

A tumorok áttétképzését korlátozó hatóanyagok kutatása

Jeney András, Kenessey István, Timár Ferenc, Oláh Júlia, Pogány Gábor,
Babó István, Harisi Reveka

¹Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet;

²MTA-SE EKSZ Molekuláris Patológiai Kutató Csoport, Budapest

Az áttétképzésre irányuló gyógyszerek sikeres kifejlesztésétől várható további előrehaladás a rosszindulatú daganatok terápiájában. Áttekintve az áttétképzés összetett és több lépcsős eseményeit, a sejt-vándorlást gátló vegyületek az ígéretes antimetasztatikus gyógyszerek közé sorolhatók. Megállapítottuk, hogy a vándorló tumorsejtek fenotípusbeli változékonyságával összhangban a daganatellenes gyógyszerek (doxorubicin, taxol) és a jelátvitelt gátló vegyületek (PD-98059, LY-294002, SB-203580) eltérő hatékonyságot mutatnak az egyes vizsgálati rendszerekben (Boyden-kamra, 3D ECM sejttenyészet). Tanulmányaink arra utalnak, hogy az antimetasztatikus gyógyszerkutatás iránymutató kémiai vegyületei (leading compounds) között érdemes számba venni az extracelluláris mátrix és a tumorsejtek kölcsönhatását befolyásoló (hexil-dezoxiuridin, borrelidin), valamint a géntranszlációt szabályozó (rapamycin, ribavirin) hatóanyagokat. A diagnosztikailag megalapozott, célzott antimetasztatikus gyógyszeres terápia bevezetéséhez további vizsgálatok feladata feltárni a sejt-vándorlás amőboid és csoportos formáinak molekuláris sajátosságait. *Magyar Onkológia* 50:93–100, 2006

Further progress in the therapy of malignant diseases is expected from the introduction of potent antimetastatic drugs. Surveying of the complex and multi-step behavior of the metastatic process, compounds showing inhibitory action against tumor cell migration may be ranked among the promising antimetastatic agents. Our present study indicate, however, that the antimigratory actions of certain antitumor drugs (doxorubicin, taxol), and inhibitors of signal transduction (PD-98059, LY-294002, SB-203580) are highly dependent on the assay applied (Boyden-chamber, 3D ECM cell culture). It has been proposed that agents interrupting cell-extracellular matrix contacts (hexyl-deoxyuridine, borrelidin) and others interfering with the regulatory mechanism of gene translation (rapamycin, ribavirin) could be regarded as leading compounds in the antimetastatic drug development process. Nevertheless, for introducing diagnostically based targeted therapy the forthcoming tasks must include the further elucidation of the molecular mechanisms implicated in the amoeboid and cluster type of cell migration. *Jeney A, Kenessey I, Timár F, Oláh J, Pogány G, Babó I, Harisi R. Inhibition of cell migration for the development of antimetastatic agents. Hungarian Oncology* 50:93–100, 2006



Bevezetés

Az előrehaladott malignus kórképek kimenetelét jelentősen meghatározza a tumorsejtek távoli szövetekbe történő elvándorlása, az áttétképzés, amely a megbetegedések mintegy 50%-ában a beteg halálához vezet. Így érthető, hogy az antimetasztatikus gyógyszerek fejlesztése a daganatok sikeres terápiájának a feltétele. Magyarországon a

daganatok áttétképzésének széleskörű tanulmányozása Kellner Béla irányításával az Országos Onkológiai Intézetben bontakozott ki az 1950-es években, amelynek egyik eredménye a gyógyszerhatás megállapítását szolgáló kísérleti modell kialakítása (23). Lapis Károly már ötven évvel ezelőtt felismerte a metasztázisra ható gyógyszerek kutatásának jelentőségét, és több kémiai vegyület hatékonysági vizsgálatát kezdeményezte. Igen nagy nemzetközi elismerést váltott ki Németh Lászlóval írt közleménye, amelyben beszámoltak a hazai fejlesztésű Degranol hatékonyságáról a Guerin-tumorsejtek megtelepedésére és szaporodására kísérleti állatokban (29, 30). E vizsgálatok folytatásához azonban előbb alapvető ismereteket kellett szerezni a tumorok áttétképzésének saját biológiai és molekuláris szintű mechanizmusáról.

A XX. század végéig az onkológiai ismeretanyagban az áttétképzés egyes szakaszainak kli-

Közlésre érkezett: 2006. június 9.

Elfogadva: 2006. június 15.

Levelezési cím: Dr. Jeney András, Semmelweis Egyetem, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26., Tel.: 1-317-1070, Fax: 1-317-1074, e-mail: ajeney@korbl.sote.hu

A bemutatott vizsgálatokat az OTKA T-32751, Egészségügyi Minisztérium 224/2000, 145/2000 és az NKFP 1/48/2000 pályázat forrásai támogatták.

nikopatológiai jellemzőihez nem kapcsolódott a vándorló tumorsejtek fenotípusbeli elkülönülése a primer tumor sejtpopulációjától, valamint a mikrokörnyezet szerepe az áttétképzésben. A primer tumorból a távoli szervekbe vándorolt tumorsejtek szaporodásának a korlátozását a biszfoszfonátok hatékonyságának megismeréséig (1, 53) a citotoxikus gyógyszerektől várták hosszú évtizedeken keresztül. A biszfoszfonátok térhódítása az emlőtumorkok csontáttéteinek terápiájában szemléleti változást hozott az antimetasztikus gyógyszerkutatásban, mivel hatékonyságukat nem lehetett a tumorsejtekre irányuló citotoxicitásnak tulajdonítani. Ez a körülmény ösztönzőleg hatott a mesenchymalis eredetű sejtek tumorprogresszióban betöltött szerepének a tanulmányozására, emellett az onkológiai alap kutatások az áttétképző tumorsejtek geno- és fenotípusbeli sajátosságairól jelentős megfigyelésekkel gazdagították az onkofarmakológiát.

A jelen tanulmányban rövid áttekintést kívánunk adni az áttétképzést gátló gyógyszerek kutatásának jelenlegi helyzetéről, továbbá bemutatjuk a Lapis Károly szellemi iránymutatásához kapcsolható vizsgálatok néhány következtetését.

Az áttétképzés klinikai és patobiológiai jellemzői

A klinikopatológiai vizsgálatok hívták fel a figyelmet arra, hogy a metasztázisok már a tumorprogresszió korai szakaszában kifejlődnek, az ún. mikrometasztázisok gyakorisága a különböző vizsgálati adatok szerint 20-50% között becsülhető az emlő-, prosztatata-, vastagbél- és tüdődaganaatok esetében (54). Ezzel magyarázható a lokális recidívák és a távoli metasztázisok kialakulása abban az esetben is, amikor a primer tumor eltávolításakor a környezeti nyirokcsomók érintettsége nem állapítható meg (54).

