-os gátlás a kezeletlen kontrollhoz képest, **25. ábra**).

25. ábra. Heparineredetű oligoszacharidkezelés hatása HT168-M1 sejtek *in vitro* proliferációjára

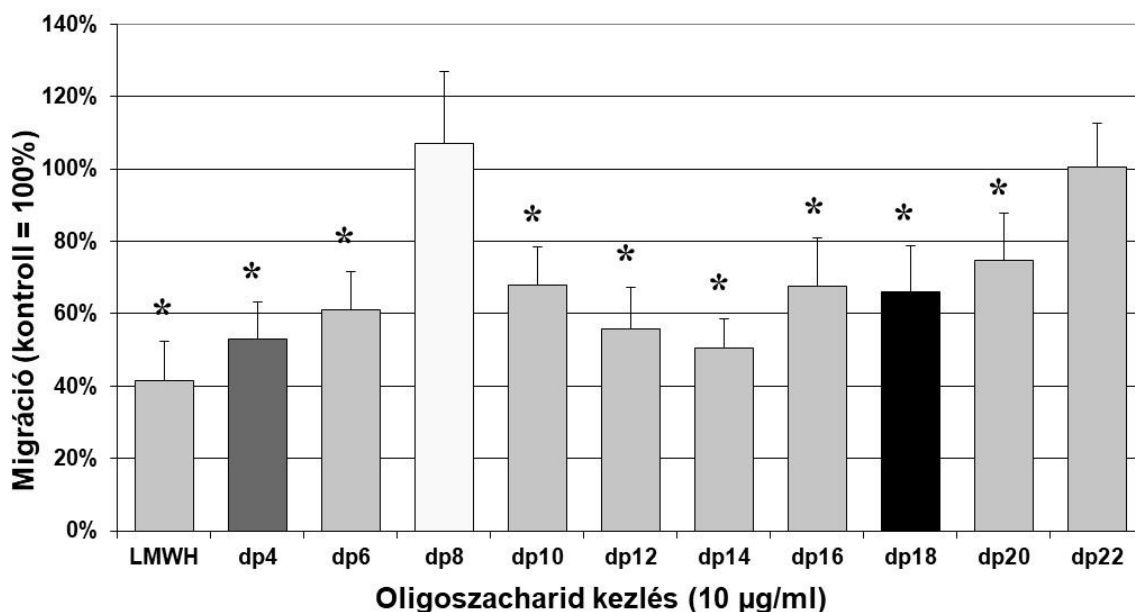


A melanómasejteket 10 µg/ml koncentrációban kezeltük az oligoszacharidokkal. Az adatok a kezeletlen kontrollhoz képest mért százalékokat mutatják, 6 párhuzamosból származó átlag±SD (* $p < 0,05$, ANOVA, post hoc Scheffé-teszt)

További vizsgálatainkban módosított Boyden-kamrában 6 órás szimultán alkalmazott hatóanyagokkal meghatároztuk az oligoszacharidok sejtmigrációra gyakorolt hatását fibronektint használva kemoattraktánsként. A kezeletlen kontroll csoporttal összehasonlítva a dp8 és dp22 oligoszacharidok kivételével az összes szimultán használt oligoszacharid szignifikáns mértékben gátolta HT168-M1 melanómasejtek kemotaxisát. A migrált sejtek száma a membrán túloldalán a kísérlet végén a kontroll 40–60%-ára csökkent, amely érték jól

korrelált a korábban is mért LMWH-hatással. A kísérletekben a legnagyobb migrációgátlást a dp4, a dp12 és a dp14 oligoszacharidok esetében tapasztaltunk (26. ábra).

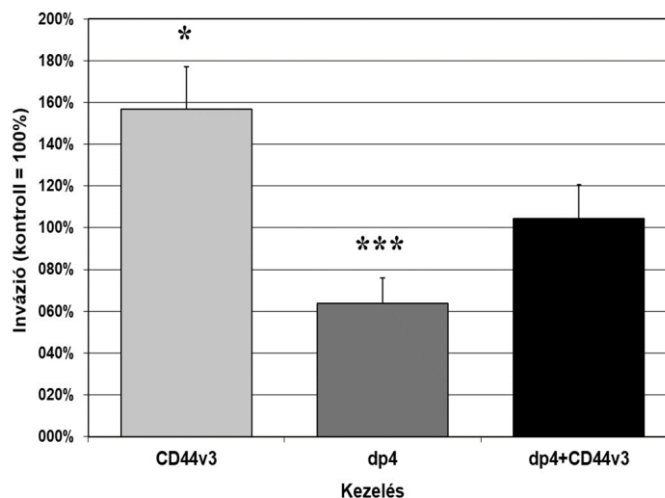
26. ábra. Heparineredetű oligoszacharidlezelés hatása HT168-M1 sejtek in vitro migrációjára



*Az adatok a kezeletlen kontrollhoz képest mért százalékokat mutatják, átlag±SD, 6 párhuzamos (*p<0,05, ANOVA-teszt, post hoc Scheffé-teszt). A dp8 és dp22 kivételével a többi oligoszacharid szignifikánsan csökkentette a melanómasejtek migrációját.*

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a HT168-M1 sejtvonal RNS- és proteinszinten is kifejezi a CD44 molekula különböző variánsait (H, v3 és v6) [188]. Azt is leírtuk, hogy endotélsejtvonalon a CD44v3-nak, amihez heparán-szulfát oldallánc kötődik, fontos szerepe van a sejt vándorlás és az invázió szabályozásában [189]. Ezért a mostani vizsgálatainkban CD44v3-ellenes antitestet használtunk a sejtek migrációs képességének vizsgálatakor, és azt tapasztaltuk, hogy az antitest szignifikánsan fokozza a melanómasejtek motilitását (146,3%±36,2% a kezeletlen kontrollhoz képest, p<0,05) és ECM-en keresztüli invázióját (158,32%±21,8% a kezeletlen kontrollhoz képest, p<0,01) Boyden-kamrában. Ugyanakkor az inváziós kísérletben a korábban jelentős migrációgátlónak bizonyult dp4 oligoszacharid együttes alkalmazásával ez a hatás kiküszöbölhető volt (27. ábra).

27. ábra. A dp4 oligoszacharid hatása az anti-CD44v3 stimulálta HT168-M1 humán melanómasejtek in vitro inváziójára



A CD44v3-ellenes antitestet 20 µg/ml, a dp4-et 10 µg/ml-es koncentrációban használtuk szimultán a vizsgálat teljes ideje alatt. Az adatok az izotípuskontroll-kezelt mintához képest mért százalékokat mutatják (átlag±SD, 6-6 párhuzamos; * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; *** $p < 0,01$ a CD44v3-indukált sejtekhez képest; ANOVA kiegészítve post hoc Scheffé-teszttel)

A heparinok és származékaik migrációt befolyásoló hatásmechanizmusainak megismerésére vizsgáltuk a miozin-könnyülánc foszfatázaktivitásának változását a kezelésekek után. Korábban leírták, hogy a PP1c-alegység gátlásán keresztül a heparin befolyásolja az enzim működését. A kollaborációs partnereink által végzett vizsgálatok során, ahol szubsztrátként ^{32}P -MLC20-at alkalmaztak kiderült, hogy a vizsgált oligoszacharidok (a lánchosszuktól függetlenül) szignifikáns mértékben gátolták a PP1c katalitikus aktivitását (8. táblázat).

8. táblázat. Heparineredetű oligoszacharidok hatása a PP1c foszfatázaktivitására

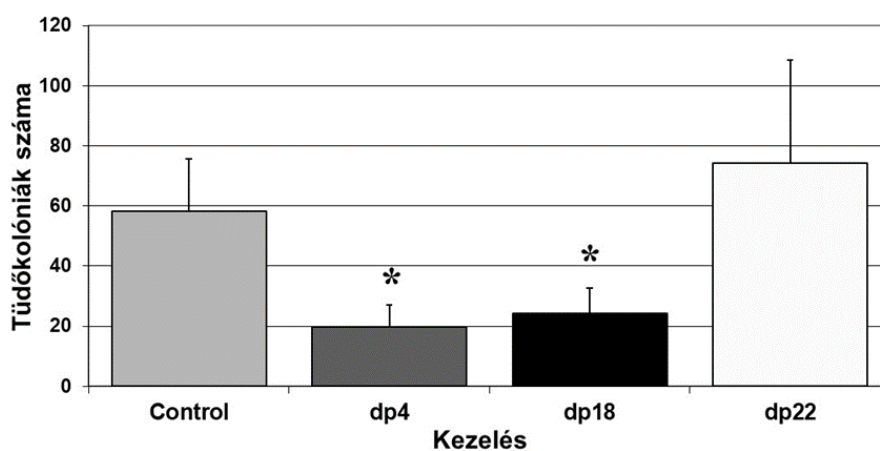
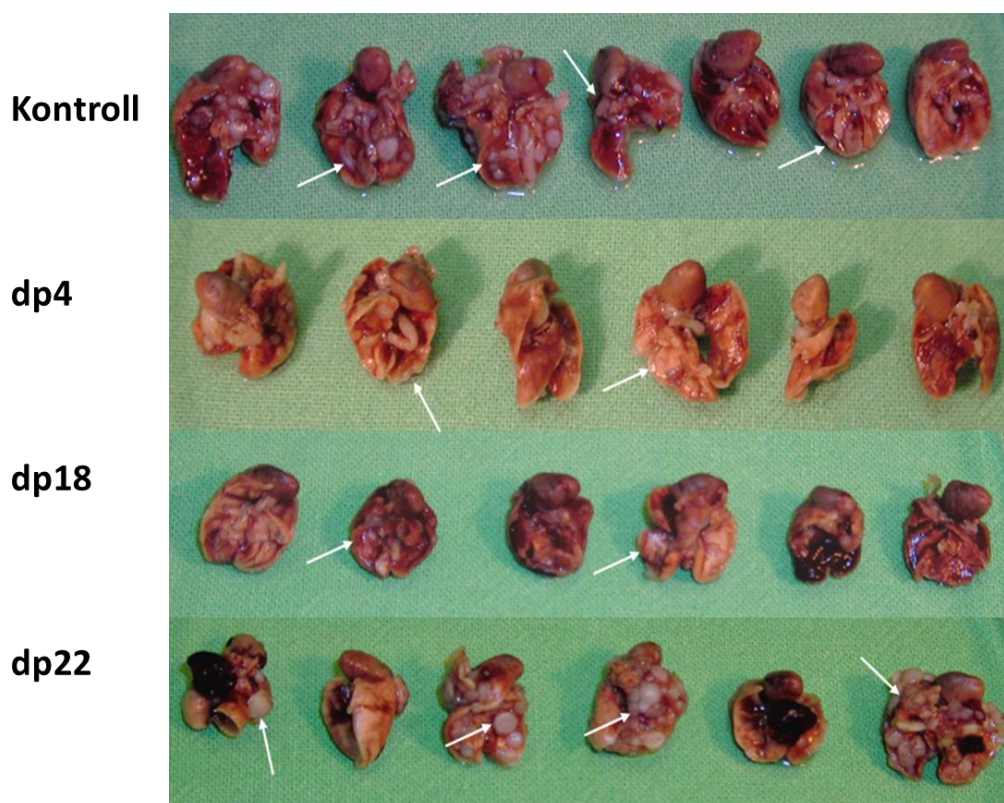
Kontroll PP1c	100,00±4,75
PP1c+Heparin	22,28±1,76
PP1c+LMWH	22,69±0,14
PP1c+dp4	21,29±0,13
PP1c+dp12	20,35±0,23
PP1c+dp14	18,21±1,12
PP1c+dp18	20,00±0,03
PP1c+dp22	20,29±1,18

Az adatok a csak szubsztrátot tartalmazó kontroll PP1c aktivitásának %-ában vannak kifejezve, átlag±SD, 3 mérés. Mind az UFH, mind az LMWH és valamennyi vizsgált oligoszacharid csökkentette a PP1c foszfatázaktivitását

Korábbi vizsgálatainkban bemutattuk, hogy a nem frakcionált heparin, illetve még inkább az LMWH gátló hatású volt tüdőkolonizációs *in vivo* modellben. Ráadásul ugyanilyen gátló hatást sikerült kimutatnunk, amikor egér melanómamodellben (B16a tüdőkolonizáció) vizsgáltuk az LMWH hatását. 200 IU/kg dózisban alkalmazott LMWH-kezelés szignifikánsan gátolta (kontroll vs. LMWH: $95,2 \pm 14,81$ vs. $38 \pm 7,17$, $p=0,004$, átlag \pm SEM, Mann–Whitney-teszt, $n=10$) a B16a sejtek tüdőkolóniáinak számát intravénás oltás után. Ezért a még rövidebb oligoszacharidokkal is elvégeztük ezt a kísérletet. Az *in vitro* proliferációs és migrációs/inváziós tesztek alapján három oligoszacharidot vontunk be a vizsgálatokba. A dp4 szignifikánsan gátolta az *in vitro* migrációt és az inváziót is, de nem volt hatása a HT168-M1 sejtek proliferációjára. A dp18 mind a proliferációt, mind a migrációt csökkentette *in vitro*. A dp22 sem a migrációt, sem a proliferációt nem befolyásolta. A kísérletek során az oligoszacharidokat intraperitoneálisan alkalmaztuk (dp4: 640 μ g/kg; dp18 and dp22: 1,4 mg/kg) az intravénás tumoroltás előtti naptól naponta, összesen 3 kezelést adva. A kísérletet az 50. napon fejeztük be, a tüdőkolóniákat makroszkóposan leszámoltuk, és a szöveteket mikroszkóposan is kiértékeltek. Azt tapasztaltuk, hogy a két hatóanyag (dp4, dp18), amelyek *in vitro* befolyásolták a sejtek motilitását, gátolták a kolóniák kialakulását is *in vivo*. Ez a hatás független a proliferációgátlástól, mert a dp18, amelyik a migráción felül a sejtosztódást is gátolta *in vitro*, nem mutatott nagyobb hatást az *in vivo* kolóniaképződés gátlásában. A kontrollként használt dp22 nem volt hatással a kolóniaképzésre (**28. ábra**).

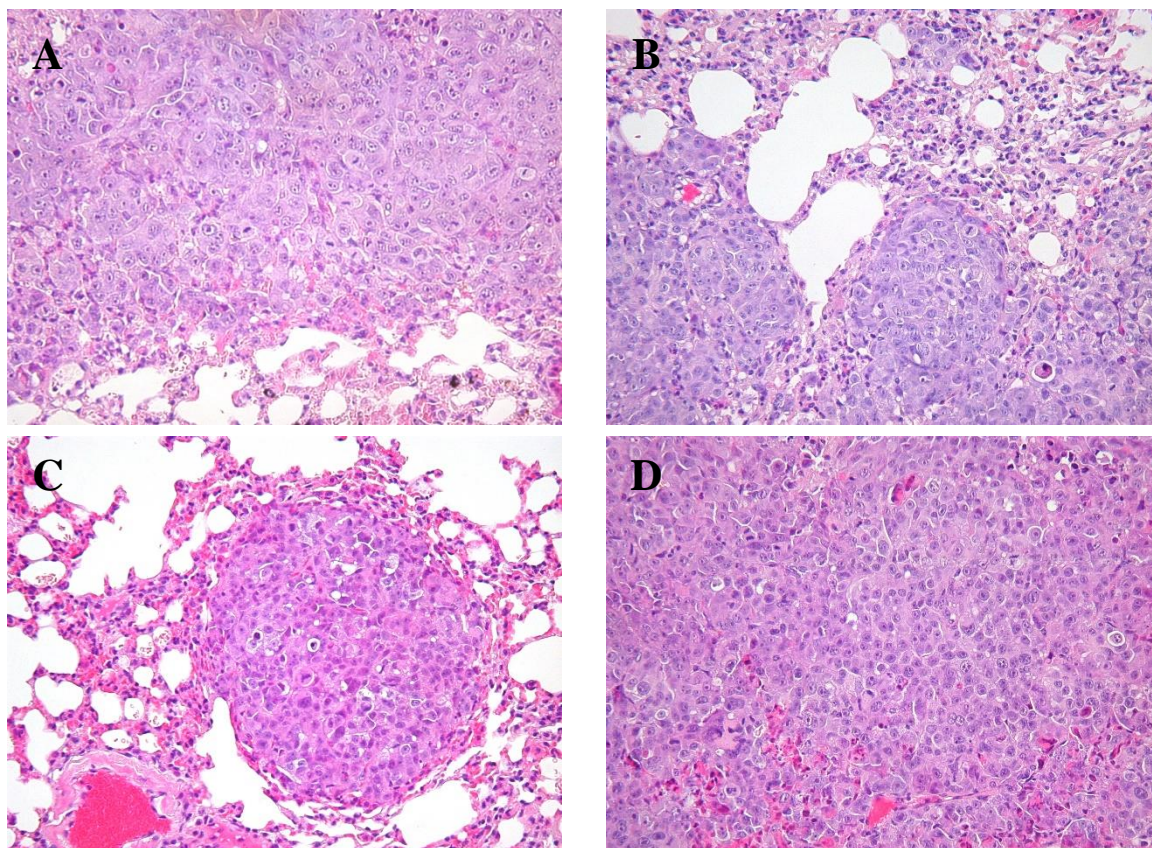
A tüdőkolóniák szövettani feldolgozásakor azt tapasztaltuk, hogy a korábban *in vitro* proliferációgátlónak bizonyult dp18 oligoszacharid szignifikáns mértékben csökkentette a melanómakolóniák méretét (átmérők, kontroll: $1,06 \pm 0,08$ mm; dp18-kezelt: $0,62 \pm 0,08$ mm, átlag \pm SEM, $p < 0,05$, Kruskal–Wallis-teszt, *post hoc* analízissel kiegészítve). A dp4 és a dp22 nem befolyásolta szignifikáns mértékben a tumorkolóniák méretét (átmérők, dp4: $1,08 \pm 0,09$ mm; dp22: $1,06 \pm 0,08$ mm, átlag \pm SEM). A kezelés hatására a tumorkolóniák szöveti szerkezetében nem tapasztaltunk eltéréseket (**29. ábra**).

28. ábra. Heparineredetű oligoszacharidok hatása a HT168-M1 sejtek tüdőkolonizációjára



Felső kép: Tumorkolóniák tüdőben (fehér nyilak) az oltás utáni 50. napon. A tumorsejteket (10^6 /állat) a farokvénába oltottuk a kísérlet 1. napján. Kezelések: dp4: 640 μ g/ttkg; dp18 és dp22: 1.4 mg/ttkg, intraperitoneálisan a 0., az 1., és a 2. napon. **Alsó ábra:** A tumorkolóniák száma (átlag±SD, n=10, * $p < 0,05$, Kruskal–Wallis-teszt post hoc Scheffé-teszttel)

29. ábra. Heparineredetű oligoszacharidok hatása HT168-M1 tüdőkolóniák szöveti szerkezetére



A) Kontrollcsoport: az anaplasztikus tumorban több osztódó sejtet figyeltünk meg. B) dp4-kezelt tumorkolónia: nincs szerkezeti eltérés a kontrollhoz képest. C) dp18-kezelt tüdőkolónia: a kontrollal és a többi oligoszachariddal kezelt tumorokkal összehasonlítva jól látszik a kolóniák kisebb mérete/átmérője, valamint a stróma, a nekrózis és a vérzés hiánya. D) dp22-kezelt kolónia, mely nem mutat szövettani különbséget a kontrollhoz képest. Hematoxilin-eozin festések, 200× nagyítás minden kép esetében

4.3 Hipoxia hatása eltérő szöveti eredetű tumorsejtvonalak migrációjára és metasztatizálására

4.3.1 A hipoxia hatása a daganatsejtek proliferációjára

Vizsgálatainkba öt tumorsejtvonalat vontunk be: HT168-M1 (humán melanóma), HT25, HT29 (humán kolonrákok) HT1080 (humán fibroszarkóma) és PE/CA-PJ15 (humán fejnaki rák). Megvizsgáltuk, hogy a hipoxiás környezet (1 és 5% O₂) hogyan befolyásolja a sejtek *in vitro* proliferációját. A 72 órás hipoxiás kezelés után SRB-teszttel határoztuk meg a sejtek mennyiségi arányait. Megállapítottuk, hogy a sejtek eltérően reagálnak a csökkent oxigénkoncentrációra (**9. táblázat**), de szignifikáns hatást csak a HT1080 sejtvonal esetében tapasztaltunk.

9. táblázat. Hipoxia hatása a daganatsejtek *in vitro* proliferációjára

Tumorsejtvonal	5% O₂	1% O₂
HT168-M1	121±4,9	110±1,34
HT1080	154±16,9*	65±16,6
HT25	126±8,4	107±5,6
HT29	88±3,2	66±16,9
PE/CA-PJ15	107±2,7	106±5,3

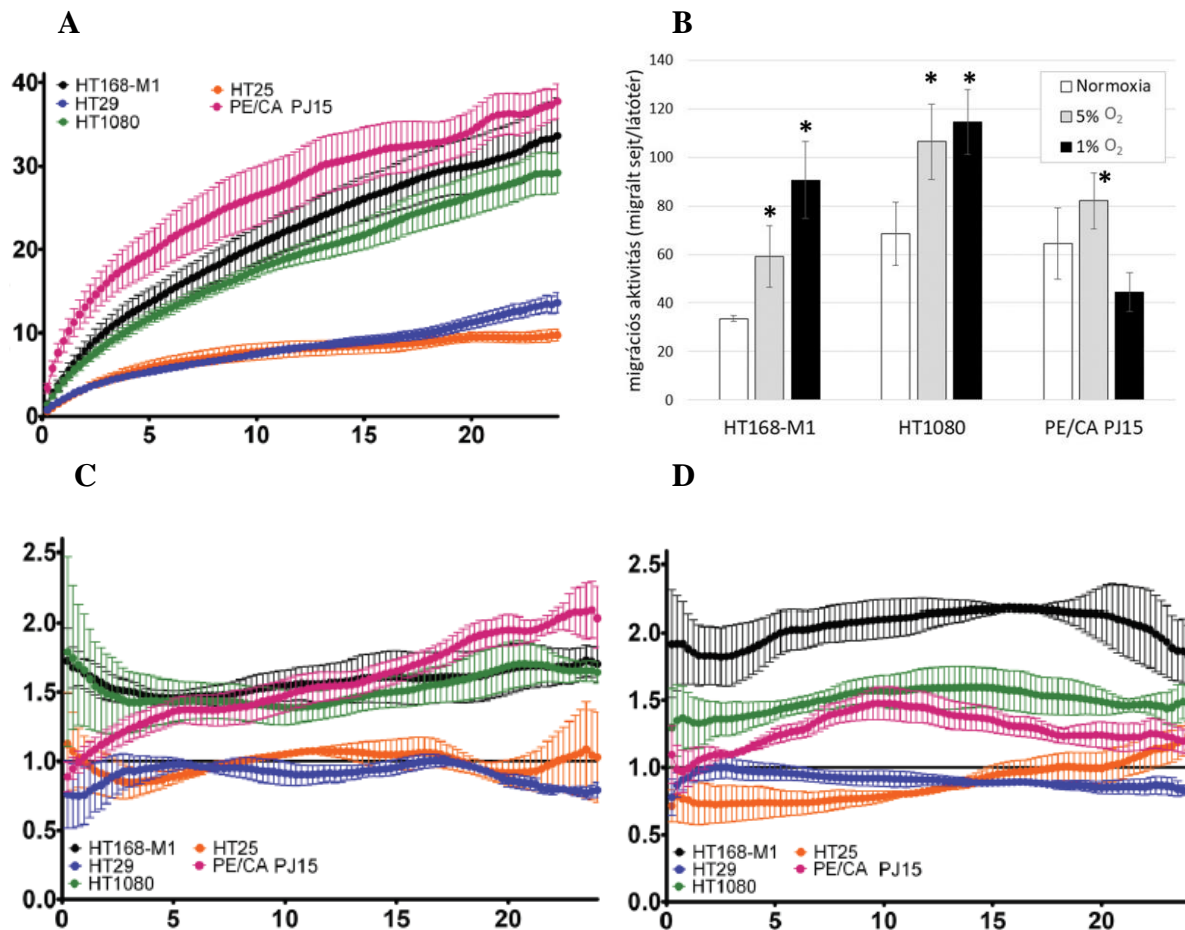
*Az adatok a légköri (21% O₂) oxigénszinten végzett mérésekhez viszonyított (100%) értékekből képzett átlag±SD-t mutatják, három független kísérletben 6-6 kamra adatait feldolgozva (*p<0,05, Student t-teszt)*

4.3.2 A hipoxiás környezet hatása a daganatsejtek *in vitro* motilitására

A sejtek motilitási képességét és annak változását a hipoxiás környezetben módosított Boyden-kamrás vizsgálatokkal (fibronektint használva kemoattraktánsként) és videomikroszkópiával is mértük. A sejtek normoxiában is erősen eltérő alapmotilitási aktivitást mutattak (**30A ábra**). A két koloncarcinóma-vonal (HT25 és HT29) nagyon lassan mozgott a videomikroszkópos detektálás során, sőt Boyden-kamrában nem is adtak értékelhető eredményt még 24 óra után sem. Ezzel szemben a PE/CA-PJ15 sejtek (20 óra), és a HT168-M1, valamint a HT1080 sejtek (mindkettő 6 órás inkubáció) kifejezetten gyorsan mozogtak a Boyden-kamrában. Ráadásul a HT168-M1 és HT1080 sejtek motilitási képessége erősen fokozódott a hipoxia súlyosságával, a PE/CA-PJ15 sejtek pedig ellentétesen működtek a kétféle oxigénszint mellett (**30B ábra**). A videomikroszkópiás mérésekben a hipoxia a normoxiás körülmények közt is mozgékonyabb

sejtek további sebességnövekedését hozta, míg a normoxiában is kevésbé mozgékony HT25 és HT29 sejtek motilitása nem változott (30C,D ábra).

30. ábra. A hipoxia hatása a vizsgált humán tumorsejtek motilitására és migrációjára

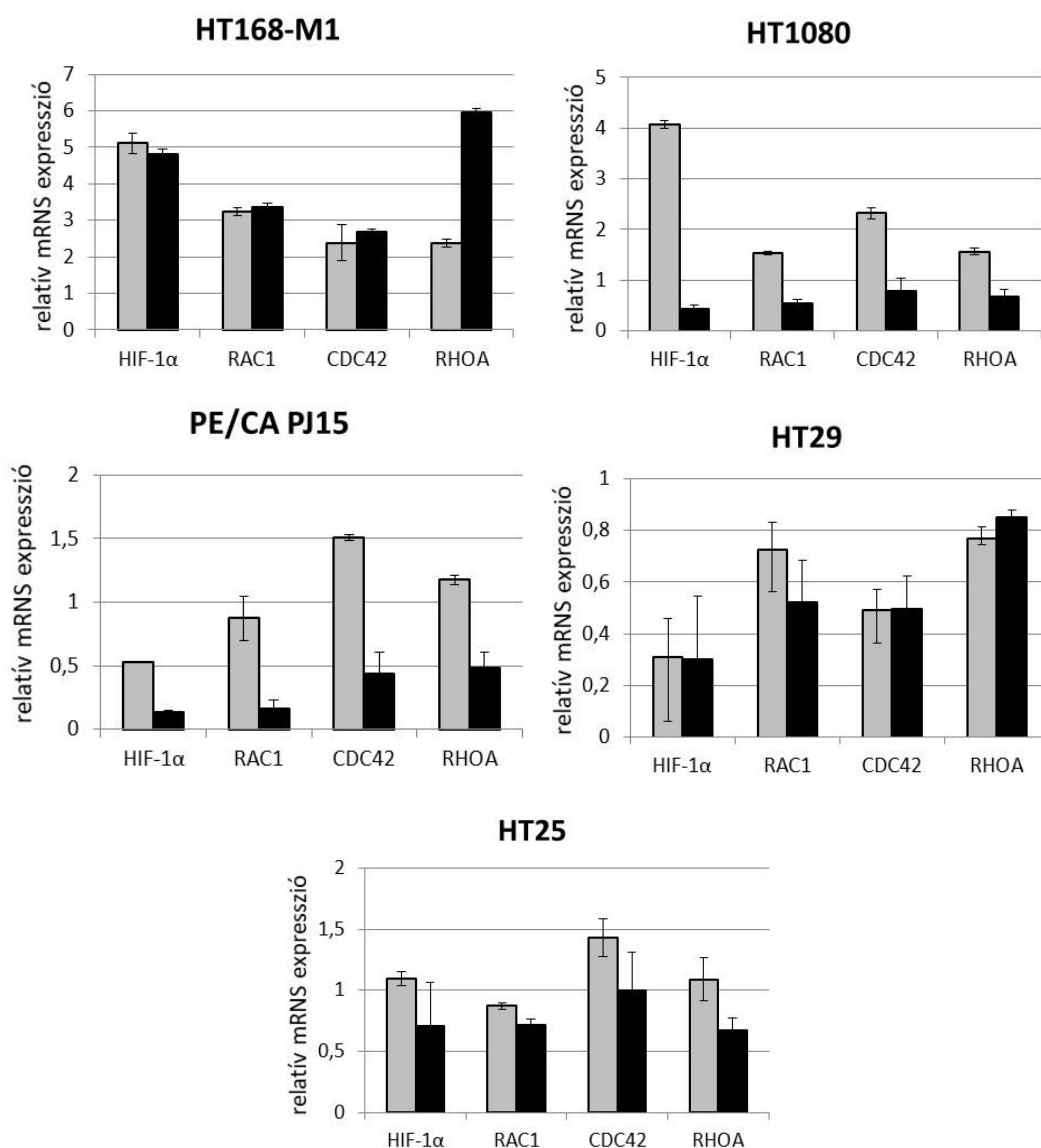


A) videomikroszkópiás vizsgálat elemzése a sejtek normoxiában mutatott alapmotiliási képességére. B) HT168-M1 (6 óra), HT1080 (6 óra), valamint PE/CA-PJ15 (20 óra) sejtek irányított mozgásának vizsgálata Boyden-kamrában. A sejtek migrációját úgy határoztuk meg, hogy megszámoltuk a sejteket az alsó kamrákban (kemoattraktáns: fibronectin; átlag±SD, n=6; *p<0,05). Videomikroszkópos vizsgálat 5% O₂ (C) és 1% O₂ (D) melletti relatív motilitásról. A fáziskontraszt-képeket egy sejt követő program segítségével elemeztük, amely lehetővé teszi az egyes sejtek kézi jelölését. A relatív migrációs távolságot a sejtek átlagos elmozdulásának aránya mutatja hipoxia (72–96. órában) és normoxia alatt (0–24. óra, átlag±SD, n=3). 1 = motilitás a normoxiában (21% O₂ az első 24 órában)

Mivel a hipoxiára adott válasz központi szabályozója a HIF-1 α transzkripciós faktor, amely hatással van a sejtmozgásban kulcsfontosságú molekulák, a kis GTP-áz fehérjék (RhoA, Rac-1 és Cdc42) kifejeződésére, ezért RT-PCR vizsgálatban megmértük a HIF-1 α , RAC1, CDC42, RHOA mRNS-szinteket az öt vizsgált tumorsejtvonalon. Az eredmények azt mutatják, hogy a sejtekben a vizsgált fehérjék expressziója a hipoxiaválaszban eltérő (31. ábra). Ráadásul ezek az expressziós változások nem mutatnak következetességet, ami azt feltételezi, hogy a

hipoxiára a sejtek eltérő módon reagálnak. A hipoxiára megnövekedett motilitást mutató sejtek közül a HT168-M1-nél mind a négy gén expressziója fokozódott, ugyanakkor HT1080 esetében ez kevésbé volt kifejezett, sőt 1% oxigénszint mellett gátlást detektáltunk. A PE/CA-PJ15 5% O₂ mellett expressziócsökkenést mutatott, ami 1% O₂-ben helyreállt. A HT25 és HT29 sejtek esetében nincs kimutatható HIF-1 α -expressziónövekedés.

31. ábra. A HIF-1 α , RHOA, RAC1 és CDC42 mRNS-expressziója normoxiában és hipoxiában



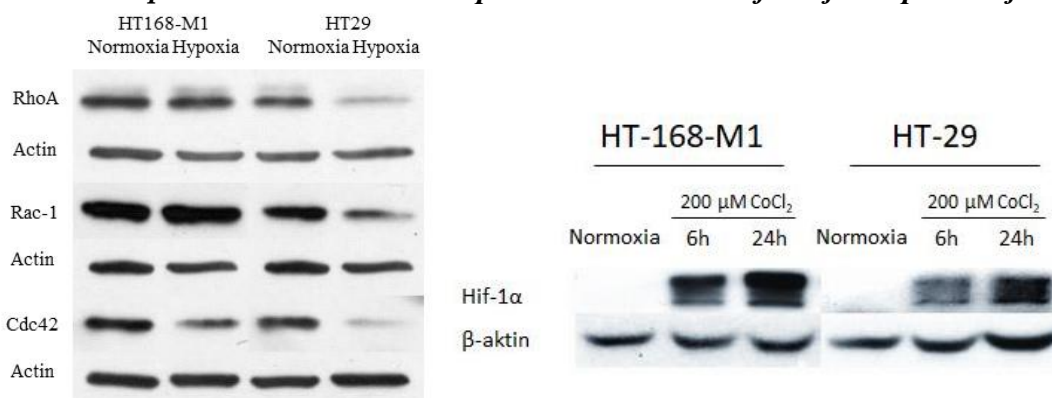
*Relatív mRNS-expresszió hipoxiás körülmények között (72 órás inkubálás után), összehasonlítva a normoxiával (normoxia=1). Átlag \pm SD, n=3, *p<0,05. Szürke oszlopok: 5% O₂, fekete oszlopok: 1% O₂*

Az eltérő motilitási képességeik alapján (magas: HT168-M1 és alacsony: HT29) kiválasztott sejtvonalakkal *in vivo* kísérleteket terveztünk a hipoxia és a metasztázisképzés

vizsgálatára. A génextpressziós eredmények megerősítésére Western blot analízisben vizsgáltuk a fehérjeszintű változásokat a kérdéses proteinekre. Azt tapasztaltuk, hogy a HT29 sejtekben a 24 órás hipoxia (1% O₂) kezelést követően a HIF-1 α indukálása mellett a RhoA, Rac1, Cdc42 csökkent expressziót mutattak, míg a HT168-M1 sejteknél ilyen csökkenés nem volt kimutatható (**32. ábra**). Ezek az eredmények nem állnak teljes korrelációban a génextpressziós adatokkal, de ez következhet a fehérjék poszttranszlációs módosulásaiból is. A hipoxiára mindkét sejtvonalban fokozódott a HIF-1 α felhalmozódása, amit nem csak az oxigénszint csökkentésével, de a hipoxia kémiai modulálásával is el lehetett érni (**32. ábra**). A kobalt-klorid (200 μ M, 24 órás kezelés) gátolja a HIF-1 α bontásában résztvevő prolil-hidroxiláz (PHD) enzimet, így a HIF-1 α felhalmozódik, és képes transzkripciós faktorként működni.

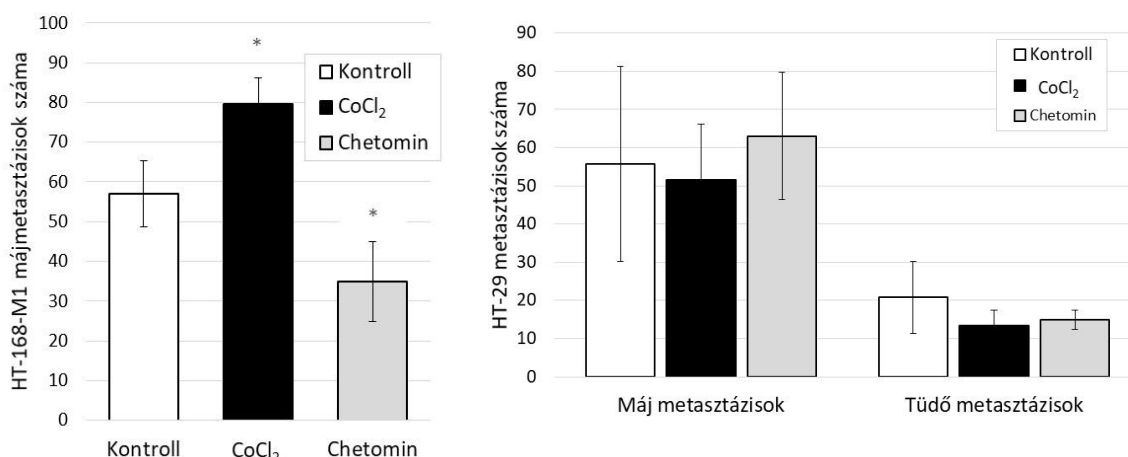
A kobalt-klorid-kezelés hipoxiát mimikáló hatása azért is fontos, mert így *in vivo* állatmodellekben is ki tudjuk váltani a hipoxiával megegyező folyamatokat. Ezt kihasználva metasztázismodellekben vizsgáltuk a két kiválasztott sejtvonal áttétképzését a hipoxia mimikálása közben. A HT168-M1 sejtvonal esetében a lép-máj modellt használtuk, ahol a lépbe oltás után májkolóniák alakulnak ki. A HT-29 sejteket pedig ortotopikusan, az állatok bélfalára oltva vizsgáltuk, ahonnan a primer daganatból áttétek képződnek az állatok májában és tüdejében is. A kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy az *in vitro* motilitásfokozódást mutató HT168-M1 sejteknek jelentősen megemelkedett a metasztatikus kapacitása a kobalt-klorid-kezelés hatására, míg a HIF-1 α -gátló chetomin csökkentette azt (**33. ábra**). Ezzel ellentétben a HT-29 ortotopikus modellben sem a tüdő-, sem a májáttétek számában nem volt kimutatható különbség a HIF-1 α modulálása után (**33. ábra**).

