

# Heparinkezelés hatása a melanoma áttétképzésére preklinikai modellben

Tóvári József,<sup>1</sup> Bereczky Báborka,<sup>1</sup> Gilly Réka,<sup>1</sup> Skopál Judit,<sup>2</sup>  
Vágó Ágnes,<sup>1</sup> Tímár József<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Országos Onkológiai Intézet, <sup>2</sup>Nemzeti Stroke Központ, Hemostasis laboratórium, Budapest

Különböző tumorok antikoagulációs terápiája során megfigyelték, hogy a heparinszármazékoknak tumorprogressziót késleltető hatása is van. Mivel humán melanomákban semmilyen erre vonatkozó adat nem áll rendelkezésre, megvizsgáltuk különböző heparinok hatását preklinikai tumormodelleken. Sem a nem frakcionált heparin (UFH), sem annak kis molekulású származéka (LMWH) nem befolyásolta a HT168-M1 melanomasejtek in vitro illetve in vivo növekedését, azonban a heparinkezelések szignifikánsan gátolták a tüdő- és májmetasztázisok kialakulását 20-200 IU/kg dózistartományban. Az antimetasztatikus hatás egyik eleme a tumorsejtek tüdőerekben történő korai (5 perctől 4 óráig terjedő) megakadásának gátlása volt. A heparinok antimetasztatikus hatásának vizsgálata során kiderült, hogy ennek fontos eleme a tumorsejtek migrációjának és mátrixinváziójának blokkolása. A bemutatott kísérleti adatok alapján kijelenthetjük, hogy a heparinoknak, különösen az LMWH-nak, specifikus antimetasztatikus hatása van humán melanomák esetében, amely független a véralvadásra gyakorolt hatástól. *Magyar Onkológia* 48:235–241, 2004

Heparin treatment, at human equivalent doses, modulates coagulation parameters in mice similarly to the human situation. Heparins were tested in various melanoma metastasis models for their antimetastatic activity. Heparins were active against melanoma metastasis without influencing the primary tumor. Tumor cell-induced platelet aggregation was not the primary target of heparins, since melanoma cells were not active in this respect. Our results support the notion that heparins have antimetastatic activity. *Tóvári J, Bereczky B, Gilly R, Skopál J, Vágó Á, Tímár J. Heparin inhibits metastatization of experimental melanoma. Hungarian Oncology* 48:235–241, 2004



## Bevezetés

A malignus melanomák az egyik legmetasztatikusabb emberi daganatok, melyek esetében már néhány mm vastag tumornál is nagy a rizikója az 5 éven belül kialakuló távoli áttéteknek. Sajnos ez a tumortípus igen ellenálló a kemoterápiával szemben, ezért szükséges újfajta farmakológiai eljárások kidolgozása, amelyek növelik a betegek

túlélését. A legtöbb daganatra, különösen azok előrehaladott állapotában különböző mértékű véralvadási zavar jellemző (13). A tumorsejtek többféle prokoaguláns termelnek, amelyek felelősek a hiperkoagulációért, az extrinsic koagulációs útvonal aktiválásáért, amelyek végül a thrombin (F-IIa) termelését eredményezik (12). Éppen ezért a daganatos betegek antikoagulációs terápiája általános gyakorlat, amelyet leggyakrabban kumarinszármazékokkal vagy heparinokkal végeznek.

A klinikai adatok elemzése ráirányította a figyelmet arra, hogy a heparinoknak más antikoagulánsokkal szemben jobb hatásuk van a daganat-indukálta thromboemboliák kezelésében, és az alacsony molekulású heparin (LMWH) hatékonyabb, mint a klasszikus forma (8, 11). Ezen felül klinikai adatok utalnak arra, hogy a warfarinnal (3, 30, 31), de még gyakrabban a heparinszármazékokkal kezelt daganatos betegekben csökkent a tumoros progresszió és meghosszabbodott a túlélés (4, 10, 18, 28).

Közlésre érkezett: 2004. július 12.

Elfogadva: 2004. szeptember 1.

Levelezési cím: Dr. Tímár József,  
Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest,  
Ráth György u. 7-9., Telefon: 1-224-8786, Fax: 1-224-8706,  
e-mail: jtimar@oncol.hu

A szerzők a közleményt Dr. Jeney András egyetemi tanár 70. születésnapjára ajánlják.

A vizsgálatokat a Pharmacia és a Pfizer Kft., valamint az NKFP 1/48/2001 program támogatta. Tóvári József a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási ösztöndíjasa.