A primer és az áttéti tumorok nemcsak a mikrokörnyezetükkel, hanem egymással is szoros kapcsolatot tartanak fenn, az általuk termelt növekedési faktorokon keresztül. Ez adhat magyarázatot arra, hogy a primer tumor sebészi eltávolításakor a metasztázisok gyorsan kezdenek növekedni, vagy ellenkezőleg tömegük csökken. Továbbá ezek a klinikopatológiai történések rámutatnak az egész szervezet potenciális érintettségére a tumorprogresszióban, és a gyógyszeres terápia szükségességére a tumor sebészi vagy radioterápiás eltávolításakor (16).

A primer tumor kötélkéből felszabaduló tumorsejt jelenti az áttétképzés megindulásának el-

ső lépését, a leválást (desquamatio), amikor érvényesül a tumorsejt csökkent homotípiás affinitása és megszakad a szomszéd sejtekkel a kapcsolat, amelynek molekuláris mechanizmusában az adhéziós molekulák (pl. cadherin, integrin, CD44) és a proteázok hibás illetve szabályozatlan működésének van kiemelkedő szerepe. Az intercelluláris kötélek megszűnését követi a migráció, amely történhet multicelluláris alakzatban, kötélekben és szorosan kapcsolódva az extracelluláris mátrixhoz, vagy egyenként, lebegve, mint az amóbak. A tumorsejtvándorlás citológiailag elkülöníthető egyes formáit eltérő molekuláris mechanizmusok irányítják, tehát különböző támadási pontú gyógyszerekkel befolyásolhatók. A gyógyszeres terápia sikerét tovább korlátozza a vándorlás mechanizmusában a mikrokörnyezet hatására bekövetkező változás. A multicelluláris kötélkéből a tumorsejtek kiszabadulhatnak és lebegve haladnak tovább, vagy fordítva, az amóbooid mozgású sejtek kötéleket alkotnak (9, 1. ábra).

A tumorsejtek vándorlásuk során áttörnek a bazális membránokat, amelynek során – hasonlóan a gyulladásos folyamat sejtjei elemeihez – proteázokat és citokineket termelnek (pl. TNF- α) (28).

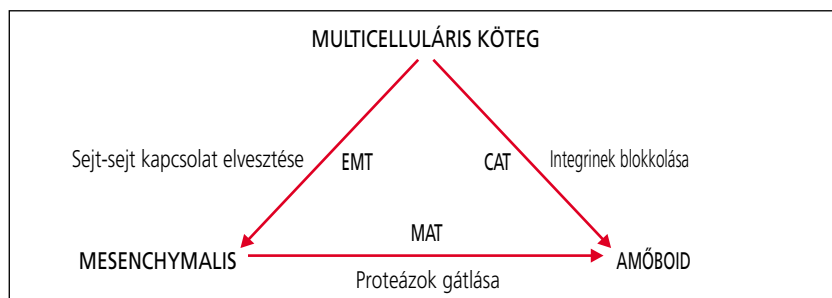
A tumorsejtek és mikrokörnyezetük közötti kapcsolat jelentős szerepet játszik az áttétképzés egész folyamatában, a sejteknek a primer tumor kötélkéből történő leválásában, vándorlásuk elindításában, előrehaladásuk mechanikai feltételeinek biztosításában és letelepedésükben. A tumorprogresszióban túlnyomóan érvényesül az áttétképzés mag és talaj (seed and soil) elmélete, amely azt jelenti, hogy az áttétképző tumorsejtek klonális fejlődés során, génexpresszió-változás eredményeként alakulnak ki a primer tumorban, azonban mikrokörnyezeti tényezők irányítják az áttétképzés egész folyamatát, beleértve az alkalmas befogadó szövet megtalálását (8). Ezt figyeltük meg abban a kísérletben, amelyben a kevertsejtes bazaloid laphámrák invazív jellegű növekedést kizárólag az ortotopikus xenotranszplantációkor mutatott, ugyanakkor növekedési üteme még kifejezettebb volt heterotranszplantáció esetén. A szövettani vizsgálatban megfigyelhető volt, hogy a szájüregből származó kevertsejtes laphámrák behatolt az egészséges szövetekbe és MMP-9-et termelt, ha a xenotranszplantáció a szájüregi submucosába történt (2, 3).

A véredényekbe jutva az epithelialis eredetű tumorsejtek mesenchymalis formát vesznek fel, majd az érpályát epithelialis formában hagyják el. Az epithelialis-mesenchymalis átalakulásnak nevezett esemény terápiai és emellett diagnosztikai korlátot is jelent, mivel megnehezíti a keringő tumorsejtek kimutatását a primer tumor epithelialis markereivel (4, 44).

Az áttétképzési folyamat utolsó állomásának tekinthetjük a tumorsejtek telepkezését a távoli szövetben, ez a folyamat azonban patobiológiailag sokkal összetettebb, mint az a klinikai képből ki lehet látni. Régóta ismert, hogy a primer tumorból kiszabadult tumorsejtek közül csak kevés jut el a telepkezés lehetőségéhez, tehát a malignus kórkép oldaláról tekintve az áttétképzés hatékonysága

1. ábra.

A tumorsejtek vándorlásának mechanizmusai és azok változékonysága. (CAT: collective-amoeboid transition, EMT: Epithelial-mesenchymal transition, MAT: Mesenchymal-amoeboid transition)



igen alacsony. Bebizonyosodott, hogy a tumorsejtek igen gyakran nem az érpályán belül pusztulnak el, hanem a szövetek korlátozzák letelepedésüket és telepképzésüket (5). A befogadó szövet védekező mechanizmusa következtében a tumorsejtek elpusztulnak, vagy életképességük megtartása esetén ún. dormant (nyugvó) mikrometasztázisok formájában vannak jelen. Lapis és mtsai klinikopatológiai tanulmányukban igazolták, hogy nem is feltétlenül szükséges a tumorsejtek kilépése a véredényekből ahhoz, hogy áttéti telepet képezzenek, amennyiben a kapillárisokban fennakadt sejtek szaporodni képesek (31).

Az áttétképző tumorsejt tulajdonságai

Az áttétképző tumorsejt geno- és fenotípusának a megismerése jelentős támpontot nyújt előbb a gyógyszerkutatás, majd az annak eredményeként megteremtett célzott terápia számára. A primer tumor egyes sejtjeiben az áttétképzésre hajlamosító vagy éppen ellenkezőleg, azt korlátozó gének expressziója egyaránt megfigyelhető volt. Az emberi tumorok metasztázisra jellemző génprofiljára vonatkozó vizsgálatok három megállapítást érdemes számba venni: (i) A tumorok metasztatikus tulajdonságának kialakulásával egyes gének expressziója csökken, másoké emelkedik. (ii) Az áttéti tumorban fokozottan expresszálódó gének között gyakran tarthatók a fehérjeszintézis szabályozását irányító (SNRPF, EIF4EL3, HNRPA, DHSP), valamint az extracelluláris állomány kialakításában közreműködő (pl. kollagén I) gének (38, 50). (iii) A tumorok áttétképzésének elmaradása kapcsolatba hozható az ún. metasztázis-szuppresszor génekkel (NM23, KAI-1 (CD82), KISS-1 TIMP, cadherin MKK-4, RhoGDI-2) (41). A metasztatikus genotípus új képességekkel ruházza fel a tumorsejtet, mint a szöveti szerkezet megváltoztatása, proteolízis, vándorlás.