32. ábra. Hipoxia mimikálása és a hipoxia hatása a kis G-fehérjék expressziójára



A hipoxia csökkenti a kis G-fehérjék kifejeződését a kevésbé motilis HT29 sejtekben (**bal ábra**). A kobalt-klorid-kezelés (hipoxiamimikálás) HIF-1 α -felhalmozódást eredményez *in vitro* (**jobb ábra**)

33. ábra. Hipoxiamimikálás hatása a daganatok áttétképzésére



Bal ábra: HT168-M1 sejtek májkolonizációs képességének vizsgálata. A kobalt-klorid-ítatás hatására (HIF-stabilizálás) emelkedett a májkolóniák száma, míg a HIF-1 α aktivitását gátló Chetomin csökkentette azt. **Jobb ábra:** HT29 ortotopikus tumorok máj- és tüdőáttétei a hipoxia indukálása és gátlása után. A kolóniák számában nincs különbség a kontrollhoz képest

Az előzőekben a HIF1-1 α aktivitását próbáltuk közvetlenül befolyásolni, a továbbiakban short hairpin RNS (shRNS) technológia segítségével le is csendesítettük a HT168-M1 és HT29 sejtek HIF-1 α mRNS-expresszióját. A kísérletekben az „üres” (scrambled) vektort használtuk kontrollként. A csendesítés eredményeként mindkét sejtvonalban csökkent az indukálható HIF-1 α mennyisége (34. ábra).

34. ábra. HIF-1 α géncsendesítés ellenőrzése

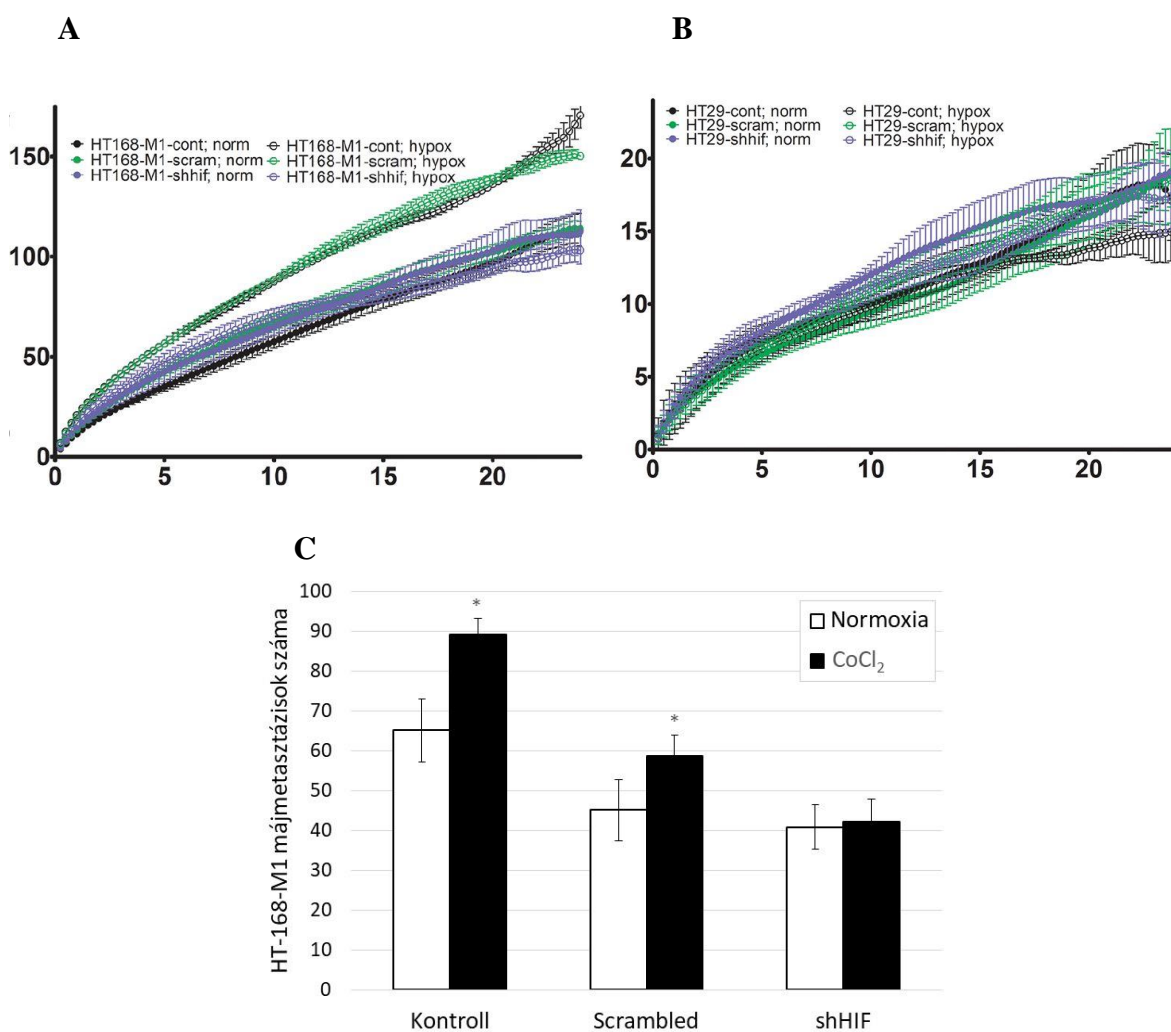


Western-blot analízis a HIF-1 α fehérje felhalmozódására HT29 és HT168-M1 sejtekben normoxiás (N) és hipoxiás (H: 1% O₂) körülmények között. A csendesített sejtekben (shHIF-1 α) a HIF-1 α akkumulációja jelentősen mérséklődött hipoxiában (H)

Mivel sikeresen tudtuk csendesíteni a HIF-1 α génexpressziót, megismételtük ezekkel a sejtekkel is az *in vitro* migrációs, és HT168-M1 sejtekkel az *in vivo* metasztázis kísérleteket. Az eredmények megerősítették, hogy a HT29 sejtek mozgása nem függ a HIF-1 α szintjétől, ugyanakkor a sokkal motilisebb HT168-M1 hipoxia általi motilitásserkentése HIF-1 α -függőnek bizonyult (35. ábra). Ezt az eredményt támasztják alá az *in vivo* kísérletek is a HT168-M1 metasztázismodellben. A kobalt-kloriddal itatott állatok (hipoxiacsoport) májában több kolónia

alakult ki parentális és a scrambled sejtek esetében, míg a csendesített sejtekben (shHIF) ez az áttétképzés-fokozódás nem alakult ki. Ez az eredmény is azt bizonyítja, hogy a HIF-1 α indukálása a motilitás fokozásán felül az áttétképzést is segíti ebben a modellben (35. ábra).

35. ábra. A HIF-1 α -csendesítés hatása a sejtek motilitására és a HT168-M1 áttétképző képességére



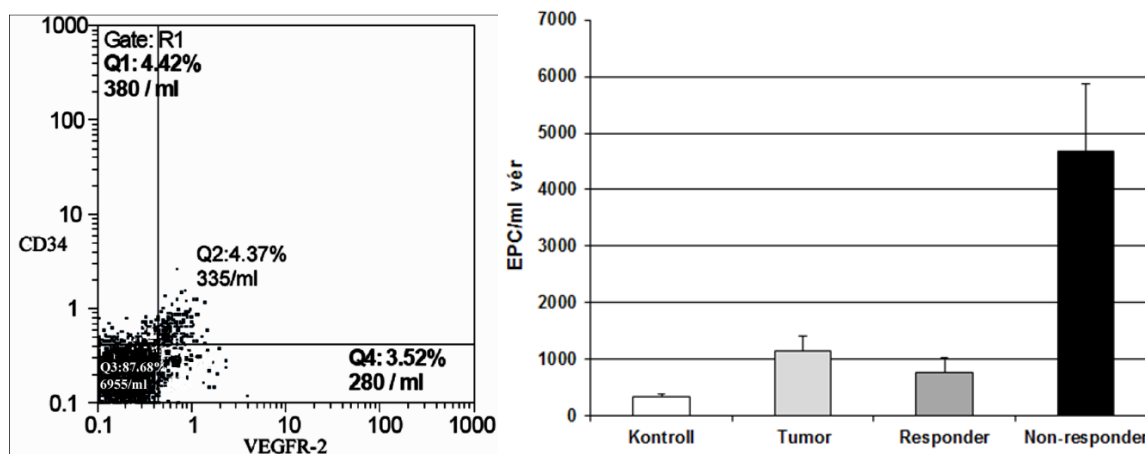
A) A hipoxia motilitásnövekedést okozott a HT168-M1 sejtek esetében, ami a HIF-1 α -csendesítéssel kivédhető volt. **B)** A HT29 sejtek motilitása nem volt befolyásolható a hipoxiával, és nem volt rá hatással HIF-1 α -csendesítés sem. **C)** HT168-M1 xenograft lép-máj modellben a HIF-1 α indukciója (kobalt-klorid-ítatás) a metasztatizáló képesség növekedésével jár, shHIF sejtek esetében ez a hatás elmarad

4.4 EPC-k diagnosztikus alkalmazása a daganatok progressziójának és a terápiák hatékonyságának követésére tüdőrákban

A hipoxia legnagyobb hatással az erek morfológiájára és funkcióira bír. Ennek része, hogy mobilizálódnak a csontvelőből különféle progenitorsejtek, amelyek részt vehetnek bizonyos helyeken érújdonképződésben. Mivel a daganatoknak szüksége van a növekedésük során az azokat tápláló érrendszer kialakítására, jogos a feltételezés, hogy a tumorokban is szerepet játszanak az endoteliális progenitorsejtek (EPC-k) az új erek formálásában.

Vizsgálatainkban humán klinikai tüdőrákmintákban (NSCLC, n=53) határoztuk meg áramlási citometriával, kettős jelöléssel (CD34+/VEGFR2+, **36. ábra**) a keringő EPC-k számát betegekben, összehasonlítva az egészséges kontrollokkal. Azt tapasztaltuk, hogy a tumoros betegekben szignifikánsan magasabb az EPC-k száma a keringésben, mint az egészséges kontrollokból. Ráadásul, a kezelésre reagáló betegekben csökken a keringő EPC-k száma, ugyanakkor a nem reagáló páciensekben a többszörösére emelkedik (**36. ábra**).

36. ábra. Keringő endoteliális progenitorsejtek (EPC-k) kimutatása NSCLC-mintákban



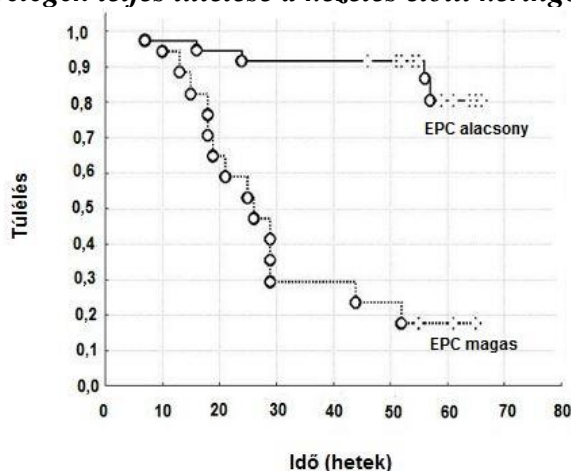
Bal ábra: reprezentatív áramlási citometriai elemzés a CD34/VEGFR2 kettős pozitív sejtek számának meghatározására. Q1=CD34+, Q2=CD34+/VEGFR2+, Q4=VEGFR2+ sejtek.

Jobb ábra: a keringő EPC-k szintje egészséges kontrollok és a betegek különböző kategóriáiban. Oszlopok: átlagos EPC-szám/ml vér ±SE, *p<0,002 (összes tumor versus a kontroll); **p <0,005 (válaszadók vs. kezelésre nem reagálók)

Mivel az 53 betegből 16 elhunyt a 30. hét előtt, és ezekben a betegekben a diagnózis felállításakor mért EPC-szám magasabb volt, mint azokban, akik túléltek a 30. hetet (2,206,8±552 szemben a 735,6±222,3-val; p<0,02), létrehoztunk különböző határértékeket (500, 750, 1000, 1250 / ml vér) keresve a diagnózis felállításakor mért EPC-szám és a betegség kimenetele közötti lehetséges korrelációt. Azt tapasztaltuk, hogy ha az 1000/ml vér értéket vesszük, akkor az ez alatti EPC-számmal rendelkező betegek túlélése szignifikánsan jobb, mint

a magasabb EPC-számmal jellemezhető betegeké (medián túlélési idő: 55,5 versus 26 hét; $p < 0,001$, **37. ábra**).

37. ábra. Az NSCLC-s betegek teljes túlélése a kezelés előtti keringő EPC-számok alapján



A kezelés előtti keringő EPC-számot CD34/VEGFR2 kettősjelöléssel határoztuk meg áramlási citometriával. Határérték az alacsony-magas megkülönböztetésére: 1000 EPC/ml perifériás vér

Ugyanakkor a keringő EPC-k száma nem mutatott semmilyen korrelációt sem a klinikopatológiai paraméterekkel (életkor, nem, dohányzási szokások, hisztológia, stádium), sem a kezelés típusával (kemoterápia, kemo-radioterápia, sebészet, palliatív; az adatokat nem mutatom). Többváltozós statisztikai elemzés (vizsgálva a daganatok stádiumát, a dohányzási szokásokat és a szövettani típust) szintén azt mutatta, hogy a kezelés előtti EPC-szám független prognosztikus markere a betegség kimenetelének ($p < 0,001$; **10. táblázat**).

10. táblázat. Különböző prognosztikai tényezők többváltozós elemzése NSCLC-s betegekben

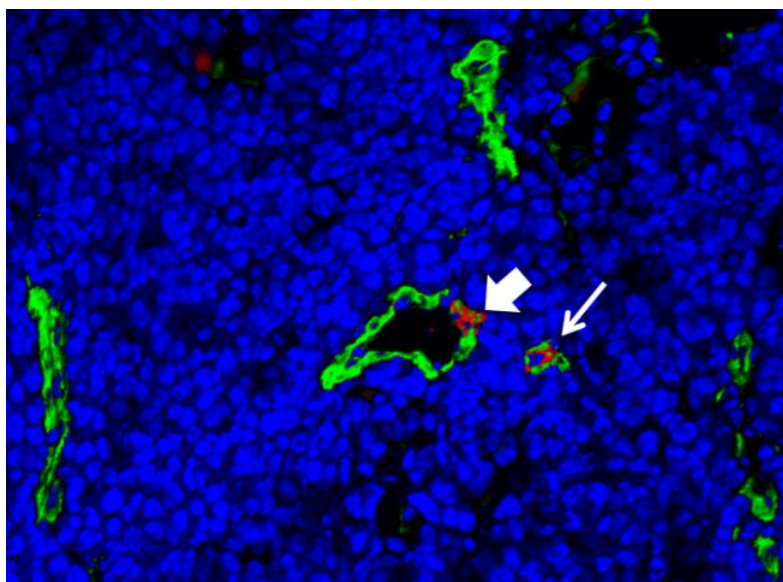
Prognosztikus faktor	RR	95% CI	p
Nem (nő vs. férfi)	0,719	(0,289-1,789)	0,478
Dohányzás (nem dohányos vs. dohányos)	1,602	(0,576-4,453)	0,366
Hisztológiai típus (nem adenokarcinóma vs. adenokarcinóma)	0,781	(0,367-1,665)	0,523
Stádium (I. vs. II-IV.)	1,96	(0,811-2,013)	0,04
Keringő EPC-szám (alacsony vs. magas)	8,41	(3,333-26,610)	<0,001

RR: relatív rizikó, CI: megbízhatósági intervallum

Azt, hogy a keringő EPC-k eljutnak-e a daganatok intratumorális ereibe, immunhisztokémiai festésekkel vizsgáltuk konfokális mikroszkóppal. Ehhez a sejteken CD133- és VEGFR2-jelöléseket végeztünk, az erek endotélsejtjeit pedig CD31-festéssel tettük

láthatóvá. Az EPC-k az érésük során különböző mértékben expresszálnak néhány jellegzetes markert, ezért CD133+ és CD133/VEGFR kettős pozitív sejteket is kerestünk a mintáinkban. Mivel a kétféle jelölés nem mutatott különbséget, ezért a teljes mintában a CD133+ sejteket tekintettük EPC-nek a metszeteken. EPC-pozitívnak tekintettük a mintát, ha akár egyetlen sejtet is láttunk az immunfestés után (**38. ábra**). 22 sebészi úton eltávolított tumorból 9-ben azonosítottunk EPC-ket, amik minden esetben intratumorálisan, elsősorban a hajszálerekben, ritkábban a nagyobb erek endotéliumában voltak megtalálhatók (**38. ábra**). A normális szövetben nem találtunk EPC-ket. Az átlagos EPC-szám $2,4 \pm 1,1/\text{mm}^2$ volt az EPC+ mintákban (átlag \pm SD, n=9), ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy nem volt kimutatható korreláció a szövetben és a keringésben mért EPC-számok között (az adatokat nem mutatom).

38. ábra. Az EPC-k azonosítása a humán NSCLC-szövetben



CD133+ EPC-ket (vörös fluoreszcencia) elsősorban a kis intratumorális kapillárisokban figyeltünk meg (nyíl) vagy megtapadtak a nagyobb kapillárisok endotéliumában (zöld fluoreszcencia, vastag nyíl). Magfestés: TOTO-3 (kék)

4.5 Az rHuEPO hatása a daganatok növekedésére és a kezelések hatékonyságára kísérletes rendszerekben

Az irodalomban ellentmondó eredmények jelentek meg a hipoxia/anémia korrekciójára használt rekombináns eritropoetinek (rHuEPO-k) alkalmazásáról. Ennek az alapja az volt, hogy tumorsejteken is azonosították az EPO-receptort, ami azt sugallta, hogy az exogén EPO-kezelés serkentheti a daganatok növekedését. Az ellentmondások értelmezésére és a korábbi saját eredményeinkből kiindulva kutatócsoportunk különféle kísérletes modelleket alapított az exogén rHuEPO hatásainak vizsgálatára.

Először szubkután tumormodellben (A431 xenograft) vizsgáltuk, hogy a daganat növekedése, valamint az exogén rHuEPO α -kezelés hogyan befolyásolja az állatok hemoglobinszintjét. A **11. táblázatban** látható, hogy a tumorok növekedése még ebben a lokalizációban is csökkenti a szisztémás oxigénszintet, amit a humán EPO helyreállít (sőt még a kontroll szintjéhez képest növel is). Hasonló eredményeket kaptunk a vörösvértestszám (RBC) és a hematokrit mérése esetén is (az adatokat nem mutatom).

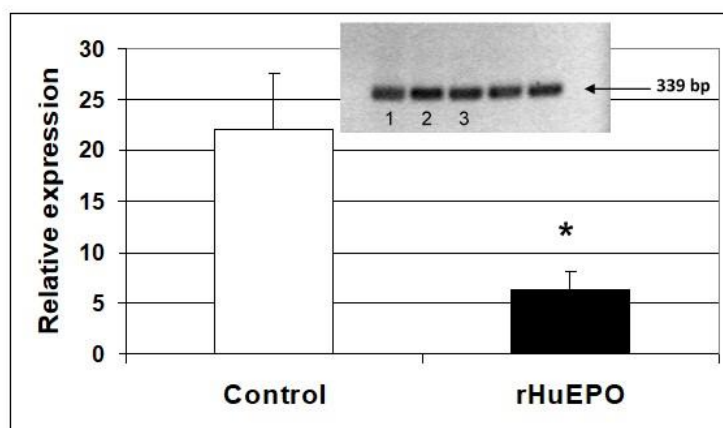
11. táblázat. rHuEPO-kezelés hatása tumort hordozó egerek hemoglobinszintjére

Tumoroltás utáni napok		0	8	15	19	22
Hemoglobin (g/dl)	Kontroll	11,6 \pm 1,1	11,6 \pm 0,7	11,4 \pm 0,4	11,4 \pm 1,2	11,3 \pm 0,2
	A431		11,3 \pm 0,5	10,9 \pm 0,6	10,4 \pm 0,5	10,1 \pm 0,5
	A431 + rHuEPO		12,3\pm0,9	13,0\pm0,5*	12,4\pm0,4*	12,5\pm0,5*

Az adatokat (átlag \pm SD) három mérésből képeztük (p <0,05, kontroll vs. rHuEPO α)*

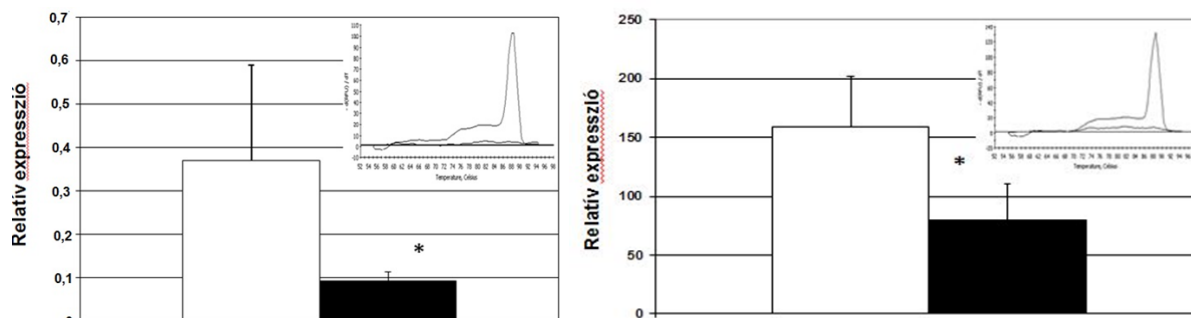
Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az EPO-kezelés hogyan befolyásolja a HIF-1 α és az általa szabályozott egyik fő effektor, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor-A (VEGF-A) expresszióját. A molekuláris biológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy mind a HIF-1 α (**39. ábra**), mind a VEGF-A (**40A ábra**) expressziója csökken az rHuEPO-kezelés hatására a daganatsejteken és az *in vivo* modellekben. Ráadásul a VEGF-A-expresszió a nem daganatos gazdaszövetekben is megfigyelhető volt (**40B ábra**), ami azt mutatja, hogy az rHuEPO-kezelés nem csak lokálisan, a daganatokban okozott változásokat.

39. ábra. A humán HIF-1 α gén expressziója A431 daganatokban



A HIF-1 α -t RT-PCR-rel mértük. A specifikus primerek egy 339 bázispár méretű terméket amplifikáltak (1–3. sáv: kontroll, 4. és 5. sáv: rHuEPO α -val kezelt xenograftok, inzert). Az rHuEPO-kezelés csökkentette a HIF-1 α -expressziót. Az adatok átlag \pm SD, n=5, * p <0,05 a kontrollhoz viszonyítva

40. ábra. VEGFA expressziója a tumorban (A) és a gazdaszervezetben (B)



A VEGF relatív expressziója szignifikáns (* p <0,05) csökkenést mutatott az rHuEPO-val kezelt állatok esetében a daganatban (A) és a gazdaszövetben (B) is (üres oszlopok: kontroll; fekete oszlopok: rHuEPO-val kezelt állatok). Oszlopok: három egérből nyert eredmények átlaga \pm SD. A görbék elemzése azt mutatta, hogy a VEGF-primerpárok egyetlen és fajspecifikus terméket amplifikáltak: humán mintán (Kaposi-szarkóma, A inzert) az emberi primerek egyetlen, jól definiált csúcsot adtak, míg egér primerekkel nem történt amplifikáció; egérminta (B16 melanóma, B inzert) az egyedüli csúcs csak egér VEGF-primerekkel volt kimutatható, és nem volt reakció a humánnal

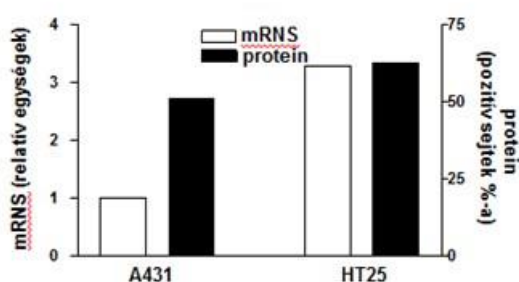
4.5.1 Az rHuEPO-val kiváltott érelváltozások hatása a kemoterápiára

A korábbi ellentétes irodalmi adatok miatt mi is megvizsgáltuk, hogy az A431 sejtek és a HT25 humán kolonkarcinóma sejtek expresszálják-e az EPO-receptort. Azt kaptuk, hogy mindkét sejtvonalban kifejeződik az EPOR mind RNS-, mind fehérjeszinten (41A ábra). Ugyanakkor az exogén rHuEPO-kezelés nem fokozza (sőt, szérummentes környezetben még csökkenti is) a daganatsejtek *in vitro* proliferációját (41B ábra). Ráadásul az rHuEPO α -kezelés *in vivo* sem fokozta a xenograft tumorok növekedését, ugyanakkor érdekes megfigyelésünk

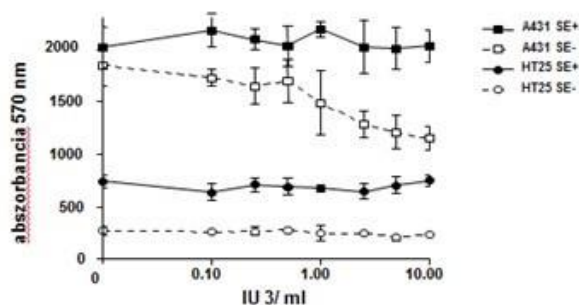
volt, hogy pozitívan befolyásolta az 5-FU-kemoterápiát: az együttes alkalmazásuk során szignifikánsan nagyobb daganattérfogat-csökkenést lehetett elérni a kezelésekkel (41C,D ábrák).

41. ábra. Az rHuEPO hatása az eritropoietinreceptorokat expresszáló, A431 és HT25 sejtekre és a daganatxenograftok proliferációjára és növekedésére

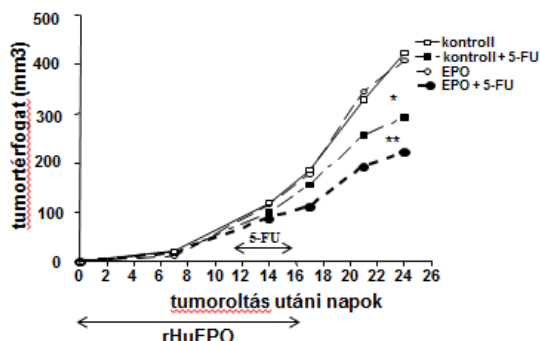
A



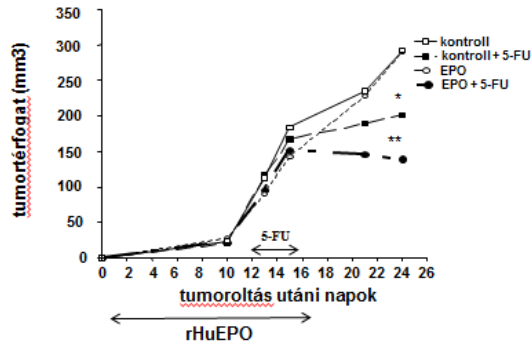
B



C



D

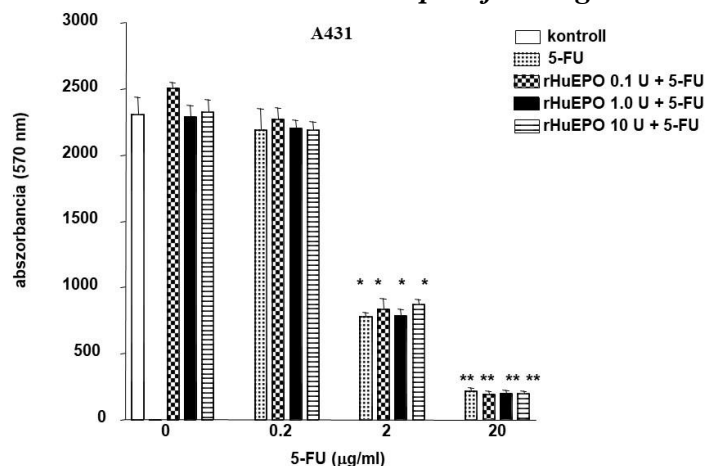


A) Humán eritropoietinreceptor kifejeződése mRNS- és fehérjeszinten (RT-PCR, áramlási citometria). B) az rHuEPO-val történő 72 órás kezelés (0,1–10,0 NE/ml; SE+/SE-, 5% szérum vagy szérummentes körülmények) hatása az *in vitro* sejtproliferációra. Pontok, átlag; oszlopok, SD (n=6). C és D) az rHuEPO *in vivo* hatásai (150 NE/kg, hetente háromszor) és 5-FU-kezelések (750 mg/m², hetente ötször) az A431 (C) és a HT25 (D) xenograftokon (*p<0,05, 5-FU a kontrollhoz képest; **p<0,05, 5-FU+rHuEPO és 5-FU, Mann-Whitney U-teszt, n=10)

A további vizsgálatokban ugyanakkor azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy az *in vivo* megfigyelt additív hatás (rHuEPO + 5-FU) nem volt kimutatható *in vitro* proliferációs tesztekben (42. ábra). Ez az eredmény azt sugallta, hogy nem a tumorsejteken történő közvetlen hatás állhat a jelenség háttérében, hanem valami egyéb, az rHuEPO-kezelés hatására a gazdaszervezetben kialakuló változás. Ezt a jelenséget keresve azt találtuk, hogy az rHuEPO-

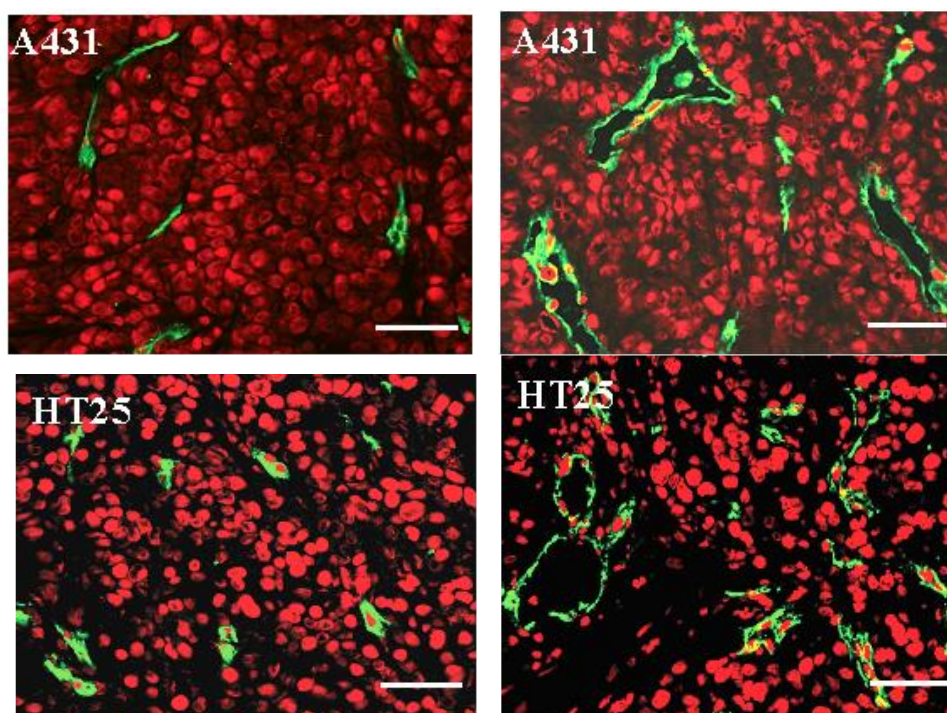
kezelt állatokban az intratumorális erek dilatáltak, szignifikánsan nagyobb az átmérőjük, de a számuk nem változott jelentősen (43-44. ábrák).

42. ábra. rHuEPO-kezelés hatása az 5-FU *in vitro* proliferációgátlására A431 sejteken



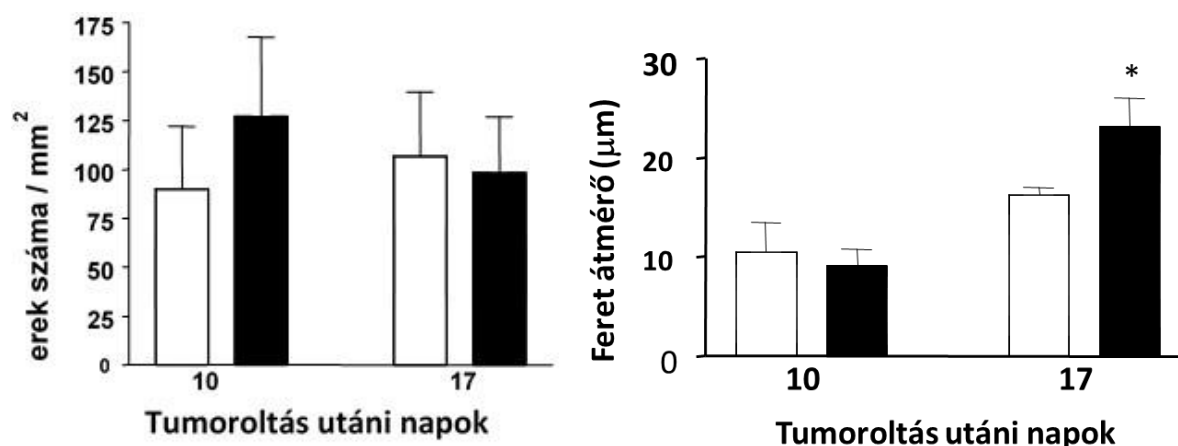
rHuEPO α (0,1–10 NE/ml) nem befolyásolta az 5-FU *in vitro* hatását és az A431 sejtek 72 órás proliferációját. Oszlopok, átlag \pm SD (n=6, *p<0,05; **p<0,01, 5-FU vs. kontroll, Student t-teszt)

43. ábra. Az rHuEPO-kezelés hatása az intratumorális erekre A431 és HT25 humán xenograftokban



Az rHuEPO α -kezelés humán-ekvivalens dózisban (150 NE/kg, háromszor/per hét, **jobb oldali ábrák**) mindkét tumor esetében növelte az erek méretét összehasonlítva a kontrollal (**bal ábrák**). Az intratumorális ereket anti-CD31-FITC (zöld) antitesttel jelöltük, a sejtmagokat pedig propidium-joddal (piros). Mércse: 50 μ m

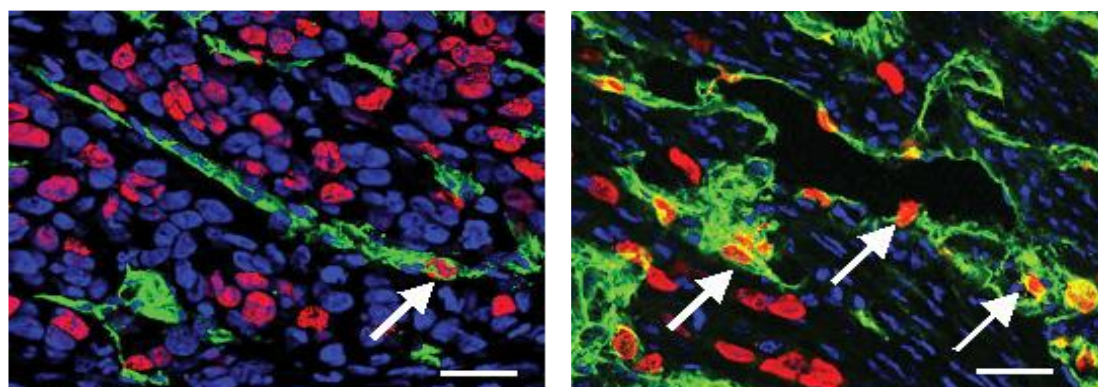
44. ábra. CD31-pozitív erek száma és átlagos átmérője az rHuEPO α -kezelés után



A) Az rHuEPO α -kezelésnek nem volt szignifikáns hatása az intratumorális erek sűrűségére. Oszlopok: átlag \pm SD (n=10; üres oszlopok, kontroll; fekete oszlopok: rHuEPO α -val kezelt daganatok). B), A Feret-átmérők mértéke az A431 daganatokban a 10. és 17. napon. Az rHuEPO α -val kezelt daganatokban szignifikánsan nagyobbak az erek átmérői a 17. napon. Oszlopok: átlag \pm SD (*p<0,05)

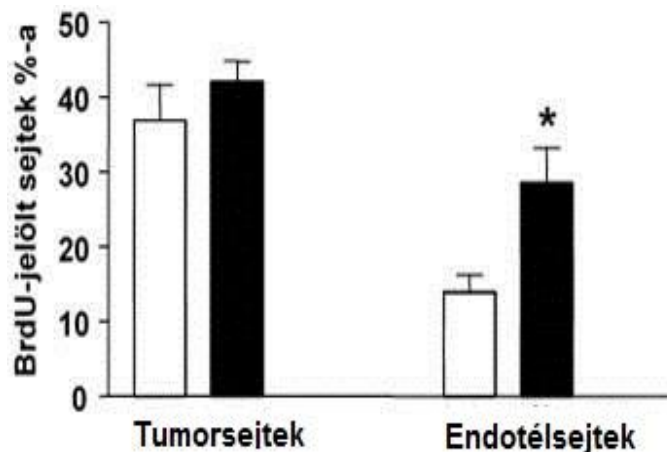
Az erek átmérője rHuEPO α -kezelés hatására megmutatkozó növekedésének hátterében az endotélsejtek proliferációjának fokozódása állt (45-46. ábrák). Érdeemes ugyanakkor emlékeznünk arra a tényre, hogy ez az osztódásfokozódás annak ellenére következett be, hogy mind a tumorokban, mind a gazdaszövetben csökkent a VEGFA expressziója az rHuEPO α -kezelés hatására (40. ábra). Ugyanakkor megfigyeltük, hogy az endotélsejtekkel ellentétben a daganatsejtekben, amelyek szintén EPOR-pozitívak, az rHuEPO-kezelés nem befolyásolta a sejtek proliferációját (46. ábra).