Az elmúlt 40 évben igen nagyszámú kísérletes adat gyűlt össze arról, hogy a heparinoknak különböző rágszáló daganatmodellekben antimetasztatikus hatásuk volt, a legjobb eredményeket melanomák és emlőcarcinomák esetében kapták (20). Ma már tudjuk, hogy a heparinok antimetasztatikus hatásának molekuláris mechanizmusában szerepet játszanak a vérlemezkék, illetve endothelsejtek adhéziós molekulái, a P- és L-szelektinek (1, 2, 14).

Mivel korábbi adatok arra mutattak, hogy a heparinoknak antimetasztatikus hatásuk van rágszáló melanomák esetében, ugyanakkor nincs emberi melanomára vonatkozó adat, preklinikai vizsgálatainknak az volt a célja, hogy a heparinok antimetasztatikus hatását elemezzük humán melanoma modellen.

## Anyagok és módszerek

### *In vitro* szövettényészet

HT168-M1 humán melanomasejteket 5% foetalis borjúsavót (FCS, Sigma) és 1% penicillin-sztreptomocint (Sigma) tartalmazó RPMI 1640 médiumban (Sigma) tartottuk fenn 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú levegőben.

### Antikoagulánsok

Két típusú heparint használtunk kísérleteink során: nem frakcionált heparin-natricum (UFH, Richter Rt.) és kis molekulásúlyú dalteparin-natricum (LMWH, Fragmin, Pharmacia/Pfizer). Kontrollként rekombináns humán hirudint alkalmaztunk (lepirudin, Refludan, Hoechst Marion Roussel GmbH), valamennyit 0,9%-os nátrium-klorid-oldatban.

### Sejtproliferációs vizsgálatok

2x10<sup>3</sup> tumorsejtet helyeztünk 96 lyukú szövettényésztő edénybe, 10% FCS-tartalmú RPMI-1640 médiumban, majd 24 óra után kezeltük 0,01–10 IU/ml UFH-val és LMWH-val 72 órán át 37°C-on. Az inkubációs idő végén MTT kolorimetriás tesztet végeztünk a sejtdenzitás meghatározására (16). A lemezeket 570 nm hullámhosszon elemeztük ELISA-platele-olvasóval (Model 550, Bio-Rad).

### Sejtheadhézió különböző matrixfehérjékhez *in vitro*

96 lyukú edényben 5 µg/lyuk koncentrációban különböző matrixproteineket (fibronektin, laminin, Matrigél, kollagén I–III és fibrinogén) egy éjszakán át használtunk bevonóanyagként. A tumorsejteket előkezeltük 0,1–10 IU/ml UFH-val és LMWH-val, vagy 5–15 µg/ml koncentrációban hirudinnal 1 órán keresztül 37°C-on. Az előkezelés után 2x10<sup>4</sup> tumorsejtet helyeztünk a matrixproteinekkel bevont felszínre, és 35–60 percig inkubáltuk szérumentes médiumban. Az inkubáció végén a nem adherens sejteket eltávolítottuk és a letapadt sejtek arányát szulfurodamin-B (Sigma) festéssel határoztuk meg.

### Sejtmigráció és Matrigél-invázió *in vitro*

A migrációs és inváziós teszteket 96 lyukú CXF8 edényben végeztük (Chemicon). A 8 mm-es szűrőket (Neuroprobe) Matrigéllal vontuk be az inváziós kísérlethez. A migrációs kamra alsó felébe 30 ml 1–10% FCS-tartalmú RPMI-t helyeztünk. A tumorsejteket 1–10 IU/ml UFH-val és LMWH-val előkezeltük 30 percen keresztül. Az előkezelt tumorsejteket 20 ml sejtszuspenzióban 2x10<sup>4</sup> dózisban helyeztük a filterekre, majd 20 órán keresztül hagytuk migrálni 37°C-on. Az inkubáció végén a felső oldalról eltávolítottuk a sejteket, majd a migrált sejteket 5 percig fixáltuk és toluidinkékkel festettük. A migrált sejtek számát 6 párhuzamos mintán fénymikroszkóppal határoztuk meg.

### Tüdőkolonizációs assay

Kísérleteinkben 2–3 hónapos nőtény BALB/c SCID egereket használtunk. Egysejtszuspenziót készítettünk 0,02% EDTA felhasználásával HT168-M1 sejt kultúrából, és 10<sup>6</sup> tumorsejtet oltottunk állatonként intravénásan. Egy nappal a tumorsejtek oltása előtt, illetve a következő három napon az állatokat intraperitoneálisan kezeltük UFH-val és LMWH-val (20–200 IU/kg) és kontrollként rekombináns hirudinnal (1–3 mg/kg). Hét héttel a tumoroltás után az állatokat túlaltattuk (Nembutallal), eltávolítottuk a tüdőket és a kialakult tumorátteket formalinos fixálást követően sztereomikroszkóp alatt leszámoztuk.