A génexpresszió változásainak ismerete reményt nyújt az antimetasztatikus genotípus terápiaiban hasznosítható módosítására. Ennek a lehetőségét mutatja az NM23 metasztázis-szuppresszor gén aktiválása dexamethasone, medroxi-progeszteron vagy 5-azacitidin kezeléssel (41, 42). A génterápia egyik lehetőségét nyújtja a kiválasztott célpontra tervezett antiszenz oligonukleotidokkal végzett kezelés (50). Munkacsoportunk az MMP-9 génnel szemben tervezett antiszenz oligodeoxinukleotid antimigrációs hatását állapította meg (34).

Tekintettel a metasztatikus genotípus jelentős heterogenitására és a mikro környezet szerepére a gének expressziójában, a jelenlegi kutatások a metasztázis fenotípusát fenntartó mechanizmusokra és az azokat aktiváló molekulákra ható vegyületek felismerésére irányul. Az áttétképző tumorsejtek fenotípusbeli változékonysága biztosítja egyfelől az egymást követő patobiológiai események (leválás a primer tumor kötélkéből, vándorlás, letapadás stb.) során felmerülő több irányú működésbeli feladatok ellátását, másfelől a fokozott életképességet (10). Az áttétképző tumorsejtek gyakran kerülnek hypoxiás illetve

anoxiás környezetbe, ezért a glikolízissal energiát nyerő szubpopulációk előnyben vannak, ennek tulajdonítható, hogy az áttétképző méhnyakrákban és a fej-nyaki daganatokban megnőtt a tejsav koncentrációja. A sejtek anaerob glikolízise kedvez az áttétképzésnek, amelyet igazol az a preklinikai vizsgálat, amelyben növelni lehetett az áttétképzést, ha a tumorsejtek alkalmazkodtak a hypoxiához (10, 39, 43).

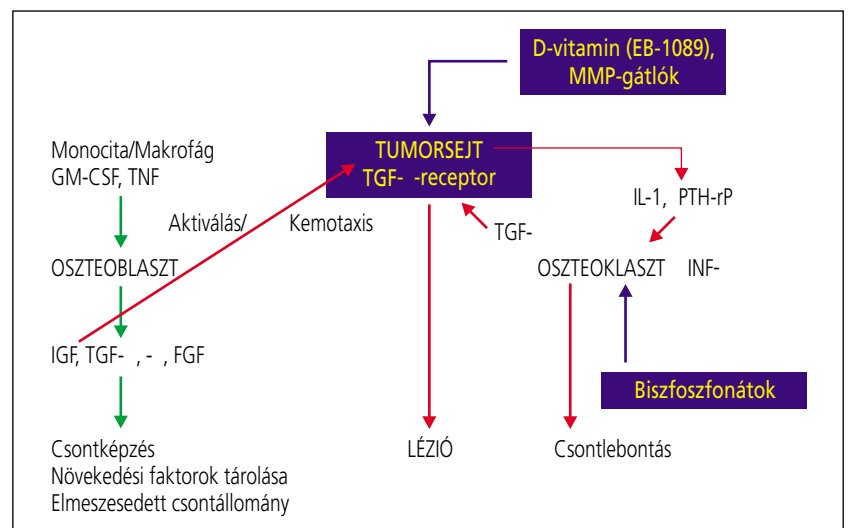
Az epithelialis tumor és a szövetek mesenchymalis sejtjei közötti kapcsolatok gátlása

A tumorprogresszió jelentős hajtóerejének tekinthető a mesenchymalis eredetű sejtekkel (fibroblasztok, endothel, monociták) kialakult kétoldali kapcsolat (25), amely jól megfigyelhető a csontáttétek képződésekor (6). A tumorsejtek önmagukban nem lennének képesek a csontállományt megbontani, ezért csak úgy tudnak letelepedni, ha megváltoztatják az oszteoklasztok és az oszteoblasztok közötti egyensúlyi állapotot. A tumorsejtek által termelt növekedési faktorok megzavarják a csontállomány megújulási folyamatát, amely súlyos oszteolitikus elváltozást hoz létre.

A biszfoszfonátok halogén-, amino-alkil- és imidazol-származékainak biológiai aktivitása a monocita-makrofág rendszerre irányul; gátolják az oszteoklasztok képződését a monocitákból és csökkentik a makrofágok fagocitózist és citokin-termelést. A biszfoszfonátok gátolják az oszteoklasztok csontleépítő működését, majd elpusztítják őket közvetlenül vagy az oszteoblasztok közvetítésével, ezáltal csökkenteni vagy késleltetni képesek a csontrendszer lebontását (32). A biszfoszfonátoknak az oszteoklasztokra irányuló gátló hatására az oszteolízis mérséklődik, ezért csökken a növekedési faktorok (IGF-1, TGF- α) kiáramlása a csontállományból (2. ábra).

A harmadik generációs biszfoszfonátok hatása kiterjedhet közvetlenül a tumorsejtekre, amelyekben gátolják a koleszterin-bioszintézis mevalonátképződési lépését. Ennek következtében elmarad a GTP-t kötő Rho fehérje prenilációja, és így a citoskeleton-rendszer hibásan működik a

2. ábra.
Az oszteoklasztok és az oszteoblasztok közötti egyensúlyi állapot változása az áttétképző tumorok jelenlétében; a csontáttétek gyógyszerinek támadási pontjai



sejtvándorlásban (40). A zoledronát hatását a Rap-1 prenilációjára, az Akt foszforilációjára és a kasz-páz-3 aktiválására ki lehet védeni geranilgeraniol, de nem farneszol jelenlétében (6, 16, 32, 53).