45. ábra. Az rHuEPO α hatása az A431 humán tumorsejtek és egér endotélsejtek BrdU-jelölési indexére



Immunfluoreszcenciás mikroszkópia: BrdU (piros), CD31 (zöld) és Hoechst 33342 (magsfestés, kék) a kontroll (bal) és rHuEPO-val kezelt (jobb) daganatokban a tumor oltását követő 18. napon. Nyilak, CD31+/BrdU+ endotélsejtek, mérce: 25 µm

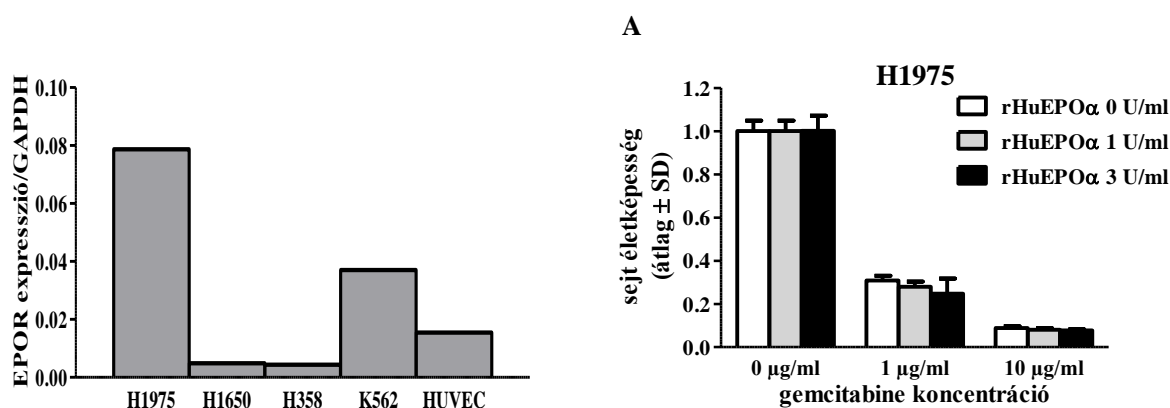
46. ábra. rHuEPO-kezelés hatása a daganatsejtek és az endotélsejtek proliferációjára



Az rHuEPO-kezelés szignifikánsan növeli a mikrovaszkuláris endotélsejtek BrdU-jelölését a daganatban (18. nap), de nincs hatással a perivaszkuláris tumorsejt-populációra. Oszlopok: átlag±SD, n=10 (üres oszlopok: kontroll; fekete oszlopok: rHuEPO-val kezelt minta; * $p < 0,001$)

Az eredményeink validálásához tüdőrák-sejtvonalakat (H1650, H1975, H358) is bevontunk a vizsgálatainkba. Ezekben kvantitatív valós idejű PCR-rel meghatároztuk az EPOR mRNS-szintjét, pozitív kontrollként humán köldökzsinórvér-eredetű endotélsejteket (HUVEC), valamint K562 leukémia-sejtvonalat használtunk. A H1650 és a H358 sejtvonalakban igen alacsony volt az EPOR-expresszió, míg a H1975 sejtvonal még a pozitív kontroll K562-nél is magasabb szinten expresszálta azt (47. ábra).

47. ábra. EPOR-expresszió humán tüdő-adenokarcinóma sejtvonalakban



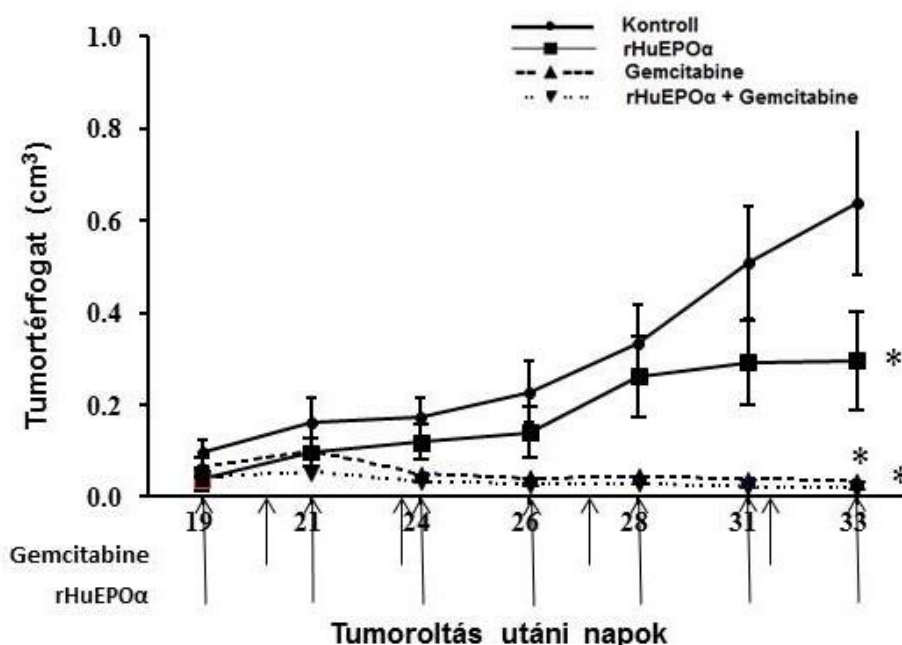
A, EPOR mRNS-expressziójának kimutatása humán tüdő-adenokarcinóma sejtekben RT-PCR-rel (pozitív kontroll: HUVEC, K562 sejtvonalak). B, rHuEPO (1, 3 IU/ml) hatása a gemcitabinkezelésre (1, 10 µg/ml) *in vitro*. 48 órás kezelés, SRB-teszt

In vitro az rHuEPOα különböző koncentrációi (1, 3 U/ml) ezekben a kísérletekben sem fokozták még az EPO-receptort kifejezeten magas szinten expresszáló daganatsejtek

proliferációját sem, és nem befolyásolták a sejtek citosztikus (gemcitabin 1, 10 µg/ml) kezelését sem (47. ábra).

Hasonló eredményt kaptunk az *in vivo* szubkután nöövő H1795 xenograft kísérletekben is. Az rHuEPO α -kezelés nem hogy nem fokozta, de szignifikánsan csökkentette az EPOR+ tumorok növekedését (48. ábra). A citosztikus kezelés hatásának korábban az A431 és HT25 xenograftoknál ismertetett fokozódását ebben a modellben nem tudtuk kimutatni, mivel a gemcitabin önmagában is majdnem teljesen eltüntette a szubkután daganatokat (48. ábra).

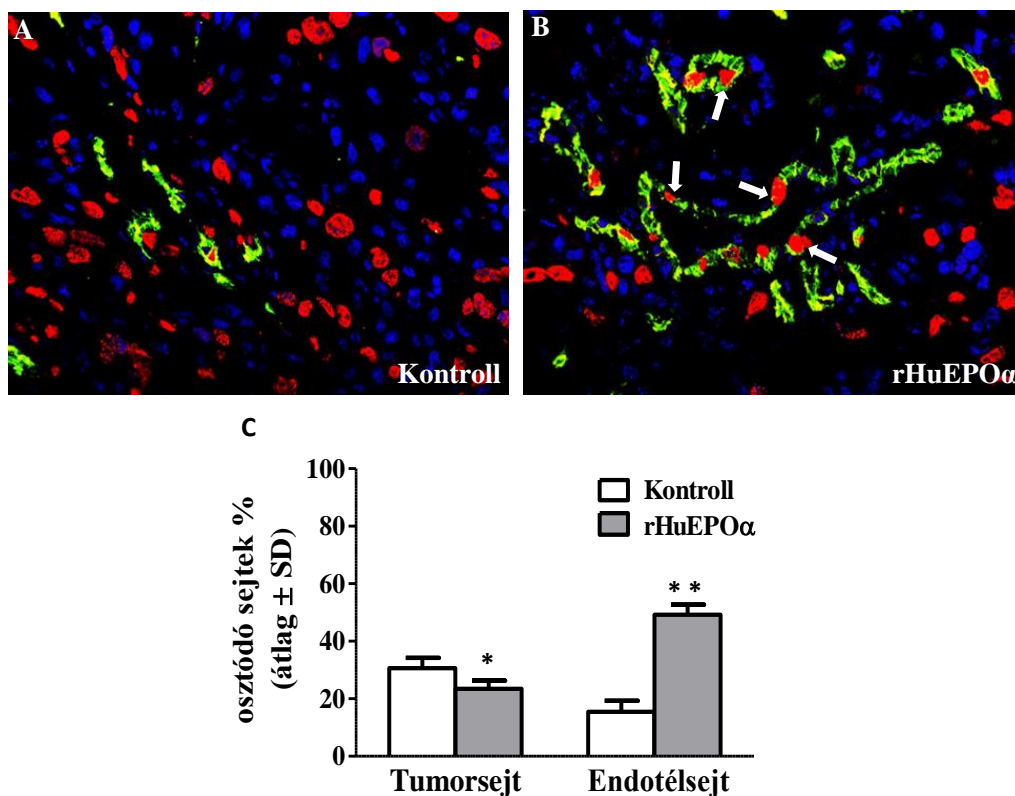
48. ábra Exogén rHuEPO α - és gemcitabinkezelés hatása EPOR+ H1795 xenograftok növekedésére



H1795 növekedés görbék a kontroll (fiziológias sóoldat), rHuEPO α (150 IU/kg), gemcitabin (100 mg/kg) és rHuEPO α + gemcitabin csoportokban; * $p < 0,05$ kontrollal összehasonlítva

Ugyanakkor az rHuEPO α -kezelés ebben a modellben is fokozta az intratumorális endotélsejtek proliferációját, és itt is nagyobb átmérőjű ereket láttunk a kezelt csoportban (49. ábra). Ezzel párhuzamosan viszont az EPOR+ H1795 daganatsejtek proliferációs indexe szignifikánsan csökkent a kezelt tumorokban (49. ábra).

49. ábra. Az rHuEPO α -kezelés hatása az endotélsejtek és a tumorsejtek proliferációjára H1975 xenograftokban

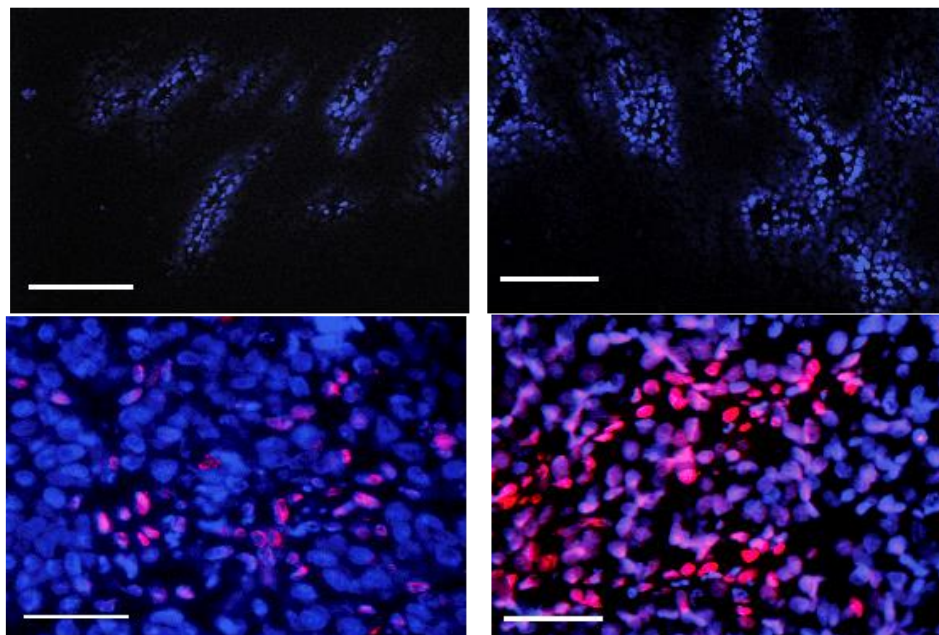


Reprezentatív immunfluoreszcens képek a kontroll (A) és az rHuEPO α -kezelt (B) egerekből származó tumorokról. Endotélsejt: anti-CD31 (zöld), proliferáció: BrdU marker (piros), sejtmagok: TOTO-3 (kék). A nyilak az osztódó endotélsejteket jelölik. C) Osztódási index meghatározása a tumorsejtekben és az endotélsejtekben a kísérlet 33. napján a kontroll és az rHuEPO α -kezelt csoportban. * $p=0,021$, ** $p<0,001$ a kontrollal összehasonlítva

Arra a kérdésre, hogy az rHuEPO-kezelés hatására bekövetkező érátmérő-növekedés hogyan befolyásolhatja a kezelőszerek hatékonyságát, szöveti perfúziós (funkcionális *in vivo* imaging) vizsgálatokat végeztünk A431 tumorxenograftokban. Először Hoechst 33342 festéket juttattunk az állatokba farokvénaoltással, majd elvégeztük a kísérleteket doxorubicinnal is, aminek vörös autofluoreszcenciája van, ezáltal fluoreszcens mikroszkópban detektálható a szöveti eloszlása. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét jelölés esetében az rHuEPO-kezelt tumorokban a festék 15 perc után nagyobb területeket jelölt, mint a kontroll állatokban (50. ábra). Az eredményeket számszerűsítve azt kaptuk, hogy mindkét esetben több mint duplájára nőtt a jelölt területek mérete a kezelt csoportokban. Annak eldöntésére, hogy ez a megfigyelt növekedés nem a kitágult erek méretváltozása miatt van-e, azaz nem azért nagyobb a terület, mert eleve nagyobb az ér átmérője, ami körül mérjük a jelölés mértékét, a jelölt területeket

standardizáltuk az erek kerületére. Ebben az esetben is azt kaptuk, hogy az rHuEPO-kezelés szignifikánsan növeli a daganatszövetben a jelölésre használt anyagok perfúzióját (**51. ábra**).

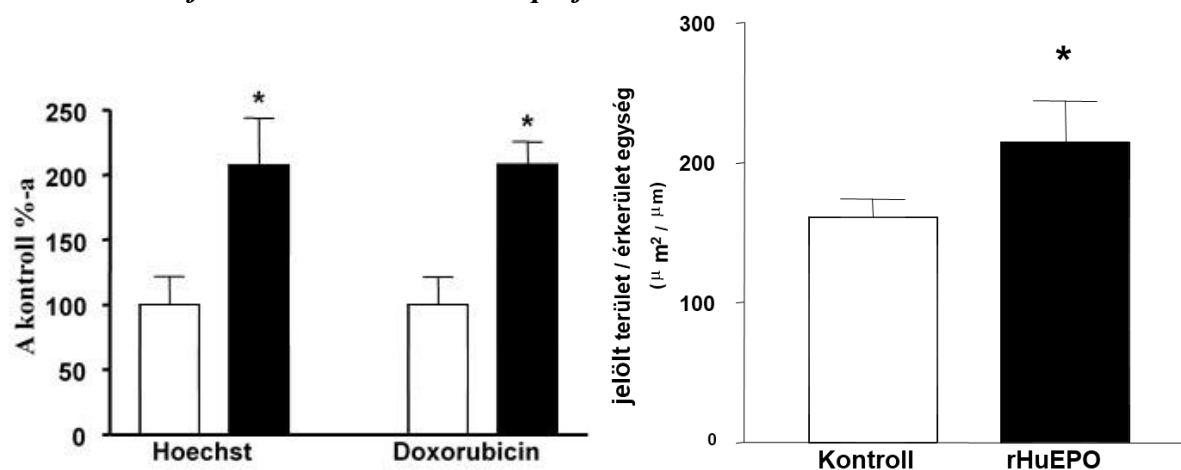
50. ábra. Funkcionális képalkotás az A431 tumorban fluoreszcens mikroszkóppal



Felső panel: Hoechst 33342 magfesték (kék) 15 perces inkubáció után a kontroll (**bal**) és az rHuEPO-val kezelt (**jobb**) tumorszövetek a 21. napon a tumor beoltása után (mérce: 50 μm).

Alsó panel: 15 perces doxorubicinjelölés (piros) a kontroll (**bal**) és az rHuEPO-val kezelt (**jobb**) tumorszövetekben. A magokat Hoechst 33342-vel jelöltük (kék, mérce: 50 μm)

51. ábra. Morfometriai analízis a tumorperfúzióra



Bal ábra: doxorubicinnal jelölt területek az A431 daganatokban. Oszlopok: átlag a kontroll százalékában \pm SD ($n=10$; üres oszlopok: kontroll; fekete oszlopok: rHuEPO-val kezelt daganatok; $*p<0,05$). **Jobb ábra:** az erek kerületére eső jelölt terület az rHuEPO-kezelés után a daganatokban. Oszlopok: átlag \pm SD ($n=10$; $*p<0,05$)

4.5.2 Az rHuEPO-val kiváltott érelváltozások hatása a sugárterápiára

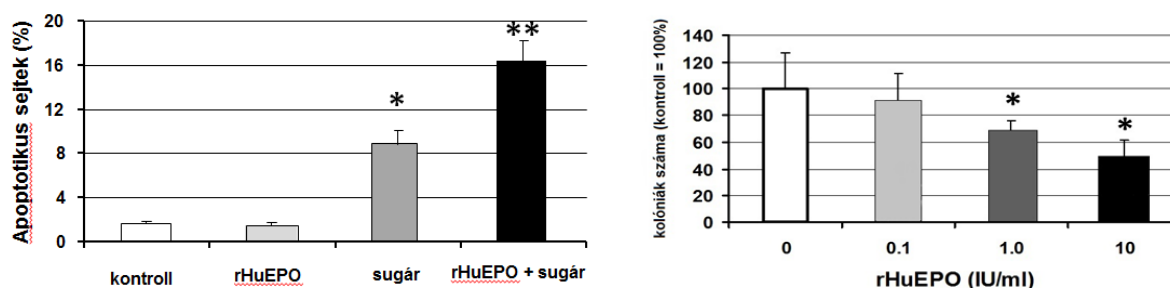
A terápiák hatékonyságát befolyásolja a szövetek oxigén- és tápanyag-ellátottsága. Mint az előzőekben láttuk, a kemoterápiát is befolyásolni lehetett exogén rHuEPO-val az intratumorális erekre kifejtett hatásai miatt, ezért arra is kíváncsiak voltunk, hogy a sugárkezelés hatásosságát is módosítja-e az EPO-kezelés.

Bár az A431 sejtek kifejezik az EPOR-t, az rHuEPO α -val 0,1–10 IU/ml dózistartományban szérumos környezetben 72 órán keresztül végzett *in vitro* kezelés nem mutatott szignifikáns hatást a sejtproliferációra. Ugyanakkor a tumorsejtek besugárzása 5 Gy-vel több mint 25%-kal csökkentette az élő sejtek számát 48 órán belül. Az rHuEPO-kezelést (0,1–10 IU/ml) és a sugárkezelést (5 Gy) együttesen alkalmazva csupán további <20%-nyi proliferációgátlást detektáltunk.

Azonban amikor a sugárkezelés hatékonyságát teszteltük a tumorsejtek apoptózisára és a kolóniaképző képességére, azt tapasztaltuk, hogy az rHuEPO α -kezelés (1 IU/ml, 48 óra) önmagában nem befolyásolta az apoptózist, viszont szignifikánsan ($p < 0,01$) megnövelte az apoptotikus sejtek mennyiségét a besugárzott (5 Gy) tumorsejtekben (**52. ábra**).

Az rHuEPO-kezelés hosszú távú hatását kolóniaképzési vizsgálattal teszteltük. Az eredmények azt mutatják, hogy az rHuEPO α (0,1-1-10 IU/ml) koncentrációfüggően szignifikánsan ($p < 0,01$) megnövelte a sugárkezelés hatékonyságát az A431 sejtekben *in vitro* (**52. ábra**). A sugárkezelés 60%-os csökkenést idézett elő a daganatsejtek kezelés utáni hosszútávú túlélésében, melyet szignifikánsan tovább fokozott (8%, 30%, ill. 49%) az rHuEPO-kezelés (**52. ábra**).

52. ábra. Az rHuEPO α -kezelés és besugárzás hatása a tumorsejtek apoptózis- és kolóniaképző képességére *in vitro*

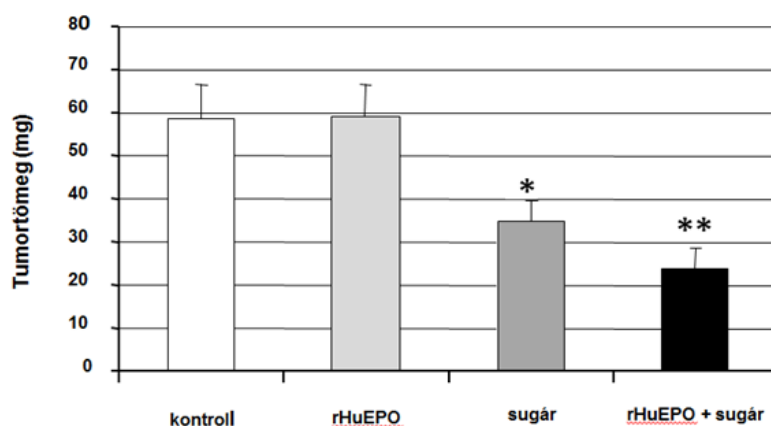


Az rHuEPO α (1 NE/ml) és besugárzás (5 Gy) hatása az A431 sejtek apoptózisára (**bal ábra**).

Besugárzott A431 sejtek hosszú távú (14 nap) kolóniaképző képessége rHuEPO α -előkezeléssel vagy anélkül (**jobb ábra**). Az adatok átlag \pm SD, $n=6$. * $p < 0,05$, kombináció vs. besugárzás önmagában. ** $p < 0,01$, besugárzás vs. kontroll.

Az *in vitro* kísérletek után megvizsgáltuk az exogén EPO-kezelés hatását az *in vivo* sugárkezelésre is. Az rHuEPO α adása *in vivo* humán-ekvivalens dózisban nem volt szignifikáns hatással az A431 tumorxenograftok növekedésére (**53. ábra**). A tumorokat egyszeri 5 Gy dózissal sugárztuk be a tumorok oltása utáni 14. napon (átlagos tumorméret: 50-70 mm³). A sugárkezelés önmagában is szignifikánsan gátolta a szubkután daganatok növekedését (61,5%), amit az rHuEPO-kezelés még tovább fokozott szignifikánsan (**53. ábra**).

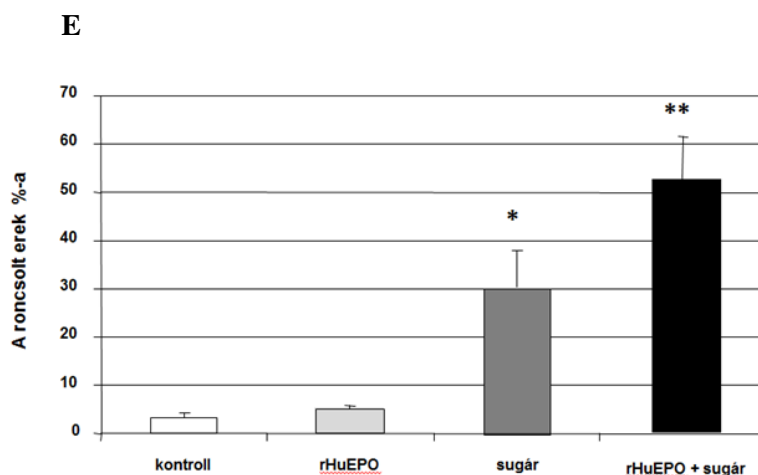
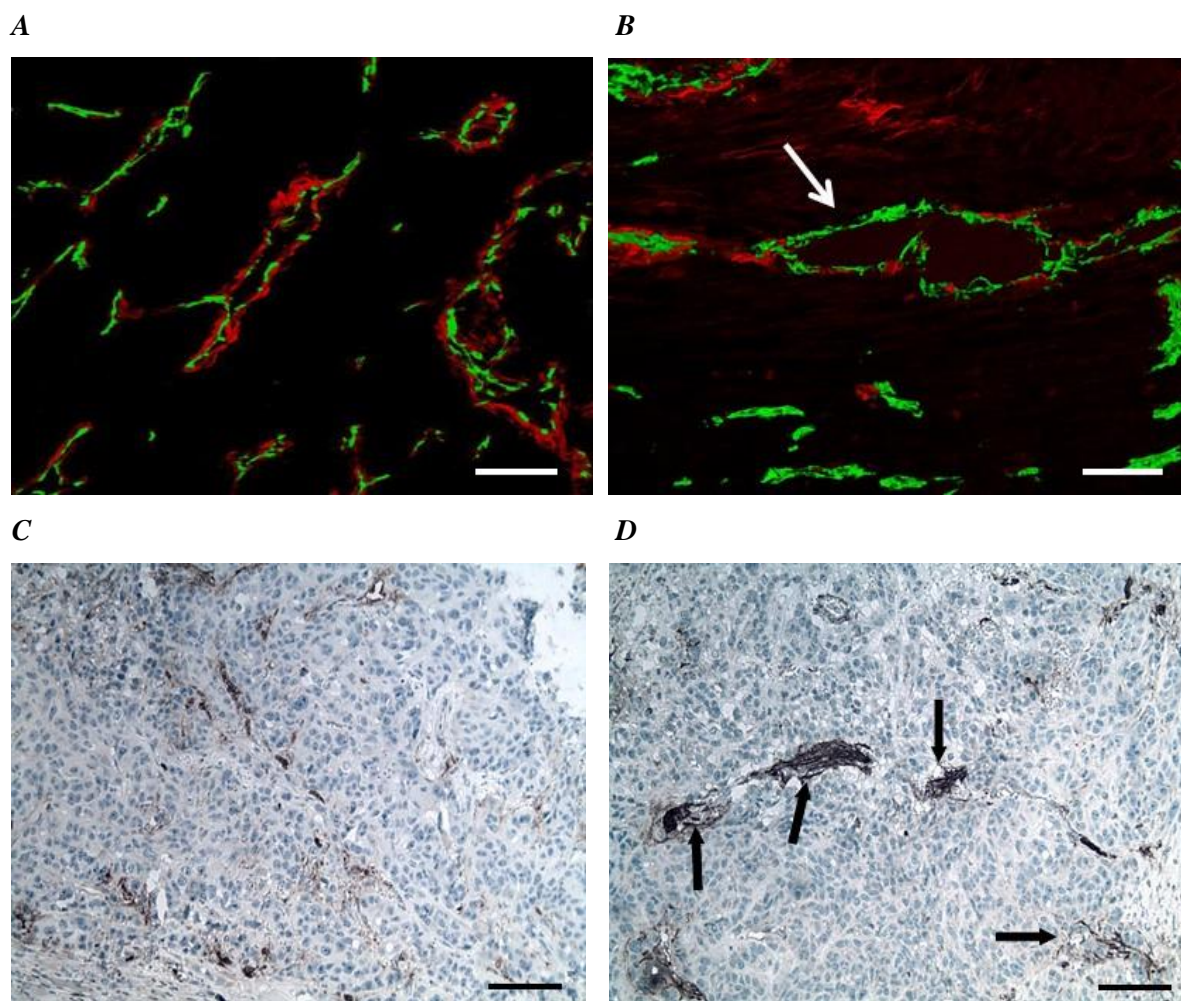
53. ábra. rHuEPO-kezelés hatása a szubkután A431 xenograftok besugarazására



Az A431 xenograftokat hordozó állatokat kezeltük rHuEPO α -val (150 NE/kg, hetente háromszor), valamint sugárterápiával *in vivo* (5 Gy egyszeri adag a tumoroltás utáni 14. napon). * $p < 0,01$, besugárzás vs. kontroll; ** $p < 0,05$, kombináció vs. besugárzás önmagában, $n=5$

A korábbi eredményeinkből kiindulva ezekben a kísérletekben is megvizsgáltuk az intratumorális ereket a kezelés után. Az előző vizsgálatokban kapott eredményekhez hasonlóan az rHuEPO-kezelés hatására nagyobb átmérőjűek voltak az erek, amiknek a pericita-borítása nem volt folytonos (a periciták nem követték az endotélsejtek proliferációjának fokozódását, (**54. ábra**). Az átlagos pericita-borítás morfometriai analízise több, mint 30%-os csökkenést ($p < 0,05$) mutatott. Összehasonlítva a kontroll tumorokkal, a sugárkezelés nagyobb érroncsolást végzett az élő tumorterületen belül az rHuEPO α -val kezelt állatokban (**54. ábra**). A morfometriai elemzés azt mutatta, hogy az abnormális alakú, roncsolt intratumorális erek aránya több mint 50%-os volt az rHuEPO-kezelt és besugarazott xenograftokban, szemben a kizárólag sugárkezelést kapott csoporttal, ahol ez 30%-nak adódott (**54. ábra**). Ez a hatás valószínűleg abból adódott, hogy az EPO-kezelt tumorokban az endotélsejtek proliferációs indexe magasabb, és a sugárkezelés jobban hat az osztódásban levő sejtekre.

54. ábra. Tumorasszociált erek morfológiai elemzése a besugárzás után

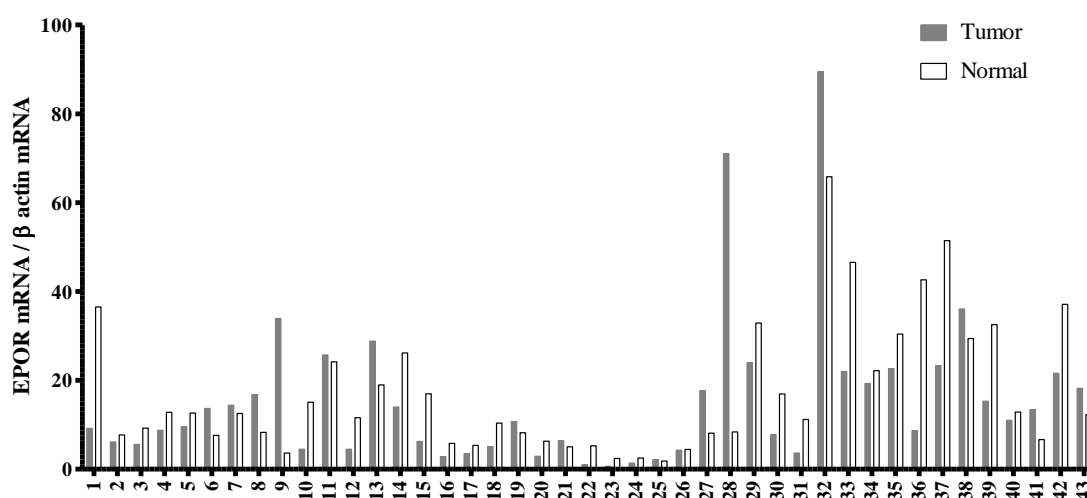


A, B Kettős immunfluoreszcencia A431 xenograftok ereire. Periciták (SMA, piros) és endotélsejtek (CD31, zöld) a kontroll (**A**) és az rHuEPO α -val kezelt állatokban (**B**) a besugárzás előtt. Látható, hogy a pericitaborítás nem folytonos az ereken (nyíl). Intratumorális erek jelölése a besugárzást követően von Willebrand-faktorral a kontroll (**C**) és az rHuEPO-val kezelt állatokban (**D**). Nyilak: roncsolt erek a besugárzás után. Mércse: 50 μ m. **E**). A roncsolt erek kvantitatív morfológiai kiértékelése a tumormintákban. * $p < 0,05$, besugárzás a kontrollhoz viszonyítva, ** $p < 0,05$, kombináció vs. sugárkezelés egyedül

4.6 EPOR-expresszió és a betegek klinikopatológiai adatai közötti összefüggések humán bronchoszkópos tüdőrákmintákban

Az *in vitro* eredményeink azt mutatták, hogy az EPO-receptor ugyan kifejeződik az általunk vizsgált tumorsejtvonalakon is, de az exogén rHuEPO-kezelés nem fokozza (sőt, egyes esetekben még csökkentette is) a sejtek proliferációs aktivitását. Ez az eredmény ellentmondott néhány korábban publikált kísérletes és klinikai adatnak, ezért mi is megvizsgáltuk az EPOR-expressziót tüdő-adenokarcinóma klinikai mintákban, összefüggést keresve a klinikopatológiai adatokkal. Korábban már leírták [190], és mi is azt tapasztaltuk, hogy az ép tüdőszövet EPOR-expressziójában is szignifikáns különbség van az egyes betegek között, ezért a tumorszövetben mért EPOR-expressziós értékeket normalizáltuk a beteg nem tumoros endobronchiális szövetében mért EPOR-expressziós szintekkel (tumor/normál, T/N, **55. ábra**). A statisztikai kiértékelések után nem találtunk összefüggést az életkor, dohányzás, nem, stádium és a kezelések tekintetében a vizsgált betegpopulációban (az adatokat nem mutatom).

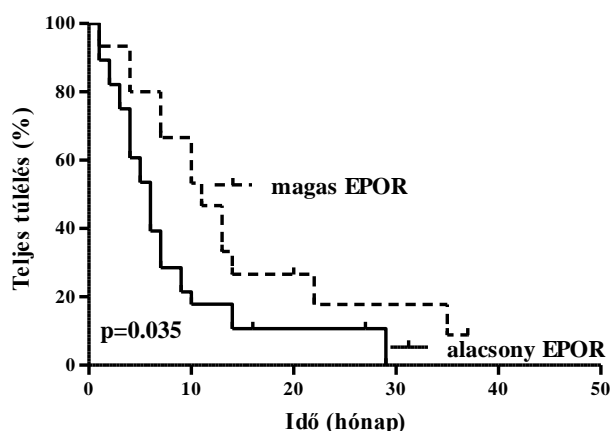
55. ábra EPOR-expresszió a tumoros (T) és a normális (N) szövetmintákban előrehaladott stádiumú tüdő-ADC-s betegekben



Kvantitatív RT-PCR mérések tüdő-adenokarcinómás betegek bronchoszkópos kefe mintáiban. Két mintát mértünk meg minden betegből, egyet a tumorból (T), egyet pedig a tumormentes, endobronchiális területről (N). Látható, hogy a normál minták között is igen nagy a szórás

Kaplan–Meier-analízissel elemeztük az előrehaladott stádiumú tüdő-adenokarcinómás betegek túlélési adatait az eltérő (magas és alacsony) EPOR-szintek függvényében. Azt tapasztaltuk, hogy 43 betegből álló mintánkban az EPOR-t a tumorsejtekben magasan expresszáló betegek túlélése szignifikánsan jobb volt, mint az alacsony EPOR-szinttel rendelkező betegeké (medián teljes túlélés 11 versus 6 hónap, $p=0,035$; **56. ábra**).

56. ábra. Az alacsony EPOR-expresszió rosszabb túléléssel párosult előrehaladott stádiumú humán tüdő-adenokarcinómában



III-IV-es stádiumú tüdő-adenokarcinómás betegek (n=43) Kaplan–Meier túlélési görbéi a kvantitatív RT-PCR-rel meghatározott, alacsony és magas EPOR-expresszió függvényében. Az alacsony expressziót az 1 alatti T/N aránnyal definiáltuk.

Ráadásul multivariáns statisztikai analízis során (bevonva az általános prognosztikai változókat: életkor, nem, tumorstádium, dohányzási szokások) azt kaptuk, hogy a kezelés előtti EPOR-szint (a nemhez és az életkorhoz hasonlóan) a többi változótól független prognosztikai faktor (p=0,031; **12. táblázat**).

12. táblázat. Előrehaladott stádiumú tüdő-adenokarcinómás betegek különböző prognosztikai faktorainak elemzése többváltozós analízissel

Paraméterek	RR	95% CI	p-érték
Életkor	1,077	(1,017-1,142)	0,012
Nem (férfi vs. nő)	0,364	(0,157-0,843)	0,018
Stage (III vs. IV)	0,615	(0,291-1,302)	0,204
Dohányzás (valaha vs. sohasem dohányzott)	0,67	(0,258-1,741)	0,342
EPOR (alacsony vs. magas)	0,431	(0,201-0,926)	0,031

RR, relatív rizikó; CI, konfidenciaintervallum

Eredményeink alapján inkább azt lehetett kijelenteni, hogy az EPOR-expresszió és az exogén rHuEPO-kezelés előnyösen befolyásolja egyes daganatok klinikai lefolyását és kezelését.

5. DISZKUSSZIÓ

A daganatok mikrokoznyezetét nagyrészt a daganatsejtek maguk hozzák létre, vagy a tumorok által generált kapcsolatok készítetik a gazdaszövet megváltozásait. A kialakuló daganat szöveti mikrokoznyezete (TME) osztódó és elhaló tumorsejtekből, tumorstrómából, tumort infiltráló erekből, a beszivárgó gyulladásoo sejtekből és számos egyéb sejttípusból, auto- és parakrin molekuláris szignálokból áll [191]. Ez egy egyedülálló környezet, amely a daganat progressziója során jelenik meg a gazdaszövettel való interakciójának eredményeként. Létrejöttét, fennmaradását és változásait alapvetően a tumorsejtek alakítják számtalan molekuláris és sejtes eseményen keresztül. Ezek között általánosan elfogadotként szerepel a korlátlan szaporodás, kitérés a növekedésgátlás alól, a lokális szöveti invázió és az áttétek megjelenése, az apoptózisrezisztencia, az érképződés beindítása, a proliferatív szignálok folyamatos fenntartása, a sejt energiaháztartásának átalakulása, immunrezisztencia, a genom instabilitása és mutációk felhalmozódása, valamint gyulladásoo reakciók fokozódása [32].