### Tumorsejtek megtapadásának dinamikája a tüdőben

A nőtény SCID egereket 200 IU/kg UFH-val és LMWH-val intraperitoneálisan előkezeltük egy nappal a tumorsejtek oltása előtt. Ezután 10<sup>6</sup> tumorsejtet injektáltunk intravénásan az egerekbe, majd azokat különböző időpontokban (5 perc, 1 óra, 4 óra) Nembutallal túlaltattuk. A tüdőket eltávolítottuk, formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk és 3 mm vastag metszeteket készítettünk.

A tüdőben kitapadt tumorsejteket monoklonális HMB45 (DAKO) és anti-MART1 antitestekkel immunhisztokémiával megfestettük. A jelölt tumorsejtek számát fénymikroszkóppal határoztuk meg.

### Májáttétképzés vizsgálata

10<sup>5</sup> tumorsejtet injektáltunk Nembutallal elaltatott nőtény egerek lépébe. Ezután UFH-val és LMWH-val (20–200 IU/kg), illetve hirudinnal (3 mg/kg) minden nap kezeltük az állatokat a tumoroltás utáni 8. naptól két héten keresztül. A kísérlet végén (a 31. napon) az állatokat túlaltattuk Nembutallal, eltávolítottuk a lépét és a májat, tömegüket megmértük majd formalinban fixáltuk azokat. A májmetasztázisokat sztereomikroszkóp alatt számoltuk le.

### Tumorindukált vérlemezke-aggregáció (TCIPA)

A koagulációs tesztek TX4 aggregométer segítségével végeztük. Egészséges önkéntestől származó vérből magas vérlemezke-tartalmú plazmát állítottunk elő, és a vérlemezkek koncentrációját  $3 \times 10^8$ /ml-re állítottuk be. A tumorsejtek által indukált vérlemezke-aggregációhoz 1/10 mennyiségű tumorsejtet adtunk a vérlemezkekben gazdag plazmához, majd az aggregációs válasz kialakulásáig 10 percig inkubáltuk a sejteket  $37^\circ\text{C}$ -on.

### Véralvadási paraméterek meghatározása

A heparinok által indukált véralvadási paraméterek közül a leggyakrabban használt laboratóriumi paraméter az aktivált parciális thromboplastin-ido (aPTT). Ennek normális értéke különböző laboratóriumok esetében 22–38 szekundum között van. Az aPTT-n kívül még meghatároztuk a thrombin-ido (TT, 12–19 másodperc), a prothrombinszintet (80–120%), és a fibrinogénszintet (20–400 mg/dl) a SCID egerekből származó vérben. Egy nappal, illetve 1 órával a SCID egerekből történő vérvétel előtt UFH-val, LMWH-val (20–200 IU/kg), illetve hirudinnal (3 mg/kg) kezeltük az egereket, ezután Nembuthallal történő alatast követően a szívükből vett vérből határoztuk meg a véralvadási paramétereket.