Proteázok gátlása

Az áttétképzés egyik patobiológiai eseménye az extracelluláris mátrix lebontása. Bár az extracelluláris mátrix biopolimerjeinek a lebontásában több enzim (szerinproteázok, plazmin, stb.) is közreműködik, a mátrix-metalloproteázok (MMP) szerepét kiemelt érdeklődés vette körül, mert az epithelialis eredetű tumorsejtek invazív növekedése során a bazális membrán áttörése az MMP család két tagjának (MMP-2 és -9) tulajdonítható. Több preklinikai vizsgálatban, így a szájüregi kevertsejtes laphámrák xenotranszplantációs modellrendszerben összefüggést lehetett tapasztalni a tumorprogresszió és az MMP-9 emelkedett aktivitása között (2). A klinikai tanulmányok hasonló következtetéseit munkacsoportunk is megerősítette, amikor magas MMP-9-aktivitást figyelt meg azokban a petefészekrákokban, amelyek növekedése a műtét után rövid időn belül felgyorsul (7). A széles körben megindult gyógyszerfejlesztés eredményeként több kollagenáz- (MMP-2/9) gátló vegyület antimetasztatikus hatásának a prelinikai majd klinikai vizsgálatára került sor, amelyek közül említésre méltó a Marimastat (BB2516). A klinikai vizsgálatok eredménye szerint stabilizálja a gyomordaganat progresszióját, kedvező hatású temozolomiddal kombinációban a glioblastoma multiforme kezelésekor, valamint pancreasrákban gemcitabinnal együtt.

Törekvés a sejtvándorlást szelektíven gátló újabb vegyületek felismerésére

Miután irodalmi beszámolók és saját vizsgálataink alapján bepillantottunk az áttétképzést meghatározó celluláris és molekuláris mechanizmusok néhány eseményébe, feltételeztük, hogy

a sejtvándorlás gátlásának a vizsgálata az antimetasztatikus gyógyszerfejlesztés ígéretes kiindulópontja lehet (17, 18, 45-47, 51). Ezt a feltételezést kívánta alátámasztani az alábbi kérdések tanulmányozása: 1. Mennyiben befolyásolható a migráció szelektíven, tehát kifejezettebben, mint a proliferáció? 2. A sejtvándorlás gátlóinak a hatékonysága egyaránt megállapítható-e a legelterjedtebben alkalmazott két módszerrel, a Boyden-kamrában és a háromdimenziós sejtenyészetben? 3. A sejt szabályozó mechanizmusainak módosítása mennyiben változtatja meg a sejtvándorlást gátlók hatását?

Anyag és módszer

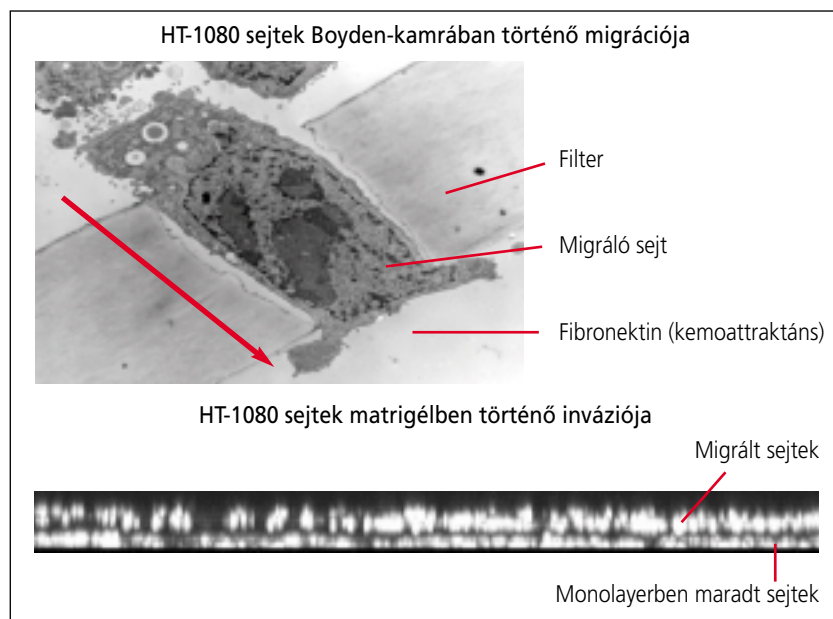
Az áttétképzés egyes szakaszai közül jelenleg elsősorban a tumorsejtek migrációjának a vizsgálata áll a gyógyszerfejlesztés homlokterében. A hatékony vegyületek kiválasztására az in vitro kemotaktikus modell terjedt el, az ún. Boyden-kamrában, amelyben a tumorsejtek 8 µm pórusnagyságú szűrőn ECM jelenlétében vagy anélkül haladnak át. A kémiai vegyületek sejtproliferációra és sejtvándorlásra irányuló hatásának a szimultán, ugyanazon tenyészetben történő meghatározására munkacsoportunk az ECM-gélt tartalmazó háromdimenziós sejtkultúrát alkalmazza (13-15, 36) (3. ábra).

A tumorsejtek vándorlását HT-1080 fibrosarcoma és Oscort osteosarcoma in vitro sejtenyészeteken vizsgáltuk az előző közleményeinkben leírtak szerint (13, 36). A tumorsejtek egyedi és kötelekben (cluster) történő vándorlásának az összehasonlítására alkalmasnak ígérkezett egyes jelátvitelt gátló vegyületek hatásának összehasonlítása Boyden-kamrában és 3D sejtenyészetben. A szövettényészethez használt (fötális borjú-savó (FCS), RPMI-1640 tápfolyadék, gentamycin), valamint „teszt” anyagokat (PD-98059, SB-203580, LY-294002, okadánsav) a Sigma-Aldrich (Magyarország) Kft-től szereztük be.

3D ECM-gél inváziós módszer: 24-well multiplate-re felvitt sejtenyészetet (induló sejtszám 10^5 sejt/W) 24 óráig inkubáltunk 1 ml 10% FCS-t tartalmazó médiumban, 37 °C-on, 5% CO₂ mellett. Ezután a monolayerben maradt tenyészetet 24 órán keresztül kezeltük a teszt-anyagokkal, majd médiumcsere után 200 µl ECM-EHS matrigélt rétegeztünk a tenyészetre, majd újabb 24 órán keresztül inkubáltunk. 72 órás tenyészetben. Bürker-kamra segítségével számoltuk meg a monolayerben maradt, ill. a gélbe vándorolt sejteket.

Sejtvándorlás vizsgálata Boyden-kamrában: A 6-well multiplate-re felvitt sejtenyészetet (induló sejtszám $2,5 \times 10^5$ sejt/W) 24 óráig inkubáltunk 2,5 ml 10% FCS-t tartalmazó médiumban, 37 °C-on, 5% CO₂ mellett. Ezután a monolayerben maradt tenyészetet újabb 24 órán keresztül kezeltük a teszt-anyagokkal. A sejtek felszedése után (0,02%-os Sigma-Aldrich EDTA) a kemotaxist 48 lyukú Boyden-kamrában (NeuroProbe, Pleasanton, CA) 8 µm pórusátmérőjű Nucleopore membránon (NeuroProbe) keresztül végeztük. A kamra alsó részébe kerül a kemoattraktáns fibronectin (100

3. ábra.
A sejtvándorlás vizsgálati módszerei (Dr. Paku Sándor felvétele)



$\mu\text{g/ml}$), a felső kamrafélbe pedig a HT-1080 tumorsejtek (2×10^4 /lyuk) 10% FCS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumban. A kamrát ezután 3 órán keresztül inkubáltuk 37°C -on 5% CO_2 atmoszférában. A teszt végén a filtert eltávolítottuk, PBS-sel lemostuk a nem migrált sejteket, utána metanolban fixáltuk, és megfestettük Diffquick oldattal (American Scientific Products, McGraw Park, IL). A teljes migrált sejtszámot Eagle-Eye denzitometria segítségével állapítottuk meg.

Az áttétképzés *in vivo* preklinikai vizsgálata: Az áttétképzést C57BL/6 hím egerek lépébe beoltott colon 38 adenocarcinomával kialakított ún. lép-máj modellben vizsgáltuk. Ez a kísérleti rendszer alkalmas a primer lokalizációban növekedés növekedésének, valamint az onnan kiáramló tumorsejtekből a májban képződött kolóniák számának a meghatározására és tömegének a megítélésére.

Eredmények

A sejt vándorlás szelektív gátlásának lehetősége

Gyakran felvetődő kérdés, hogy lehet-e a tumorsejtek invazív növekedésének egyik elemét, a sejt vándorlást szelektíven, a proliferációtól függetlenül csökkenteni. A 3D sejtenyészeten végzett vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy a tumorsejteknek ezt a két működését a citotoxikus gyógyszerek eltérő mértékben gátolhatják. A 3D ECM sejtenyészeten a topoizomeráz II-t gátló doxorubicin alacsony koncentrációban sokkal kifejezettebben csökkentette a vándorló sejt populációt, mint a monolayerben maradt nem vándorló tumorsejteket. Ezzel szemben a taxol mind az Osort, mind a HT-1080 sejtek 3D tenyészeten kifejezettebben gátolta a sejtek szaporodását, mint vándorlását. A rapamycin vizsgálata további bizonyítékot szolgáltatott arról, hogy megalapozottnak tekinthető a szelektív sejt vándorlást gátló hatóanyagok gyógyszerként történő fejlesztésének tervezése (1. táblázat).

További kérdés azonban, hogy a vizsgált vegyületek hatása mennyiben változik az egyes kísérleti modellekben, különös tekintettel a sejt vándorlás mechanizmusának a mikrokozmosztól való függőségére. A Boyden-kamrában a tumorsejtek kemo-taktikus fibronectin irányítása alatt a $8 \mu\text{m}$ átmérőjű pórusokon egyedileg haladnak át, míg a 3D ECM-gélben kötélekben haladnak, így valószínűsíthető a sejt vándorlás eltérő molekuláris mechanizmusainak érvényesülése. Összehasonlítva a taxol gátló hatását a HT-1080 fibrosarcoma sejtek vándorlására Boyden-kamrában és 3D ECM tenyészeten, igen eltérő hatékonyságot lehetett megállapítani. A taxol, amelyik szelektív sejtproliferáció-gátló hatást mutatott az Osort osteosarcoma sejtek 3D tenyészeten, a proliferációnál jobban gátolta a HT-1080 sejtek vándorlását Boyden-kamrában. A taxol Boyden-kamrában megfigyelhető sejt migrációt gátló hatását számottevően lehetett mérsékelni a MEK/ERK-gátló, PD98059 jelzésű vegyülettel, amely önmagában nem befolyásolta a sejt migrációt ebben a vizsgálati rendszerben (2. táblázat).

A jelátvitel mechanizmusának gátlóival végzett vizsgálatok további adatot szolgáltatottak a Boyden-kamrában és a 3D sejtenyészeten történő sejt vándorlás eltérő válaszreakcióiról. A 3. táblázatban feltüntetett adatok mutatják, hogy a fibrosarcoma sejtek vándorlását Boyden-kamrában a proteinfoszfatáz 2A és a PKC gátlásával, 3D ECM tenyészeten pedig ERK- és p38-SAPK-gátlókkal lehetett jelentős mértékben csökkenteni.

Tumorsejtek és az extracelluláris mátrix kapcsolat módosítása

Az integrinek, mint sejt felszíni receptorok fontos szerepet játszanak a sejt és mikrokozmosz közötti kétirányú jelátvitelben, amelyek molekuláris letéteményese az integrinek kapcsolódása egyfelől a sejt citoskeletonhoz, másfelől az ECM-biopolimerekhez. A sejtek specifikus integrin-ECM profilja jelentősen eltérő, változásai befolyásolják a sejtek működését. A megfelelő ECM-integrin kapcsolódáskor aktiválódik az integrin-

1. táblázat.
Daganatellenes gyógyszerek hatása a proliferációra és a sejt vándorlásra Osort 3D ECM sejtenyészeten

Kezelés	Sejtek száma			
	Nem vándorló		Vándorló	
	átlag \pm SD($\times 10^4$)	%	átlag \pm SD($\times 10^4$)	%
Kontroll	12,5 \pm 2,0	100	19,0 \pm 3,1	100
Taxol				
0,1 ng/ml	7,8 \pm 0,9	57	17,6 \pm 1,2	93
1,0 ng/ml	6,1 \pm 0,6	49	12,7 \pm 1,8	67
10,0 ng/ml	2,0 \pm 0,6	16	6,0 \pm 1,4	32
Doxorubicin				
0,01 $\mu\text{g/ml}$	18,3 \pm 1,5	146	9,5 \pm 3,0	50
0,05 $\mu\text{g/ml}$	10,4 \pm 2,8	83	2,7 \pm 0,6	14
0,25 $\mu\text{g/ml}$	7,6 \pm 2,7	61	2,0 \pm 1,0	10
Rapamycin:				
0,05 $\mu\text{g/ml}$	11,8 \pm 3,5	94	3,7 \pm 0,8	19

2. táblázat. A taxol daganatellenes hatásának módosítása a MEK/ERK gátlásával HT-1080 fibrosarcoma sejteken sejtenyészeten és Boyden kamrában

Kezelés	Proliferáció (sejtszám)		Migráció (denzitás)	
	$\times 10^4$	%	átlag \pm SD	%
Kontroll	46,5	100	46,6 \pm 8,6	100
Taxol (50 ng/ml)	18,5	39,8	1,8 \pm 1,8	3,9
Taxol (10 ng/ml)	28,5	61,3	5,3 \pm 2,8	11,4
Taxol (1 ng/ml)	31,5	67,7	35,4 \pm 5,3	76,0
Taxol (0,1 ng/ml)	26,0	55,9	60,8 \pm 11,6	130,5
PD-98059 (50 μM)	28,5	61,3	43,5 \pm 7,2	93,3
PD-98059 + Taxol (50 ng/ml)	19,5	41,0	4,0 \pm 4,0	8,6
PD-98059 + Taxol (10 ng/ml)	32,5	68,4	11,9 \pm 5,0	25,5
PD-98059 + Taxol (1 ng/ml)	26	55,9	51,8 \pm 6,1	111,1
PD-98059 + Taxol (0,1 ng/ml)	41,0	87,4	63,6 \pm 2,4	136,5