Habár már rengeteg tényel és adattal rendelkezünk a daganatok általános jellemzőiről, a daganatok kialakulásáról és túléléséről [192–194], még mindig kevés az információnk a daganatos környezetről, valamint a tumor és környezete kapcsolatáról. Pedig ahogy jobban megismertük ezeket, kiderült, hogy a környezeti elemek kritikus szerepet játszanak a rosszindulatú daganatok túlélésében és terápiájában [195].

5.1 A vér- és a nyirokérhálózatok

A normális szövetekhez hasonlóan a vér- és a nyirokérhálózatok oxigént és táplálékot szállítanak oda, valamint a szén-dioxidot és metabolikus hulladékot szállítják el a daganatokban is. Ugyanakkor ismert, hogy az intratumorális erek szerkezete különbözhet a normális szövetekben található erekétől: gyakran rigidebbek, kevésbé tűnnek jól szervezettnek és „szivároghatnak” is [196]. Ezen felül az úgynevezett angiogén kapcsoló („angiogenic switch”) folyamatosan bekapcsolt állapotban van, az új erek képződése nem áll le [197, 198]. A vér- és a nyirokérrendszernek különböző szerepeik vannak a tumorgenezis egyes szakaszaiban [199]. A tumorokban viszonylag gyorsan kialakul az oxigénhiányos állapot (hipoxia), amelyhez először megpróbálnak adaptálódni a sejtek, de aztán az osztódásukhoz muszáj új érhalózatra szert tenniük [197, 198]. Az új erek pedig nem csak az oxigén- és a tápanyagellátás szempontjából fontosak, de a tumorok áttétképzésében is elengedhetetlen szerepet játszanak [200, 201].

Saját vizsgálataink is bizonyítják, hogy a nyirokérhálózat kialakulása és a tumorok áttétképzése között szoros korreláció van nem kissejtes tüdőrákokban (NSCLC) [202]. Azt tapasztaltuk, hogy NSCLC klinikai mintákban a nyirokérdenzitás (LVD) szignifikánsan magasabb volt a tumor perifériáján azokban a mintákban, amik nyirokcsomó-metasztázisokat adtak összehasonlítva anem metasztatikus tumorokkal ($p < 0,005$) és a magas LVD korrelált a rosszabb teljes túléléssel.

A tumorokban többféle folyamatot is leírtak a beereződésük kialakulása során [11]. Ezek egy részében bizonyított az endoteliális sejtek osztódása (pl. bimbózó érképződés), amelynek a főbb molekuláris szabályozói is ismertek (VEGF-ek, PIFI, PDGF β , FGF, angiopoetinek stb.) [203–205]. Azonban a tumorok érálózatának kialakulása során több folyamatban (intusszusceptív, glomeruloid angiogenezis, posztnatális vaszkulogenezis, vaszkuláris mimikri) nincs szükség az endoteliális sejtek osztódására, amit figyelembe kell venni későbbi antiangiogén terápiák tervezésénél.

5.2 Posztnatális vaszkulogenezis: endoteliális progenitorsejtek szerepe a daganatok beereződésében

A vaszkulogenezis során az ereket borító endotélsejtek *in situ* differenciálódnak éretlen csontvelői eredetű prekursorsejtekből. Sokáig úgy gondolták, hogy ez a folyamat csak az érrendszer fejlődésének korai szakaszában fordul elő. Azonban később bebizonyosodott, hogy keringő, csontvelőből származó endoteliális őssejtek (EPC-k) jelennek meg a kóros neovaszkularizáció során, és képesek endoteliális sejtekké differenciálódni az erekben. Asahara és munkatársai leírták, hogy a tumorok hogyan képesek citokinekkal, elsősorban VEGF-fel mobilizálni ezeket a sejteket a csontvelőből [130]. De az is ismert, hogy pl. az Ang-1 csökkenti a keringő EPC-k számát [206]. Az érálózatba beépült és differenciálódott EPC-k nem csak mechanikailag vesznek részt az új erek képződésében, de bizonyított, hogy angiogén citokinek termelésében is fontos szerepet játszanak, hozzájárulva az intratumorális erek fennmaradásához, működésük stabilizálásához és továbbiak képződéséhez [207].

Bár a keringő EPC-k számának megemelkedéséről számoltak be különféle érrendszeri betegségekkel kapcsolatosan [208, 209], és számos rágcsőmodelleken végzett tanulmány is kimutatta, hogy a csontvelőből származó keringő EPC-k hozzájárulnak a daganatok vaszkularizációjához [210–212], a mai napig nem tisztázott, hogy ezeknek milyen valóságos szerepük van a tumorok beereződésében. Néhány tanulmány jelent csak meg korábban, amelyben megpróbálták kiértékelni az EPC-k jelentőségét az emberi tumorokban [213–215],

és a mi kutatócsoportunk volt az első, amelyik nem kissejtes klinikai tüdőrákmintákban (NSCLC) vizsgálta a keringő EPC-k és a daganat lefolyásának lehetséges korrelációit [212].

Vizsgálatainkban áramlási citometriával meghatároztuk a keringő EPC-k gyakoriságát, valamint valós idejű kvantitatív RT-PCR módszerrel az EPC-specifikus markerek (CD34, VEGFR2, VE-kadherin és CD133) szintjét NSCLC-s betegek perifériás vérében. Ezen felül elemeztük az EPC-k megjelenését a sebészileg eltávolított NSCLC-k érrendszerében.

Eredményeink azt mutatták, hogy a keringő EPC-k száma szignifikánsan magasabb a daganatos betegekben, összehasonlítva az egészséges kontrollokkal. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a kezelés előtti EPC-szám alacsonyabb volt olyan betegekben, akik részleges, vagy teljes remissziót értek el (válaszadók) a kezelés után, mint stabil, vagy progresszív betegségben szenvedő betegekben (nem reagálók). Azt is megállapítottuk, hogy a 15 hónapos követés után szignifikánsan magasabb volt a halálozás azokban a betegekben, akiknél magasabb volt a kezelés előtti EPC-szám. Ezek a megfigyelések alátámasztották, hogy a CD34+/VEGFR2+ EPC-k egyszeri mérése áramlási citometriával hasznos eszköze lehet a betegek kezelése kimenetelének előrejelzésére NSCLC-ben. Ez az eredményünk megfelelt a Jain és munkatársai által leírt hipotézisnek az erek normalizálásáról az anti-VEGF terápia (bevacizumab) alkalmazása után [216, 217]. Ezt a hipotézist erősítik azok a kísérletes és klinikai megfigyelések, ahol úgy találták, hogy a keringő EPC-k szintje az antiangiogén aktivitás érzékeny jelzője lehet alacsony dózisu metronomikus kemoterápia esetén rágcsálómódelben [218], vagy hogy a keringő EPC-k száma gyorsan csökken a végbélben olyan rákbetegekben, akik bevacizumabot kaptak [219]. Az adataink azt sugallták, hogy azoknál a betegekknél, akiknél alacsonyabb a kezelés előtti EPC-szám, feltehetően több a "normális" ér és jobban reagálnak a kezelésre, míg azok, akiknél magasabb az EPC-szám (az intratumorális kapillárisokban), nem reagálnak jól. Ezért az olyan betegek esetében, akiknél magas a kezelés előtti EPC-szám az anti-VEGF terápiával csökkenthető az EPC-k száma (ezzel „normalizálva” az érrendszert) a kemoterápia előtt, így potenciálisan javul a terápiás válasz is.

Ugyan sikerült kimutatnunk a keringő EPC-k számának változását, valamint beépülését a daganatos érfalba, azt feltételezve, hogy ennek mértéke a nem tumoros iszkémiás szövetekben leírtak szerinti lehet [207, 220], nem világos még mindig, hogy mekkora a szerepe az EPC-knek a daganatok beereződésében. De figyelemreméltó a diagnosztikai lehetőség a terápiamonitorozásra, sőt, akár terápiás alternatívaként is használhatóak lesznek ezek a sejtek a jövőben daganatellenes hatóanyagok célba juttatására [221, 222].

5.3 Az extracelluláris mátrix és a mikrokörnyezet

Az extracelluláris mátrix (ECM) egy dinamikus és bonyolult környezet, amelyek biofizikai, mechanikai és biokémiai tulajdonságai eltérőek az egyes szövetekben [223]. Főbb komponensei a kollagének [224–226], lamininek [227], fibronektinek [228], proteoglikánok [229] és hialuronsavak [230, 231], de az ECM-ben megtalálhatjuk a stromális és a tumorsejtek által kiválasztott citokineket, növekedési faktorokat is. Ma már közismert, hogy az ECM döntő fontosságú a tumorok növekedésében, valamint a tumorsejtek inváziójában és áttétképzésében egyaránt [232]. Ezekben a folyamatokban elengedhetetlen a sejtek motilitási képessége, és a sejtmozgás mindig ebben a háromdimenziós extracelluláris térben történik.

5.4 A sejtmozgás alapjai

A külső ingerekre adott, határozott irányú mozgás a biológiai rendszerek alapvető tulajdonsága az egysejtűektől a bonyolult, többsejtű organizmusokig. A szervezet túléléséhez elengedhetetlen a tápanyagok és más kedvező környezet felé történő elmozdulás, valamint az éhezés és általában az ellenséges körülmények elkerülése. Az első organizmusok, amelyek kifejlesztették ezt a viselkedést, egysejtűek voltak. A többsejtű organizmusok evolúciója során a sejtek a mozgási képességüket valamilyen biológiai folyamathoz (embriogenezis, a felnőttkori szövetek homeosztázisan immunválasz(adaptálták, és sejttípusokra specializálták [233–235]. Így a sejtmobilitás alapjai összefonódnak a sejtek működésével és túlélésével, amely kapcsolatok valószínűleg relevánsak a metasztázisok szempontjából is. A sejtek migrációja azonban nem egységes jelenség. Különböző fiziológiai hatásokra és környezetben a különféle sejttípusok eltérő morfológiákat, sejt-sejt kölcsönhatásokat és mozgástípusokat mutatnak. A leggyakoribb morfológiák az amómoid, a mezenhimális vagy epiteliális mozgások, amelyet egyedül vagy klaszterekben, folyadékokban vagy szilárd felületeken végeznek, ráadásul ezek között gyakran dinamikusan válhatnak is, reagálva a környezet változásaira [236]. A vándorlási dinamika ilyen sokféleségét a mozgást létrehozó erők térben és időben történő differenciált szabályozása teszi lehetővé [236].

Feltehető, hogy valamennyi sejttípus mozgásának hátterében a vezető lamella területén működő univerzális elcsúszó aktomiozin-rendszer áll, ahol az aktinszálak a sejtek letapadási helyeibe, az adhéziókba kötnek be. A sejtek elmozdulása ezekhez a külső mátrixhoz rögzített pontokhoz képest történik meg. A mozgási morfológiában talált eltérések, illetve a sebességbeli

különbség okát a citoskeletális elemek szerveződésében, és a sejtadhéziós mintázatban kell keresnünk.

Kezdeti munkáink eredményeként egy modellt írtunk le a HT1080 fibroszarkómasejtek kétdimenziós mozgására [60]. Ez a modell jelentősen különbözik a széles körben elfogadott fibroblaszt-típusú sejtmozgástól [40]. Az a megfigyelés, hogy a HT1080 sejtekben adhéziók kizárólag a sejtek élére lokalizálódtak és folyamatosan megújultak, azt jelenti, hogy a korábban feltételezettekkel ellentétben a letapadási pontok öregedése, valamint érése nem bizonyított ezen a területen. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy ezek az adhéziók az összes olyan komponenszt tartalmazták (vinkulin és a FAK), amelyek jelenléte az adhéziókban a korábbi irodalmi adatok szerint az érés jele [237, 238]. Érdekes megfigyelésünk volt, hogy a fibroblaszt-eredetű tumorsejtek nem a klasszikus fibroblaszt-típusú alakot vették fel és tartották fenn a mozgásuk során, hanem a hal keratocitákban leírt félkör alakot. Ennél a mozgásféleségnél a félkör pontjai merőlegesen mozognak a sejt éléhez képest, az elmozdulások a csúcstól a sejt hossz tengelye felé haladva egyre kisebbek. Ez azt jelenti, hogy a sejtek élén minden pont egy látszólagos ívelt utat fog követni a mozgás során (GRE-modell) [56]. A GFP-vel jelzett vinkulint kifejező HT1080 sejtekben is ezt az elmozdulást figyeltük meg mozgásuk során, amelyeket még neutrofil fragmensek mozgásában is leírtak [59]. Ez azt sugallja, hogy a modell univerzálisabb lehet. Az erő generálásáért [239] felelős aktinszálak íveket formálnak két adhéziós plakk között, amelyeknek növekedniük kell a mozgás során, a maximális méretüket a sejt hossz tengelyében elérve. Az aktinszálak polimerizációja felelős a lamellipódium kitüremkedéséért, amelyeknek kezdetben nincs orientációja. Ezen a területen megfigyelhetünk elágazó szálakat is, azonban ezeknek nem lehet szerepe a mozgás kiváltásáért felelős erő generálásában [240]. Valószínűleg az újonnan szintetizált elágazó aktinszálak többségének le kell válniuk az anyaszálról ahogy a sejt előre halad [240]. Feltételezzük, hogy ezek a leválasztott szálak nem depolimerizálódnak, helyette a miozinmolekulák szabályozása segítségével beépülnek a csúszó aktomiozin-rendszerbe. Ezt az elképzelést támogatják azok a megfigyeléseink, amelyek szerint a miozin már nagyon közel a lamellipódiumhoz megjelenik a mozgó tumorsejtekben, hasonlóan korábbi eredményekhez humán fibroblasztok esetében [241]. Ugyanakkor ellentétben áll a keratocitákkal, amelyekben a miozinmolekulák nélküli lamellipódium széles, ennél fogva a kontraktilis zóna a sejtmag előtt helyezkedik el [55, 57].

A vinkulintartalmú adhéziók eloszlása és az aktomiozinívek szerkezete a HT1080 sejtekben azt sugallja, hogy a hajtóerő centripetális irányú. Mivel ez az elrendeződés önmagában meghatározza a mozgó sejt alakját, nincs szükség a sejtmozgáshoz adhéziókra a sejtestest alatt. A lamellában lévő aktinkábelek homorú íveket képeznek, amelyek összehúzódnak

adja az erőt az előrehaladáshoz. Hasonló aktomiozínveket figyeltek meg hal keratocitákban is, ott is kizárólag a sejtest elülső részén [55, 57]. Az ívek az összehúzódásuk során egyre kevésbé lesznek homorúak, a sejt hátsó hossz tengelyében már egyenesek, vagy át is fordulhatnak. Itt a legvastagabb az aktinív, ami valószínűleg a sejtek szélén található nagy adhéziók behúzásában vesz részt. Ebben az elrendezésben minden olyan letapadási pont, amelyek nem a sejtek széli részén vannak (esetleg „farkat” képeznek a sejtnak [39]), és amikbe aktinszálak is kapcsolódnak, csak hátráltatják a sejtek elmozdulását.

A korábbi eredményeink kétdimenziós vizsgálatokban születtek. Mivel biológiailag relevánsabbnak tűnnek a háromdimenziós tesztrendszerek [242], ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük egy egyszerű 3D rendszerre. Ebben Boyden-kamrában migráltattuk a sejteket egy 10 μm vastag és 8 μm átmérőjű póruson keresztül, ami a háromdimenziós szerkezetet biztosította [243]. A háromdimenziós mozgás szervezői is az adhéziós pontok [244], valamint az erő generálásáért felelő aktomiozín-rendszer és ezek szabályozott működése. A vinkulinmolekulának kitüntetett szerepe van a sejtek mozgásában. Ez a szabályozó adapter fontos alkotója a sejtadhézióknak, kölcsönhatásban áll a talinnal és az aktinszálakkal, valamint az integrinokkal is [245–247]. A 3D kollagénmátrixban migráló sejtekben a letapadási pontokban mutatták ki, kolokalizációban a béta-1 integrinnel, a FAK-kal és az aktinszálakkal [242]. Korábbi vizsgálatok azt sugallták, hogy a különböző sejtípusokban eltérő lehet az adhéziók és az aktinszálak eloszlása a 3D mátrixban történő migráció során [248]. Ráadásul, a 2D rendszerekben megfigyeltekkel ellentétben a 3D vizsgálatokban a mozgást biztosító erő a véletlenszerűen megjelenő adhéziós plakkokon keresztül közvetítődik, bármilyen is a sejt alakja a vándorlás során [248, 249]. Tumorsejtek esetében *in vivo* megfigyelték az F-aktinban gazdag kitüremkedéseket, amelyek aztán ki is tapadnak a környezethez a mozgás frontján, és ezt követte a hátsó rész összehúzódása („motilitási ciklus” [250]). A Boyden-kamrában, GFP-vinkulinnal transzfektált HT1080 fibroszarkóma-tumorsejtekkel kapott saját eredményeink alapján elképzelt modell a 3D migrációra (24. ábra) jó kiegészítése a korábbi 2D modellünknek [60]. Mindkét modell azon a megfigyelésen alapul, hogy a letapadások csak a sejt elülső részén képződnek a mozgás során, amik a 3D rendszerben egy gyűrűben jelennek meg a póruson áthaladó tumorsejtekben. Ez a jelenség általánosnak tűnik, mivel a megfigyelt elrendeződés független a sejt vonalak típusától és a mozgás megindítására használt kemoattraktánsztól egyaránt. Az adhéziók ilyen elrendeződése kizárja, hogy az erőt generáló aktinszálak párhuzamosan fussanak a sejtmozgás irányával a pórusban. Ezt az állítást támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az aktinszálak orientációja akkor lesz párhuzamos a sejtmembránnal, amikor azok elérik a Boyden-kamra membránjának alsó felét, és elkezdnek kiterülni, azaz 2D

mozgást végeznek. Sajnos technikai okokból a póruson belül ezeket az íveket nem lehetett vizsgálni, de amiatt, hogy a pórusból éppen kilépő sejtekben ez az elrendeződés figyelhető meg feltételezhetjük, hogy a póruson belül is ez a helyzet. Az aktinívek és a letapadások folyamatosan alakulnak ki a sejtekben mindhárom körülmény között (2D és 3D migráció, kiterülés). Az aktinhálózat felelős a sejttest és a vimentinburokban található sejttag transzlokációjáért is. A mozgás és a kiterülés között az a különbség, hogy az előbbinél az aktinívek szerveződése nem szimmetrikus a teljes sejtben, ezért a húzóerő elmozdítja a sejttestet a maggal együtt egy irányba. A kiterülés (spreading) ennek megfelelően „egy mozgás minden irányba”. Így a letapadások dinamikája 2D-ben nagyon jól megfelelt a GRE-modellnek (az adhéziók az aktinívek végén folyamatosan megújulnak és időben egy görbe mentén mozognak, miközben a sejtek alakja és mérete változatlan marad [60]). Ugyanakkor a spreading során, mivel a sejtek folyamatosan növekednek, a letapadásoknak egyenes vonalban kell mozogniuk sugárirányban.

Ezek az eredményeink a sejtmozgás alapjairól megmutatták, hogy a sejtek mozgásában univerzális törvényszerűségek vannak (letapadások, aktinszálak elrendeződése, erő generálása), és ezek tumorsejtek esetében is érvényesek, bármilyen mozgásformát is lehet megfigyelni az egyes sejtek esetében.

5.5 A motilitás befolyásolása

A szolid daganatos betegek halála szinte kizárólag az áttétek miatt következik be. Az áttétek kialakulásában kiemelkedő szerepet játszik a daganatsejtek mozgási képessége [251]. Ugyan rohamosan fejlődik a sejtmozgás megismerése, rengeteg molekuláris eseményt azonosítottunk abban, azonban a klinikai gyakorlatba nagyon kisszámú próbálkozás került, amiket kifejezetten a tumorsejtek mozgékonyságának befolyásolására terveztek. Az alapvető próbálkozások a motilitás célzására a következő jelenségekre fókuszálnak: a sejtmozgás szabályozásában résztvevő molekulák és szignálútvonalak befolyásolása; a sejtmozgásra ható szolubilis molekulák (citokinek, kemokinek) és azok receptorainak gátlása; sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix (ECM) kapcsolatok gátlása; az ECM bontása [252].

Ezek között intenzíven kutatott terület a kis G-fehérjék (Rho/Rac/Cdc42) szabályozása [253], valamint a Snail, a Twist [254, 255], az src [256, 257], a VAW3 [258], a talin-1 [259, 260], a FAK [261, 262] és a kortaktin [263, 264] fehérjék működésének befolyásolása. A szolubilis molekulák közül sok adattal rendelkezünk a VEGF [203, 265], az EGF [266, 267], az SDF-1 [268, 269], a TGF β [270, 271], a TNF α [272] és a c-Met [273–275] migrációt, és ezáltal a

metasztatizálást befolyásoló hatásaikról, illetve ezek lehetséges gátlásáról. A sejt-sejt kapcsolatok befolyásolásában a kadherineknél [79, 276, 277] és a klaudinok [278–280] a legtöbbet kutatott molekulák, míg a sejt-ECM kapcsolatoknál az integrinek [281, 282], a CD44 [283, 284], a szindekán-1 [285, 286] és a mátrixbontásban szereplő MMP14 [287, 288]. Ezek a molekulák targetként szerepelnek több klinikai vizsgálatban, amelyek közül számos már fázis III-ba is eljutott [252].

A saját kutatásainkban mi is vizsgáltuk a c-Met szerepét kísérletes humán melanómamodellekben, ahol a specifikus tirozinkináz-gátló vegyület (SU11274, Pfizer Inc., San Diego, CA, USA; szintetizálva Vichem Chemie Kft, Budapest) szignifikánsan csökkentette a tumorsejtek *in vitro* motilitását és inváziós képességét, valamint az *in vivo* áttétképzést [289]. Ezen felül fej-nyaki daganatokban azt tapasztaltuk, hogy a c-Met gátlása eredményes volt cetuximabrezisztens kísérletes fej-nyaki daganatok progressziójának és metasztatizálásának gátlásában [290].

A sejtmozgás és ezáltal az áttétképzés befolyásolására ezen felül is születtek érdekes eredményeink. Az korábban is ismert volt, hogy a daganatos megbetegedésben a véralvadás zavarának is fontos szerepe van [291]. Ugyanakkor több klinikai megfigyelés is alátámasztja, hogy az antikoaguláns kezelésben részesülőknél a heparin és annak származékai késleltették a tumorprogressziót [28, 292, 293]. Ezen felül kísérletes munkák is bizonyították, hogy a heparinszármazékoknak, köztük a kismolekulású heparinoknak (LMWH) metasztatizációs-gátló hatásaik is lehetnek [102, 294, 295].

Saját kísérletes munkánkban megmutattuk, hogy a nem frakcionált (UFH) és a kismolekulású heparinok (LMWH) antimetasztatikus hatásúak humán melanómamodellekben [104], amely eredmény megerősített egy korábbi megfigyelést, amiben egér melanómamodellt használtak [102]. A jelenség magyarázatául többféle molekuláris esemény felmerült: elsősorban a véralvadás, a tumorsejt-vérlemezkék kölcsönhatások (P- és L-szelektinek), valamint az endoteliális sejtekből felszabaduló szöveti faktor útvonal inhibitor (TFPI) is [100, 295, 296].

Azonban a korábbi, egér melanómasejteken kapott eredmények nem voltak igazolhatóak humán kísérletes rendszerekben, mivel az általunk is használt HT168-M1 sejtvonal nem aggregáltatja a vérlemezkéket, és a heparinok antimetasztatikus hatása jóval kisebb dózison is igazolható volt, mint ahol a véralvadást befolyásolnák. A véralvadás lehetséges szerepének kizárását támasztja az is alá, hogy a rekombináns hirudinnak nem volt antimetasztatikus hatása a mi kísérleti modellünkben. Ugyan korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a trombin fokozta a kísérletes melanómák metasztatizálását [297, 298], és a

trombinreceptor (PAR) többféle szöveti eredetű daganatsejten (köztük melanómán) is expresszálódik [299–301], nincs adat funkcionálisan aktív PAR-expresszióról a HT168-M1 humán melanóma-sejtvonalban. Ez magyarázat lehet a hirudin hatástalanságára, valamint a tumorsejtek által kiváltott vérlemezke-aggregációs potenciál hiányára. Mindezekon felül az is dokumentált, hogy korábban vizsgált négy daganattípus közül csak egyben (tüdőrák) volt a betegség progressziója a trombintól függő, és ezáltal érzékeny az antitrombin terápia [302].

A heparinok antimetasztikus hatásának egy másik lehetséges magyarázata az L-szelektinen keresztüli kölcsönhatások a leukocitákkal [303, 304]. Azonban a tüdőkolonizáció korai fázisának morfológiai elemzése az alveoláris kapillárisokban nem mutatott kapcsolatot a tumorsejtek és a leukociták között. Eredményeink szerint a heparinok hatására a tumorsejtek a keringésben maradnak (az extravazáció blokkolása), ahol fokozott mechanikai stressznek vannak kitéve hosszabb ideig. Ezzel párhuzamosan a heparin-előkezelés gátolta a melanómasejtek kitapadását is a tüdőkapillárisokban, hozzájárulva a megfigyelt antimetasztikus hatáshoz. Az endotélsejtekhez történő kitapadás gátlását korábban mások is leírták [296], ráadásul még kísérletes rendszerekben a heparinoknak antiangiogén hatásuk is mutatkozott [96]. Mivel a mi kísérleteinkben a heparinoknak a kolonizáció korai fázisában volt hatása (4 órán belül), így valószínűtlen, hogy az angiogenezis gátlása a fő oka a heparinok antimetasztikus hatásának a kísérletes rendszerünkben. Ráadásul a tüdő az egyik legjobban vaszkularizált szerv, a daganatsejteknek általában nem kell új erek képződését indukálniuk a metasztatizálás korai szakaszában.

In vitro vizsgálataink egyik érdekes eredménye, hogy a heparinok gátolják a tumorsejtek motilitását, miközben nincs hatásuk a daganatsejtek proliferációjára, túlélésére vagy *in vitro* mátrixadhézióira. Irodalmi adatok azt sugallják, hogy a heparinok P-szelektin-közvetített antimetasztikus hatása a tumorsejtek felszínén expresszálódó heparán-szulfát proteoglikánok (HSPG-k) glükózaminoglikán-láncain keresztül érvényesül [305]. Ismert, hogy humán melanómák fokozottan kifejezik a CD44v3 és a szindekán-4 HSPG-ket, amelyek részt vesznek a daganatok progressziójában [188, 189]. Kísérletesen igazolták (részben a mi csoportunk eredményeivel), hogy mind a heparán-szulfát bioszintézisének gátlása, mind a funkcióinak megzavarása bázikus peptidekkel szignifikáns antimetasztikus hatást eredményeztek humán melanómamodellekben [306, 307]. A heparinok versenyezhetnek az ECM-komponensekkel vagy citokinekkal ezen felületi cukorcsoportok kötéséért. A tumorsejtek extravazációja kritikus jelentőségű lépés a metasztázisok kialakulásában, ahol a keringő tumorsejtek migrációs aktivitása kiemelten fontos szerepet játszik. Ezért figyelemre méltó azon megfigyelésünk, hogy a heparinok gátolják melanómasejtek migrációját és inváziós képességét mesterséges bazális

membránokon. A potenciális molekuláris mechanizmus a gátlás hátterében a heparinok hatása a heparán-szulfát proteoglikánok funkcióira [304], vagy akár közvetlenül az integrinokra. Az adatok azt jelzik, hogy a heparin közvetlenül kötődik az $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -hoz, amely a vérlemezkék uralkodó integrinje. Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy több tumorsejt-típus, beleértve az emberi melanómát is, expresszálják az ektopikus $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrint [53, 308], amit ha blokkolunk antitesttel, specifikusan gátolható a melanómasejtek migrációja *in vitro* és csökkenthető az áttétképző potenciálja *in vivo* [309].

A korábban bemutatott eltérő morfológiájú mozgástípusok is szerepet játszhatnak a heparinok hatásában. A mezenhimális/fibroblaszt típusú sejtmozgás integrinfüggő, míg az amőboid típus esetében inkább a mátrix-glükózaminoglikánok szerepét emelik ki [310, 311]. A humán melanómasejtek heparinérzékeny migrációjára vonatkozó adataink jól illeszkednek a glükózaminoglikán-függő amőboid migrációs modellbe.

Egy kollaborációs partnerünk segítségével sikerült még kisebb, 4-20 poliszacharidot tartalmazó heparinszármazékokat is tesztelnünk a melanóma rendszereinkben. Sikerült kimutatnunk, hogy a heparineredetű, rövidebb dp4 és a hosszabb dp18 oligoszacharidok melanómametasztázis-modellen vizsgálva hasonló antimetasztatikus hatást mutatnak, mint a heparin vagy az LMWH [312].

Nem világos, hogy a heparinok véralvadásgátló hatása és azok kémiai szerkezete között milyen összefüggések vannak. Az említett oligoszacharidok véralvadásra kifejtett gátló hatása a klinikailag validált parciális trombolasztin-idővel vizsgálható. Egyéb kísérletes munkák kimutatták, hogy a szintetikus pentaszacharidok képviselik a heparinláncnak azt a minimális szekvenciáját, amely képes befolyásolni a hemosztázist [313]. Ezenkívül Hasan és mtsai szerint a véralvadást gátló hatás nem valószínű, hogy érvényesül, amennyiben a szacharidlánc 14 monomernél kevesebb egységet tartalmaz, míg a 16 monomert tartalmazók már szignifikáns antikoaguláns hatással bírtak 30 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban [181]. *In vitro* migrációs vizsgálataink szerint a már legalább négy egységet tartalmazó oligoszacharidok képesek gátolni a migrációt, viszont nincs véralvadásgátló potenciáljuk. Ezzel szemben a legfeljebb 18 egységet tartalmazó oligoszacharidokról kimutatták, hogy antimigratorikus hatásúak, illetve, legalábbis a dp18 esetében, az antikoaguláns hatás is valószínű. Érdekes módon úgy tűnik, hogy ezen oligoszacharidok esetében a molekula hosszúsága és hatékonysága között összefüggés figyelhető meg. A rövidebb formák hatékonyabbnak bizonyultak a migrációt gátló aktivitás tekintetében (kivéve dp18), míg a hosszabbakra túlnyomórészt véralvadásgátló hatás jellemző. A heparán-szulfátok szerkezetére nagyfokú szekvenciadiverzitás jellemző [314], amely funkcionális heterogenitást is eredményezhet. A heparin a heparán-szulfátok S-doménjének

analógja, és főként UA(2S)-GlcNS(6S) szerkezetek triszulfatált diszacharidjainak szekvenciáiból áll [315]. Hasan és mtsai korábban publikált munkája alapján [181] elemeztük az oligoszacharidok kémiai összetételét és biológiai hatásait (**13. táblázat**). A dp4 oligoszacharid *in vitro* szignifikáns migrációt gátló, inváziót gátló, valamint *in vivo* antimetasztikus kapacitással rendelkezik, és nagyon alacsony szinten tartalmazott UAGlcNAc, UA-GlcNS és UA-GlcNAc(6S) diszacharid szekvenciákat. A dp6 oligoszacharid szintén kis mennyiségben tartalmazta ezeket a diszacharidegységeket, illetve gátolta a sejtek migrációját. Továbbá úgy tűnik, hogy a nem szulfatált és szulfatált UA-GlcNAc egységekre nincs szükség az antimigratorikus, illetve az antimetasztikus hatáshoz. Ahogy fentebb említettük, az összes vizsgált oligoszacharidban a fő diszacharidegység az UA(2S)-GlcNS(6S) volt. A vizsgált oligoszacharidok jelentős mennyiségű UA-GlcNS(6S) és UA(2S)-GlcNS(6S) diszacharidegységet tartalmaztak. Összefoglalva az oligoszacharidok szerkezeti vizsgálatával kapott eredményeinket, a migrációt gátló és antimetasztikus hatást a 2-szulfatált UA és a 6-szulfatált GlcN szekvenciák befolyásolják leginkább. Mivel az olyan oligoszacharidok, mint például a dp8 és a dp22 hatástalanok voltak, a 2-szulfatált UA és 6-szulfatált GlcN szekvenciák ugyan nélkülözhetetlenek, de nem elegendők a migrációgátló hatás kialakításához. Hosszabb oligoszacharidláncok esetén azonban a szekvenciahomológián kívül további szabályozó mechanizmusok is létezhetnek.

Az antimetasztikus hatóanyagok a metasztikus kaszkád különböző fázisait támadhatják, ezért a migrációt gátló hatású heparinszármazékok különböző lehetséges célpontokkal rendelkeznek.

Egy korábbi vizsgálatban úgy találták, hogy az MDA-MB231 humán emlőtumor-sejtvonal esetében a heparin-dodekaszacharidok hossza volt a minimálisan szükséges lánchosszúság, amely a CXCL12 ligandum gátlásán keresztül szignifikánsan csökkentette *in vitro* a CXCR4 által kiváltott migrációt [316]. A CXCR4 a kemokinreceptor-család tagja, amely a tumorsejtek és mikro környezetük közötti kommunikációban vesz részt [317], de modellünk alapján más célpontjai is létezhetnek, úgymint a rövidebb, migrációt gátló oligoszacharidok, például a dp4, dp6 és dp10.

13. táblázat. Különböző hosszúságú oligoszacharid heparinszármazékok kémiai szerkezete és biológiai hatásai

Oligoszacharid lánc hossz	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
IdoA-GlcNAc	+/-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
IdoA-GlcNS	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
IdoA-GlcNAc(6S)	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+
IdoA-GlcNS(6S)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IdoA(2S)-GlcNS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IdoA(2S)-GlcNS(6S)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Biológiai hatás</i>										
Antiproliferatív	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Migrációgátló	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Metasztázisgátló	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	n.a.	-

A felső sorok mutatják a különböző diszacharidkomponenseket, míg az oszlopok jelölik az oligoszacharidok lánc hosszát. Az alsó sorok mutatják a kapott biológiai hatást. IdoA: iduronsav; GlcNAc: N-acetil-glükózamin; GlcNS: N-szulfatált glükózamin; 6S: 6-O-szulfát; 2S: 2-O-szulfát; n.a: nincs adat

Malignus melanóma esetében, ahogy korábban említettem, egy másik lehetséges molekula, a CD44 sejtfelszíni glikoprotein szerepe is felmerül a heparinok hatásmechanizmusában, mint lehetséges közvetítő. Ennek a molekulának több splice variánsát írták le, amelyek a v3, v5, v7, v8 és v10 variábilis régiót tartalmazzák [189, 318, 319]. A CD44 legtöbb splice variánsa kondroitin-szulfát által glikozilált, míg a v3 exont tartalmazó izoformák a ser-gly-X-gly konszenzusmotívumot tartalmazzák a heparán-szulfát kötésért [307, 320]. Munkacsoportunk korábbi munkáiban egy humán melanóma-sejtvonalakat tartalmazó panelen kimutattuk a CD44H, CD44v3 és CD44v6 expresszióját, amelyeket különféle GAG-ok glikoziláltak [189]. A v3 exont tartalmazó CD44-variánsok expressziója összefügg a malignus melanómák rosszabb prognózisával. Valószínű, hogy a CD44v3-HSPG-expresszió elősegítheti a metastatikus fenotípus megjelenését a heparinkötő növekedési faktorok, különösen a HGF, a c-Met ligandumának megkötése és bemutatása révén [321, 322]. A növekedési faktorok CD44v3 által közvetített felhalmozódása a c-Met útvonal megnövekedett aktivációjához vezet, amely összefügg a melanómasejtek invazív növekedésével [323]. Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy endothelsejtekben a sejtmigráció egyik szabályozója a CD44v3 [324]. A mi eredményeink azt mutatták, hogy az anti-CD44v3 antitesttel végzett kezelés stimulálta a

melanómasejtek migrációját és invázióját. Elméletben a HS-utánzó oligoszacharidok interferálhatnak az endogén ligandumokkal [325], ami megmagyarázza, hogy a vizsgált fragmensek miként csökkentették a CD44v3 által kiváltott migrációt.

Másrészt az is ismert, hogy tumorsejtekben a CD44 család tagjai a P-szelektin ligandumaiként szolgálnak [100, 326, 327]. Ezek a szelektinek fontos szerepet játszanak a tumorsejtek extravazációjában (a véráramból a célszövetbe történő kilépésben) [100, 328, 329]. Kimutatták, hogy többféle szöveti eredetű tumorsejtek (köztük melanóma is) esetében is igaz, hogy ha megakadályozzuk a sejtek vérelemezke- és endotél P-szelektin molekulákhoz történő kötődését, akkor az legalább részben felelős a heparin antimetasztatikus hatásáért [100, 296, 330]. Esetünkben az oligoszacharidok (és az LMWH) csökkentették a humán melanómasejtek tüdőkolonizációját *in vivo*, amely hatás elérésében mind a tumorsejt-tumor niche kölcsönhatásokat, mind a P-szelektin expressziós partnereket egyaránt figyelembe kell venni.