### Eredmények

#### Antikoagulánsok hatása a humán melanomasejtek tüdő- és májmetasztázis képtetésére

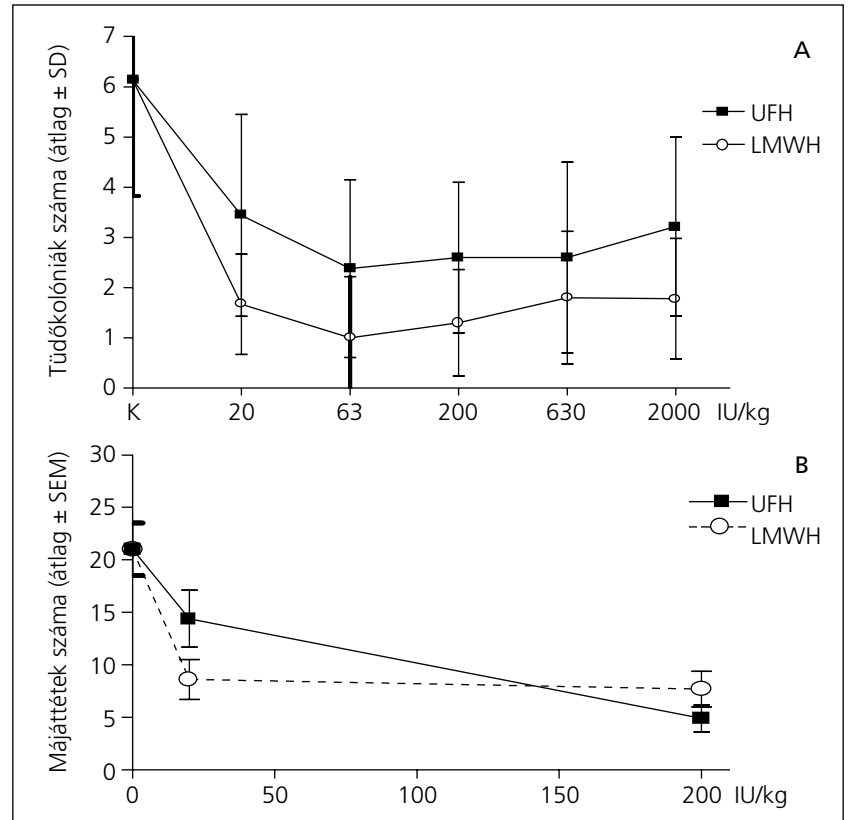
HT168-M1 melanomasejteket intravénásan oltottunk be az antikoagulánsokkal előkezelt SCID egerekbe, majd a kezelést még 3 napig folytattuk. Az oltás utáni 7. héten az eredmények azt mutatják, hogy az alacsony, a humán-ekvivalens, és a magas dózisú heparinok gátolták a tüdőmetasztázisok kialakulását (1A. ábra). Ez a hatás specifikus volt a heparinokra, mert a rekombináns hirudin humán-ekvivalens dózisban nem hatott a tüdőkolonizációra (22).

A fenti antikoagulánsokat májmetasztázis-modellben is teszteltük. A daganatsejteket a lépbe oltottuk, majd az állatokat a 8. naptól két hétig kezeltük heparinokkal intraperitoneálisan. Az LMWH már a humán-ekvivalens dózis 1/10-énél szignifikánsan csökkentette a májmetasztázis képződést, míg a humán-ekvivalens dózisban (200 IU/kg) mindkét fajta heparin gátolta a májmetasztázis képződést (1B. ábra), ugyanakkor a hirudinak semmiféle hatása nem volt (22).

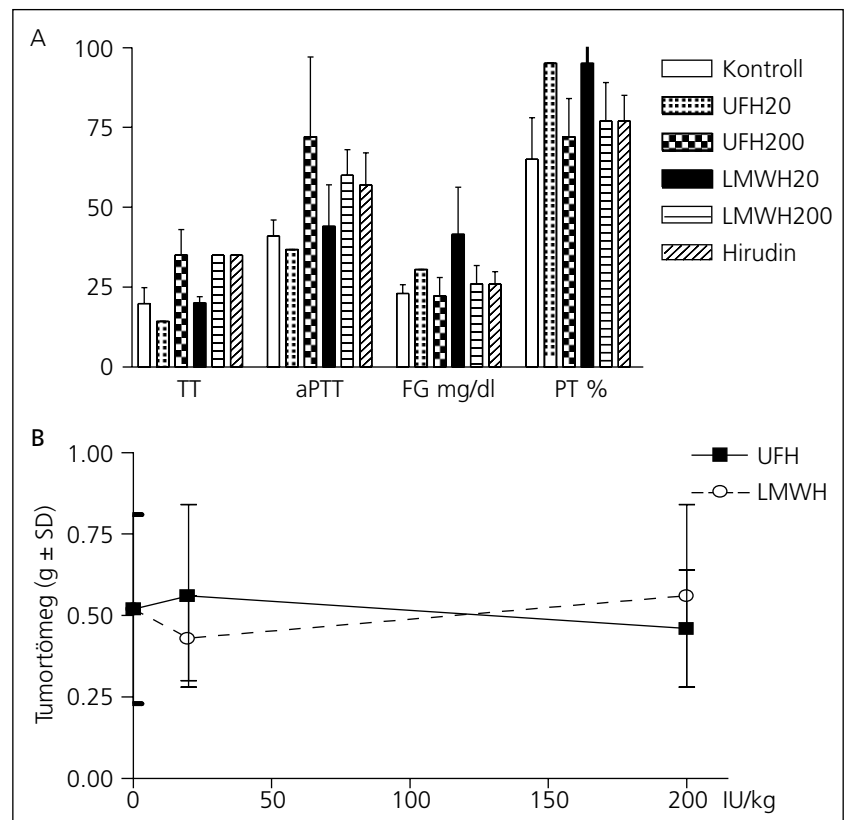
#### Antikoagulánsok hatása SCID egerek hemosztázisára

A vérvétel előtt egy nappal a SCID egereket intraperitoneálisan UFH-val, LMWH-val, illetve hirudinnal kezeltük. A legfontosabb koagulációs paramétereket, mint az aPTT, TT, prothrombinszintet és fibrinogénszintet mértük. A humán-ekvivalens dózisú heparin- és a hirudinkezelés hatására az

1. ábra. Heparinok hatása emberi melanomasejtek tüdőkolonizációjára (A) és májmetasztázisára (B) SCID egerekben ( $n = 10$ ).