3. táblázat.
Jelátvitelt gátlók eltérő hatása a HT-1080 fibrosarcoma sejtek vándorlására Boyden-kamrában és 3D ECM sejttenyészetben (kontroll %)

Kezelés	Támadási pont	Prolifерáció	Boyden	3D ECM
		%	% (átlag±SD)	% (átlag±SD)
PD-98059 (50 μM)	MEK/ERK	92,5	109,2±6	33,3±2,8
LY-294002 (50 μM)	Foszfatidilinozitol-3-kináz	104	134,3±15,2	91,1±11,7
SB 294002 (10 μM)	P38/SAPK	103	77±19	36±15
Okadánsav (10 nM)	Protein-foszfataz 2	112	0,3±0,3	67,9±8,6
Calphostin-C (100 nM)	Proteinkináz-C	72	5,2±5,2	72,4±3,2

4. táblázat. A sejt-ECM kapcsolatra ható vegyületek antimigrációs hatása HT-1080 fibrosarcoma 3D ECM sejttenyészetében (átlag ± SD)

Kezelés	A Szaporodás monolayerben sejtszám (x10 ⁴)	B Vándorlás az ECM-gélbe sejtszám (x10 ⁴)	Inváziós index B/(A+B) %
Kontroll	10,1±1,1	9,8±1,5	49
HUdR (50 μg/ml)	14,3±1,0	5,8±1,2	29
Lodronát (300 μg/ml)	12,8±1,2	6,8±0,8	35
Lodronát (150 μg/ml)	10,3±1,0	8,0±1,3	44
Borrelidin (50 ng/ml)	12,0±1,3	8,6±1,3	41
Borrelidin (150 ng/ml)	14,33±1,4	5,7±0,8	28
Borrelidin (450 ng/ml)	11,8±1,9	4,3±0,5	27

5. táblázat. Fehérjeszintézis szabályozását gátlók hatása a colon 38 adenocarcinoma áttétképzésére (átlag ± SD)

Kezelés	Primer tumor tömege (g)	Máj tömege (g)	Májáttétek száma
Kontroll (2x5, 0,9 % NaCl 0,2 ml)	1,57±0,8	6,18±0,9	12,0±1,36
Ribavirin (2x5, 0,04 mg/kg p.o.)	1,69±0,3	3,7±0,8	6,0±2,1
Rapamycin (2x5, 1,5 mg/kg i.p.)	3,04±0,58	1,97±0,2	4,3±0,8
Borrelidin (2x5, 0,2 mg/kg i.p.)	1,99±0,6	4,25±0,8	6,0±1,0
Rapamycin + Borrelidin	1,66±0,4	2,6±0,7	2,8±0,4

függő kináz (ILK), amely a jelátvitelt közvetítve az Akt/PKB-hez a sejtanyagcserét és a citoszkeletális rendszert alkalmassá teszi a migrációra (37). Ennek egyik példáját mutatja az IGF-receptor együttműködése az αvβ3 integrinnel, mely szelektíven a tumorsejt migrációjának a szabályozására irányul, tehát a sejtszaporodás fokozódása nélkül. Az αvβ3 integrin expressziója akkor következik be, amikor a melanomasejt horizontális növekedése vertikális irányba vált át, tehát a tumorsejt invazivitása megnyilvánul. A melanoma sejteinek áttétképzése megakadályozható az

αvβ3 integrin működésének a felfüggesztésével. Az αvβ6 integrin fokozott megjelenése egybeesik az MMP-9 fokozott termelésével.

Az integrin-ECM kapcsolat módosítására alkalmas gyógyszerek fejlesztésének kiindulási pontját előbb az RGD-peptidek, majd a disintegrinek családja jelentette, amelyhez később csatlakozott az integrin inaktiválását eredményező egyéb molekulák, pl. cilengitid és a borrelidin felismerése. A közelmúltban végzett vizsgálatainkban megfigyelhettük az extracelluláris mátrix (ECM) egyes biopolimerjei (fibronektin, heparánszulfát-proteoglikán) tumorsejt-migrációt fokozó hatását. Megállapítottuk, hogy HSPG és a fibronektin migrációt fokozó hatása kapcsolatba hozható a tumorsejtek integrinexpressziójának és MMP-9-aktivitásának a fokozódásával, valamint a topoizomeráz II és topoizomeráz I expressziója közötti arány megváltozásával (13-15).

A heparánszulfát-proteoglikánok áttétképzést fokozó hatásának a jelentőségét alátámasztja az, hogy a szintézisüket gátló 5-hexil-2'-dezoxiuridin (HUdR) jelentősen csökkenthető egyes tumorok áttétképzése. A HUdR antimetasztikus hatásának a felismerése a vegyület molekuláris támadási pontja és a HSPG metasztatizálásban betöltött szerepének azonos munkacsoportban történő vizsgálatának köszönhető. A HUdR citotoxikus hatás módjának tanulmányozása azt a következtetést eredményezte, miszerint ez a pirimidin-antimetabolit nem a nukleotidszintézist gátolja, hanem az uridinnukleozid-transzportot, ezért csökkenti a HSPG-termelést (35). Ugyanakkor kapcsolatot lehetett megállapítani LLT sejtvonalakban a fokozott áttétképzés és az emelkedett HSPG-termelés között (49). Ez a két megfigyelés ösztönözte az 5-hexil-2'-dezoxiuridin antimetasztikus hatásának a megállapítására (21, 22, 24, 47, 48).

A tumorsejtek és az extracelluláris mátrix közötti kapcsolat befolyásolható az integrinek vagy az egyes speciálisan kötődő biopolimerek inaktiválása útján. Az inaktiválás mechanizmusa a bioszintézis elmaradása, vagy a kapcsolat közvetlen vagy közvetett felfüggesztése. Az eddigi vizsgálataink arra utalnak, hogy a HUdR a heparánszulfát, a lodronát pedig egyéb proteoglikánok képződésének a csökkentése útján módosítja egyes tumorsejtek vándorlását. A borrelidin csökkenti az α5β3 integrin expresszióját, és ezáltal módosul az érintett tumorsejtek kapcsolata az extracelluláris állománnyal, valamint az integrin-közvetített intracelluláris jelátvitellel. A 4. táblázatban látható, hogy a HUdR szelektíven visszatartotta a sejtek vándorlását a sejtpopuláció nagyságának a változása nélkül, így viszonylagosnak kell tekinteni a nem vándorló, monolayerben maradt sejtek számának az emelkedését. Borrelidin kezelést követően jelentősen csökken a vándorló sejtek száma, de változatlan a nem vándorló sejtpopuláció nagysága (4. táblázat).

Az áttétképzés in vivo korlátozása a jelátvitelt gátló vegyületekkel

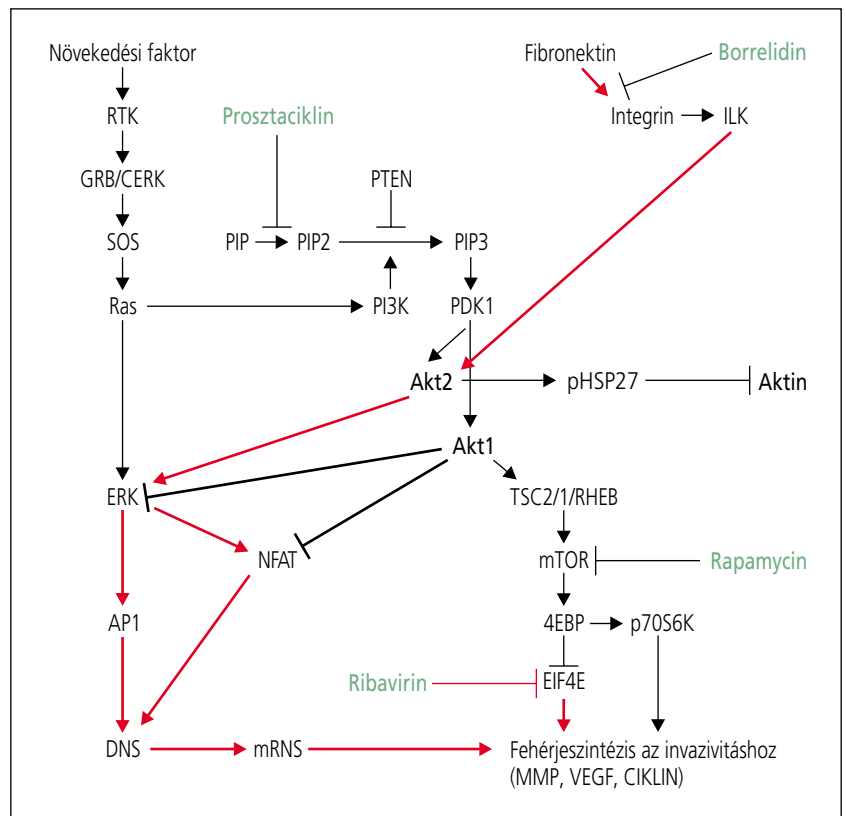
A sejt-vándorlás szövettényészetekben megállapítható szelektív csökkentése nyomán az a kér-

dés vetődik fel, hogy ez a hatás elegendő-e az áttétképzés korlátozására. A colon 38 adenocarcinoma sejtek lépbe történő transzplantációjával kialakított metasztázis-modellben összehasonlítottuk a rapamycin, a borrelidin és a ribavirin hatását a primer tumorra és a képződött májjáttétekre. A kiválasztott vegyületek a géntranszláció szabályozásában szerepet játszó molekulákra (mTOR, e14FE, p38SAPK) irányuló hatásukon keresztül csökkentik a fehérvérsejtet (11, 12, 20, 26, 27, 52). Igen figyelemreméltónak tartható, hogy ezek a vegyületek nem csökkentették a primer tumor növekedését, azonban jelentősen korlátozták az áttétek számát a májban, valamint ez utóbbinak az áttétek következtében megnövekedett tömegét (5. táblázat).

Megbeszélés

A korszerű gyógyszerfejlesztést az adott kórképet meghatározó patobiológiai események ismeretére kívánatos építeni. Az antimetasztatikus gyógyszerek kutatása vonatkozásában ez azt jelenti, hogy meg kell határozni az áttétképzésnek azt a patobiológiai eseményét, amelynek a gyógyszeres befolyásolása képezi a vizsgálat irányát. Ebből következik, hogy az antimetasztatikus hatóanyagok vizsgálatok a gyógyszerfejlesztés három feltételének kell eleget tenni: (i) Ismerni kell az áttétképzés molekuláris mechanizmusait, amelyek a kiválasztott vegyület potenciális célpontjaként tekinthetők. (ii) Ki kell alakítani a megfelelő hatástani értékmérő módszert. (iii) Rendelkezni kell a hatékonyságot megjelenítő kémiai vegyülettel (ún. leading compounds), amelynek származékai közül lehet az optimálisat (hatékonyság, toxikológiai és farmakokinetikai tulajdonságok alapján) kiválasztani.

Napjainkban az áttétképzés összetett eseményei közül a tumorsejtek vándorlását szelektíven gátló hatóanyagoktól várható hatékony antimetasztatikus gyógyszer kifejlesztése. Ennek a célnak a megvalósítását azonban megnehezíti az a körülmény, hogy a vándorló tumorsejtek a változó mikro környezeti tényezők következtében eltérő molekuláris folyamatokban vesznek részt, amely jelentősen meghatározza a kémiai vegyületekkel szembeni válaszreakcióikat. Ezt a helyzetet igen jól mutatja az epithelialis-mesenchymalis átalakulás, valamint az amőboid és kötelékben történő vándorlási formák váltakozó megjelenése. Ezért a jelenlegi feladatok egyike a sejt vándorlás egyes formájának a további jellemzése. Ennek alapján kell kialakítani a megfelelő gyógyszer-kiválasztási módszert, hogy a sejt vándorlás egyes formáira ható gyógyszerek álljanak rendelkezésre. Munkacsoportunk ezt a célkitűzést szem előtt tartva összehasonlította citotoxikus gyógyszerek és jelátvitelt gátlók hatását a Boyden-kamrában és a 3D-ECM sejtenyészetben megfigyelhető sejt vándorlásra. A sejtproliferáció gátlására kifejlesztett citotoxikus gyógyszerek alacsony koncentrációban jelentős mértékben, de az alkalmazott vizsgálati módszertől függően, szelektíven gátolták a tumorsejtek vándorlását. Bár a sejt vándorlás különböző formáit (amőboid, csoportos) irányító molekuláris mechanizmusok ma még csak körvonalaikban ismertek, többoldalú vizsgálatok utalnak a PI3K/Akt/mTOR közreműködésére a sejt felszínről érkező jelek továbbítására mind a sejtmozgást végrehajtó citoskeletális rendszer, mind az invazív növekedéshez szükséges fehérjék transzlációs szintű szabályozói felé (33) (4. ábra).



4. ábra. A sejt vándorlás szabályozásában résztvevő PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonal

Irodalom

1. Ali SM, Esteva FJ, Hortobagyi G, et al. Safety and efficacy of bisphosphonates beyond 24 months in cancer patients. *J Clin Oncol* 19:3434-3437, 2001
2. Babó I, Bocsi J, Jeney A. The site-dependent growth characteristics of a human xenotransplanted basaloid squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:35-41, 1999
3. Babó I, Zalatnai A, Schaff Z, et al. The pathomorphology of a human xenotransplanted basaloid squamous cell carcinoma. *Neoplasma* 45:210-215, 1998
4. Boyer B, Valles AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 60:1091-1099, 2000
5. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2:563-572, 2002
6. Cooper CR, Pienta KJ. Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3:6-12, 2000
7. Demeter A, Szirmai K, Oláh J, et al. A mátrix metalloproteázok aktivált formáinak megjelenése és a fibronectin koncentrációjának emelkedése recidiváló petefészekrákban. *Orvosi Hetilap* 145:1617-1624, 2004
8. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3:453-458, 2003
9. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3:362-374, 2003

10. Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, et al. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett* 115:185-193, 1997
11. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8:128-135, 2002
12. Han S, Khuri FR, Roman J. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res* 66:315-323, 2006
13. Harisi R, Dudás J, Pogány G, et al. Repopulation of osteosarcoma cells after treatment with doxorubicin in the presence of extracellular matrix biopolymers. *Cancer Chemother Pharmacol* 58:334-342, 2006
14. Harisi R, Dudás J, Timár F, et al. Antiproliferative and antimigratory effects of doxorubicin in human osteosarcoma cells exposed to extracellular matrix. *Anticancer Res* 25:805-813, 2005
15. Harisi R, Dudás J, Timár F, et al. Invasive growth and topoisomerase-switch induced by tumorous extracellular matrix in osteosarcoma cell culture. *Cell Biol Int* 29:959-967, 2005
16. Hart IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. *Lancet* 339:1453-1457, 1992
17. Hauptmann S, Budianto D, Denkert C, et al. Adhesion and migration of HRT-18 colorectal carcinoma cells on extracellular matrix components typical for the desmoplastic stroma of colorectal adenocarcinomas. *Oncology* 65:174-181, 2003
18. Hejna M, Raderer M, Zielinski CC. Inhibition of metastases by anticoagulants. *J Natl Cancer Inst* 91:22-36, 1999
19. Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2:91-100, 2002
20. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, et al. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* 64:3171-3178, 2004
21. Jeney A, Kopper L, Hidvégi E, et al. Pharmacobiochemical properties of 5-alkyl-2' deoxyuridine on tumor growth and glycoconjugate synthesis. *Int J Exp Clin Chemother* 4:32-39, 1991
22. Jeney A, Timár J, Pogány G, et al. Glycosaminoglycans as novel target in antitumor therapy. *Tokai J Exp Clin Med* 15:167-177, 1990
23. Kellner B. A daganatos áttételek képződésére és azok kemoterápiás befolyásolására vonatkozó vizsgálatok. *Orvosi Hetilap* 98:1227-1230, 1957
24. Kopper L, Timár J, Jeney A, et al. Glycosaminoglycan (GAG) metabolism as a potential target to prevent metastasis formation. *Adv Exp Med Biol* 233:367-375, 1988
25. Matrisian LM, Cunha GR, Mohla S. Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and future directions. *Cancer Res* 61:3844-3846, 2001
26. Kentsis A, Topisirovic I, Culjkovic B, et al. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:18105-18110, 2004
27. Kim MS, Lee EJ, Kim HR, et al. p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res* 63:5454-5461, 2003
28. Ladányi A, Nagy JO, Jeney A, et al. Cytokine sensitivity of metastatic human melanoma cell lines - simultaneous inhibition of proliferation and enhancement of gelatinase activity. *Pathol Oncol Res* 4:108-114, 1998
29. Lapis K, Nemeth L. Die wirkung des BCM auf die metastasenbildung transplantiertier tiergeschwülste. *Klin Wochenschr* 34:864-867, 1956
30. Lapis K, Nemeth L. Effect of various chemotherapeutic agents on metastasis. *Br J Cancer* 10:719-723, 1956
31. Lapis K, Paku S, Liotta LA. Endothelialization of embolized tumor cells during metastasis formation. *Clin Exp Metastasis* 6:73-89, 1988
32. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2:584-593, 2002
33. Nakajima K, Hirade K, Ishisaki A, et al. Akt regulates thrombin-induced HSP27 phosphorylation in aortic smooth muscle cells: function at a point downstream from p38 MAP kinase. *Life Sci* 77:96-107, 2005
34. Ötvös L, Sági J, Sági G, et al. Enzymatic hydrolysis and biological activity of oligonucleotides containing 5-substituted pyrimidine bases. *Nucleosides Nucleotides* 18:1665-1666, 1999
35. Pogány G, Jeney A, Timár J, et al. Modulation of glycoconjugate biosynthesis by 5-hexyl-2'-deoxyuridine in highly metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Neoplasma* 37:501-510, 1990
36. Pogány G, Timár F, Oláh J, et al. Role of the basement membrane in tumor cell dormancy and cytotoxic resistance. *Oncology* 60:274-281, 2001
37. Qian Y, Zhong X, Flynn DC, et al. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 24:3154-3165, 2005
38. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33:49-54, 2003
39. Ridley A. Molecular switches in metastasis. *Nature* 406:466-467, 2000
40. Sawada K, Morishige K, Tahara M, et al. Alendronate inhibits lysophosphatidic acid-induced migration of human ovarian cancer cells by attenuating the activation of rho. *Cancer Res* 62:6015-6020, 2002
41. Shevde LA, Welch DR. Metastasis suppressor pathways - an evolving paradigm. *Cancer Lett* 198:1-20, 2003
42. Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3:55-63, 2003
43. Swinnen JV, Beckers A, Brusselmans K, et al. Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. *Cancer Res* 65:2441-2448, 2005
44. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442-54, 2002
45. Timár J, Csuka O, Orosz Z, et al. Molecular pathology of tumor metastasis. I. Predictive pathology. *Pathol Oncol Res* 7:217-230, 2001
46. Timár J, Csuka O, Orosz Z, et al. Molecular pathology of tumor metastasis. II. Molecular staging and differential diagnosis. *Pathol Oncol Res* 8:204-219, 2002
47. Timár 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
48. Timár J, Jeney A, Kovalszky I, et al. Role of proteoglycans in tumor progression. *Pathol Oncol Res* 1:85-93, 1995
49. Timár J, Moczár E, Timár F, et al. Comparative study on Lewis lung tumor lines with 'low' and 'high' metastatic capacity. II. Cytochemical and biochemical evidence for differences in glycosaminoglycans. *Clin Exp Metastasis* 5:79-87, 1987
50. Timár J, Ladányi A, Peták I, et al. Molecular pathology of tumor metastasis III. Target array and combinatorial therapies. *Pathol Oncol Res* 9:49-72, 2003
51. Timár J, Tóvári J, Pogány G, et al. The antimetabolite Tiazofurin (TR) inhibits glycoconjugate biosynthesis and invasiveness of tumour cells. *Eur J Cancer* 32A:152-159, 1996
52. Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* 66:3963-3966, 2006
53. Virtanen SS, Vaananen HK, Harkonen PL, et al. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 62:2708-2714, 2002
54. Woelfle U, Cloos J, Sauter G, et al. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63:5679-5684, 2003