Munkacsoportunk korábban leírta, hogy a heparinok és heparinszármazékok képesek bejutni a sejtbe, és módosíthatnak különböző citoplazmatikus és intranukleáris szabályozó mechanizmusokat [331, 332]. Korábban leírták azt is, hogy 5-10 µg/ml heparin 50%-os gátlást okozott a protein-foszfataz-1 foszfatazaktivitásában [182]. A protein-foszfataz-1 (PP1c) a miozin-foszfataz (MLCP) katalitikus alegysége, amely a sejt motilitását és alakját döntően befolyásolja [333, 334] a kontrakció szabályozásán keresztül [335, 336]. Azt találtuk, hogy a heparineredetű oligoszacharidok hasonlóan potens PP1c-inhibitorok *in vitro*, ami arra utal, hogy ezen oligoszacharidok egyik potenciális intracelluláris célpontja az MLCP lehet. Korábban kimutatták, hogy a protein-foszfatazok okadánsav általi inhibíciója a HepG2 sejtek migrációjának csökkenését okozta [337], és ebben az MLCP-aktivitás részleges gátlása is szerepet játszott. Úgy tűnik, a heparineredetű oligoszacharidok PP1c-gátló potenciálja (valószínűleg MLCP-inhibíción keresztül) hozzájárulhat ezen molekulák antimigratorikus hatásához.

A heparinok megfigyelt *in vivo* hatása klinikailag hasznosítható lehet az előrehaladott stádiumú melanóma kezelésében. Ígéretes az a megfigyelés, hogy az alacsony dózisu heparinok hasonló antimetasztatikus hatást fejtenek ki humán melanómára, mint a humán-ekvivalens dózis, miután a progresszió korai stádiumának (akár nyirok-, akár bőrterjedés) észlelését követően lehetővé teszi a gyógyszerek huzamosabb ideig (akár hónapokig) történő alkalmazását. Néhány klinikai tanulmány már szolgáltatott adatokat az LMWH közvetlen antimetasztatikus hatásáról emlő- és kismencedei daganatok esetében [338, 339], melanómában azonban nem. Ha a melanómát viszonylag kemorezisztens daganatnak tekintjük, akkor az előrehaladott betegség LMWH-terápiájának klinikai jelentősége lehet. Ráadásul a HS-utánzó

heparineredetű oligoszacharidok még ígéretesebb új lehetőséget jelenthetnek a rosszindulatú metasztatikus daganatok, köztük a malignus melanóma terápiájában, a hemosztatikus rendszerre gyakorolt jelentős moduláló hatás nélkül. Ezek a terápiák kiegészítőként alkalmazhatók a hagyományos, vagy az újabb, pl. immunterápiás alkalmazások mellett.

5.6 A hipoxia szerepe a daganatok áttétképzésében

A szolid daganatok vizsgálata során bizonyítékok egyre növekvő száma hangsúlyozza a csökkent oxigénszint fontosságát a daganatok progressziójában, valamint kemo- és sugárterápiás érzékenységében [340, 341]. Ugyanakkor az eredményekben vannak ellentmondások és bizonytalanságok is. Több tanulmány szerint a csökkent oxigénszint gátolja a daganatsejtek proliferációját [342–344], ugyanakkor mások azt tapasztalták, hogy nincs arra hatása [345]. A saját eredményeink is ezt a nem egyértelmű hatást erősítették meg: ötféle daganatsejtet vizsgálva 1% és 5% O₂-szint mellett nem volt egyértelmű a tumorsejtek proliferációjára gyakorolt hatás.

Szintén ellentmondásosak a közölt eredmények a hipoxia sejtmozgásra gyakorolt hatásaiban is. A feltételezést, miszerint a hipoxia fokozza a daganatsejtek mozgását és ezáltal a daganatok progresszióját, áttétképzését [346–348] számos kísérletes megfigyelés támasztja alá [349–351]. Ugyanakkor más tanulmányok azt mutatják, hogy a hipoxiának nincs hatása a tumorsejtek mozgási képességére [345]. Ezek az ellentmondó eredmények azt sugallták, hogy talán fontos szerepe lehet a daganatsejtek alap mozgási képességének a hipoxiára adott válaszban. Ezért először mi is meghatároztuk az alapmotilitási aktivitását öt tumorsejtvonalnak. Time-lapse videomikroszkópiát használva azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált két vastagbélkarcinóma sejtvonal (HT29, HT25) csak korlátozott migrációs képességgel rendelkezik normoxiás körülmények között is, míg a másik három sejttípus (HT168-M1, HT1080, PE/CA-PJ15) aktív sejtmozgást mutatott. A hipoxiás körülmény hatására megnőtt az eleve is aktívabb motilitással rendelkező sejtek mozgási aktivitása, ugyanakkor a két vastagbélrák-sejtvonalé nem változott. Ezt a megfigyelést megerősítettük Boyden-kamrás vizsgálatokkal is [352].

A csökkent oxigénszintre adott molekuláris válasz tanulmányozására megmértük a HIF-1 α , valamint a sejtmozgás szabályozásában résztvevő kis G-fehérjék (a RhoA, a Rac1 és a Cdc42) mRNS-szintjének, valamint a RhoA fehérje aktivitásának változását 72 órás hipoxiás (1% és 5% O₂) inkubálás után. Ebben a vizsgálatban is azt tapasztaltuk, hogy a sejtek eltérően reagáltak a csökkent oxigénszintre. A magas motilitású HT168-M1 humán melanóma-sejtvonalban mind a négy marker magasabb mRNS-expressziót mutatott. Ugyanakkor a HT1080 sejtekben 5% O₂ mellett emelkedtek, míg 1% O₂ mellett csökkentek az expressziós

szintek, a HT29 esetében pedig egyöntetűen csökkentek. Az irodalomban is ismert, hogy elhúzódó hipoxiában (12 óra, 0,5% O₂) a HIF-1 α mRNS mennyisége csökken, mivel fokozódik az expressziója az antiszensz HIF-1 α -nak, ami szabályozza az mRNS mennyiségét [353]. Az általunk használt 72 órás inkubációs periódus alatt a hipoxia hasonló választ válthatott ki egyes sejtvonalainkban. Gilkes és munkatársai korábban leírtak 3 HIF-kötőhelyet a RhoA génekben [137]. Ugyanakkor a mi vizsgálatainkban nem volt egyértelmű korreláció a HIF-1 α és a RhoA expressziója, vagy fehérjeaktivitása között.

A további vizsgálatainkhoz két sejtvonalat választottunk: a jól migráló, és a hipoxiára aktivitásfokozódással válaszoló HT168-M1-et, valamint a kevésbé motilis, és a hipoxiára nem reagáló HT29-sejtvonalakat. Mindkét vonal esetében a hipoxia hatására nőtt a HIF-1 α fehérje mennyisége a sejtekben (azaz reagáltak a csökkent oxigénszintre), ugyanakkor a RhoA és a Rac1 fehérjék expressziója csak a jól migráló humán melanómasejtekben fokozódott, míg a kevésbé motilis kolonráksejtekben csökkent.

Érdekes eredményt kaptunk az *in vivo* metasztázismodellekben is. Ebben a rendszerben a hipoxiát CoCl₂-kezeléssel mimikáltuk [354, 355], ami normoxiás körülmények között stabilizálja a HIF-1 α -t, így a sejtek úgy viselkednek, mintha csökkent oxigénszint lenne a környezetükben. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a CoCl₂ szignifikánsan fokozta a HT168-M1 melanómasejtek májkolonizációs képességét, míg a HIF-1 α gátlása csökkentette azt. Ugyanakkor a HT29 xenograftok metasztatikus potenciáljában nem láttunk változást sem a hipoxia indukciójakor, sem a HIF-1 α gátlása után.

Annak demonstrálása érdekében, hogy a HIF-1 α szerepet játszik a sejtvándorlás és az áttétképző potenciál szabályozásában, mind a két sejtvonalban shRNS-sel lecsendesítettük a HIF-1 α expresszióját. Az erősen mozgékony HT168-M1 melanómasejtekben, ahol a hipoxia fokozta a vizsgált három kis G-fehérje expresszióját mRNS- és a fehérjeszinten is, valamint a RhoA-aktivitást is, a HIF-1 α elnémítása visszaállította ezeket a változásokat. Sőt, míg a HIF-1 α -csendesített HT168-M1 sejtek migrációs képessége változatlan a normoxia alatt, a hipoxiaindukált megnövekedett motilitást a HIF-1 α elnémítása blokkolta. Ez az eredmény összhangban van korábbi megállapításokkal, ahol gliómasejtvonalakban a HIF-1 α expressziójának csökkentése gátolta a sejtek hipoxiás körülmények közötti motilitását és inváziós képességét [356].

In vivo modellekben is vizsgálták korábban a HIF-1 α csendesítésének hatását a daganatok növekedésére. Egy korábbi tanulmányban SW480 sejteket szubkután injektáltak nude egerekbe, amiket aztán HIF-1 α siRNS-sel kezeltek intraperitoneálisan. Azt tapasztalták, hogy siHIF-1 α -csoportban a tumorok térfogata jelentősen kisebb volt a negatív kontroll

csoportokhoz képest [36]. Míg ez a tanulmány bebizonyította a HIF-csendesítés pozitív hatását a primer daganatok növekedésével kapcsolatban, a saját vizsgálataink HIF-1 α érintettségét bizonyították az áttétek kialakulásában és progressziójában. A korábbi vizsgálatok többsége arra utal, hogy a hipoxiás kondíció növeli a tumorsejtek agresszivitását a kis GTPázok aktiválása révén [357, 358]. Ezekhez az eredményekhez hasonlóan a megállapításaink is ezt bizonyították a magas motilitási képességgel rendelkező HT168-M1 melanóma-sejtvonal esetében. Ugyanakkor a hipoxiának nem volt semmilyen hatása kevésbé mozgékony HT29 vastagbélrák-sejtvonal *in vivo* metasztatizálására.

Összegésként azt mondhatjuk, hogy a hipoxia által kiváltott sejtmigrációs és metasztatikus potenciálváltozások sejttípusfüggőek, amit nagyrészt a sejtek alapmotilitási aktivitása határoz meg. Ezért jó lenne megtalálni azokat a markereket, amelyek összefüggnek a sejtek mozgékonyásával, hogy egy esetleges HIF-célzó terápia hasznosságát előre jósolhassuk.

5.7 HIF-1 α -t célzó terápiás lehetőségek

A korábban bemutatott eredmények felvetik a lehetőségét annak, hogy a HIF-1 α -aktivitás befolyásolása terápiás következményekkel is járhat.

Ugyan a HIF-1 α genetikai módosulásait ritkán írták le tumorokban, az expresszójának változása többféle daganatban is befolyásolta a progressziót és a kezelések hatékonyságát [359–362]. Ráadásul többféle szignalizációs útvonalról is leírták, hogy befolyásolja a HIF-1 α expresszióját, vagy degradációját [363, 364]. A széles terápiás lehetőségeknek megfelelően számos hatóanyag áll klinikai kipróbálás alatt. Ezek többek között a HIF-1 α proteinszintézis (2-metoxi-ösztadiol – 2ME2 [365]), vagy a transzkripció gátlói (EZN-2968 antiszenz RNS [366], PX478 topoizomeráz-gátló [367]), a fehérje lebontását elősegítő molekulák (tanespymicin [368], biszfenol A [369]), vagy a sejtmagban a HIF-1 β -val való dimerizáció (PS2385 [370], akriflavin [371]), illetve a transzkripciós faktor komplex DNS-hez való kötődés gátlója (echinomycin [372]), amihez hasonlatosak a HRE elemeken keresztül történő transzkripció gátlószerei (chetomin [373], indenopirazol-2I [374]). Érdekes, hogy a HIF-1 α olyan gének kifejeződésére is hatással van, amelyek nem rendelkeznek HRE-elemekkel a génjeikben. Ezek közé tartoznak a saját munkák szempontjából különösen fontos Rho GTPáz fehérjék is [375]. Leírták, hogy a RhoA, Rac-1 és Cdc42 fehérjék aktivitására nagy hatással van a hipoxia és a HIF-1 α -expresszió is [138, 139, 376–378]. Ugyanakkor a közvetlen HIF-1 α -

szabályozás alatt álló génekkel ellentétben nem univerzális a hipoxia hatása, nagy különbségek mutatkoznak a tumorsejtek válaszreakcióiban [379].

5.8 A hipoxia korrekciója

A hipoxia/anémia jelentősége a klinikumban már régóta ismert, a daganatos megbetegedéseken felül számos más kórképben is leírták a negatív hatásait [380, 381]. A konkrét betegségekre gyakorolt hatáson felül az életminőség romlásában játszott szerepe is fontos, ezért a korrekciójára is régóta törekszenek a klinikai gyakorlatban [382–384]. 1993-ban az Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerügynöksége (FDA) jóváhagyta a rekombináns humán eritropoetin alfa (rHuEPO α) alkalmazását daganatos betegeknél, csökkentve a kemoterápiás kezelések hatására kialakuló vérszegénység miatt szükséges transfúziók számát. Nem sokkal ezután számos klinikai megfigyelés került napvilágra, amelyek azt sugallták, hogy az eritropoézist stimuláló szereknek (ESA) hátrányos hatásai lehetnek a daganatos megbetegedések lefolyására [168, 169, 385–388]. Az eredmények alapján az rHuEPO-k (α vagy β) ártalmasan befolyásolták a progressziómentes, vagy a teljes túlélést fej-nyaki, mell-, vagy méhnyakrákos betegek esetében radio-, vagy kemoterápiával történő kombinált kezelés után. Az FDA új iránymutatást adott ki az ESA-k alkalmazására daganatos betegekben, rámutatva, hogy további vizsgálatok szükségesek annak tisztázása, hogy az ESA-k alkalmazásának valóban van-e kockázata a daganatnövekedéssel összefüggésben [389].

A klinikumban megfigyelt hatások *in vitro* és *in vivo* preklinikai tesztelése során leírták, hogy az exogén rHuEPO-kezelés befolyásolja a daganatok növekedését és a terápiák hatékonyságát. Az exogén rHuEPO fokozta például a fotodinámiás terápia tumorellenes hatékonyságát [390], és helyreállította az anémia által kiváltott csökkent ciklofoszfamidérzékenységet ráegcsálómódellekben [391]. Ráadásul az rHuEPO önmagában indukálta a daganatok regresszióját és a tumorellenes immunválaszt egér mielómamódellekben [392]. Ezen felül különféle kemoterápiás szerek hatékonyabbak voltak oxigén jelenlétében [393], és tumorellenes hatásaik összefüggésben voltak a tumor perfúziójával [394]. Ugyanakkor más vizsgálatok megkérdőjelezték ezeket a pozitív hatásokat. Leírták, hogy többféle tumorsejt is expresszálja az eritropoetinreceptort, és így a citokin jelátviteli rendszer elősegítheti a daganatok növekedését [159, 395, 396]. Ezen kívül az eritropoetin jelátvitel útvonala gátlása elpusztította a petefészek- és méhnyakrák-xenograftokat [190]. Ráadásul egy ellentmondásos klinikai vizsgálatban a kutatók felfedezték, hogy azon áttétes emlőrákban szenvedő betegek esetében, akik rHuEPO-t kaptak a vérszegénység megelőzésére a

kemoterápiájuk során, magasabb volt a halálozási arány, mint a placebóval kezelt csoportban [168].

A saját vizsgálatainkban humán epidermoid (A431) és vastagbélrák (HT29) xenograftmodellek esetén az rHuEPO α -kezelés megakadályozta a vörösvértest- és a hematokritcsökkenést, de nem befolyásolta a daganatok növekedését, viszont szignifikánsan fokozta az 5-FU tumorelles hatékonyságát [397]. Annak ellenére, hogy mindkét tumorsejtvonalon kimutattuk az eritropoetinreceptort, mások eredményeivel ellentétben [159, 395, 396] az rHuEPO-kezelés nem stimulálta a daganatsejtek *in vitro* proliferációját, és nem befolyásolta az 5-FU-kezelés hatékonyságát sem a humán-ekvivalens dózisban. Ezek az eredmények viszont felvetik, hogy az *in vivo* megfigyelt érzékenyítés a kemoterápia iránt arra utal, hogy az rHuEPO-kezelés *in vivo* hatásai nem a tumorsejtekre gyakorolt közvetlen okokkal magyarázhatóak.

Korábban leírták, hogy az endoteliális sejtek expresszálják az eritropoetinreceptort, és az EPO serkenti a sejtek proliferációját és migrációját, valamint gátolja az apoptózisukat [398, 399]. Az EPO egy erős angiogén faktor, amelynek hatása összemérhető a VEGF-ével [400]. Az rHuEPO stimulálja az endotélsejtek csöképző képességét *in vitro*, és indukálja az angiogenezist csirke korioallantoiszmembrán-tesztben [401]. A saját vizsgálatainkban az rHuEPO-kezelés nem befolyásolta a humán xenograftok érsűrűségét (microvessel density – MVD), de jelentős érmegnagyobbodást váltott ki. Ennek a háttérében az állt, hogy az rHuEPO indukálta az endoteliális sejtek proliferációját. Ráadásul ezt a hatást úgy váltotta ki, hogy közben mind a gazdaszervezet-, mind a tumorsejt-eredetű VEGF expressziója csökkent. Érdekes megfigyelés volt mindeközben, hogy a szintén EPOR⁺ tumorsejtek sejtosztódásában nem következett be változás az exogén rHuEPO-kezelés hatására csakúgy, ahogy az *in vitro* tesztekben már leírtuk.

Az erek méretének növekedésével az ereket borító periciták száma nem változott, így részlegesen borított erek alakultak ki az rHuEPO-kezelés hatására. Feltételeztük, hogy ez a nagyobb felületű, de nem teljes borítással rendelkező érhálózat lehet felelős a jobb kemoterápiás hatásért, méghozzá a tumorszövet perfúziójának javításán keresztül. Ezt sikerült is igazolnunk fluoreszcens DNS-festékkel (Hoechst) és autofluoreszcens kemoterápiás szerrel (doxorubicin) egyaránt. Mindkét tesztben az rHuEPO-kezelt daganatokban szignifikánsan nagyobb területre jutott el a festék a daganatszövetben, sőt az egy egységnyi érfelületre jutó perfundált daganatszövet nagysága is nőtt. Ez az eredmény jól illeszkedik azon korábbi megfigyeléshez, hogy az eritropoetinkezelés önmagában, függetlenül a hemoglobinszinttől növeli xenograftok O₂-perfúzióját [402]. Ezek a korábbi megfigyelések, valamint a DNS-

adduktum-vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy az rHuEPO modulálja a daganatok perfúzióját, növelve a daganatellenes hatóanyagok biohasznosulását.

A daganatszövetek oxigenizáltsága, valamint az intratumorális erek mennyisége és minősége a sugárkezelést is befolyásolják [403–405]. Ráadásul kísérletes és klinikai adatok azt támasztották alá, hogy az rHuEPO-kezelés jótékony hatással volt különböző daganatok sugárkezelésére a megnövekedett intratumorális oxigénszintek miatt [406, 407]. A mi vizsgálatainkban az A431 tumor beültetése és növekedése csökkentette a hemoglobinszintet a tumoros állatokban, amit a humán-ekvivalens dózisú rHuEPO α adása kompenzált. Ezzel párhuzamosan az rHuEPO-előkezelés fokozta a xenograftok sugárérzékenységét is. Ebben a kezelési modalitásban is elvégeztük az *in vitro* vizsgálatokat, ahol megállapítottuk, hogy a tumorsejtek proliferációja kismértékben változik csak, de fokozódik az apoptózisuk és csökken a kolóniaformáló képességük az EPO-kezelés mellett adott sugárterápiában. Mivel a vizsgálatokat légköri oxigénszint mellett végeztük, az *in vitro* adatok azt támasztották alá, hogy az rHuEPO *in vivo* hatása nem csak az oxigénszinttől függhet [408].

Ahogy leírtuk, az rHuEPO-kezelés megváltoztatta az endoteliális sejtek proliferációját, valamint az intratumorális erek méretét és struktúráját. Az az irodalomban ismert volt, hogy az exogén rHuEPO-k fokozzák az endoteliális sejtek sugárérzékenységet, emelve az apoptotikus arányukat [409, 410]. Ezek mellett fontos megfigyelésünk volt, hogy az rHuEPO-kezelés csökkentette a HIF-1 α expresszióját, és ezzel párhuzamosan mind a gazdaszervezet-, mind a tumoreredetű VEGF mennyiségét. Az korábban ismert volt, hogy a VEGF gátlása fokozza az intratumorális erek érzékenységét a sugárkezelésre [411–413], és hogy szoros összefüggés lehet a HIF-1 α expressziója, valamint a HIF-1 által szabályozott citokinek és az endoteliális sejtek sugárérzékenysége között. Sőt a HIF-1 gátlása szignifikánsan képes fokozni a sugárérzékenységet, mégpedig az intratumorális erek roncsolásán keresztül [414, 415]. Ezek az eredmények megerősítik a mi megfigyeléseinket, hogy az rHuEPO-kezelés fokozta a sugárkezelés érroncsoló hatását, ami hozzájárult a daganatellenes terápia hatékonyságának fokozásához.

Mindezeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az exogén rHuEPO α , mint potenciális angiogén faktor indukálja az intratumorális erek EPOR+ endoteliális sejtjeinek a proliferációját VEGF- és HIF-független módon, ami megnövekedett méretű, de szerkezetében károsodott ereket eredményez. Ezek a sejtválaszok az EPO-kezelésre azt sugallják, hogy az rHuEPO α legalább három különféle mechanizmuson keresztül is hatással van a daganatokra: először, csökkenti az intratumorális hipoxiát, másodsor, növeli az erek méretét, ami javítja a daganat

perfúzióját oxigénnel és kemoterápiás szerekkel, harmadszor, az inkomplett érszerkezet, valamint az endoteliális sejtek érzékenyítése révén fokozza a tumorok sugárérzékenységét.

5.9 Az EPOR szerepe tüdőrákban: klinikai eredmények

Ugyan az eritropoetinreceptor (EPOR) számos sejtfeleségen, köztük daganatsejteken is megjelenik [416], az EPOR jelátvitel jelentősége a rosszindulatú daganatok progressziójában nem teljesen tisztázott. A korábban diszkutált eredményeink vulva- és kolonkarcinóma-sejtvonalakon azt mutatták, hogy az exogén EPO adása nem egyformán hat az EPOR+ tumorsejtek *in vitro* viselkedésére, vagy a daganatok *in vivo* növekedésére. További vizsgálatainkban nem kissejtes tüdőráksejtvonalakat (NSCLC) használva megállapítottuk, hogy a sejtek eltérő mértékben expresszálják az EPO-receptort, az exogén rHuEPO α (akár önmagában, vagy gemcitabinnal kombinálva) nem volt hatással az adenokarcinóma-sejtek proliferációjára *in vitro*. Ez az eredmény összhangban van más korábbi megfigyelésekkel [162–165], azonban érdekes megfigyelésünk volt, hogy a legmagasabb EPOR-expressziós szintű H1975 tumorsejtekből képzett xenograftokban az rHuEPO α önmagában is jelentősen csökkentette a tumorsejtek proliferációját és a daganatok növekedését *in vivo*. Mindeközben az EPO-kezelés ebben a modellben is fokozta az endoteliális sejtek proliferációját, aminek köszönhetően az intratumorális erek mérete is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll tumorokkal összehasonlítva. Ez az eredményünk is azt bizonyította, hogy nem elegendő egy receptor megléte valamilyen sejten ahhoz, hogy a ligandum adásától egyértelmű biológiai választ várjunk.

A kísérletes adatokhoz képest a klinikai összefüggések (betegség kimenetele, túlélés) vizsgálatára még kevesebb előzetes eredmény volt a szakirodalomban NSCLC-s betegekben [417, 418]. Ráadásul ezekben a vizsgálatokban immunhisztokémiai módszerrel mutatták ki az EPOR jelenlétét a tumormintákban, azonban az antitest specificitása később megkérdőjeleződött [419]. Mi is megpróbáltuk a sejtvonalainkban és a tumormintákban is az immunhisztokémiát, valamint Western-blotot is, ráadásul az akkor kapható valamennyi EPO-receptor elleni antitesttel (még piacon nem kapható, fejlesztés alatt állót is sikerült beszerezniünk), de sajnos vagy számos nem specifikus csíkot adó reakciót detektáltunk, vagy egyáltalán nem kaptunk jelet a tesztekben. Ezek az eredményeink megerősítették mások megfigyeléseit is [420], amire talán magyarázatot adhat az EPOR poszttranszlációs módosulásainak megjelenése is [421, 422]. Mindezek alapján a saját klinikai mintáink feldolgozásához a qRT-PCR technikát választottuk, ahol a daganatokból származó RNS-

mintákat az ugyanazon beteg egészséges tüdőszövetéből izolált expressziós mintákkal hasonlítottuk össze [423]. A megfigyelésünk a klinikai mintákban is meglepetéssel szolgált, mivel a magasabb EPOR-expressziójú daganatos betegek átlagos túlélése a követési periódusban szignifikánsan jobb volt, mint az alacsony expressziót mutató pácienseké. Egyéb kliniko-patológiai paraméterekben nem volt különbség a két betegpopuláció között. Korábban ilyen jellegű vizsgálat tüdőrákban azt mutatta, hogy nincs összefüggés a klinikai kimenetel és az EPOR-expresszió között NSCLC-ben [424].

6. KÖVETKEZTETÉS

A daganatkezelési stratégiák magukban foglalják a műtétet, a radiológiai beavatkozást és a kemoterápiát. A tumorsejtek azonban rendkívül rugalmasak és alkalmazkodhatnak az eltérő kezelésekhez, amik gyakran rezisztenciát váltanak ki [425–427]. Ráadásul ebben az alkalmazkodásban fontos szerepe van a tumorsejtek mikro környezetének (TME) is. Ez a TME nem csak a közvetlenül elérhető extracelluláris mátrixból, vagy a különböző sejtes elemekből (fibroblasztok, immunsejtek) áll, de része a keringés, az oxigén- és tápanyag-ellátottság, a különböző autokrin és parakrin szabályozó molekulák. Ezek együttesen kihatnak a tumorsejtek osztódására, motilitására, a tumorszövet beereződésére, a lokális invázióra és az áttétképzésre, a daganatellenes hatóanyagok célba juttatására, vagy a terápia rezisztenciára egyaránt. Ezért fontos mind jobban megismerni és megérteni a TME szerepét a daganatok kialakulásában és különösen a progressziójában. Már most is több olyan prediktív biomarkert írtak le, amelyek a tumorok környezetéből származnak, és amik segítségével korai diagnosztikai, vagy akár terápia monitorozási eljárások fejleszthetők. Ezen felül a környezeti elemek célzása (immunterápia, tumor metabolizmusának szabályozása, hipoxia kezelése, sejtmozgás és mátrixemésztés, valamint angiogenezis gátlása stb.), mint lehetséges daganatellenes terápia is előtérbe kerültek az utóbbi két évtizedben [428].

Meggyőződésem, hogy a jelenleg feltörekvő célzott és személyre szabott terápia fejlesztésekor elengedhetetlen a tumorsejtek környezetének célzása is, ahol figyelembe véve az eltérő szöveti környezetet, a multitarget, szinergikus terápia fejlesztése lehet a jövőbeli kutatások helyes iránya.

7. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. A tumorsejtek mozgásának modellezése során elsőként mutattuk ki, hogy egy humán fibroszarkóma-sejtvonal nem a fibroblasztokra jellemző morfológiát mutat a kétdimenziós mozgása során, hanem a hal epidermiszsejtekére. Ezt a morfológiát az úgynevezett GRE-modellel lehet leírni, ahol az adhézión pontok és az azokat összekötő, a mozgáshoz szükséges erőt generáló aktinszálak dinamikája jól jellemzett. Szintén elsőként írtuk le, hogy ez a kétdimenziós modell egy 3D vizsgálati rendszerben is helytálló és univerzálisnak tekinthető.

2. A tumorsejtek mozgásának befolyásolása témakörében végzett vizsgálataink eredményeként elmondható, hogy a heparinok (a nem frakcionált és a kismólsúlyú is) gátolják humán melanómasejtek *in vitro* migrációját és invázióját, valamint kísérletes rendszerekben az *in vivo* tüdőkolonizációját. Ez a gátlás nem függ össze a heparinok véralvadást befolyásoló hatásával, amit az is bizonyít, hogy 4-20 tagú oligoszacharidokkal is el tudtuk érni a tüdőkolóniák számának csökkenését a kezelések hatására. Az antitumorális hatásban inkább a daganatsejtek motilitási képességének, valamint a tüdőben történő kitapadásának a gátlása a fontos.

3. Leírtuk, hogy a hipoxiás környezet nem egyformán hat a különböző szöveti eredetű daganatsejtek migrációjára és áttétképzésére. A magasabb alapmotilitási képességgel rendelkező daganatsejtek hipoxiában nagyobb *in vitro* mozgási aktivitást mutattak, amely hatással volt az *in vivo* áttétképző képességükre is, szemben a kevésbé mozgékony sejtekkel, amelyek rezisztensek voltak a csökkent oxigénszint hatásaira. Kimutattuk, hogy ez a hatás HIF-1-függő, és a kis G-fehérjék (RhoA, Rac, cdc42) kulcsszerepet játszanak benne.

4. A hipoxiára adott egyik válasz az angiogenezis fokozása. A tumorok beereződése számos mechanizmuson keresztül valósul meg, amelyek közül az egyik a csontvelői őssejtekből eredő endoteliális progenitorsejtek (EPC-k) beépülése a daganatok érrendszerébe. Vizsgálataink eredményeként elsőként számoltunk be arról, hogy klinikai tüdőrákmintákban ezeknek az EPC-knek diagnosztikus és prognosztikus jelentőségük van. A daganatos betegekben megemelkedik a keringő EPC-k száma (amik beépülnek a daganatokba is), amely a hatékony kezelésre csökkenést mutat, azonban a rosszabb prognózisú esetekben még magasabbra emelkedett. Ráadásul a magasabb kezdeti EPC-szám szignifikánsan rosszabb prognózissal járt a tüdőrákos betegek esetében.

5. A hipoxia korrekciójára gyakran használnak a klinikumban rekombináns humán eritropoetint (rHuEPO-k). Vizsgálataink érdekes eredménye volt, amit elsőként írtunk le, hogy az exogén rHuEPO-kezelés hatására fokozódik az intratumorális endotélsejtek proliferációja, amely tágultabb, de szabálytalanabb szerkezetű, nagyobb felszínű ereket eredményezett, úgy, hogy az erek száma közben nem változott. Ezzel párhuzamosan nagyobb területet értek el a daganatokban a kemoterápiás szerek, fokozva ezzel azok antitumorális hatását. Ez a jótékony hatás a sugárterápiában is megmutatkozott, az rHuEPO-kezelés fokozta a daganatsejtek *in vitro* apoptózisát, csökkentette a kolóniaképző képességét, és fokozta a kísérletes daganatok *in vivo* sugárérzékenységét.

6. Az rHuEPO-k klinikai alkalmazása kétségessé vált azután, hogy számos daganatsejten is kimutatható az EPO-receptor (EPOR). Azonban a mi vizsgálataink azt mutatták, hogy az EPOR-expresszió nem jelentett rossz prognózist a kísérletes modellekben: az exogén rHuEPO-kezelés, a szintén EPOR+ endoteliális sejtekkel ellentétben nem fokozta a daganatsejtek *in vitro* proliferációját, vagy *in vivo* növekedését. Ezt klinikai mintákban is igazoltuk, elsőként leírva, hogy III-IV. stádiumú tüdő-adenokarcinómás betegek esetében épp az alacsonyabb EPOR-expresszió társult a rosszabb prognózissal.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Legelőször szeretnék köszönetet mondani Tímár József professzor úrnak, aki diplomázó koromban befogadott a SOTE I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet „Metasztázis munkacsoportjába”, ahol a szakdolgozatom készítettem, és később a PhD kutatásaim is ott végezhettem. Az inspiráló közeg kialakításában, ami később a teljes tudományos pályafutásom meghatározója lett, kiemelkedő szerepe volt Dr. Kovalszky Ilonának és Dr. Paku Sándornak, akik a szakmai példamutatáson felül emberileg is sokat adtak nekem, és megtiszteltetés számomra, hogy a mai napig barátsággal fordulhatok hozzájuk.

Hálás vagyok Lapis Károly professzor úrnak, akit még intézetigazgatóként ismerhettem meg, valamint az intézet későbbi vezetőinek, Szende Béla és Kopper László professzor uraknak, hogy támogató légkörben végezhettem a kutatómunkám. Az intézet számos munkatársa nyújtott segítséget az akkori és későbbi munkámban, amit szívből köszönök mindegyik kollégának. Név szerint is szeretném megemlíteni Jeney András professzor urat, Dr. Ladányi Andreát, Dr. Rásó Erzsébetet, Dr. Pápay Juditot, Dr. Tímár Ferencet, Dr. Dezső Katalint, Dr. Bugyik Edinát, Csorba Gézané Maricát, Oláh Lászlóné Julit, Egedi Krisztinát, Felletár Ildikót és Laczik Cecíliát, valamint PhD-s társaim: Dr. Dudás Józsefet, Dr. Babó Istvánt, Dr. Sebestyén Annát, Dr. Gallai Mónikát, később Dr. Barna Gábort.

A disszertációban szereplő legtöbb eredmény az Országos Onkológiai Intézetben végzett kutatásaim során keletkezett. Ezúton szeretném megköszönni a korábbi és a jelenlegi főigazgatónak, Kásler Miklós és Polgár Csaba professzor uraknak, valamint Nagy Péter professzor úrnak a kutatómunka támogatását és lehetőségének biztosítását az intézetben. Továbbá köszönettel tartozom a Tumorprogressziós Osztály korábbi kutatóinak és technikusainak, név szerint Dr. Dobos Juditnak, Csordás Pálnénak, Bakonyi Ildikónak és Sinka Andrásné Ibolyának, akik a szakmai segítségen felül kiváló légkört teremtettek a laborban. Hálás vagyok a Daganatpatológiai Központ korábbi és jelenlegi vezetőinek, Szentirmay Zoltán professzor úrnak, Dr. Tóth Erikának és Dr. Szőke Jánosnak, valamint munkatársaiknak, hogy a napi rutinban a minták biztosításán és kiértékelésén felül mindig fordulhattam hozzájuk segítségért. Sokat tanultam és tanulok ma is tőlük. Köszönet illeti a klinikus kollégákat, Dr. Lövey Józsefet, Dr. Remenár Évát és Dr. Dobra Mónikát, akik szakmai tudása nélkülözhetetlen volt a kutatásaimhoz, valamint Kónya Miklóst a képi adatok rögzítésében és bemutatásában nyújtott segítségéért.

tovari.jozsef_19_22

Nem születhettek volna meg ezek az eredmények a Kísérletes Farmakológiai Osztály munkatársai nélkül, akik odaadó munkája elengedhetetlen a daganatmodellek kialakításában, a kísérletek kivitelezésében. Köszönet ezért Dr. Bálintné Tátrai Enikőnek, Hegedűs Zitának, Hidvégi Anitának, Léner Violettnak, Tóth Anna Máriának, Bodrogi-Mayer Irénnek, Kovács Editnek, Bodrogi Zoltánnak, Szabó Józsefnének, Baliga Jánosnak, Honfiné Szabó Viktóriának, Strómajer Karolinának, Kovaljovné Hegedűs Mónikának, Várnai Erzsébetnek, Juhász Jánosnénak.

Rendkívül hálás vagyok a korábbi és jelenlegi TDK- és PhD-hallgatóimnak is, elsősorban Dr. Kenessey Istvánnak, akivel a mai napig szoros kapcsolatban vagyok, Dr. Bereczky Bíborkának, Dr. Szabó Balázsnak, Dr. Rózsás Anitának, Dr. Ivan Randelovićnak, Dr. Cserepes Mihálynak, Dr. Gilly Rékának, Dr. Futosi Krisztinának, Dr. Krámer Zsófiának, Dr. Simon Erikának, Dr. Horváth Lászlónak, Dr. Kárpáti Adélnak, Dr. Nelhübel Györgyinek, Dr. Kói Krisztinának, Dr. Pataki Annának, Bajtai Eszternek, Surguta Sárának, Vári-Mező Diánának, Vári Balázsnak és Svajda Laurának.

Kiemelt köszönet illeti Parragné Derecskei Katalint, aki több mint 25 éve nagy türelemmel és kiemelkedő szakmai színvonalon segíti a kutatásaim és a magánéletben is pozitív kritikával áll hozzám.

Köszönöm az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet korábbi és jelenlegi vezetőinek, valamint a Daganatbiológiai Osztály munkatársainak, Dr. Döme Balázsnak, Dr. Berta Juditnak, Dr. Török Szilviának, Kovács Ildikónak és Tisza Annának a sok éves kollaborációt és segítséget a kutatásaimban.

Köszönettel tartozom Horváth Lászlóné Siha Mónikának a pályázataim szervezéséért, valamint Faragó Dániel és Frankó Orsolya könyvtárosoknak a közleményeim rendben tartásáért.

Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak, szüleimnek, nővéremnek és családjának, feleségemnek és gyermekeimnek a feltétel nélküli, töretlen támogatásukért.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A: Cancer statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* 72 (1), 7–33 (2022).
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71 (3), 209–249 (2021).
3. Nemzeti Ráktregiszter Statisztika - online elérés: 2022.07.26., <http://stat.nrr.hu/>.
4. Központi Statisztikai Hivatal - Halálozások a gyakoribb halálokok szerint. - online elérés: 2022.07.26., https://www.ksh.hu/stadat_files/nep/hu/nep0010.html.
5. Nishio K, Arao T, Shimoyama T, Fujiwara Y, Tamura T, Saijo N: Translational studies for target-based drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56 Suppl 1 90–93 (2005).
6. Singh H, Kinarivala N, Sharma S: Multi-Targeting Anticancer Agents: Rational Approaches, Synthetic Routes and Structure Activity Relationship. *Anticancer Agents Med. Chem.* 19 (7), 842–874 (2019).
7. Stracke ML, Liotta LA: Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *Vivo Athens Greece.* 6 (4), 309–316 (1992).
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular Biology of the Cell. Garland Science 2002, p.
9. Patan S: Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neurooncol.* 50 (1–2), 1–15 (2000).
10. Risau W: Differentiation of endothelium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9 (10), 926–933 (1995).
11. **Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J: Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.* 170 (1), 1–15 (2007).**
12. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Dev. Camb. Engl.* 102 (3), 471–478 (1988).
13. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J: Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell.* 93 (5), 661–664 (1998).
14. Paku S, Sebestyén A, Kopper L: [Angiogenesis – antiangiogenesis]. *Clin. Oncol.* (2015).
15. Paku S, Paweletz N: First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 65 (3), 334–346 (1991).
16. Ribatti D, Pezzella F: Overview on the Different Patterns of Tumor Vascularization. *Cells.* 10 (3), 639 (2021).
17. Du Cheyne C, Smeets M, De Spiegelaere W: Techniques used to assess intussusceptive angiogenesis: A systematic review. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* (2021).
18. Li W, Tran V, Shaked I, Xue B, Moore T, Lightle R, Kleinfeld D, Awad IA, Ginsberg MH: Abortive intussusceptive angiogenesis causes multi-cavernous vascular malformations. *eLife.* 10 e62155 (2021).
19. Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC, Simpson JG: Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J. Pathol.* 151 (4), 323–332 (1987).
20. Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J: Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J. Pathol.* 197 (3), 355–362 (2002).
21. Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, Bégin LR, Foulkes WD, Akslen LA: Prognostic importance of glomeruloid microvascular

- proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res.* 62 (23), 6808–6811 (2002).
22. Stiver SI, Tan X, Brown LF, Hedley-Whyte ET, Dvorak HF: VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63 (8), 841–855 (2004).
 23. Döme B, Tímár J, Paku S: A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62 (6), 655–661 (2003).
 24. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F: Postnatal vasculogenesis. *Mech. Dev.* 100 (2), 157–163 (2001).
 25. Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG: The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv. Wound Care.* 2 (6), 283–295 (2013).
 26. Gao D, Nolan D, McDonnell K, Vahdat L, Benezra R, Altorki N, Mittal V: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1796 (1), 33–40 (2009).
 27. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275 (5302), 964–967 (1997).
 28. Tímár J, Paku S, Tóvári J, Döme B: [Rationale of antiangiogenic therapy]. *Magy. Onkol.* 50 (2), 141–151 (2006).
 29. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ: Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* 155 (3), 739–752 (1999).
 30. Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84 (3), 359–369 (1996).
 31. Montell DJ: Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. *Science.* 322 (5907), 1502–1505 (2008).
 32. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144 (5), 646–674 (2011).
 33. Rottner K, Faix J, Bogdan S, Linder S, Kerkhoff E: Actin assembly mechanisms at a glance. *J. Cell Sci.* 130 (20), 3427–3435 (2017).
 34. Kaverina I, Straube A: Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (9), 968–974 (2011).
 35. Li R, Gundersen GG: Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (11), 860–873 (2008).
 36. Farquhar MG, Palade GE: Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17 375–412 (1963).
 37. Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N: Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10 (4), a029181 (2018).
 38. Mishra YG, Manavathi B: Focal adhesion dynamics in cellular function and disease. *Cell. Signal.* 85 110046 (2021).
 39. Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ: Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J. Cell Biol.* 136 (6), 1287–1305 (1997).
 40. Horwitz AR, Parsons JT: Cell migration--movin' on. *Science.* 286 (5442), 1102–1103 (1999).
 41. Small JV, Rottner K: Elementary Cellular Processes Driven by Actin Assembly: Lamellipodia and Filopodia. In: *Actin-based Motility: Cellular, Molecular and Physical Aspects*. Springer Netherlands, Dordrecht (Carlier, M.-F., ed.) (2010).

42. Pollard TD, Cooper JA: Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 326 (5957), 1208–1212 (2009).
43. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ: Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83 (2), 433–473 (2003).
44. Winder SJ, Ayscough KR: Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118 (Pt 4), 651–654 (2005).
45. Higgs HN, Pollard TD: Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70 649–676 (2001).
46. Padrick SB, Doolittle LK, Brautigam CA, King DS, Rosen MK: Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (33), E472-479 (2011).
47. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM: Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (11), 793–805 (2001).
48. Liu J, Wang Y, Goh WI, Goh H, Baird MA, Ruehland S, Teo S, Bate N, Critchley DR, Davidson MW, Kanchanawong P: Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (35), E4864-4873 (2015).
49. Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM: Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*. 468 (7323), 580–584 (2010).
50. Collins KL, Gates EM, Gilchrist CL, Hoffman BD: Chapter 1 - Bio-Instructive Cues in Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: *Bio-Instructive Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Academic Press (Brown, J.L., Kumbur, S.G., and Banik, B.L., eds.) (2017).
51. Santa-Cruz Mateos C, Valencia-Expósito A, Palacios IM, Martín-Bermudo MD: Integrins regulate epithelial cell shape by controlling the architecture and mechanical properties of basal actomyosin networks. *PLoS Genet.* 16 (6), e1008717 (2020).
52. Winograd-Katz SE, Fässler R, Geiger B, Legate KR: The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (4), 273–288 (2014).
53. **Rásó E, Tóvári J, Tóth K, Paku S, Trikha M, Honn KV, Tímár J: Ectopic alphaIIb beta3 integrin signaling involves 12-lipoxygenase- and PKC-mediated serine phosphorylation events in melanoma cells. *Thromb. Haemost.* 85 (6), 1037–1042 (2001).**
54. Mogilner A, Keren K: The shape of motile cells. *Curr. Biol. CB.* 19 (17), R762-771 (2009).
55. Svitkina TM, Verkhovsky AB, McQuade KM, Borisy GG: Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J. Cell Biol.* 139 (2), 397–415 (1997).
56. Lee J, Ishihara A, Theriot JA, Jacobson K: Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature*. 362 (6416), 167–171 (1993).
57. Anderson KI, Wang YL, Small JV: Coordination of protrusion and translocation of the keratocyte involves rolling of the cell body. *J. Cell Biol.* 134 (5), 1209–1218 (1996).
58. Lee J, Leonard M, Oliver T, Ishihara A, Jacobson K: Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J. Cell Biol.* 127 (6 Pt 2), 1957–1964 (1994).
59. Mizuno T, Kagami O, Sakai T, Kawasaki K: Locomotion of neutrophil fragments occurs by graded radial extension. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 35 (4), 289–297 (1996).

60. **Paku S, Tóvári J, Lőrincz Z, Timár F, Döme B, Kopper L, Raz A, Tímár J: Adhesion dynamics and cytoskeletal structure of gliding human fibrosarcoma cells: a hypothetical model of cell migration. *Exp. Cell Res.* 290 (2), 246–253 (2003).**
61. Charo IF, Ransohoff RM: The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354 (6), 610–621 (2006).
62. Hughes CE, Nibbs RJB: A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 285 (16), 2944–2971 (2018).
63. Rosen EM, Goldberg ID: Protein factors which regulate cell motility. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* 25 (12), 1079–1087 (1989).
64. Infante E, Ridley AJ: Roles of Rho GTPases in leucocyte and leukaemia cell transendothelial migration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368 (1629), 20130013 (2013).
65. Hall A, Nobes CD: Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355 (1399), 965–970 (2000).
66. Ridley AJ: RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J. Microsc.* 251 (3), 242–249 (2013).
67. Ridley AJ, Hall A: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70 (3), 389–399 (1992).
68. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70 (3), 401–410 (1992).
69. Nobes CD, Hall A: Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81 (1), 53–62 (1995).
70. Beljan S, Herak Bosnar M, Četković H: Rho Family of Ras-Like GTPases in Early-Branching Animals. *Cells.* 9 (10), E2279 (2020).
71. Devreotes P, Horwitz AR: Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (8), a005959 (2015).
72. Narumiya S, Thumkeo D: Rho signaling research: history, current status and future directions. *FEBS Lett.* 592 (11), 1763–1776 (2018).
73. Ridley AJ: Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16 (10), 522–529 (2006).
74. Spiering D, Hodgson L: Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhes. Migr.* 5 (2), 170–180 (2011).
75. Hanna S, El-Sibai M: Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell. Signal.* 25 (10), 1955–1961 (2013).
76. Pantarelli C, Welch HCE: Rac-GTPases and Rac-GEFs in neutrophil adhesion, migration and recruitment. *Eur. J. Clin. Invest.* 48 Suppl 2 e12939 (2018).
77. Cossart P: Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell. Microbiol.* 2 (3), 195–205 (2000).
78. Miller KE, Kang PJ, Park H-O: Regulation of Cdc42 for polarized growth in budding yeast. *Microb. Cell Graz Austria.* 7 (7), 175–189 (2020).
79. Kalluri R, Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119 (6), 1420–1428 (2009).
80. Moustakas A, Heldin C-H: Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Clin. Med.* 5 (7), E63 (2016).
81. Jansen S, Gosens R, Wieland T, Schmidt M: Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond. *Pharmacol. Ther.* 183 1–21 (2018).

82. Ungefroren H, Witte D, Lehnert H: The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 247 (3), 451–461 (2018).
83. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM: The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123 (Pt 24), 4195–4200 (2010).
84. Elfenbein A, Simons M: Auxiliary and autonomous proteoglycan signaling networks. *Methods Enzymol.* 480 3–31 (2010).
85. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK: Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97 4–27 (2016).
86. Gordon MK, Hahn RA: Collagens. *Cell Tissue Res.* 339 (1), 247–257 (2010).
87. Zollinger AJ, Smith ML: Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 60–61 27–37 (2017).
88. Aumailley M: The laminin family. *Cell Adhes. Migr.* 7 (1), 48–55 (2013).
89. Theocharis AD, Karamanos NK: Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 75–76 220–259 (2019).
90. DeAngelis PL: Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2), 295–305 (2012).
91. De Pasquale V, Pavone LM: Heparan Sulfate Proteoglycan Signaling in Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18), E6588 (2020).
92. Uchimura K, Morimoto-Tomita M, Bistrup A, Li J, Lyon M, Gallagher J, Werb Z, Rosen SD: HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem.* 7 2 (2006).
93. Bedini E, Laezza A, Iadonisi A: Chemical Derivatization of Sulfated Glycosaminoglycans. *Eur. J. Org. Chem.* 2016 (18), 3018–3042 (2016).
94. Couchman JR: Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 89–114 (2010).
95. Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tsegenidis T, Karousou E, Theocharis AD, Pavão MS, Tzanakakis GN, Karamanos NK: Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* 279 (7), 1177–1197 (2012).
96. Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U: Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2 (7), 521–528 (2002).
97. Iozzo RV, Sanderson RD: Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 15 (5), 1013–1031 (2011).
98. Rodrigues JG, Balmaña M, Macedo JA, Poças J, Fernandes Â, de-Freitas-Junior JCM, Pinho SS, Gomes J, Magalhães A, Gomes C, Mereiter S, Reis CA: Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. *Cell. Immunol.* 333 46–57 (2018).
99. Bendas G, Borsig L: Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int. J. Cell Biol.* 2012 676731 (2012).
100. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A: Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (6), 3352–3357 (2001).
101. Schlesinger M, Roblek M, Ortmann K, Naggi A, Torri G, Borsig L, Bendas G: The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin. *Thromb. Res.* 133 (5), 855–862 (2014).
102. Smorenburg SM, Van Noorden CJ: The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol. Rev.* 53 (1), 93–105 (2001).

103. Green D, Hull RD, Brant R, Pineo GF: Lower mortality in cancer patients treated with low-molecular-weight versus standard heparin. *Lancet Lond. Engl.* 339 (8807), 1476 (1992).
104. **Bereczky B, Gilly R, Rásó E, Vágó A, Tímár J, Tóvári J: Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. *Clin. Exp. Metastasis.* 22 (1), 69–76 (2005).**
105. Harris AL: Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer.* 2 (1), 38–47 (2002).
106. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK: The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia Auckl. NZ.* 3 83–92 (2015).
107. Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G: Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer.* 91 (12), 2214–2221 (2001).
108. Sebestyén A, Kopper L, Dankó T, Tímár J: Hypoxia Signaling in Cancer: From Basics to Clinical Practice. *Pathol. Oncol. Res. POR.* 27 1609802 (2021).
109. Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16 (10), 1151–1162 (2002).
110. Wang GL, Semenza GL: General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (9), 4304–4308 (1993).
111. Lee P, Chandel NS, Simon MC: Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (5), 268–283 (2020).
112. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M: Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 15 (7), 1312–1314 (2001).
113. Semenza GL: Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiol. Bethesda Md.* 24 97–106 (2009).
114. Coleman ML, Ratcliffe PJ: Oxygen sensing and hypoxia-induced responses. *Essays Biochem.* 43 1–15 (2007).
115. Cserepes TM: A kemoterápia-rezisztencia jelentősége és kezelési lehetősége rosszindulatú daganatokban, <http://oatd.org/oatd/record?record=oai%3Arepo.lib.semmelweis.hu%3A123456789%2F9072&q=cserepes>, (2021).
116. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ: An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 37 (14), 4587–4602 (2009).
117. Nakayama K, Kataoka N: Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (13), E3278 (2019).
118. Slemc L, Kunej T: Transcription factor HIF1A: downstream targets, associated pathways, polymorphic hypoxia response element (HRE) sites, and initiative for standardization of reporting in scientific literature. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37 (11), 14851–14861 (2016).
119. Tsai Y-P, Wu K-J: Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. *J. Biomed. Sci.* 19 102 (2012).
120. Le Q-T, Denko NC, Giaccia AJ: Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 23 (3–4), 293–310 (2004).
121. Chan DA, Giaccia AJ: Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2), 333–339 (2007).
122. McKeown SR: Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br. J. Radiol.* 87 (1035), 20130676 (2014).

123. Kerkelä R, Karsikas S, Szabo Z, Serpi R, Magga J, Gao E, Alitalo K, Anisimov A, Sormunen R, Pietilä I, Vainio L, Koch WJ, Kivirikko KI, Myllyharju J, Koivunen P: Activation of hypoxia response in endothelial cells contributes to ischemic cardioprotection. *Mol. Cell. Biol.* 33 (16), 3321–3329 (2013).
124. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16 (9), 4604–4613 (1996).
125. Otrock ZK, Hatoum HA, Awada AH, Ishak RS, Shamseddine AI: Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: structure, regulation and clinical perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 70 (2), 93–102 (2009).
126. Eul B, Rose F, Krick S, Savai R, Goyal P, Klepetko W, Grimminger F, Weissmann N, Seeger W, Hänze J: Impact of HIF-1alpha and HIF-2alpha on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20 (1), 163–165 (2006).
127. Yoder MC: Endothelial progenitor cell: a blood cell by many other names may serve similar functions. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91 (3), 285–295 (2013).
128. Wojakowski W, Tendera M: Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes. *Folia Histochem. Cytobiol.* 43 (4), 229–232 (2005).
129. Briasoulis A, Tousoulis D, Antoniadis C, Papageorgiou N, Stefanadis C: The role of endothelial progenitor cells in vascular repair after arterial injury and atherosclerotic plaque development. *Cardiovasc. Ther.* 29 (2), 125–139 (2011).
130. Asahara T, Kawamoto A: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287 (3), C572-579 (2004).
131. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG: Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res.* 99 (7), 675–691 (2006).
132. Wojciak-Stothard B, Tsang LYF, Haworth SG: Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288 (4), L749-760 (2005).
133. Madden JA, Vadula MS, Kurup VP: Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 263 (3 Pt 1), L384-393 (1992).
134. Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G: Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 62 (9), 955–970 (2005).
135. Hall A: Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* 40 (6), 1378–1382 (2012).
136. Jaffe AB, Hall A: Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 247–269 (2005).
137. Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, Semenza GL: Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (3), E384-393 (2014).
138. Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, Semenza GL: Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (3), E384-393 (2014).
139. Zieseniss A: Hypoxia and the modulation of the actin cytoskeleton - emerging interrelations. *Hypoxia Auckl. NZ.* 2 11–21 (2014).
140. Blaschke F, Stawowy P, Goetze S, Hintz O, Gräfe M, Kintscher U, Fleck E, Graf K: Hypoxia activates beta(1)-integrin via ERK 1/2 and p38 MAP kinase in human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (4), 890–896 (2002).

141. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E: Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res.* 69 (8), 3308–3316 (2009).
142. Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC: Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression. *Mol. Biol. Cell.* 16 (4), 1901–1912 (2005).
143. Hirota K, Semenza GL: Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 276 (24), 21166–21172 (2001).
144. Xue Y, Bi F, Zhang X, Zhang S, Pan Y, Liu N, Shi Y, Yao X, Zheng Y, Fan D: Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von Hippel-Lindau suppression and HIF1alpha activation. *Int. J. Cancer.* 118 (12), 2965–2972 (2006).
145. Ludwig H, Van Belle S, Barrett-Lee P, Birgegård G, Bokemeyer C, Gascón P, Kosmidis P, Krzakowski M, Nortier J, Olmi P, Schneider M, Schrijvers D: The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990. 40 (15), 2293–2306 (2004).
146. Knight K, Wade S, Balducci L: Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am. J. Med.* 116 Suppl 7A 11S-26S (2004).
147. Groopman JE, Itri LM: Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (19), 1616–1634 (1999).
148. Bohlius J, Weingart O, Trelle S, Engert A: Cancer-related anemia and recombinant human erythropoietin--an updated overview. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3 (3), 152–164 (2006).
149. Wood PA, Hrushesky WJ: Cisplatin-associated anemia: an erythropoietin deficiency syndrome. *J. Clin. Invest.* 95 (4), 1650–1659 (1995).
150. Langer CJ, Hirsch FR, Cortés-Funes H, Sawyer ST, Thatcher N: Targeted molecular mechanisms of epoetin alfa. *Lung Cancer Amst. Neth.* 41 Suppl 1 S133-145 (2003).
151. Fisher JW: Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ.* 228 (1), 1–14 (2003).
152. Jelkmann W: Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur. J. Haematol.* 78 (3), 183–205 (2007).
153. Klingmüller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF: Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (16), 8324–8328 (1996).
154. Miura O, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN, Aoki N: Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood.* 84 (5), 1501–1507 (1994).
155. Martin KJ, Epoetin Delta 3001 Study Group: Epoetin delta in the management of renal anaemia: results of a 6-month study. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 22 (10), 3052–3054 (2007).
156. Eschbach JW, Abdulhadi MH, Browne JK, Delano BG, Downing MR, Egrie JC, Evans RW, Friedman EA, Graber SE, Haley NR: Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. Results of a phase III multicenter clinical trial. *Ann. Intern. Med.* 111 (12), 992–1000 (1989).
157. Roger SD, McMahon LP, Clarkson A, Disney A, Harris D, Hawley C, Healy H, Kerr P, Lynn K, Parnham A, Pascoe R, Voss D, Walker R, Levin A: Effects of early and late intervention with epoetin alpha on left ventricular mass among patients with chronic kidney disease (stage 3 or 4): results of a randomized clinical trial. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 15 (1), 148–156 (2004).

158. Szenajch J, Wcislo G, Jeong J-Y, Szczylik C, Feldman L: The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells From clinic to bench - a critical review. *Biochim. Biophys. Acta.* 1806 (1), 82–95 (2010).
159. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A: Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res.* 61 (9), 3561–3565 (2001).
160. Takeshita A, Shinjo K, Higuchi M, Miyawaki S, Takemoto Y, Kishimoto Y, Saito K, Takuchi H, Kuriyama K, Kimura Y, Asou N, Takahashi M, Hotta T, Kanamaru A, Ueda R, Ohno R: Quantitative expression of erythropoietin receptor (EPO-R) on acute leukaemia cells: relationships between the amount of EPO-R and CD phenotypes, in vitro proliferative response, the amount of other cytokine receptors and clinical prognosis. Japan Adult Leukaemia Study Group. *Br. J. Haematol.* 108 (1), 55–63 (2000).
161. Elliott S, Sinclair AM: The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biol. Targets Ther.* 6 163–189 (2012).
162. Berdel WE, Danhauser-Riedl S, Oberberg D, Zafferani M: Effects of hematopoietic growth factors on malignant nonhematopoietic cells. *Semin. Oncol.* 19 (2 Suppl 4), 41–45 (1992).
163. Mundt D, Berger MR, Bode G: Effect of recombinant human erythropoietin on the growth of human tumor cell lines in vitro. Micro-titer-tetrazolium assay. *Arzneimittelforschung.* 42 (1), 92–95 (1992).
164. Rosti V, Pedrazzoli P, Ponchio L, Zibera C, Novella A, Lucotti C, Della Cuna GR, Cazzola M: Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro. *Haematologica.* 78 (4), 208–212 (1993).
165. Berdel WE, Oberberg D, Reufi B, Thiel E: Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells in vitro. *Ann. Hematol.* 63 (1), 5–8 (1991).
166. Dunlop EA, Percy MJ, Boland MP, Maxwell AP, Lappin TR: Induction of signalling in non-erythroid cells by pharmacological levels of erythropoietin. *Neurodegener. Dis.* 3 (1–2), 94–100 (2006).
167. Bohlius J, Schmidlin K, Brillant C, Schwarzer G, Trelle S, Seidenfeld J, Zwahlen M, Clarke M, Weingart O, Kluge S, Piper M, Rades D, Steensma DP, Djulbegovic B, Fey MF, Ray-Coquard I, Machtay M, Moebus V, Thomas G, Untch M, Schumacher M, Egger M, Engert A: Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* 373 (9674), 1532–1542 (2009).
168. Leyland-Jones B, BEST Investigators and Study Group: Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol.* 4 (8), 459–460 (2003).
169. Henke M, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase K-D, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H: Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 362 (9392), 1255–1260 (2003).
170. Aapro M, Osterwalder B, Scherhag A, Burger HU: Epoetin-beta treatment in patients with cancer chemotherapy-induced anaemia: the impact of initial haemoglobin and target haemoglobin levels on survival, tumour progression and thromboembolic events. *Br. J. Cancer.* 101 (12), 1961–1971 (2009).
171. Hedenus M, Vansteenkiste J, Kotasek D, Austin M, Amado RG: Darbepoetin alfa for the treatment of chemotherapy-induced anemia: disease progression and survival analysis from four randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23 (28), 6941–6948 (2005).

172. Boogaerts M, Oberhoff C, Ten Bokkel Huinink W, Nowrousian MR, Hayward CRW, Burger HU: Epoetin beta (NeoRecormon) therapy in patients with solid tumours receiving platinum and non-platinum chemotherapy: a meta-analysis. *Anticancer Res.* 26 (1B), 479–484 (2006).
173. Glaspy J, Crawford J, Vansteenkiste J, Henry D, Rao S, Bowers P, Berlin JA, Tomita D, Bridges K, Ludwig H: Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes. *Br. J. Cancer.* 102 (2), 301–315 (2010).
174. Ludwig H, Crawford J, Osterborg A, Vansteenkiste J, Henry DH, Fleishman A, Bridges K, Glaspy JA: Pooled analysis of individual patient-level data from all randomized, double-blind, placebo-controlled trials of darbepoetin alfa in the treatment of patients with chemotherapy-induced anemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27 (17), 2838–2847 (2009).
175. Ladányi A, Tímár J, Paku S, Molnár G, Lapis K: Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int. J. Cancer.* 46 (3), 456–461 (1990).
176. Albin A, Paglieri I, Orenco G, Carlone S, Aluigi MG, DeMarchi R, Matteucci C, Mantovani A, Carozzi F, Donini S, Benelli R: The beta-core fragment of human chorionic gonadotrophin inhibits growth of Kaposi's sarcoma-derived cells and a new immortalized Kaposi's sarcoma cell line. *AIDS Lond. Engl.* 11 (6), 713–721 (1997).
177. Martin A, Clynes M: Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology.* 11 (1), 49–58 (1993).
178. Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 47 (12), 3239–3245 (1987).
179. Garay T, Juhász É, Molnár E, Eisenbauer M, Czirók A, Dekan B, László V, Hoda MA, Döme B, Tímár J, Klepetko W, Berger W, Hegedüs B: Cell migration or cytokinesis and proliferation?--revisiting the 'go or grow' hypothesis in cancer cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 319 (20), 3094–3103 (2013).
180. Hegedüs B, Czirók A, Fazekas I, B'abel T, Madar'asz E, Vicsek T: Locomotion and proliferation of glioblastoma cells in vitro: statistical evaluation of videomicroscopic observations. *J. Neurosurg.* 92 (3), 428–434 (2000).
181. Hasan J, Shnyder SD, Clamp AR, McGown AT, Bicknell R, Presta M, Bibby M, Double J, Craig S, Leeming D, Stevenson K, Gallagher JT, Jayson GC: Heparin octasaccharides inhibit angiogenesis in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11 (22), 8172–8179 (2005).
182. Gergely P, Erdödi F, Bot G: Heparin inhibits the activity of protein phosphatase-1. *FEBS Lett.* 169 (1), 45–48 (1984).
183. Sussman LK, Upalakalin JN, Roberts MJ, Kocher O, Benjamin LE: Blood markers for vasculogenesis increase with tumor progression in patients with breast carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 2 (3), 255–256 (2003).
184. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *Br. J. Cancer.* 77 (1), 1–10 (1998).
185. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US), Washington (DC) 2011, p.
186. Kft WKH: 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet az állatkísérletekről - Hatályos Jogszabályok Gyűjteménye. - online elérés: 2022.08.23., <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a1300040.kor>.

187. Edge SB, Compton CC: The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* 17 (6), 1471–1474 (2010).
188. Tímár J, Lapis K, Dudás J, Sebestyén A, Kopper L, Kovalszky I: Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 12 (3), 173–186 (2002).
189. Döme B, Somlai B, Ladányi A, Fazekas K, Zöller M, Tímár J: Expression of CD44v3 splice variant is associated with the visceral metastatic phenotype of human melanoma. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 439 (5), 628–635 (2001).
190. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, Fujita Y, Fujita H, Utsumi H, Matsuo T, Masuda S, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y: Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br. J. Cancer.* 84 (6), 836–843 (2001).
191. Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, Hu G, Sun Y: New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* 13 45 (2015).
192. Freitas MO, Gartner J, Rangel-Pozzo A, Mai S: Genomic Instability in Circulating Tumor Cells. *Cancers.* 12 (10), E3001 (2020).
193. Matozaki T, Kotani T, Murata Y, Saito Y: Roles of Src family kinase, Ras, and mTOR signaling in intestinal epithelial homeostasis and tumorigenesis. *Cancer Sci.* 112 (1), 16–21 (2021).
194. Zeng Z-Y, Zhou Y-H, Zhang W-L, Xiong W, Fan S-Q, Li X-L, Luo X-M, Wu M-H, Yang Y-X, Huang C, Cao L, Tang K, Qian J, Shen S-R, Li G-Y: Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway. *Hum. Pathol.* 38 (1), 120–133 (2007).
195. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, Gong Z, Zhang S, Zhou J, Cao K, Li X, Xiong W, Li G, Zeng Z, Guo C: Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer.* 8 (5), 761–773 (2017).
196. De Bock K, Cauwenberghs S, Carmeliet P: Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21 (1), 73–79 (2011).
197. Barankay T, Baumgärtl H, Lübbers DW, Seidl E: Oxygen pressure in small lymphatics. *Pflugers Arch.* 366 (1), 53–59 (1976).
198. Chovatiya R, Medzhitov R: Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol. Cell.* 54 (2), 281–288 (2014).
199. Hos D, Schlereth SL, Bock F, Heindl LM, Cursiefen C: Antilymphangiogenic therapy to promote transplant survival and to reduce cancer metastasis: what can we learn from the eye? *Semin. Cell Dev. Biol.* 38 117–130 (2015).
200. Guillaumond F, Leca J, Olivares O, Lavaut M-N, Vidal N, Berthezène P, Dusetti NJ, Loncle C, Calvo E, Turrini O, Iovanna JL, Tomasini R, Vasseur S: Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (10), 3919–3924 (2013).
201. Koshikawa N, Iyozumi A, Gassmann M, Takenaga K: Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene.* 22 (43), 6717–6724 (2003).
202. **Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B: Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11 (20), 7344–7353 (2005).**

203. Ellis LM, Hicklin DJ: VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer.* 8 (8), 579–591 (2008).
204. Crawford Y, Ferrara N: VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res.* 335 (1), 261–269 (2009).
205. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P: FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer.* 8 (12), 942–956 (2008).
206. Garmy-Susini B, Varner JA: Circulating endothelial progenitor cells. *Br. J. Cancer.* 93 (8), 855–858 (2005).
207. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S: Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (5), 733–742 (2005).
208. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G: Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N. Engl. J. Med.* 353 (10), 999–1007 (2005).
209. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A: Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45 (9), 1449–1457 (2005).
210. Davidoff AM, Ng CY, Brown P, Leary MA, Spurbeck WW, Zhou J, Horwitz E, Vanin EF, Nienhuis AW: Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7 (9), 2870–2879 (2001).
211. Bolontrade MF, Zhou R-R, Kleinerman ES: Vasculogenesis Plays a Role in the Growth of Ewing’s Sarcoma in Vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8 (11), 3622–3627 (2002).
212. **Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, Tovari J: Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 66 (14), 7341–7347 (2006).**
213. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Hoffman R, Barosi G: Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23 (24), 5688–5695 (2005).
214. Cortelezzi A, Fracchiolla NS, Mazzeo LM, Silvestris I, Pomati M, Somalvico F, Bertolini F, Mancuso P, Pruneri GC, Gianelli U, Pasquini MC, Cortiana M, Deliliers GL: Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma.* 46 (9), 1345–1351 (2005).
215. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C: Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat. Med.* 11 (3), 261–262 (2005).
216. Jain RK: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 307 (5706), 58–62 (2005).
217. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK: Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* 64 (11), 3731–3736 (2004).
218. Shaked Y, Emmenegger U, Man S, Cervi D, Bertolini F, Ben-David Y, Kerbel RS: Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood.* 106 (9), 3058–3061 (2005).

219. Willett CG, Boucher Y, Duda DG, di Tomaso E, Munn LL, Tong RT, Kozin SV, Petit L, Jain RK, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Cohen KS, Scadden DT, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Shellito PC, Mino-Kenudson M, Lauwers GY: Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23 (31), 8136–8139 (2005).
220. Yoon C-H, Hur J, Park K-W, Kim J-H, Lee C-S, Oh I-Y, Kim T-Y, Cho H-J, Kang H-J, Chae I-H, Yang H-K, Oh B-H, Park Y-B, Kim H-S: Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation.* 112 (11), 1618–1627 (2005).
221. **Dome B, Dobos J, Tovari J, Paku S, Kovacs G, Ostoros G, Timar J: Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 73 (3), 186–193 (2008).**
222. **Dome B, Timar J, Ladanyi A, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, Bogos K, Tovari J: Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 69 (2), 108–124 (2009).**
223. Gout S, Huot J: Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 1 (1), 69–83 (2008).
224. Monboisse JC, Oudart JB, Ramont L, Brassart-Pasco S, Maquart FX: Matrikines from basement membrane collagens: a new anti-cancer strategy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840 (8), 2589–2598 (2014).
225. Chelberg MK, Tsilibary EC, Hauser AR, McCarthy JB: Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration: involvement of multiple, distinct domains of the collagen molecule. *Cancer Res.* 49 (17), 4796–4802 (1989).
226. Brown E, McKee T, diTomaso E, Pluen A, Seed B, Boucher Y, Jain RK: Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. *Nat. Med.* 9 (6), 796–800 (2003).
227. Schminke B, Frese J, Bode C, Goldring MB, Miosge N: Laminins and Nidogens in the Pericellular Matrix of Chondrocytes: Their Role in Osteoarthritis and Chondrogenic Differentiation. *Am. J. Pathol.* 186 (2), 410–418 (2016).
228. Yamada KM, Olden K: Fibronectins--adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature.* 275 (5677), 179–184 (1978).
229. Kim LB, Shkurupy VA, Putyatina AN: Dynamic Structure of Proteoglycans/Glycosaminoglycans in the Lungs of Mice with Chronic Granulomatous Inflammation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 160 (4), 435–438 (2016).
230. Dahl LB, Dahl IM, Engström-Laurent A, Granath K: Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* 44 (12), 817–822 (1985).
231. Goldberg VM, Buckwalter JA: Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: evidence for disease-modifying activity. *Osteoarthritis Cartilage.* 13 (3), 216–224 (2005).
232. Zhu J, Liang L, Jiao Y, Liu L, U.S.-China Physical Sciences-Oncology Alliance: Enhanced invasion of metastatic cancer cells via extracellular matrix interface. *PLoS One.* 10 (2), e0118058 (2015).
233. Jin T, Xu X, Hereld D: Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine.* 44 (1), 1–8 (2008).

234. Charest PG, Firtel RA: Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem. J.* 401 (2), 377–390 (2007).
235. Sarris M, Sixt M: Navigating in tissue mazes: chemoattractant interpretation in complex environments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 36 93–102 (2015).
236. Te Boekhorst V, Preziosi L, Friedl P: Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32 491–526 (2016).
237. Lee J, Jacobson K: The composition and dynamics of cell-substratum adhesions in locomoting fish keratocytes. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 22) 2833–2844 (1997).
238. Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL: Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J. Cell Biol.* 153 (4), 881–888 (2001).
239. Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP: The relationship between force and focal complex development. *J. Cell Biol.* 159 (4), 695–705 (2002).
240. Pollard TD, Borisy GG: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112 (4), 453–465 (2003).
241. Verkhovsky AB, Svitkina TM, Borisy GG: Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J. Cell Biol.* 131 (4), 989–1002 (1995).
242. Niggemann B, Drell TL, Joseph J, Weidt C, Lang K, Zaenker KS, Entschladen F: Tumor cell locomotion: differential dynamics of spontaneous and induced migration in a 3D collagen matrix. *Exp. Cell Res.* 298 (1), 178–187 (2004).
243. **Tóvári J, Futosi K, Bartal A, Tátrai E, Gacs A, Kenessey I, Paku S: Boyden chamber-based method for characterizing the distribution of adhesions and cytoskeletal structure in HT1080 fibrosarcoma cells. *Cell Adhes. Migr.* 8 (5), 509–516 (2014).**
244. Geiger B, Bershadsky A: Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (5), 584–592 (2001).
245. Jockusch BM, Rüdiger M: Crosstalk between cell adhesion molecules: vinculin as a paradigm for regulation by conformation. *Trends Cell Biol.* 6 (8), 311–315 (1996).
246. Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR: The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 16 (9), 453–460 (2006).
247. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C: Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 179 (5), 1043–1057 (2007).
248. Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Siemeski A, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, Wells A, Lauffenburger DA, Matsudaira P: Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (29), 10889–10894 (2006).
249. Wolf K, Alexander S, Schacht V, Coussens LM, von Andrian UH, van Rheenen J, Deryugina E, Friedl P: Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20 (8), 931–941 (2009).
250. Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J: Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24 (2), 277–283 (2012).
251. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J: Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer.* 9 (4), 274–284 (2009).
252. Palmer TD, Ashby WJ, Lewis JD, Zijlstra A: Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (8), 568–581 (2011).
253. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO: Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 406 (6795), 532–535 (2000).

254. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP: Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 15 (5), 416–428 (2009).
255. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 117 (7), 927–939 (2004).
256. Aleshin A, Finn RS: SRC: a century of science brought to the clinic. *Neoplasia N. Y. N.* 12 (8), 599–607 (2010).
257. Bhatt AS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Craik CS, Moasser MM: Adhesion signaling by a novel mitotic substrate of src kinases. *Oncogene*. 24 (34), 5333–5343 (2005).
258. Sossey-Alaoui K, Safina A, Li X, Vaughan MM, Hicks DG, Bakin AV, Cowell JK: Down-regulation of WAVE3, a metastasis promoter gene, inhibits invasion and metastasis of breast cancer cells. *Am. J. Pathol.* 170 (6), 2112–2121 (2007).
259. Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, García-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, McGlade CJ, Liddington RC, Ginsberg MH: Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (5), 2272–2277 (2003).
260. Cantor JM, Ginsberg MH, Rose DM: Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunol. Rev.* 223 236–251 (2008).
261. Van Slambrouck S, Grijelmo C, De Wever O, Bruyneel E, Emami S, Gespach C, Steelant WFA: Activation of the FAK-src molecular scaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by alpha1-integrins during colon cancer cell invasion. *Int. J. Oncol.* 31 (6), 1501–1508 (2007).
262. Michael KE, Dumbauld DW, Burns KL, Hanks SK, García AJ: Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Mol. Biol. Cell*. 20 (9), 2508–2519 (2009).
263. Clark ES, Weaver AM: A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur. J. Cell Biol.* 87 (8–9), 581–590 (2008).
264. Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM: Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adhes. Migr.* 5 (2), 187–198 (2011).
265. Tabernero J: The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol. Cancer Res. MCR*. 5 (3), 203–220 (2007).
266. Baselga J, Arteaga CL: Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23 (11), 2445–2459 (2005).
267. Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*. 5 (5), 341–354 (2005).
268. Teicher BA, Fricker SP: CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16 (11), 2927–2931 (2010).
269. Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS: CXCR4 and cancer. *Pathol. Int.* 60 (7), 497–505 (2010).
270. Vogelmann R, Nguyen-Tat M-D, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A: TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J. Cell Sci.* 118 (Pt 20), 4901–4912 (2005).
271. Zavadil J, Böttinger EP: TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 24 (37), 5764–5774 (2005).
272. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand P-O, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon A-M, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin A-C,

- Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G: A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol.* 6 (2), 97–105 (2004).
273. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science.* 251 (4995), 802–804 (1991).
274. Comoglio PM, Trusolino L: Invasive growth: from development to metastasis. *J. Clin. Invest.* 109 (7), 857–862 (2002).
275. Trusolino L, Comoglio PM: Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat. Rev. Cancer.* 2 (4), 289–300 (2002).
276. Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, Fazli L, Wada R, Huang J, Vessella RL, An J, Horvath S, Gleave M, Rettig MB, Wainberg ZA, Reiter RE: Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat. Med.* 16 (12), 1414–1420 (2010).
277. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA: Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 60 (13), 3650–3654 (2000).
278. Singh AB, Sharma A, Dhawan P: Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J. Oncol.* 2010 541957 (2010).
279. Tabariès S, Dong Z, Annis MG, Omeroglu A, Pepin F, Ouellet V, Russo C, Hassanain M, Metrakos P, Diaz Z, Basik M, Bertos N, Park M, Guettier C, Adam R, Hallett M, Siegel PM: Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene.* 30 (11), 1318–1328 (2011).
280. Oku N, Sasabe E, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T: Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res.* 66 (10), 5251–5257 (2006).
281. Sloan EK, Pouliot N, Stanley KL, Chia J, Moseley JM, Hards DK, Anderson RL: Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res. BCR.* 8 (2), R20 (2006).
282. Chen M, O'Toole EA, Li YY, Woodley DT: Alpha 2 beta 1 integrin mediates dermal fibroblast attachment to type VII collagen via a 158-amino-acid segment of the NC1 domain. *Exp. Cell Res.* 249 (2), 231–239 (1999).
283. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M: Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J. Cell Biol.* 153 (5), 893–904 (2001).
284. Zhang Y, Thant AA, Machida K, Ichigotani Y, Naito Y, Hiraiwa Y, Senga T, Sohara Y, Matsuda S, Hamaguchi M: Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer Res.* 62 (14), 3962–3965 (2002).
285. Ding K, Lopez-Burks M, Sánchez-Duran JA, Korc M, Lander AD: Growth factor-induced shedding of syndecan-1 confers glypican-1 dependence on mitogenic responses of cancer cells. *J. Cell Biol.* 171 (4), 729–738 (2005).
286. Juuti A, Nordling S, Lundin J, Louhimo J, Haglund C: Syndecan-1 expression--a novel prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncology.* 68 (2–3), 97–106 (2005).
287. Ueda J, Kajita M, Suenaga N, Fujii K, Seiki M: Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors. *Oncogene.* 22 (54), 8716–8722 (2003).

288. Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ: Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J. Cell Biol.* 167 (4), 769–781 (2004).
289. **Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, Berta J, Adám A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Döme B, Klepetko W, Tóvári J: Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr. Cancer Drug Targets.* 10 (3), 332–342 (2010).**
290. **Nelhűbel GA, Cserepes M, Szabó B, Türk D, Kárpáti A, Kenessey I, Rásó E, Barbai T, Hegedűs Z, László V, Szokol B, Dobos J, Örfi L, Tóvári J: EGFR Alterations Influence the Cetuximab Treatment Response and c-MET Tyrosine-Kinase Inhibitor Sensitivity in Experimental Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Pathol. Oncol. Res. POR.* 27 620256 (2021).**
291. Lip GYH, Chin BSP, Blann AD: Cancer and the prothrombotic state. *Lancet Oncol.* 3 (1), 27–34 (2002).
292. Lebeau B, Chastang C, Brechot JM, Capron F, Dautzenberg B, Delaisements C, Mornet M, Brun J, Hurdebourcq JP, Lemarie E: Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. ‘Petites Cellules’ Group. *Cancer.* 74 (1), 38–45 (1994).
293. Constantini S, Kanner A, Friedman A, Shoshan Y, Israel Z, Ashkenazi E, Gertel M, Even A, Shevach Y, Shalit M, Umansky F, Rappaport ZH: Safety of perioperative minidose heparin in patients undergoing brain tumor surgery: a prospective, randomized, double-blind study. *J. Neurosurg.* 94 (6), 918–921 (2001).
294. Sciumbata T, Caretto P, Pirovano P, Pozzi P, Cremonesi P, Galimberti G, Leoni F, Marcucci F: Treatment with modified heparins inhibits experimental metastasis formation and leads, in some animals, to long-term survival. *Invasion Metastasis.* 16 (3), 132–143 (1996).
295. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL: Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 1 (9), 1972–1976 (2003).
296. Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandl C, Boehncke W-H, Zollner TM, Kaufmann R, Gille J: Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res.* 64 (8), 2743–2750 (2004).
297. Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F, Karpatkin S: Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J. Clin. Invest.* 87 (1), 229–236 (1991).
298. Esumi N, Fan D, Fidler IJ: Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res.* 51 (17), 4549–4556 (1991).
299. Booden MA, Eckert LB, Der CJ, Trejo J: Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion. *Mol. Cell. Biol.* 24 (5), 1990–1999 (2004).
300. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M: Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am. J. Pathol.* 162 (5), 1503–1513 (2003).
301. Tellez C, McCarty M, Ruiz M, Bar-Eli M: Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *J. Biol. Chem.* 278 (47), 46632–46642 (2003).
302. Hejna M, Raderer M, Zielinski CC: Inhibition of metastases by anticoagulants. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (1), 22–36 (1999).

303. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A: Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* 101 (4), 877–889 (1998).
304. Wang L, Brown JR, Varki A, Esko JD: Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J. Clin. Invest.* 110 (1), 127–136 (2002).
305. Ma YQ, Geng JG: Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 165 (1), 558–565 (2000).
306. **Tímár J, Diczházi C, Bartha I, Pogány G, Paku S, Rásó E, Tóvári J, Ladányi A, Lapis K, Kopper L: Modulation of heparan-sulphate/chondroitin-sulphate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metastatic potential of tumor cells. *Int. J. Cancer.* 62 (6), 755–761 (1995).**
307. Fazekas K, Rásó E, Zarándi M, Dudás J, Tímár J: Basic HGF-like peptides inhibit generation of liver metastases in murine and human tumor models. *Anticancer Res.* 22 (5), 2575–2579 (2002).
308. Trikha M, Timar J, Zacharek A, Nemeth JA, Cai Y, Dome B, Somlai B, Raso E, Ladanyi A, Honn KV: Role for beta3 integrins in human melanoma growth and survival. *Int. J. Cancer.* 101 (2), 156–167 (2002).
309. Trikha M, Zhou Z, Timar J, Raso E, Kennel M, Emmell E, Nakada MT: Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 62 (10), 2824–2833 (2002).
310. Wolf K, Müller R, Borgmann S, Bröcker E-B, Friedl P: Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood.* 102 (9), 3262–3269 (2003).
311. Friedl P, Wolf K: Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 3 (5), 362–374 (2003).
312. **Kenessey I, Simon E, Futosi K, Bereczky B, Kiss A, Erdödi F, Gallagher JT, Tímár J, Tóvári J: Antimigratory and antimetastatic effect of heparin-derived 4-18 unit oligosaccharides in a preclinical human melanoma metastasis model. *Thromb. Haemost.* 102 (6), 1265–1273 (2009).**
313. Héroult JP, Bernat A, Roye F, Michaux C, Schaeffer P, Bono F, Petitou M, Herbert JM: Pharmacokinetics of new synthetic heparin mimetics. *Thromb. Haemost.* 87 (6), 985–989 (2002).
314. Sasisekharan R, Venkataraman G: Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (6), 626–631 (2000).
315. Gallagher JT: Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J. Clin. Invest.* 108 (3), 357–361 (2001).
316. Mellor P, Harvey JR, Murphy KJ, Pye D, O'Boyle G, Lennard TWJ, Kirby JA, Ali S: Modulatory effects of heparin and short-length oligosaccharides of heparin on the metastasis and growth of LMD MDA-MB 231 breast cancer cells in vivo. *Br. J. Cancer.* 97 (6), 761–768 (2007).
317. Burger JA, Kipps TJ: CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 107 (5), 1761–1767 (2006).
318. Seiter S, Schadendorf D, Herrmann K, Schneider M, Rösel M, Arch R, Tilgen W, Zöller M: Expression of CD44 variant isoforms in malignant melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2 (3), 447–456 (1996).
319. Manten-Horst E, Danen EH, Smit L, Snoek M, Le Poole IC, Van Muijen GN, Pals ST, Ruiter DJ: Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and

- melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int. J. Cancer.* 64 (3), 182–188 (1995).
320. Lesley J, Hyman R: CD44 structure and function. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 3 d616-630 (1998).
 321. van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST: Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J. Biol. Chem.* 274 (10), 6499–6506 (1999).
 322. Jackson DG, Bell JI, Dickinson R, Timans J, Shields J, Whittle N: Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. *J. Cell Biol.* 128 (4), 673–685 (1995).
 323. Natali PG, Nicotra MR, Di Renzo MF, Prat M, Bigotti A, Cavaliere R, Comoglio PM: Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br. J. Cancer.* 68 (4), 746–750 (1993).
 324. Forster-Horváth C, Mészáros L, Rásó E, Döme B, Ladányi A, Morini M, Albini A, Tímár J: Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvasc. Res.* 68 (2), 110–118 (2004).
 325. Lindahl U: Heparan sulfate-protein interactions--a concept for drug design? *Thromb. Haemost.* 98 (1), 109–115 (2007).
 326. Alves CS, Burdick MM, Thomas SN, Pawar P, Konstantopoulos K: The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294 (4), C907-916 (2008).
 327. Napier SL, Healy ZR, Schnaar RL, Konstantopoulos K: Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J. Biol. Chem.* 282 (6), 3433–3441 (2007).
 328. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A: Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (4), 2193–2198 (2002).
 329. Thomas SN, Schnaar RL, Konstantopoulos K: Podocalyxin-like protein is an E-/L-selectin ligand on colon carcinoma cells: comparative biochemical properties of selectin ligands in host and tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296 (3), C505-513 (2009).
 330. Stevenson JL, Varki A, Borsig L: Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects. *Thromb. Res.* 120 Suppl 2 S107-111 (2007).
 331. Timar J, Moczar M, Lapis K, Moczar E: Interactions of exogenous heparan sulfate with tumor cells of different metastatic phenotype. *Invasion Metastasis.* 10 (5), 301–315 (1990).
 332. **Kovalszky I, Dudás J, Oláh-Nagy J, Pogány G, Tövény J, Timár J, Kopper L, Jeney A, Iozzo RV: Inhibition of DNA topoisomerase I activity by heparan sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Biochem.* 183 (1–2), 11–23 (1998).**
 333. Wakatsuki T, Wysolmerski RB, Elson EL: Mechanics of cell spreading: role of myosin II. *J. Cell Sci.* 116 (Pt 8), 1617–1625 (2003).
 334. Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F: Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 279 (36), 37211–37214 (2004).

335. Hirano K, Derkach DN, Hirano M, Nishimura J, Kanaide H: Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol. Cell. Biochem.* 248 (1–2), 105–114 (2003).
336. Somlyo AP, Somlyo AV: Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* 522 Pt 2 177–185 (2000).
337. Lontay B, Kiss A, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F: Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell. Signal.* 17 (10), 1265–1275 (2005).
338. Thodiyil P, Kakkar AK: Can low-molecular-weight heparins improve outcome in patients with cancer? *Cancer Treat. Rev.* 28 (3), 151–155 (2002).
339. von Tempelhoff GF, Harenberg J, Niemann F, Hommel G, Kirkpatrick CJ, Heilmann L: Effect of low molecular weight heparin (Certoparin) versus unfractionated heparin on cancer survival following breast and pelvic cancer surgery: A prospective randomized double-blind trial. *Int. J. Oncol.* 16 (4), 815–824 (2000).
340. Rohwer N, Cramer T: Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 14 (3), 191–201 (2011).
341. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW: Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2), 241–248 (2007).
342. Hongo K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Kaneko M, Hiyoshi M, Muroto K, Tada N, Nirei T, Sunami E, Takahashi K, Nagawa H, Kitayama J, Watanabe T: Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition. *J. Surg. Res.* 182 (1), 75–84 (2013).
343. Yu L, Hales CA: Long-term exposure to hypoxia inhibits tumor progression of lung cancer in rats and mice. *BMC Cancer.* 11 331 (2011).
344. Muroto K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Hongo K, Kaneko M, Hiyoshi M, Tada N, Nirei T, Sunami E, Takahashi K, Kitayama J: SN-38 overcomes chemoresistance of colorectal cancer cells induced by hypoxia, through HIF1alpha. *Anticancer Res.* 32 (3), 865–872 (2012).
345. Wang X, Schneider A: HIF-2alpha-mediated activation of the epidermal growth factor receptor potentiates head and neck cancer cell migration in response to hypoxia. *Carcinogenesis.* 31 (7), 1202–1210 (2010).
346. Noda S, Yashiro M, Nshii T, Hirakawa K: Hypoxia upregulates adhesion ability to peritoneum through a transforming growth factor-beta-dependent mechanism in diffuse-type gastric cancer cells. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990.* 46 (5), 995–1005 (2010).
347. Zhao X-Y, Chen T-T, Xia L, Guo M, Xu Y, Yue F, Jiang Y, Chen G-Q, Zhao K-W: Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis.* 31 (8), 1367–1375 (2010).
348. Ryu MH, Park HM, Chung J, Lee CH, Park HR: Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393 (1), 11–15 (2010).
349. Rofstad EK, Galappathi K, Mathiesen B, Ruud E-BM: Fluctuating and diffusion-limited hypoxia in hypoxia-induced metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13 (7), 1971–1978 (2007).
350. Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP: Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Res.* 61 (24), 8903–8908 (2001).

351. Cairns RA, Hill RP: Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Res.* 64 (6), 2054–2061 (2004).
352. **Tátrai E, Bartal A, Gacs A, Paku S, Kenessey I, Garay T, Hegedűs B, Molnár E, Cserepes MT, Hegedűs Z, Kucsma N, Szakács G, Tóvári J: Cell type-dependent HIF1 α -mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumor cells. *Oncotarget.* 8 (27), 44498–44510 (2017).**
353. Uchida T, Rossignol F, Matthy MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C: Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* 279 (15), 14871–14878 (2004).
354. Zhang Y-B, Wang X, Meister EA, Gong K-R, Yan S-C, Lu G-W, Ji X-M, Shao G: The effects of CoCl₂ on HIF-1 α protein under experimental conditions of autoprogressive hypoxia using mouse models. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (6), 10999–11012 (2014).
355. Dai M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R: Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. *J. Pineal Res.* 44 (2), 121–126 (2008).
356. Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, Nagato S, Furukawa K, Teraoka M, Seno T, Oka K, Iwata S, Ohnishi T: Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int. J. Oncol.* 30 (4), 793–802 (2007).
357. Thews O, Wolloscheck T, Dillenburg W, Kraus S, Kelleher DK, Konerding MA, Vaupel P: Microenvironmental adaptation of experimental tumours to chronic vs acute hypoxia. *Br. J. Cancer.* 91 (6), 1181–1189 (2004).
358. Alqawi O, Wang HP, Espiritu M, Singh G: Chronic hypoxia promotes an aggressive phenotype in rat prostate cancer cells. *Free Radic. Res.* 41 (7), 788–797 (2007).
359. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH: The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene.* 22 (21), 3213–3220 (2003).
360. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL: Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res.* 61 (7), 2911–2916 (2001).
361. Wilson WR, Hay MP: Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 11 (6), 393–410 (2011).
362. Fu XS, Choi E, Bublely GJ, Balk SP: Identification of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. *The Prostate.* 63 (3), 215–221 (2005).
363. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET: Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Research.* 7 307 (2018).
364. Semenza GL: HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* 8 (4 Suppl), S62-67 (2002).
365. Liu X, Chen Z, Xu C, Leng X, Cao H, Ouyang G, Xiao W: Repression of hypoxia-inducible factor α signaling by Set7-mediated methylation. *Nucleic Acids Res.* 43 (10), 5081–5098 (2015).
366. Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, Sapra P, Westergaard M, Frydenlund HF, Albaek C, Schröder H, Ørum H: A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1 α , EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol. Cancer Ther.* 7 (11), 3598–3608 (2008).
367. Lee K, Kim HM: A novel approach to cancer therapy using PX-478 as a HIF-1 α inhibitor. *Arch. Pharm. Res.* 34 (10), 1583–1585 (2011).

368. Ibrahim NO, Hahn T, Franke C, Stiehl DP, Wirthner R, Wenger RH, Katschinski DM: Induction of the hypoxia-inducible factor system by low levels of heat shock protein 90 inhibitors. *Cancer Res.* 65 (23), 11094–11100 (2005).
369. Kubo T, Maezawa N, Osada M, Katsumura S, Funae Y, Imaoka S: Bisphenol A, an environmental endocrine-disrupting chemical, inhibits hypoxic response via degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318 (4), 1006–1011 (2004).
370. Scheuermann TH, Tomchick DR, Machius M, Guo Y, Bruick RK, Gardner KH: Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2), 450–455 (2009).
371. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL: Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (42), 17910–17915 (2009).
372. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, Fisher RJ, Shoemaker RH, Melillo G: Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res.* 65 (19), 9047–9055 (2005).
373. Kung AL, Zabrudoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, Cornell-Kennon S, Lee J, Wang B, Wang J, Memmert K, Naegeli H-U, Petersen F, Eck MJ, Bair KW, Wood AW, Livingston DM: Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway. *Cancer Cell.* 6 (1), 33–43 (2004).
374. Minegishi H, Fukashiro S, Ban HS, Nakamura H: Discovery of Indenopyrazoles as a New Class of Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 4 (2), 297–301 (2013).
375. Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420 (6916), 629–635 (2002).
376. Vogel S, Wottawa M, Farhat K, Zieseniss A, Schnelle M, Le-Huu S, von Ahlen M, Malz C, Camenisch G, Katschinski DM: Prolyl hydroxylase domain (PHD) 2 affects cell migration and F-actin formation via RhoA/rho-associated kinase-dependent cofilin phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 285 (44), 33756–33763 (2010).
377. Zhou J, Dehne N, Brüne B: Nitric oxide causes macrophage migration via the HIF-1-stimulated small GTPases Cdc42 and Rac1. *Free Radic. Biol. Med.* 47 (6), 741–749 (2009).
378. Turcotte S, Desrosiers RR, Béliveau R: HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J. Cell Sci.* 116 (Pt 11), 2247–2260 (2003).
379. Olbryt M, Habryka A, Student S, Jarzab M, Tyszkiewicz T, Lisowska KM: Global gene expression profiling in three tumor cell lines subjected to experimental cycling and chronic hypoxia. *PloS One.* 9 (8), e105104 (2014).
380. Gattas BS, Ibetoh CN, Stratulat E, Liu F, Wuni GY, Bahuva R, Shafiq MA, Gordon DK: The Impact of Low Hemoglobin Levels on Cognitive Brain Functions. *Cureus.* 12 (11), e11378 (2020).
381. Cappellini MD, Motta I: Anemia in Clinical Practice-Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging? *Semin. Hematol.* 52 (4), 261–269 (2015).
382. Beusterien KM, Nissenson AR, Port FK, Kelly M, Steinwald B, Ware JE: The effects of recombinant human erythropoietin on functional health and well-being in chronic dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 7 (5), 763–773 (1996).
383. Phrommintikul A, Haas SJ, Elsik M, Krum H: Mortality and target haemoglobin concentrations in anaemic patients with chronic kidney disease treated with erythropoietin: a meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* 369 (9559), 381–388 (2007).

384. Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H, Verma A: Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am. J. Pathol.* 162 (6), 1789–1806 (2003).
385. Ritz E, Laville M, Bilous RW, O'Donoghue D, Scherhag A, Burger U, de Alvaro F, Anemia Correction in Diabetes Study Investigators: Target level for hemoglobin correction in patients with diabetes and CKD: primary results of the Anemia Correction in Diabetes (ACORD) Study. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 49 (2), 194–207 (2007).
386. Henke M, Mattern D, Pepe M, Bézay C, Weissenberger C, Werner M, Pajonk F: Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24 (29), 4708–4713 (2006).
387. Temkin SM, Hellmann M, Serur E, Lee Y-C, Abulafia O: Erythropoietin administration during primary treatment for locally advanced cervical carcinoma is associated with poor response to radiation. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* 16 (5), 1855–1861 (2006).
388. Leo C, Horn L-C, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, Höckel M: Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12 (23), 6894–6900 (2006).
389. Research C for DE and: FDA Drug Safety Communication: Erythropoiesis-Stimulating Agents (ESAs): Procrit, Epogen and Aranesp, <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/fda-drug-safety-communication-erythropoiesis-stimulating-agents-esas-procrit-epogen-and-aranesp>.
390. Gołab J, Olszewska D, Mróz P, Kozar K, Kamiński R, Jalili A, Jakóbisiak M: Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8 (5), 1265–1270 (2002).
391. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P: Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res.* 61 (4), 1358–1361 (2001).
392. Mittelman M, Neumann D, Peled A, Kanter P, Haran-Ghera N: Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (9), 5181–5186 (2001).
393. Littlewood TJ: The impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer. *Semin. Oncol.* 28 (2 Suppl 8), 49–53 (2001).
394. ten Hagen TLM, Eggermont AMM: Manipulation of the tumour-associated vasculature to improve tumour therapy. *J. Liposome Res.* 12 (1–2), 149–154 (2002).
395. Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P: Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 83 (10), 1477–1487 (2003).
396. Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA: Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (4), 999–1007 (2003).
397. **Tóvári J, Gilly R, Rásó E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó A, Tímár J: Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res.* 65 (16), 7186–7193 (2005).**
398. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M: Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (15), 5978–5982 (1990).

399. Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, Blanca I, Weisinger JR, Rothstein M, Bellorin-Font E: Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney Int.* 55 (2), 546–553 (1999).
400. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck K-H: Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc. Res.* 64 (2), 326–333 (2002).
401. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell’Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F: Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood.* 93 (8), 2627–2636 (1999).
402. Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Snyder SA, Broadwater G, Farrell F, Jolliffe L, Brizel DM, Dewhirst MW: Human recombinant erythropoietin significantly improves tumor oxygenation independent of its effects on hemoglobin. *Cancer Res.* 63 (19), 6162–6165 (2003).
403. Lavey RS: Clinical trial experience using erythropoietin during radiation therapy. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft Al.* 174 Suppl 4 24–30 (1998).
404. Reichel O, Panzer M, Wimmer C, Dühmke E, Kastenbauer E, Suckfüll M: Prognostic implications of hemoglobin levels before and after surgery as well as before and after radiochemotherapy for head and neck tumors. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 260 (5), 248–253 (2003).
405. Lövey J, Lukits J, Remenár E, Koronczay K, Kásler M, Németh G, Tímár J: Antiangiogenic effects of radiotherapy but not initial microvessel density predict survival in inoperable oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft Al.* 182 (3), 149–156 (2006).
406. Stüben G, Thews O, Pöttgen C, Knühmann K, Sack H, Stuschke M, Vaupel P: Impact of anemia prevention by recombinant human erythropoietin on the sensitivity of xenografted glioblastomas to fractionated irradiation. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft Al.* 179 (9), 620–625 (2003).
407. Vaupel P, Mayer A, Höckel M: Impact of hemoglobin levels on tumor oxygenation: the higher, the better? *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft Al.* 182 (2), 63–71 (2006).
408. **Lövey J, Bereczky B, Gilly R, Kenessey I, Rásó E, Simon E, Dobos J, Vágó A, Kásler M, Döme B, Tímár J, Tóvári J: Recombinant human erythropoietin alpha improves the efficacy of radiotherapy of a human tumor xenograft, affecting tumor cells and microvessels. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft Al.* 184 (1), 1–7 (2008).**
409. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R: Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science.* 300 (5622), 1155–1159 (2003).
410. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R: Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science.* 293 (5528), 293–297 (2001).
411. Huber PE, Bischof M, Jenne J, Heiland S, Peschke P, Saffrich R, Gröne H-J, Debus J, Lipson KE, Abdollahi A: Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation, and chemotherapy. *Cancer Res.* 65 (9), 3643–3655 (2005).
412. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae S-S, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK: Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell.* 6 (6), 553–563 (2004).

413. Zips D, Eicheler W, Geyer P, Hessel F, Dörfler A, Thames HD, Haberey M, Baumann M: Enhanced susceptibility of irradiated tumor vessels to vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *Cancer Res.* 65 (12), 5374–5379 (2005).
414. Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, Nakajima M, Kitamoto Y, Saitoh J-I, Nakano T: Expression of hypoxic-inducible factor 1alpha predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 60 (2), 513–521 (2004).
415. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW: Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell.* 5 (5), 429–441 (2004).
416. **Tóvári J, Pirker R, Tímár J, Ostoros G, Kovács G, Döme B: Erythropoietin in cancer: an update. *Curr. Mol. Med.* 8 (6), 481–491 (2008).**
417. Saintigny P, Besse B, Callard P, Vergnaud A-C, Czernichow S, Colombat M, Girard P, Validire P, Breau J-L, Bernaudin J-F, Soria J-C: Erythropoietin and erythropoietin receptor coexpression is associated with poor survival in stage I non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13 (16), 4825–4831 (2007).
418. Dagnon K, Pacary E, Commo F, Antoine M, Bernaudin M, Bernaudin J-F, Callard P: Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11 (3), 993–999 (2005).
419. Brown WM, Maxwell P, Graham ANJ, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, Johnston PG, Lappin TRJ: Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 25 (3), 718–722 (2007).
420. Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, Spahr C, Um M, Van G, Begley CG: Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood.* 107 (5), 1892–1895 (2006).
421. Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H: A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science.* 257 (5073), 1138–1141 (1992).
422. Elliott S, Busse L, McCaffery I, Rossi J, Sinclair A, Spahr C, Swift S, Begley CG: Identification of a sensitive anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody allows detection of low levels of EpoR in cells. *J. Immunol. Methods.* 352 (1–2), 126–139 (2010).
423. **Rózsás A, Berta J, Rojkó L, Horváth LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, László V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Török S, Klepetko W, Rényi-Vámos F, Hegedűs B, Döme B, Tóvári J: Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *PloS One.* 8 (10), e77459 (2013).**
424. Vansteenkiste J, Glaspy J, Henry D, Ludwig H, Pirker R, Tomita D, Collins H, Crawford J: Benefits and risks of using erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) in lung cancer patients: study-level and patient-level meta-analyses. *Lung Cancer Amst. Neth.* 76 (3), 478–485 (2012).
425. Meacham CE, Morrison SJ: Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 501 (7467), 328–337 (2013).
426. Yuan S, Norgard RJ, Stanger BZ: Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov.* 9 (7), 837–851 (2019).
427. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C, Kuperwasser C: Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell.* 24 (1), 65–78 (2019).
428. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ: Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15 (6), 366–381 (2018).

tovari.jozsef_19_22

10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

10.1 Az értekezés alapját képező, a PhD fokozat elnyerése (1999) után született közlemények

10.1.1 Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

1. Nelhübel GA, Cserepes M, Szabó B, Türk D, Kárpáti A, Kenessey I, Rásó E, Barbai T, Hegedűs Z, László V, Szokol B, Dobos J, Örfi L, **Tóvári J.** EGFR Alterations Influence the Cetuximab Treatment Response and c-MET Tyrosine-Kinase Inhibitor Sensitivity in Experimental Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2021 May 3;27:620256. IF: 3,201. Független idéző: 1 Összesen: 1
2. Tátrai E, Bartal A, Gacs A, Paku S, Kenessey I, Garay T, Hegedűs B, Molnár E, Cserepes MT, Hegedűs Z, Kucsma N, Szakács G, **Tóvári J.** Cell type-dependent HIF1 α -mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumor cells. *Oncotarget.* 2017 Jul 4;8(27):44498-44510. IF (2016): 5,168; (2017): 0. Független idéző: 18 Független idéző: 1 Összesen: 19
3. **Tóvári J,** Futosi K, Bartal A, Tátrai E, Gacs A, Kenessey I, Paku S. Boyden chamber-based method for characterizing the distribution of adhesions and cytoskeletal structure in HT1080 fibrosarcoma cells. *Cell Adh Migr.* 2014;8(5):509-16. IF: 4,505. Független idéző: 8 Összesen: 8
4. Rózsás A, Berta J, Rojkó L, Horváth LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, László V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Török S, Klepetko W, Rényi-Vámos F, Hegedűs B, Döme B, **Tóvári J.** Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *PLoS One.* 2013 Oct 14;8(10):e77459. IF: 3,534. Független idéző: 18 Független idéző: 4 Összesen: 22
5. Kenessey I, Keszthelyi M, Krámer Z, Berta J, Adám A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Döme B, Klepetko W, Tímár J, **Tóvári J.** Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010 May;10(3):332-42. IF: 4,771. Független idéző: 33 Független idéző: 3 Összesen: 36
6. Kenessey I, Simon E, Futosi K, Bereczky B, Kiss A, Erdödi F, Gallagher JT, Tímár J, **Tóvári J.** Antimigratory and antimetastatic effect of heparin-derived 4-18 unit oligosaccharides in a preclinical human melanoma metastasis model. *Thromb Haemost.* 2009 Dec;102(6):1265-73. IF: 4,451. Független idéző: 9 Független idéző: 1 Összesen: 10
7. Dome B, Timar J, Ladanyi A, Paku S, Renyi-Vamos F, Klepetko W, Lang G, Dome P, Bogos K, **Tovari J.** Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009 Feb;69(2):108-24. IF: 5,269. . Független idéző: 61 Független idéző: 6 Összesen: 67

8. **Tóvári J**, Pirker R, Tímár J, Ostoros G, Kovács G, Döme B. Erythropoietin in cancer: an update. *Curr Mol Med.* 2008 Sep;8(6):481-91. IF: 5,254. Független idéző: 22 Független idéző: 2 Összesen: 24
9. Lövey J, Bereczky B, Gilly R, Kenessey I, Rásó E, Simon E, Dobos J, Vágó A, Kásler M, Döme B, Tímár J, **Tóvári J**. Recombinant human erythropoietin alpha improves the efficacy of radiotherapy of a human tumor xenograft, affecting tumor cells and microvessels. *Strahlenther Onkol.* 2008 Jan;184(1):1-7 IF: 3,005. Független idéző: 22 Független idéző: 7 Összesen: 29
10. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, **Tóvári J**, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2007 Jan;170(1):1-15. IF: 5,487. Független idéző: 346 Független idéző: 32 Összesen: 378
11. Dome B, Dobos J, **Tovari J**, Paku S, Kovacs G, Ostoros G, Timar J. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry A.* 2008 Mar;73(3):186-93. IF: 3,259. Független idéző: 70 Független idéző: 8 Összesen: 78
12. Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, **Tovari J**. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2006 Jul 15;66(14):7341-7. IF: 7,656. Független idéző: 216 Független idéző: 10 Összesen: 226
13. Bereczky B, Gilly R, Rásó E, Vágó A, Tímár J, **Tóvári J**. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(1):69-76. IF: 2,811. Független idéző: 37 Független idéző: 4 Összesen: 41
14. **Tóvári J**, Gilly R, Rásó E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó A, Tímár J. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7186-93. IF: 7,616. Független idéző: 47 Független idéző: 14 Összesen: 61
15. Renyi-Vamos F*, **Tovari J***, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 15;11(20):7344-53. IF: 5,715. Független idéző: 187 Független idéző: 4 Összesen: 191
16. Paku S, **Tóvári J**, Lörincz Z, Timár F, Döme B, Kopper L, Raz A, Tímár J. Adhesion dynamics and cytoskeletal structure of gliding human fibrosarcoma cells: a hypothetical model of cell migration. *Exp Cell Res.* 2003 Nov 1;290(2):246-53. IF: 3,949. Független idéző: 9 Független idéző: 3 Összesen: 12

10.1.2 Magyar nyelvű közlemények

1. Lövey J, Kenessey I, Rásó E, Dobos J, Vágó A, Kásler M, Futosi K, Döme B, Tímár J, **Tóvári J**. A rekombináns human erythropoietin-alpha fokozza a human laphámrák sugárérzékenységét preklinikai modellben. [Human recombinant erythropoietin-alpha

increases the efficacy of irradiation in preclinical model]. *Magy Onkol.* 2007;51(1):53-61. Független idéző: 3 Független idéző: 2 Összesen: 5

2. Tímár J, Paku S, **Tóvári J**, Döme B. Az antivaszkuláris terápia elvi alapjai. [Rationale of antiangiogenic therapy]. *Magy Onkol.* 2006;50(2):141-51. Független idéző: 5 Összesen: 6

3. **Tóvári J**, Bereczky B, Gilly R, Skopál J, Vágó A, Tímár J. Heparinkezelés hatása a melanoma áttétképzésére preklinikai modellben: Heparinkezelés hatása a melanoma áttétképzésére preklinikai modellben. [Heparin inhibits metastatization of experimental melanoma]. *Magy Onkol.* 2004;48(3):235-41. Független idéző: 5 Összesen: 5

10.2 Egyéb, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények

10.2.1 Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

17. Schmidhuber S, Scheiblhofer S, Weiss R, Cserepes M, **Tóvári J**, Gadermaier G, Bezdard E, De Giorgi F, Ichas F, Strunk D, Mandler M. A Novel C-Type Lectin Receptor-Targeted α -Synuclein-Based Parkinson Vaccine Induces Potent Immune Responses and Therapeutic Efficacy in Mice. *Vaccines (Basel)*. 2022 Aug 30;10(9):1432. IF: 4,961.

18. Kiss K, Hegedüs K, Vass P, Vári-Mező D, Farkas A, Kristóf Nagy, Molnár L, **Tóvári J**, Mező G, Marosi Gy. Development of fast-dissolving dosage forms of curcuminoids by electrospinning for potential tumor therapy application *Int J Pharm* 2022 Jan 5;611:121327. IF: 6,51. Független idéző: 2 Összesen: 2

19. Hegyesi H, Pallinger É, Mecsei S, Hornyák B, Kovácsházi Cs, Brenner Gábor B., Giricz Z, Pálóczi K, Kittel Á, **Tóvári J**, Turiak L, Khamari D, Ferdinandy P, Buzás E, Circulating cardiomyocyte-derived extracellular vesicles reflect cardiac injury during systemic inflammatory response syndrome in mice. *Cell Mol Life Sci* 2022 Jan 20;79(2):84. IF: 9.207. Független idéző: 1 Összesen: 1

20. Cserepes M. ; Nelhübel G.A. ; Meilinger-Dobra M. ; Herczeg A. ; Türk D. Hegedüs Z.; Svajda L.; Rásó E. ; Ladányi A. ; Csikó K.G. ; Kenessey I.; Szőőr Á. ; Vereb G. ; Remenár É.; **Tóvári J**. EGFR R521K Polymorphism Is Not a Major Determinant of Clinical Cetuximab Resistance in Head and Neck Cancer. *Cancers* 2022 May 13;14(10):2407. IF: 6.575.