2. ábra. Heparinok, illetve hirudin hatása SCID egerek véralvadási értékeire (A) és HT168-M1 emberi melanomasejtek in vivo növekedésére (B). aPTT: thromboplastin-ido, TT: thrombin-ido, FG: fibrinogénszint, PT%: prothrombinszint (A:  $n = 3-5$ , B:  $n = 10$ ).



aPTT- és TT-értékek megemelkedtek, míg a prothrombin- és fibrinogénszintek nem változtak szignifikánsan (2A. ábra).

#### Daganatsejt-proliferáció in vitro és in vivo

Egyik fajta heparin sem befolyásolta sem az in vitro daganatsejt-növekedést, sem az intrasplenikus tumornövekedést (2B. ábra), hasonlóan a hirudinhoz (22).

#### Daganatsejt-adhézió matrixproteinekhez

A melanomasejteket különböző matrixfehérjékkel (fibronektin, laminin, Matrigél, kollagén I-III, fibrinogén) bevont lemezekben inkubáltuk 35-60 percig, és a kitapadt sejtek százalékos arányát meghatároztuk. Sem a heparinok, sem a hirudin nem befolyásolta a humán melanomasejtek kitapadását fibrinogénre (3A. ábra) hasonlóan más matrixproteinekhez.

#### Melanomasejtek in vitro migrációja és inváziója

A heparinok jelenlétében elvégzett migrációs teszt azt mutatta, hogy – függetlenül a kemoattraktánsként használt szérum koncentrációjától – az alacsony és humán-ekvivalens dózisu UFH és LMWH szignifikánsan gátolta a melanomasejtek migrációját (3B. ábra). Matrigéllal végzett kísérleteinkben aheparinok szignifikánsan gátolták a humán melanomasejtek matrixinvázióját is (22).

#### Daganatsejt-indukált vérlemezke-aggregáció

Az aggregometriát abból a célból végeztük el, hogy megállapítsuk, a thrombocytá-aggregáció lehet-e oka a heparinok in vivo tapasztalt hatásának. Kísérleteinkben a HT168-M1 melanomasejtek igen gyengén aggregálták a humán thrombocytákat (8%-os volt a maximális aggregációs képesség a normális, ADP-indukált 62–91%-os arányhoz képest), ami nem volt befolyásolható semmilyen antikoagulánssal sem.

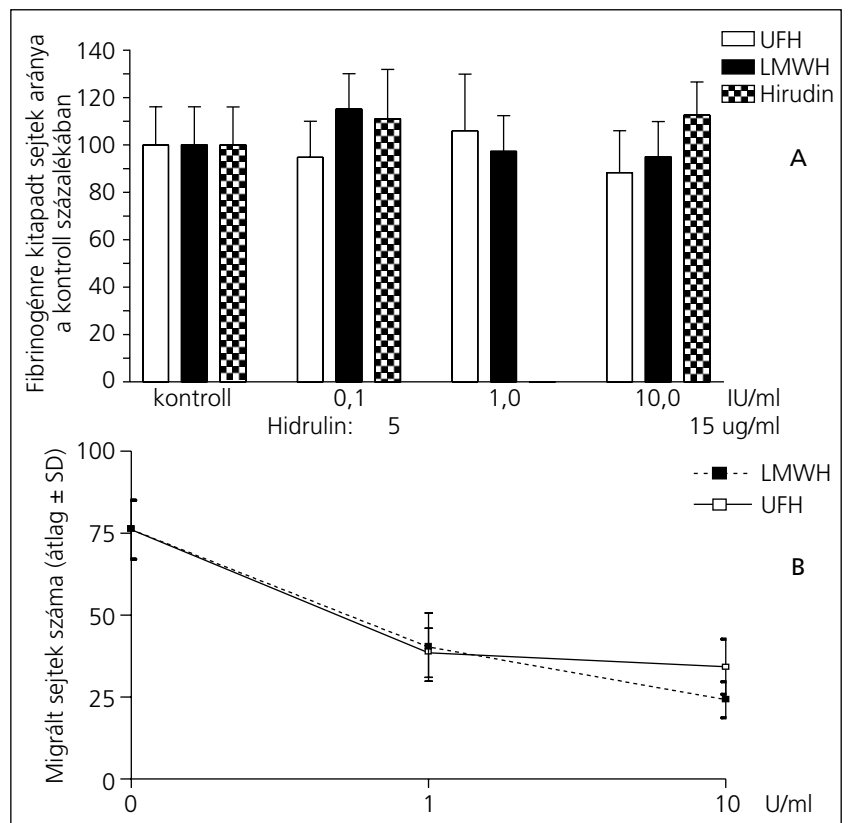
#### Az antimetasztatikus hatás analízise

A tüdőkolonizációs teszt a hematogén úton történt metasztázis-képződés második fázisát foglalja magában, amikor is a keringő daganatsejtek a tüdőben megakadnak, extravazálódnak és kolonizálnak. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ennek a komplex folyamatnak melyik fázisa befolyásolható a heparinkezeléssel. Az állatokat humán-ekvivalens dózisu UFH-val és LMWH-val kezeltük egy nappal, illetve egy órával a tumorsejtek bejuttatása előtt, majd az állatokat az 5. percen, az első illetve az 4. órában túlaltattuk. A tumorsejteket a tüdőmetszeteken melanomaantigének expressziója alapján azonosítottuk és mikroszkóp alatt számoltuk le. Már a legkorábbi időpontban (5 perc) a daganatsejtek tüdőkapilláris-beli gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb volt a heparin-előkezelt állatokban, és ez a 4. óráig észlelhető volt (4. ábra).

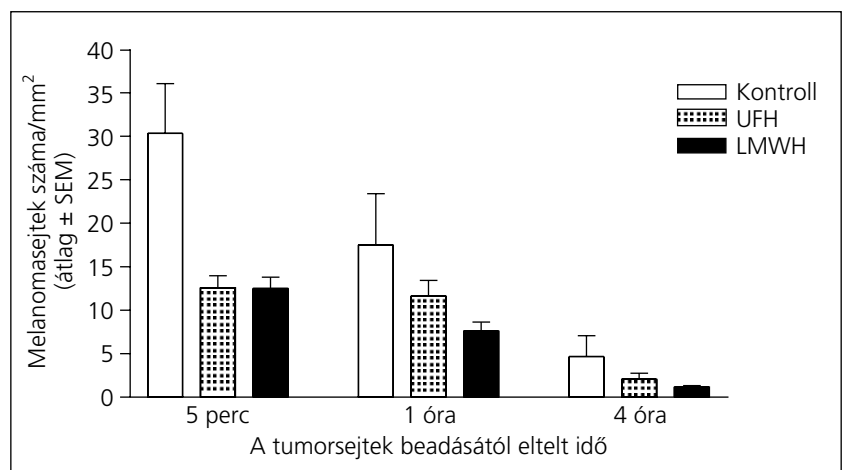
## Megbeszélés

Munkánkkal először bizonyítottuk be, hogy a heparinoknak (UFH, LMWH) humán melanoma metasztázis-modellben specifikus antimetasztatikus hatása van. Korábbi tanulmányok bőséges adatot szolgáltatottak e hatásról rágcsáló melanoma modellekben (20), amit a mi munkánk is megerősít. Kísérletes tanulmányok felvetik, hogy a heparinok antimetasztatikus hatásáért a daganatsejtek (beleértve a melanomát is) vérlemezkékkal és endotheliális P-szelektin molekulákkal való interakciójában játszott szerepük felelős, minthogy a P- vagy L-szelektin-deficiens állatokban hatásuk eltűnt (1, 2, 14). Metasztatikus humán tumormodellünkben a fent említett

3. ábra.  
Heparinok hatása emberi melanomasejtek in vitro fibrinogén-adhéziójára (A) és migrációjára (B) (n=4-6).



4. ábra. Heparinok hatása emberi melanomasejtek tüdőben való kitapadásának dinamikájára SCID egerekben (n=3).



mechanizmusok közül egyik sem tekinthető felelősnek a heparinok áttétképzést gátló hatásáért. Először is az antimetasztatikus hatás már a humán-ekvivalens terápiás dózisonál alacsonyabb koncentrációban is jelentkezett, ahol a véralvadásgátló hatás még nem volt detektálható. Másrészt az általunk használt humán melanoma-sejtvonal (HT168-M1) nem aggregáltatta a vérlemezskéket. A heparinok antimetasztatikus hatásának másik lehetséges mechanizmusa a humán melanoma xenograftokban az L-szelektinek által mediált leukociták gátló hatása (9, 29). A tüdőkolonizáció korai fázisának morfológiai analízise azonban nem tárt fel ilyen sejteket a daganatsejtek közvetlen környezetében az alveoláris kapillárisokban, ezzel kizárva a fent említett mechanizmust. A heparinok antimetasztatikus hatásának vizsgálata azt bizonyította, hogy az intravénásan beadott humán melanomasejtek tovább maradtak a keringésben (ezt kvantitatív PCR módszerrel (17) ki is mutattuk), így tovább voltak kitéve a keringő daganatsejtek éró különböző mechanikai és immuneffektor hatásoknak. Másrészt a heparin-előkezelés meggátolta a melanomasejtek tüdőkapillárisokban való kitapadását, így ez a mechanizmus is közreműködhet az antimetasztatikus hatásban (22).

Különféle kísérletes modellekben igazolták, hogy a heparinoknak antiangiogenetikus hatása is van (19). Minthogy a SCID egerek heparinkezelésének gátló hatása volt daganatsejtek tüdőkapillárisban való korai megtapadására (4 órán belül), ez valószínűtlenné teszi, hogy a heparinok antiangiogenetikus hatása szignifikáns szereppel bírna a humán melanomasejtek áttétképzésének befolyásolásában. Továbbá a tüdő a legjobban vaszkularizált szervek közé tartozik, ahol általában a daganatsejteknek nincs szüksége új erek képzésére ahhoz, hogy a kolóniaképzés meginduljon.

In vitro tanulmányaink során direkt anti-melanoma hatást figyeltünk meg, ami a heparinok egy új érdekes specifikus antimigrációs hatásában nyilvánult meg anélkül, hogy interferálna a daganatsejtek korábban már vizsgált más aktivitásával: a proliferációval, a túléléssel vagy a matrixadhézióval. Irodalmi adatok szerint a heparinok P-szelektin-mediált antimetasztatikus hatása a daganatsejtek felszíni heparánszulfát-proteoglikánjai (HSPG) glükózaminoglikán-láncainak köszönhető (15). A tumorprogresszióban a humán melanoma esetében a CD44v3 és syndecan-4 expressziója játszhat szerepet (6, 24). Kísérletes tanulmányok szerint mind a heparánszulfát-bioszintézis gátlása, mind bázikus peptidekkel történő blokkolásuk antimetasztatikus hatású humán melanoma modellekben (7, 23).

A heparinoknak a tumorsejtek tüdőben való korai megkötődését gátló hatását már másfajta daganattípusokban is leírták, és thrombocytavagy endothelsejt-interakciókkal, vagy az anti-coaguláns hatással magyarázták (20). A daganatsejtek extravazációja a szervkolonizáció során egy kulcsfontosságú lépés, ahol migrációs készségük játssza a legkritikusabb szerepet. Kísérle-

teink azt bizonyítják, hogy a heparinok specifikusan gátolják a daganatsejt-migrációt és a bazális membránon keresztüli inváziót. E gátlás potenciális molekuláris mechanizmusa a heparánszulfát-proteoglikánok integrinsupportáló funkcióival lehet kapcsolatban (19), vagy éppen magukkal az integrinokkal. A kísérleti adatok azt mutatják, hogy a heparinok képesek kötődni az  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-hoz, ami a thrombocyták predomináns integrinjé (5). Korábbi munkáinkban bemutattuk, hogy különböző daganatsejt-típusok, beleértve a humán melanomát is, ektópiás  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 integrint expresszálnak (26), és e funkciók gátlása (antitesteken keresztül) specifikusan megszünteti a melanomasejtek in vitro migrációját és gyengíti metametastatikus képességüket (15, 27).

A heparinok most megfigyelt hatása előrehaladott melanomák klinikai kezelésében is felhasználható lehetne. Igen ígéretes az a megfigyelés, mely szerint a heparinoknak, különösen az LMWH-nak alacsony dózisban ugyanolyan antimetasztatikus hatása van humán melanomára, mint magas dózisban, így ezt a kezelést hosszabb ideig (akár hónapokig) is lehetne a betegeknek adni, a progresszió korai fázisainak diagnosztizálása után (limfatikus áttét és bőrrecidíva). Néhány klinikai vizsgálat már bebizonyította az LMWH direkt antimetasztatikus hatását emlőrákban és kismencedei tumorokban, de melanomára vonatkozó adat még nem ismert (10, 21). Mivel a melanoma kemorezisztens daganat, az LMWH-kezelésnek a betegség progressziója szempontjából komoly jelentősége lehet.

## Irodalom

1. Borsig L, Wong R, Feramisco J, et al. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *PNAS* 98:3352-3357, 2001
2. Borsig L, Wong R, Hynes RO, et al. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *PNAS* 99:2193-2198, 2002
3. Chahinian AP, Propert KJ, Ware JH, et al. A randomized trial of anticoagulation with warfarin and of alternating chemotherapy in extensive small-cell lung cancer by the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 7:993-1002, 1989
4. Constantini S, Kanner A, Friedmann A, et al. Safety of perioperative minidose heparin in patients undergoing brain tumor surgery: a prospective, randomized double-blind study. *J Neurosurg* 94:918-921, 2001
5. Da Silva MS, Horton JA, Wijelath JM, et al. Heparin modulates integrin-mediated cellular adhesion: specificity of interactions with alpha and beta integrin subunits. *Cell Commun Adhes* 10:59-67, 2003
6. Döme B, Somlai B, Ladányi A, et al. Expression of CD44v3 splice variant is associated with the visceral metastatic phenotype of human melanoma. *Virchows Arch* 439:628-635, 2001
7. Fazekas K, Rásó E, Zarándi M, et al. Basic HGF-like peptides inhibit generation of liver metastases in murine and human tumor models. *Anticancer Res* 22:2575-2580, 2002
8. Green D, Hull RD, Brant R, Pineo GF. Lower mortality in cancer patients treated with low-molecular-weight versus standard heparin. *Lancet* 339:1476, 1992
9. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. *J Clin Invest* 101:877-889, 1998

10. Lebeau B, Chastang C, Brechot J-M, et al. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. *Cancer* 74:38-45, 1994
11. Lee AYY, Levine MN, Baker RI, et al. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med* 349:146-153, 2003
12. Letai A, Kuter DJ. Cancer. Coagulation, and anticoagulation. *Oncologist* 4:443-449, 1999
13. Lip GYH, Chin BSP, Blann AD. Cancer and the prothrombotic state. *Lancet Oncol* 3:27-34, 2002
14. Ludwig RJ, Bochme B, Podda M, et al. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* 64:2743-2750, 2004
15. Ma A-Q, Geng J-G. Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow. *J Immunol* 165:558-565, 2002
16. Martin M, Clynes M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11:49-58, 1993
17. Raso E, Meszaros L, Albin A, Timar J. A WT1 expressing metastatic human Kaposi sarcoma xenograft model. *Pathol Oncol Res* 10:22-25, 2004
18. Robert F, Busby E, Marques MB, et al. Phase II study of docetaxel plus enoxaparin in chemotherapy naïve patients with metastatic non-small cell lung cancer: preliminary results. *Lung Cancer* 42:237-245, 2003
19. Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer* 2:521-528, 2002
20. Smorenburg SS, van Noorden CJF. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol Rev* 59:93-105, 2001
21. Thodiyil P, Kakkar AK. Can low-molecular-weight heparins improve outcome in patients with cancer? *Cancer Treatment Rev* 28:151-155, 2002
22. Tímár J, Bereczky B, Gilly R, Tóvári J. Selective antimetastatic effect of low molecular weight heparin on human melanoma xenograft. *Eur J Cancer* S167:580, 2003
23. Tímár J, Diczházi C, Bartha I, et al. Modulation of heparan-sulphate / chondroitin-sulphate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metastatic potential of tumor cells. *Int J Cancer* 62:755-761, 1995
24. Tímár J, Lapis K, Dudás J, et al. Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Cancer Biol* 12:173-186, 2002
25. Tímár J, Tóvári J, Rásó E, et al. Thrombocyte-mimicry of cancer cells: rationale for the prevention and treatment of hematogenous dissemination. *Oncology* (accepted), 2004
26. Trikha M, Tímár J, Zacharek A, et al. Role for  $\beta 3$  integrins in human melanoma growth and survival. *Int J Cancer* 101:156-167, 2002
27. Trikha M, Zhou Z, Tímár J, et al. Multiple roles for platelet gpIIb/IIIa and  $\alpha v\beta 3$  integrins in tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Res* 62:2824-2833, 2002
28. von Tempelhoff GF, Harenberg J, Niemann F, et al. 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* 16:815-824, 2000
29. 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* 110:127-136, 2002
30. Zacharski LP, Henderson WG, Rickles FR, et al. Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. *Cancer* 53:2046-2052, 1984
31. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, et al. Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. *JAMA* 145:831-835, 1981