21. Szepesi Kovács D, Hajdu I, Mészáros G, Wittner L, Meszéna D, Tóth EZ, Hegedüs Z, Randelović I, **Tóvári J**, Szabó T, Szilágyi B, Milen M, Keserű GM, Ábrányi-Balogh P. Synthesis and characterization of new fluorescent boro- β -carboline dyes. *RSC Adv.* 2021 Apr 1;11(21):12802-12807. IF: 3.245. Független idéző: 3 Összesen: 3

22. Rácz GA, Nagy N, **Tóvári J**, Apáti Á, Vértessy BG. Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines. *Sci Rep.* 2021 Sep 30;11(1):19459. IF: 4,996. Független idéző: 2 Összesen: 2

23. Jarvas G, Szerenyi D, **Tovari J**, Takacs L, Guttman A. Modification of Hemodialysis Membranes for Efficient Circulating Tumor Cell Capture for Cancer Therapy. *Molecules.* 2021 Aug 10;26(16):4845. IF:4,927. Független idéző: 1 Összesen: 1

24. Hegedüs L, Okumus Ö, Livingstone E, Baranyi M, Kovács I, Döme B, **Tóvári J**, Bánkfalvi Á, Schadendorf D, Aigner C, Hegedüs B. Allosteric and ATP-Competitive MEK-Inhibition in a Novel Spitzoid Melanoma Model with a RAF- and Phosphorylation-Independent Mutation. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 16;13(4):829. *IF*: 6,639. Független idéző: 2 Összesen: 2
25. Erdélyi K, Ditrói T, Johansson HJ, Czikora Á, Balog N, Silwal-Pandit L, Ida T, Olasz J, Hajdú D, Mátrai Z, Csuka O, Uchida K, **Tóvári J**, Engebraten O, Akaike T, Børresen Dale AL, Kásler M, Lehtiö J, Nagy P. Reprogrammed transsulfuration promotes basal-like breast tumor progression via realigning cellular cysteine persulfidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Nov 9;118(45): e2100050118. *IF*: 12,779. Független idéző: 7 Összesen: 7
26. Berta J, Török S, Tárnoki-Zách J, Drozdovszky O, **Tóvári J**, Paku S, Kovács I, Czirók A, Masri B, Megyesfalvi Z, Oskolás H, Malm J, Ingvar C, Markó-Varga G, Döme B, László V. Apelin promotes blood and lymph vessel formation and the growth of melanoma lung metastasis. *Sci Rep*. 2021 Mar 11;11(1):5798. *IF*: 4,996. Független idéző: 4 Összesen: 4
27. Tripodi AAP, Randelović I, Biri-Kovács B, Szeder B, Mező G, **Tóvári J**. In Vivo Tumor Growth Inhibition and Antiangiogenic Effect of Cyclic NGR Peptide-Daunorubicin Conjugates Developed for Targeted Drug Delivery. *Pathol Oncol Res*. 2020 Jul;26(3):1879-1892. *IF*: 3,201. Független idéző: 9 Független idéző: 4 Összesen: 13
28. Tanjore Ramanathan J, Lehtipuro S, Sihto H, **Tóvári J**, Reiniger L, Téglási V, Moldvay J, Nykter M, Haapasalo H, Le Joncour V, Laakkonen P. Prostate-specific membrane antigen expression in the vasculature of primary lung carcinomas associates with faster metastatic dissemination to the brain. *J Cell Mol Med*. 2020 Jun;24(12):6916-6927. *IF*: 5,31. Független idéző: 4 Összesen: 4
29. Rittler D, Molnár E, Baranyi M, Garay T, Hegedüs L, Aigner C, **Tóvári J**, Tímár J, Hegedüs B. Horizontal Combination of MEK and PI3K/mTOR Inhibition in BRAF Mutant Tumor Cells with or without Concomitant PI3K Pathway Mutations. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 16;21(20):7649. *IF*: 5,924. Független idéző: 2 Összesen: 2
30. Naffa R, Vogel L, Hegedüs L, Pászty K, Tóth S, Kelemen K, Singh N, Reményi A, Kállay E, Cserepes M, **Tóvári J**, Grusch M, Enyedi Á. P38 MAPK Promotes Migration and Metastatic Activity of BRAF Mutant Melanoma Cells by Inducing Degradation of PMCA4b. *Cells*. 2020 May 13;9(5):1209. *IF*: 6,6. Független idéző: 10 Független idéző: 2 Összesen: 12
31. Jiménez-Orozco FA, Randelović I, Hegedüs Z, Vega-Lopez A, Martínez-Flores F, **Tóvári J**. In vitro anti-proliferative effect and in vivo antitumor action of daphnetin in different tumor cells. *Cir Cir*. 2020;88(6):765-771. *IF*: 0,361. Független idéző: 1 Összesen: 1
32. Hámori L, Kudlik G, Szabéni K, Kucsma N, Szeder B, Póti Á, Uher F, Várady G, Szüts D, **Tóvári J**, Füredi A, Szakács G. Establishment and Characterization of a Brca1^{-/-}, p53^{-/-} Mouse Mammary Tumor Cell Line. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 11;21(4):1185. *IF*: 5,924. Független idéző: 3 Független idéző: 4 Összesen: 7
33. Gaál A, Garay TM, Horváth I, Máthé D, Szöllösi D, Veres DS, Mbuotidem J, Kovács T, **Tóvári J**, Bergmann R, Strelci C, Szakács G, Mihály J, Varga Z, Szoboszlai N. Development and In Vivo Application of a Water-Soluble Anticancer Copper Ionophore System Using a Temperature-Sensitive Liposome Formulation. *Pharmaceutics*. 2020 May 20;12(5):466. *IF*: 6,321. Független idéző: 8 Összesen: 8

34. Dókus LE, Lajkó E, Randelović I, Mező D, Schlosser G, Kőhidai L, **Tóvári J**, Mező G. Phage Display-Based Homing Peptide-Daunomycin Conjugates for Selective Drug Targeting to PANC-1 Pancreatic Cancer. *Pharmaceutics*. 2020 Jun 22;12(6):576. IF: 6,321. Független idéző: 10 Független idéző: 3 Összesen: 13
35. Cserepes M, Türk D, Tóth S, Pape VFS, Gaál A, Gera M, Szabó JE, Kucsma N, Várady G, Vértessy BG, Strelci C, Szabó PT, **Tóvári J**, Szoboszlai N, Szakács G. Unshielding Multidrug Resistant Cancer through Selective Iron Depletion of P-Glycoprotein-Expressing Cells. *Cancer Res*. 2020 Feb 15;80(4):663-674. IF: 12,701. Független idéző: 10 Független idéző: 7 Összesen: 17
36. Baranyi M, Rittler D, Molnár E, Shirasawa S, Jalsovszky I, Varga IK, Hegedűs L, Németh A, Dank M, Aigner C, **Tóvári J**, Tímár J, Hegedűs B, Garay T. Next Generation Lipophilic Bisphosphonate Shows Antitumor Effect in Colorectal Cancer In Vitro and In Vivo. *Pathol Oncol Res*. 2020 Jul;26(3):1957-1969. IF: 3,201. Független idéző: 7 Független idéző: 1 Összesen: 8
37. Vas V, Kovács T, Körmendi S, Bródy A, Kudlik G, Szeder B, Mező D, Kállai D, Koprivanacz K, Merő BL, Dülk M, **Tóvári J**, Vajdovich P, Şenel ŞN, Özcan I, Helyes Z, Dobó-Nagy C, Buday L. Significance of the Tks4 scaffold protein in bone tissue homeostasis. *Sci Rep*. 2019 Apr 8;9(1):5781. IF: 3,998. Független idéző: 4 Független idéző: 5 Összesen: 9
38. Vas V, Háhner T, Kudlik G, Ernszt D, Kvell K, Kuti D, Kovács KJ, **Tóvári J**, Trexler M, Merő BL, Szeder B, Koprivanacz K, Buday L. Analysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing. *Cells*. 2019 Aug 5;8(8):831. IF: 4,366. Független idéző: 4 Összesen: 4
39. Rittler D, Baranyi M, Molnár E, Garay T, Jalsovszky I, Varga IK, Hegedűs L, Aigner C, **Tóvári J**, Tímár J, Hegedűs B. The Antitumor Effect of Lipophilic Bisphosphonate BPH1222 in Melanoma Models: The Role of the PI3K/Akt Pathway and the Small G Protein Rheb. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 3;20(19):4917. IF: 4,556. Független idéző: 7 Független idéző: 2 Összesen: 9
40. Randelović I, Schuster S, Kapuvári B, Fossati G, Steinkühler C, Mező G, **Tóvári J**. Improved In Vivo Anti-Tumor and Anti-Metastatic Effect of GnRH-III-Daunorubicin Analogs on Colorectal and Breast Carcinoma Bearing Mice *Int J Mol Sci* 2019 20(19): 4763, 26 p. IF: 4.556. Független idéző: 6 Független idéző: 7 Összesen: 13
41. Rádai Z, Windt T, Nagy V, Füredi A, Kiss N, Randelović I, **Tóvári J**, Keglevich G, Szakács G, Tóth S. Synthesis and anticancer cytotoxicity with structural context of an α -hydroxyphosphonate based compound library derived from substituted benzaldehydes *New J. Chem*. 2019. 43(35):14028-14035. IF: 3.288. Független idéző: 5 Független idéző: 6 Összesen: 11
42. Madera-Sandoval RL, **Tóvári J**, Lövey J, Randelović I, Jiménez-Orozco A, Hernández-Chávez VG, Reyes-Maldonado E, Vega-López A. Combination of pentoxifylline and α -galactosylceramide with radiotherapy promotes necro-apoptosis and leukocyte infiltration and reduces the mitosis rate in murine melanoma. *Acta Histochem*. 2019 Aug;121(6):680-689. IF: 2,107.
43. Laszlo V, Valko Z, Ozsvár J, Kovács I, Garay T, Hoda MA, Klikovits T, Stockhammer P, Aigner C, Gröger M, Klepetko W, Berger W, Grusch M, **Tóvári J**, Waizenegger IC, Dome B, Hegedus B. The FAK inhibitor BI 853520 inhibits spheroid formation and orthotopic tumor

growth in malignant pleural mesothelioma. *J Mol Med (Berl)*. 2019 Feb;97(2):231-242. IF: 4,427. Független idéző: 22 Fügő idéző: 1 Összesen: 23

44. Kotlan B, Horvath S, Eles K, Plotar VK, Naszados G, Czirbesz K, Blank M, Farkas E, Toth L, **Tovari J**, Szekacs A, Shoenfeld Y, Godeny M, Kasler M, Liskay G. Tumor-Associated Disialylated Glycosphingolipid Antigen-Revealing Antibodies Found in Melanoma Patients' Immunoglobulin Repertoire Suggest a Two-Direction Regulation Mechanism Between Immune B Cells and the Tumor. *Front Immunol*. 2019 Apr 5;10:650. IF: 5.085. Független idéző: 3 Összesen: 3

45. Kiss K, Biri-Kovács B, Szabó R, Randelović I, Enyedi KN, Schlosser G, Orosz Á, Kapuvári B, **Tóvári J**, Mező G. Sequence modification of heptapeptide selected by phage display as homing device for HT-29 colon cancer cells to improve the anti-tumour activity of drug delivery systems. *Eur J Med Chem*. 2019 Aug 15;176:105-116. IF: 5,573. Független idéző: 3 Fügő idéző: 9 Összesen: 12

46. Baska F, Sipos A, Órfi Z, Nemes Z, Dobos J, Szántai-Kis C, Szabó E, Szénási G, Dézsi L, Hamar P, Cserepes MT, **Tóvári J**, Garamvölgyi R, Krekó M, Órfi L. Discovery and development of extreme selective inhibitors of the ITD and D835Y mutant FLT3 kinases. *Eur J Med Chem*. 2019 Dec 15;184:111710. IF: 5,573. Független idéző: 9 Összesen: 9

47. Molnár E, Rittler D, Baranyi M, Grusch M, Berger W, Döme B, **Tóvári J**, Aigner C, Tímár J, Garay T, Hegedűs B. Pan-RAF and MEK vertical inhibition enhances therapeutic response in non-V600 BRAF mutant cells. *BMC Cancer*. 2018 May 8;18(1):542 IF: 2.933. Független idéző: 13 Fügő idéző: 2 Összesen: 15

48. López RP, Randelović I, Raposo MDA, Pina A, Arosio D, **Tóvári J**, Mező, G, Dal CA, Pignataro L, Gennari C. Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Conjugates Involving Linkers Cleavable by Lysosomal Enzymes and $\alpha V\beta 3$ -Integrin Ligands for Tumor Targeting *Eur J Org Chem* 2018;(23): 2902-2909. IF: 3.029. Független idéző: 6 Fügő idéző: 6 Összesen: 12

49. Laszlo V, Valko Z, Kovacs I, Ozsvár J, Hoda MA, Klikovits T, Lakatos D, Czírok A, Garay T, Stiglbauer A, Helbich TH, Gröger M, **Tovari J**, Klepetko W, Pirker C, Grusch M, Berger W, Hilberg F, Hegedűs B, Dome B. Nintedanib Is Active in Malignant Pleural Mesothelioma Cell Models and Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth In Vivo. *Clin Cancer Res*. 2018 Aug 1;24(15):3729-3740. IF: 8.911. Független idéző: 12 Fügő idéző: 4 Összesen: 16

50. Kenessey I, Kramer Z, István L, Cserepes MT, Garay T, Hegedűs B, Dobos J, Tímár J, **Tóvári J**. Inhibition of epidermal growth factor receptor improves antitumor efficacy of vemurafenib in BRAF-mutant human melanoma in preclinical model. *Melanoma Res*. 2018 Dec;28(6):536-546. IF: 2,381. Független idéző: 12 Fügő idéző: 1 Összesen: 13

51. Csoboz B, Gombos I, Tatrai E, **Tovari J**, Kiss AL, Horvath I, Vigh L. Chemotherapy induced PRL3 expression promotes cancer growth via plasma membrane remodeling and specific alterations of caveolae-associated signaling. *Cell Commun Signal*. 2018 Aug 29;16(1):51. IF: 5,111. Független idéző: 6 Összesen: 6

52. Bugyik E, Szabó V, Dezső K, Rókus A, Szűcs A, Nagy P, **Tóvári J**, László V, Döme B, Paku S. Role of (myo)fibroblasts in the development of vascular and connective tissue structure

of the C38 colorectal cancer in mice. *Cancer Commun (Lond)*. 2018 Jul 5;38(1):46. Független idéző: 4 Fügő idéző: 2 Összesen: 6

53. Bánóczy Z, Keglevich A, Szabó I, Randelović I, Hegedüs Z, Regenbach FL, Keglevich P, Lengyel Z, Gorka-Kereskényi Á, Dubrovay Z, Háda V, Szigetvári Á, Szántay C Jr, Hazai L, **Tóvári J**, Hudecz F. The effect of conjugation on antitumor activity of vindoline derivatives with octaarginine, a cell-penetrating peptide. *J Pept Sci*. 2018 Oct;24(10):e3118. IF: 2,081 Független idéző: 4 Fügő idéző: 8 Összesen: 12

54. Torok S, Rezeli M, Kelemen O, Vegvari A, Watanabe K, Sugihara Y, Tisza A, Marton T, Kovacs I, **Tovari J**, Laszlo V, Helbich TH, Hegedus B, Klikovits T, Hoda MA, Klepetko W, Paku S, Marko-Varga G, Dome B. Limited Tumor Tissue Drug Penetration Contributes to Primary Resistance against Angiogenesis Inhibitors. *Theranostics*. 2017 Jan 1;7(2):400-412. IF: 8.537. Független idéző: 46 Fügő idéző: 4 Összesen: 50

55. Keller-Pinter A, Ughy B, Domoki M, Pettko-Szandtner A, Letoha T, **Tovari J**, Timar J, Szilak L. The phosphomimetic mutation of syndecan-4 binds and inhibits Tiam1 modulating Rac1 activity in PDZ interaction-dependent manner. *PLoS One*. 2017 Nov 9;12(11):e0187094. IF: 2,766. Független idéző: 7 Fügő idéző: 6 Összesen: 13

56. Gronewold A, Horn M, Randelović I, **Tóvári J**, Muñoz Vázquez S, Schomäcker K, Neundorf I. Characterization of a Cell-Penetrating Peptide with Potential Anticancer Activity. *ChemMedChem*. 2017 Jan 5;12(1):42-49. Erratum in: *ChemMedChem*. 2017 May 9;12(9):712. IF: 3,009. Független idéző: 16 Fügő idéző: 16 Összesen: 32

57. Füredi A, Tóth S, Szebényi K, Pape VF, Türk D, Kucsma N, Cervenak L, **Tóvári J**, Szakács G. Identification and Validation of Compounds Selectively Killing Resistant Cancer: Delineating Cell Line-Specific Effects from P-Glycoprotein-Induced Toxicity. *Mol Cancer Ther*. 2017 Jan;16(1):45-56. IF: 5,365. Független idéző: 10 Fügő idéző: 21 Összesen: 31

58. Füredi A, Szebényi K, Tóth S, Cserepes M, Hámori L, Nagy V, Karai E, Vajdovich P, Imre T, Szabó P, Szüts D, **Tóvári J**, Szakács G. Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer. *J Control Release*. 2017 Sep 10;261:287-296. IF: 7,877. Független idéző: 38 Fügő idéző: 11 Összesen: 49

59. Donczo B, Szarka M, **Tovari J**, Ostoros G, Csanky E, Guttman A. Molecular glycochemistry by capillary electrophoresis: Analysis of the N-glycome of formalin-fixed paraffin-embedded mouse tissue samples. *Electrophoresis*. 2017 Jun;38(12):1602-1608. IF: 2,569. Független idéző: 6 Fügő idéző: 2 Összesen: 8

60. Kenessey I, Kóí K, Horváth O, Cserepes M, Molnár D, Izsák V, Dobos J, Hegedüs B, **Tóvári J***, Tímár J*. KRAS-mutation status dependent effect of zoledronic acid in human non-small cell cancer preclinical models. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):79503-79514. IF: 5,168. Független idéző: 7 Fügő idéző: 5 Összesen: 12

61. Kapuvári B, Hegedüs R, Schulcz Á, Manea M, **Tóvári J**, Gacs A, Vincze B, Mező G. Improved in vivo antitumor effect of a daunorubicin - GnRH-III bioconjugate modified by apoptosis inducing agent butyric acid on colorectal carcinoma bearing mice. *Invest New Drugs*. 2016 Aug;34(4):416-23. IF: 3,484. Független idéző: 9 Fügő idéző: 14 Összesen: 23

62. Donczo B, Szigeti M, Ostoros G, Gacs A, **Tovari J**, Guttman A. N-Glycosylation analysis of formalin fixed paraffin embedded samples by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2016 Sep;37(17-18):2292-6. IF: 2,744. Független idéző: 8 Fügő idéző: 3 Összesen: 11
63. Torok S, Vegvari A, Rezeli M, Fehniger TE, **Tovari J**, Paku S, Laszlo V, Hegedus B, Rozsas A, Dome B, Marko-Varga G. Localization of sunitinib, its metabolites and its target receptors in tumour-bearing mice: a MALDI-MS imaging study. *Br J Pharmacol*. 2015 Feb;172(4):1148-63. IF: 5,259. Független idéző: 12 Fügő idéző: 10 Összesen: 22
64. Szebényi K, Füredi A, Kolacsek O, Csohány R, Prókai Á, Kis-Petik K, Szabó A, Bősze Z, Bender B, **Tóvári J**, Enyedi Á, Orbán TI, Apáti Á, Sarkadi B. Visualization of Calcium Dynamics in Kidney Proximal Tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Nov;26(11):2731-40. IF: 8,491. Független idéző: 18 Fügő idéző: 5 Összesen: 23
65. Szebényi K, Füredi A, Kolacsek O, Pergel E, Bősze Z, Bender B, Vajdovich P, **Tóvári J**, Homolya L, Szakács G, Héja L, Enyedi Á, Sarkadi B, Apáti Á, Orbán TI. Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep*. 2015 Aug 3;5:12645. IF: 5,228. Független idéző: 2 Fügő idéző: 6 Összesen: 8
66. Szabo V, Bugyik E, Dezso K, Ecker N, Nagy P, Timar J, **Tovari J**, Laszlo V, Bridgeman VL, Wan E, Frenzas S, Vermeulen PB, Reynolds AR, Dome B, Paku S. Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. *J Pathol*. 2015 Feb;235(3):384-96. IF.: 7,381. Független idéző: 32 Fügő idéző: 15 Összesen: 47
67. Garay T, Kenessey I, Molnár E, Juhász É, Réti A, László V, Rózsás A, Dobos J, Döme B, Berger W, Klepetko W, **Tóvári J**, Tímár J, Hegedús B. Prenylation inhibition-induced cell death in melanoma: reduced sensitivity in BRAF mutant/PTEN wild-type melanoma cells. *PLoS One*. 2015 Feb 3;10(2):e0117021. IF: 3,057. Független idéző: 10 Fügő idéző: 12 Összesen: 22
68. Connell JJ, Sugihara Y, Török S, Döme B, **Tóvári J**, Fehniger TE, Marko-Varga G, Végvári Á. Localization of sunitinib in in vivo animal and in vitro experimental models by MALDI mass spectrometry imaging. *Anal Bioanal Chem*. 2015 Mar;407(8):2245-53. IF: 3,125. Független idéző: 11 Fügő idéző: 3 Összesen: 14
69. Schelch K, Hoda MA, Klikovits T, Münzker J, Ghanim B, Wagner C, Garay T, Laszlo V, Setinek U, Dome B, Filipits M, Pirker C, Heffeter P, Selzer E, **Tovari J**, Torok S, Kenessey I, Holzmann K, Grasl-Kraupp B, Marian B, Klepetko W, Berger W, Hegedus B, Grusch M. Fibroblast growth factor receptor inhibition is active against mesothelioma and synergizes with radio- and chemotherapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Oct 1;190(7):763-72. IF: 12,996. Független idéző: 29 Fügő idéző: 19 Összesen: 48
70. Nelhübel GA, Károly B, Szabó B, Lotz G, Kiss A, **Tóvári J**, Kenessey I. The prognostic role of claudins in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2014 Jan;20(1):99-106. doi: 10.1007/s12253-013-9665-6. Epub 2013 Jul 12. PMID: 23856835. IF.: 1,855. Független idéző: 11 Fügő idéző: 1 Összesen: 12
71. Berta J, Hoda MA, Laszlo V, Rozsas A, Garay T, Torok S, Grusch M, Berger W, Paku S, Renyi-Vamos F, Masri B, **Tovari J**, Groger M, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. Apelin

promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4426-37. IF: 6,359. Független idéző: 68 Fügő idéző: 7 Összesen: 75

72. Lövey J, Nie D, **Tóvári J**, Kenessey I, Tímár J, Kandouz M, Honn KV. Radiosensitivity of human prostate cancer cells can be modulated by inhibition of 12-lipoxygenase. *Cancer Lett*. 2013 Jul 28;335(2):495-501. doi: 10.1016/j.canlet.2013.03.012. Epub 2013 Mar 21. PMID: 23523613. IF.: 5,016. Független idéző: 23 Fügő idéző: 3 Összesen: 26

73. Dobos J, Mohos A, **Tóvári J**, Rásó E, Lőrincz T, Zádori G, Tímár J, Ladányi A. Sex-dependent liver colonization of human melanoma in SCID mice--role of host defense mechanisms. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Apr;30(4):497-506. IF: 3,725. Független idéző: 3 Fügő idéző: 1 Összesen: 4

74. Manea M, **Tóvári J**, Tejada M, Schulcz A, Kapuvári B, Vincze B, Mezo G. In-vivo antitumour effect of daunorubicin-GnRH-III derivative conjugates on colon carcinoma-bearing mice. *Anticancer Drugs*. 2012 Jan;23(1):90-7. IF: 2,232. Független idéző: 8 Fügő idéző: 13 Összesen: 21

75. Kenessey I, Bánki B, Márk A, Varga N, **Tóvári J**, Ladányi A, Rásó E, Tímár J. Revisiting CB1 receptor as drug target in human melanoma. *Pathol Oncol Res*. 2012 Oct;18(4):857-66. IF: 1,555. Független idéző: 12 Fügő idéző: 3 Összesen: 15

76. Flachner B, Lőrincz Z, Carotti A, Nicolotti O, Kuchipudi P, Remez N, Sanz F, **Tóvári J**, Szabó MJ, Bertók B, Cseh S, Mestres J, Dormán G. A chemocentric approach to the identification of cancer targets. *PLoS One*. 2012;7(4):e35582. IF: 3,73. Független idéző: 10 Fügő idéző: 7 Összesen: 17

77. Szabó B, Nelhubel GA, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Székely C, Peták I, Lotz G, Hegedus Z, Hegedus B, Füle T, Döme B, Tímár J, **Tóvári J**. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2011 Jun;47(6):487-96. IF: 2,857. Független idéző: 74 Fügő idéző: 8 Összesen: 82

78. Paku S, Dezso K, Bugyik E, **Tóvári J**, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*. 2011 Sep;179(3):1573-85. IF: 4,89. Független idéző: 51 Fügő idéző: 6 Összesen: 57

79. Manea M, Leurs U, Orbán E, Baranyai Z, Öhlschläger P, Marquardt A, Schulcz Á, Tejada M, Kapuvári B, **Tóvári J**, Mezo G. Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4. *Bioconjug Chem*. 2011 Jul 20;22(7):1320-9. IF: 4,93. Független idéző: 9 Fügő idéző: 25 Összesen: 34

80. Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, László V, **Tóvári J**, Tímár J, Nagy P, Klepetko W, Döme B, Paku S. Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011 Nov;70(11):979-91. IF: 4,258. Független idéző: 33 Fügő idéző: 7 Összesen: 40

81. Berta J, Kenessey I, Dobos J, **Tovari J**, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, Dome B. Apelin

expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol.* 2010 Aug;5(8):1120-9. IF: 4,04. Független idéző: 107 Független idéző: 4 Összesen: 111

82. Dome P, Teleki Z, Rihmer Z, Peter L, Dobos J, Kenessey I, **Tovari J**, Timar J, Paku S, Kovacs G, Dome B. Circulating endothelial progenitor cells and depression: a possible novel link between heart and soul. *Mol Psychiatry.* 2009 May;14(5):523-31. IF: 15,049. Független idéző: 95 Független idéző: 7 Összesen: 102

83. Dezso K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, **Tóvári J**, Tímár J, Nagy P, Paku S. Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol.* 2009 Aug;175(2):835-43. IF: 5,673. Független idéző: 32 Független idéző: 9 Összesen: 41

84. Bogos K, Renyi-Vamos F, Dobos J, Kenessey I, **Tovari J**, Timar J, Strausz J, Ostoros G, Klepetko W, Ankersmit HJ, Lang G, Hoda MA, Nierlich P, Dome B. High VEGFR-3-positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in human small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Mar 1;15(5):1741-6. IF: 6,747. Független idéző: 50 Független idéző: 5 Összesen: 55

85. Amir E, Hughes S, Blackhall F, Thatcher N, Ostoros G, Timar J, **Tovari J**, Kovacs G, Dome B. Targeting blood vessels for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008 Aug;8(5):392-403. IF: 4,316. Független idéző: 9 Független idéző: 2 Összesen: 11

86. Bogos K, Renyi-Vamos F, Kovacs G, **Tovari J**, Dome B. Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008 Jul 14;27(1):18. IF: 1,184. Független idéző: 31 Összesen: 31

87. Deli T, Varga N, Adám A, Kenessey I, Rásó E, Puskás LG, **Tóvári J**, Fodor J, Fehér M, Szigeti GP, Csernoch L, Tímár J. Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer.* 2007 Jul 1;121(1):55-65. IF: 4,555. Független idéző: 59 Független idéző: 7 Összesen: 66

88. Kiss J, Kunstár A, Fajka-Boja R, Dudics V, **Tóvári J**, Légrádi A, Monostori E, Uher F. A novel anti-inflammatory function of human galectin-1: inhibition of hematopoietic progenitor cell mobilization. *Exp Hematol.* 2007 Feb;35(2):305-13. IF: 3,147. Független idéző: 17 Független idéző: 4 Összesen: 21

89. Tímár J, **Tóvári J**, Rásó E, Mészáros L, Bereczky B, Lapis K. Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology.* 2005;69(3):185-201. IF: 1,985. Független idéző: 62 Független idéző: 14 Összesen: 76

90. Rásó E, **Tóvári J**, Ladányi A, Varga N, Tímár J. Ligand-mimetic anti-alphaIIb beta3 antibody PAC-1 inhibits tyrosine signaling, proliferation and lung colonization of melanoma cells. *Pathol Oncol Res.* 2005;11(4):218-23. IF: 1,162. Független idéző: 10 Független idéző: 1 Összesen: 11

91. Rásó E, **Tóvári J**, Tóth K, Paku S, Trikha M, Honn KV, Tímár J. Ectopic alphaIIbbeta3 integrin signaling involves 12-lipoxygenase- and PKC-mediated serine phosphorylation events in melanoma cells. *Thromb Haemost.* 2001 Jun;85(6):1037-42. IF: 4,91. Független idéző: 18 Független idéző: 13 Összesen: 31

10.2.2. Magyar nyelvű közlemények

4. Mező G, Andrea TAP, Ivan R, Enyedi NK, Biri-Kovács B, **Tóvári J.** Asn-Gly-Arg szekvenciát tartalmazó ciklopeptidek alkalmazása a célzott tumorterápiában [Application of Asn-Gly-Arg sequence based cyclic peptides for targeted tumor therapy]. *Magy Onkol.* 2021 Jun 3;65(2):113-120.
5. Cserepes M, Nelhübel GA, Meilinger-Dobra M, Surguta SE, Rásó E, Ladányi A, Kenessey I, Szöör Á, Vereb G, Remenár É, **Tóvári J.** Az EGFR extracelluláris módosulásainak hatása fej-nyaki daganatok cetuximabterápiájára. [Consequences of extracellular alterations of EGFR on cetuximab therapy in HNSCC]. *Magy Onkol.* 2021 Jun 3;65(2):188-195.
6. Nyíri K, Koppány G, Pálffy Gy, Vida I, Tóth Sz, Orgován Z, I Randelović, Baranyi M, Molnár E, Keserű GyM, **Tóvári J,** Perczel A, Vértessy G.B, Tímár J. Allélspecifikus inhibitorok nyomában: a RASopátia konzorcium célpontjában a KRAS fehérje onkogén mutációi [Allele-specific inhibitors of mutant kras are in the focus of rasopathy consortium]. *Magy Onkol.* 2019 Dec 9;63(4):310-323.
7. Mező G, Dókus L, Schlosser G, Lajkó E, Szász Zs, Randelovic I, Biri-Kovács B, **Tóvári J,** Kőhidai L. Hasnyálmirigy-tumort célzó terápiás irányítópeptidek összehasonlítása. [Comparison of therapeutic peptides targeting pancreatic cancer]. *Magy Onkol.* 2019 Dec 9;63(4):301-308., Függő idéző: 2 Összesen: 2
8. Mező G, Biri-Kovács B, Pethő L, S Schuster, Kiss K, Oláhné Szabó R, I Randelović, **Tóvári J.** Célzott tumorterápiára alkalmas peptidhatóanyag konjugátumok szerkezetének optimalizálása. [Optimization of peptide-drug conjugates for targeted tumor therapy] *Magy Onkol.* 2019 Dec 9;63(4):290-300.
9. **Tóvári J.** Betegekből származó tumormintákból képzett xenograftok lehetséges szerepe a hatékony, személyre szabott terápia kiválasztásában. [Potential role of patient-derived tumor xenografts (PDXs) in the selection of optimal therapeutic strategy]. *Magy Onkol.* 2015 Dec;59(4):324-8.
10. Kapuvári B, Schulcz Á, Hegedűs R, Szabó I, Manea M, Vincze B, **Tóvári J,** Gacs A, Tejada M, Gaál D, Mező G. Módosított GnRH-III-antraciklin biokonjugátumok daganatnövekedést gátló hatásának tanulmányozása in vivo szubkután vs. ortotopikus rendszerekben. [Studying the tumor growth inhibitory effect of modified GnRH-III-anthracycline bioconjugates in subcutaneous vs. orthotopic models in vivo]. *Magy Onkol.* 2015 Dec;59(4):310-8.
11. Hegedűs B, Moldvay J, Berta J, Lohinai Z, Rózsás A, Cserepes MT, Fábán K, Ostoros G, **Tóvári J,** Rényi-Vámos F, Tímár J, Döme B. Szemelvények a Semmelweis Egyetem, az Országos Onkológiai Intézet és az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet együttműködésén alapuló tüdőrák-kutatási programból. [Excerpts from the collaborative lung cancer research program of Semmelweis University, the National Institute of Oncology and Korányi Institute of TB and Pulmonology (2010-2015)]. *Magy Onkol.* 2015 Dec;59(4):282-5
Független idéző: 1 Összesen: 1
12. Balázs M, Vízkeleti L, Ecsedi S, Ádány R, Rásó E, Hegedűs B, Ladányi A, **Tóvári J,** Tímár J. Hazai melanomakutatások: reményt keltő eredmények egy korábban reménytelen

daganatban. [Melanoma research in Hungary: promising results in a previously orphan tumor]. *Magy Onkol.* 2015 Dec;59(4):275-81.

13. Szabó V, Bugyik E, Dezső K, **Tóvári J**, Döme B, Paku S. Tumorsejt-invázió/migráció szerepe kísérletes tüdőmetasztázisok ereződésében. [Role of tumour cell invasion/migration in the vascularisation of experimental lung metastases]. *Magy Onkol.* 2015 Dec;59(4):319-23. Függő idéző: 1 Összesen: 1

14. Furedi, A ; Toth, S ; Hamori, L ; Nagy, V ; **Tovari, J** ; Szakacs, G. Állatmodellek szerepe a multidrogrezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében. [Relevance of animal models in the development of compounds targeting multidrug resistant cancer]. *Magy Onkol.* 2015 Dec;59(4):338-45.

15. Lövey J, Nie D, **Tóvári J**, Kenessey I, Kandouz M, Tímár J, Kásler M, Honn KV. Humán prosztatarák sugárérzékenységének fokozása szelektív 12-lipoxigenáz-gátlással preklinikai modellben. [Selective 12-lipoxygenase inhibition potentiates the effect of radiation on human prostate cancer cells in vitro and in vivo]. *Magy Onkol.* 2014 Sep;58(3):211-8.

16. Rózsás A, Ostoros G, Hegedűs B, Döme B, **Tóvári J**. Az erythropoietin jelátvitel szerepe humán nem-kissejtes tüdőrákban. *Medicina Thoracalis (Budapest)* 2013;6:21-30.

17. Dome, B ; Somlai, B ; Tamasy, A ; Peter, L ; **Tovari, J** ; Horvath, A ; Timar, J A cutan melanoma prognózisa és inváziós marker expressziója. Metasztázis asszociált gének (nm23, CD44v3, MMP2) *Orv Hetil* 1999;140(5): 235-240. Független idéző: 2 Függő idéző: 2 Összesen: 4

10.3 Egyéb, a PhD fokozat elnyerése előtt született közlemények

92. Tímár J, Tóth S, **Tóvári J**, Paku S, Raz A. Autocrine motility factor (neuroleukin, phosphohexose isomerase) induces cell movement through 12-lipoxygenase-dependent tyrosine phosphorylation and serine dephosphorylation events. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(10):809-16. IF: 2,000. Független idéző: 10 Függő idéző: 7 Összesen: 17

93. **Tóvári J**, Szende B, Bocsi J, Falaschi A, Simoncsits A, Pongor S, Erchegeyi J, Steták A, Kéri G. A somatostatin analogue induces translocation of Ku 86 autoantigen from the cytosol to the nucleus in colon tumour cells. *Cell Signal.* 1998 Apr;10(4):277-82. IF: 2,608 Független idéző: 11 Függő idéző: 12 Összesen: 23

94. Kovalszky I ; Dudas J ; Olahnagy J ; Pogany G ; **Tovary J** ; Timar J ; Kopper L ; Jeney A. Inhibition of DNA topoisomerase I activity by heparan sulfate and modulation by basic fibroblast growth factor *Mol Cell Biochem* 1998 Jun;183(1-2):11-23. IF:1.273 Független idéző: 48 Függő idéző: 15 Összesen: 63

95. **Tóvári J**, Paku S, Rásó E, Pogány G, Kovalszky I, Ladányi A, Lapis K, Tímár J. Role of sinusoidal heparan sulfate proteoglycan in liver metastasis formation. *Int J Cancer.* 1997 May 29;71(5):825-31. IF: 3,362. Független idéző: 23 Függő idéző: 4 Összesen: 27

96. Tímár J, **Tóvári J**, Szekeres K, Kagawa D, Honn KV. Key determinants of the invasion mechanism of melanoma. Role for a new signaling pathway. *Adv Exp Med Biol.* 1997;407:303-10. IF: 0,36. Független idéző: 6 Függő idéző: 1 Összesen: 7

97. **Tóvári J**, Bocsi J, Ladányi A, Lapis K, Timár J. The antitumor effect of Tiazofurin (TR) consists of anti-proliferative and anti-invasive elements. *Anticancer Res.* 1996 Nov-Dec;16(6A):3307-12. IF: 1,049. Független idéző: 14 Összesen: 14
98. Timár J, **Tóvári J**, Pogány G, Ladányi A, Paku S, Rásó E, Bocsi J, Jeney A, Lapis K. The antimetabolite Tiazofurin (TR) inhibits glycoconjugate biosynthesis and invasiveness of tumour cells. *Eur J Cancer.* 1996 Jan;32A(1):152-9. IF: 2,017. Független idéző: 7 Fügő idéző: 8 Összesen: 15
99. Timar J, Trikha M, Szekeres K, Bazaz R, **Tovari J**, Silletti S, Raz A, Honn KV. Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* 1996 Apr 15;56(8):1902-8 IF: 8,958. Független idéző: 34 Fügő idéző: 17 Összesen: 51
100. Lapis KY, Bocsi J, **Tóvári J**, Bartha I, Timár J, Rásó E. Antiinvasive effects of Tiazofurin on liver-metastatic human colon carcinoma xenografts. *Anticancer Res.* 1996 Nov-Dec;16(6A):3323-31. IF: 1,049. Független idéző: 8 Fügő idéző: 1 Összesen: 9
101. Timár J, Bazaz R, Kimler V, Haddad M, Tang DG, Robertson D, **Tovari J**, Taylor JD, Honn KV. Immunomorphological characterization and effects of 12-(S)-HETE on a dynamic intracellular pool of the alpha IIb beta 3-integrin in melanoma cells. *J Cell Sci.* 1995 Jun;108 (Pt 6):2175-86. IF: 4,827. Független idéző: 23 Fügő idéző: 19 Összesen: 42
102. Timár J, Diczházi C, Bartha I, Pogány G, Paku S, Rásó E, **Tóvári J**, Ladányi A, Lapis K, Kopper L, Jeney A. Modulation of heparan-sulphate/chondroitin-sulphate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metastatic potential of tumor cells. *Int J Cancer.* 1995 Sep 15;62(6):755-61. IF: 3,403. Független idéző: 39 Fügő idéző: 14 Összesen: 53
103. Ladányi A, Timár J, Bocsi J, **Tóvári J**, Lapis K. Sex-dependent liver metastasis of human melanoma lines in SCID mice. *Melanoma Res.* 1995 Apr;5(2):83-6. IF: 1,57. Független idéző: 25 Fügő idéző: 11 Összesen: 36

10.4 Tudománymetriai adatok

<i>Tóvári József tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2022.10.06)</i>				
Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk ²	120	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	96	1804	2307
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	13	14	20
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	0	0	0
összefoglaló közlemény	---	11	542	604
rövid közlemény	---	0	0	0
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0		
III. Könyvrészlet	2	---	---	---
idegen nyelvű	---	2	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	10	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)		132	2360	2931
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	132	---	2360	2931

V. További tudományos művek	12	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkekét és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkekét is	---	9	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	2	1	1
Oltalmak (szabadalmak)	---	1	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	2	---	0	2
Összes hivatkozás ¹	---	---	2361	2934
Hirsch index ⁶	31	---	---	---
g index ⁶	53	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	9	324
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	21	531
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (1999) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	107	2610
Az utolsó 10 év (2012 - 2022) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	77	861
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	341	11,62%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	471 + 0
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:

1 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

2 lektorált, tudományos folyóiratban

3 a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemihozzájárulást dokumentálni tudja

4 konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

5 nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

6 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

7 közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be azösszesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat