

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Iszkémia-reperfúzió mediált receptor expresszió
in vivo tanulmányozása különböző experimentális
állatmodelleken PET radiotrészek
alkalmazásával**

Dr. Farkasinszky Gergely

Témavezető: Dr. Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM

Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2025

**Iszkémia-reperfúzió mediált receptor expresszió
in vivo tanulmányozása különböző experimentális állatmodelleken PET radiotrészerek
alkalmazásával**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Farkasinszky Gergely okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai
és Allergológiai Doktori Iskolája keretében
Témavezető: Dr. Trencsényi György, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Pávics László, az MTA doktora
Dr. Deák Ádám, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szegedi Andrea, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Pávics László, az MTA doktora
Dr. Deák Ádám, PhD
Dr. Besenyei Zsuzsanna, PhD
Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2025. december 12. 13:00

Bevezetés

A pozitron emissziós tomográfia (PET) egy speciális, a nukleáris medicinában alkalmazott nem invazív képalkotó eljárás, amely alkalmas különböző betegségek sejt-, szubcelluláris- vagy akár molekuláris szintű vizsgálatára is. Alkalmazásával különböző élettani és patofiziológiai folyamatok *in vivo* tanulmányozása lehetséges. Az eljárás nem megvalósítható radiojelzett molekulák nélkül. Napjainkban a [^{18}F]FDG-vel végzett vizsgálatok jelentik a klinikai PET képalkotás fősodrát, azonban használatban vannak további ^{18}F -ral (pl. [^{18}F]PSMA-1007) és ^{68}Ga -mal (pl. [^{68}Ga]Ga-PSMA-11) jelzett molekulák is. A PET leginkább az onkológiában alkalmazott képalkotó eljárás, éppen ezért a preklinikai vizsgálatokban gyakran az érdeklődés középpontjába kerülnek az angiogenezis molekuláris szintű tanulmányozására alkalmas radiofarmakonok, mint például a ^{68}Ga -mal jelölt RGD és NGR peptidek.

Számos komoly betegség hátterében az angiogenezis diszregulációja áll. A véredényképződéshez kapcsolható állapotokban új erek keletkeznek, amelyek az adott szerv funkcióját közvetlen vagy közvetett módon negatívan befolyásolhatják. A véredényképzéssel összefüggésben lévő betegségek listája évről évre nő, ennek oka a kórélettani folyamatok egyre mélyebb megismerése. E tendencia alól a kardiovaszkuláris kutatások sem képeznek kivételt, például az iszkémiás szívbetegség, a proliferatív diabéteszes retinopátia vagy az akut alsó végtagi iszkémia, hiszen az iszkémia-reperfúziós (I/R) események szerepet játszanak az angiogénikus folyamatok inicializálásában, többek között az aminopeptidáz N (APN/CD13) molekula expresszióján keresztül.

Az érrendszer betegségeinek kutatásaiban az állatmodellek alkalmazása az egyik legfontosabb és legszélesebb körben alkalmazott kísérleti eszköz. Az úgynevezett elszorításos módszerek, mint a proliferatív diabéteszes retinopátia kutatásában a szemgolyó mögé helyezett érelszorító, vagy az akut alsó végtagi iszkémia kutatásában alkalmazott tourniquet, alkalmasak lehetnek a helyes betegségmodellek kialakítására, a megfelelő protokoll végrehajtása mellett, amelyek tárgyát képezhetik az *in vivo* PET képalkotási eljárásoknak. Ezekon keresztül jobban megérthetőek az angiogénikus folyamatok és az APN/CD13 molekula expressziója közötti összefüggések, ezzel lehetőséget teremtve a preklinikai kutatások és a humán klinikai alkalmazások közötti transzlációra.

Célkitűzés

Az érrendszer betegségeinek kutatásaiban az állatmodellek alkalmazása az egyik legfontosabb és legszélesebb körben alkalmazott kísérleti eszköz. Az elszorításos módszerek, mint a proliferatív diabéteszes retinopátia kutatásában a szemgolyó mögé helyezett érelszorító, vagy az akut alsó végtagi iszkémia kutatásában alkalmazott tourniquet, a megfelelő protokoll végrehajtása mellett, alkalmasak lehetnek az iszkémia-reperfúzió mediált receptor expresszió tanulmányozására az *in vivo* PET képalkotó eljárások segítségével.

Kutatómunkánk fő célkitűzése az iszkémia-reperfúzió mediált receptor expresszió (APN/CD13) tanulmányozása olyan diagnosztikus radiogyógyszer jelölt molekulák segítségével, amelyek az onkológiai kutatásokban már bizonyított módon, ismert specificitással dúsulnak a receptor ligand kölcsönhatás alapján, ezáltal alkalmasak az angiogenikus folyamatok tanulmányozására a proliferatív diabéteszes retinopátia és az akut alsó végtagi iszkémia preklinikai modelljeiben.

A kitűzött célokat két projekt formájában valósítottuk meg:

Projekt 1:

APN/CD13 expresszió időbeli változásainak *in vivo* tanulmányozása iszkémia-reperfúziós proliferatív diabéteszes retinopátia patkány modellben pozitron emissziós tomográfia segítségével.

Projekt 2:

APN/CD13 expresszió időbeli változásainak *in vivo* tanulmányozása akut alsó végtagi iszkémia-reperfúziós patkány modellben pozitron emissziós tomográfia segítségével.

Ezeken keresztül jobban megérthetőek az iszkémia-reperfúzió és az APN/CD13 molekula expressziója közötti összefüggések, így lehetőség nyílna a preklinikai kutatások és a humán klinikai alkalmazások közötti transzlációra.

Anyag és módszer

Radiokémia

[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)

A radiojelöléshez 1000 µl térfogatú [⁶⁸Ga]GaCl₃-ot mértük be. A prekursor bemérése után (3 mM, 5 µl) (NOTA-c(NGR)) a reakcióelegyet 5 percig 95°C-on inkubáltuk.

Az inkubációs idő letelte után a reakcióelegyet szobahőmérsékleten (20°C) 3 percig állni hagytuk, majd egy a szintézist megelőzően aktivált OASIS HLB 1 cc 30 mg töltettérfogatú oszlopon juttattuk keresztül (aktiválás: 5 ml 96%-os EtOH, majd 10 ml injekcióhoz való vízzel történő mosás). A cartridge-en megkötött radioaktív reakcióterméket 2 ml injekcióhoz való vízzel (B.BRAUN, Magyarország) tisztítottuk az esetlegesen jelenlévő fémszennyezők és a nem komplexált szabad ⁶⁸Ga eltávolítása érdekében. [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t 0,2 ml 0,9%-os nátrium klorid oldat (Fresenius Kabi, Németország)/96%-os etanol (Merck, Németország)/2:1 térfogategység arányú elegyével eluáltuk egy 1ml térfogatú Eppendorf csőbe. A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t ezután steril szűrtük (*Cathivex®-GV*, Merck, Németország) és elosztottuk, majd a további vizsgálatok érdekében hígítottuk, hogy az etanol koncentrációját 10% alá csökkentjük.

[⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂

Reakcióedénynek egy 5ml térfogatú Eppendorf csövet használtunk. A prekursor bemérése után (3 mM, 5 µl) (NOTA-c(NGR)) a reakcióelegyet 5 percig 95°C-on inkubáltuk.

Az inkubációs idő letelte után a reakcióelegyet szobahőmérsékleten (20°C) 3 percig állni hagytuk, majd egy a szintézist megelőzően aktivált OASIS HLB 1 cc 30 mg töltettérfogatú oszlopon juttattuk keresztül. A cartridge-en megkötött radioaktív reakcióterméket 2 ml injekcióhoz való vízzel (B.BRAUN, Magyarország) tisztítottuk az esetlegesen jelenlévő fémszennyezők és a nem komplexált szabad ⁶⁸Ga eltávolítása érdekében. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂-t 0,2 ml 0,9%-os nátrium klorid oldat (Fresenius Kabi, Németország)/96%-os etanol (Merck, Németország)/2:1 térfogategység arányú elegyével eluáltuk egy 1 ml térfogatú Eppendorf csőbe. A radiojelzett molekulát ezután steril szűrtük (*Cathivex®-GV*, Merck, Németország) és elosztottuk.

2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz

A 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz-t a GE Tracerlab FX FDG Synthesizer (GE, USA) szintézispanellel állítottuk elő, amely magában integrálja a jelzési reakció és a kémiai tisztítás folyamatait.

A folyamat első lépéseként dúsított vízzel bevitt aktív [¹⁸F]fluor az erre a célra kialakított edénybe került. A szintézisprogram indításával a panelre helyezett QMA (WATERS, USA) ioncserélő oszlopon vákuum segítségével megkötődött a [¹⁸F]fluor. A QMA ioncserélő oszlopról a megkötött [¹⁸F]fluor-t ionos elúcióval K₂CO₃-al (SigmaAldrich, USA) választottuk le és a reakcióedénybe juttattuk. Ahhoz, hogy a prekursor (ABX, Németország) molekulában a szubsztitúció végbe mehessen, a [¹⁸F]fluor-t szerves oldószerben oldhatóvá kellett tenni Kriptofix 2.2.2 (Merck, Németország) segítségével. Ezután a vízmentes acetonitrilben (SigmaAldrich, USA) feloldott prekursor molekulát bejuttattuk a reakcióedénybe, ahol kontrollált körülmények között (hőmérséklet, nyomás) és megfelelő idő alatt lejátszódott a szubsztitúció, melynek során a TATM molekula triflát csoportja aktív fluorra cserélődött. Ezután a végtermékben a nem kívánatos szerves oldószert eltávolítottuk a reaktorból. Oldószertmentesítés után az acetyl-csoportokat savas közegben hidrolizáltuk, majd a vizes elegyet egy oszlop- és töltetsoron tisztítottuk. A szintetizált [¹⁸F]FDG oldatot steril szűrőn keresztül (Millex-GV, SigmaAldrich, USA) ampullákba juttattuk, amelyeket vizsgálati célra elkülönítettünk.

MiniPET-II kisállat PET kamera

A PET vizsgálatokat a MiniPET-II kisállat PET kamera (Debreceni Egyetem, Magyarország) segítségével végeztük el a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Nukleáris Medicina nem önálló Tanszék Radiobiológiai Kutatócsoport laboratóriumaiban.

A képző vizsgálatok során a megfelelő fájdalomcsillapító protokollok alkalmazása mellett a radiofarmakon laterális farokvénán át i.v. bólusban történő bejuttatása után a szükséges várakozási idő elteltével.

Projekt 1 keretében a fej régióját vizsgáltuk. A vizsgálatokhoz vagy [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR), vagy [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ radiofarmakont alkalmaztunk, 15 MBq aktivitással. A radiofarmakon beadása után 90 perces várakozási időt követően egy 20 perces statikus PET képző vizsgálatot végeztünk, egyetlen 20 perces frame-ben rögzítve az adatokat.

Projekt 2 során az alsó végtag régióját tanulmányoztuk. Ebben az esetben a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) mellett [¹⁸F]FDG radiofarmakont is használtunk, mindkét esetben 15 MBq aktivitással. A beadást követően 60 perces várakozási időt alkalmaztunk, majd a képalkotást szintén 20 perces statikus PET felvétellel hajtottuk végre, egyetlen frame-ben rögzítve a vizsgálatot.

A vizsgálat során nyert adatokat a BrainCAD verzió 1.124 (Debreceni Egyetem, Magyarország) segítségével értékeltük ki. A kapott eredmények SUV (standardizált felvételi érték) (1.képlet) és SBR (jel/háttér arány) értékek (2.képlet) formájában kerültek meghatározásra. Háttérnek minden esetben a vizsgált szerv (jel) ellenoldali párjának SUV_{mean} értékeit vettük.

$$\text{SUV} = \text{VOI} - n \text{ belüli aktivitás koncentráció (MBq/ml)} / \frac{\text{beadott dózis (MBq)}}{\text{állat súlya (g)}}$$

1. képlet: A standardizált felvételi érték képlete

$$\text{SBR} = \frac{\text{SUV}_{\text{mean vizsgált régió}}}{\text{SUV}_{\text{mean referencia régió}}}$$

2. képlet: A jel-háttér arány képlete

Az állatok a képalkotás ideje alatt eszméletlen állapotban voltak, a testhőmérsékletüket fűthető vizsgálóasztal segítségével állandó 37°C±0,5°C hőmérsékleten stabilizáltuk.

Kísérleti állatok

Kísérleteinket hím Fischer-344 patkányokon végeztük. A kísérleti állatokat a szaporításukra és forgalmazásukra szakosodott Animalab Hungary Kft.-től szereztük be.

Az állatok tartása és kezelése a 40/2013. (II.14.) kormányrendelettel összhangban a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Nukleáris Medicina nem önálló Tanszék állatházában történt (engedély száma: III/6-KÁT/2015.). A projekteket Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság 21/2017/DEMÁB és 28/2022/ DEMÁB nyilvántartási számon regisztrálta.

Az állatokat IVC (egyeseivel szellőztetett ketrecrendszer) állványokon tartottuk. A megvilágított órák száma 12 volt. Az etetés: VRF-1 (SDS Diets) rágcsálótáppal *ad libitum*

történt. Az itatás csapvízzel *ad libitum* valósult meg. A hőmérséklet: 22 ± 2 °C, a páratartalom: $50 \pm 10\%$ volt. Környezetgazdagításként papír fészkelőanyaggal és búvóhellyel (papírcső) láttuk el a kísérleti állatokat.

Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia kísérletsorozatban alkalmazott állatok sajátságai és elkülönített csoportok

A kísérletben Fischer-344 típusú, hím patkányokat ($n=15$) alkalmaztunk, amelyek testsúlya 250-300 gramm között volt. Az állatokat két csoportba osztottuk: iszkémiás csoportba és kontroll csoportba.

Iszkémiás csoport ($n=10$)

A patkányok bal szemében (bal bulbus-műtött-I/R) ($n=10$) iszkémiát majd reperfúziót váltottunk ki. A jobb szem (jobb bulbus) ($n=10$) nem esett át beavatkozáson (non-I/R), így az belső kontrollként szolgált. A beavatkozás után antibiotikus szemcseppet alkalmaztunk a gyulladásszerű folyamatok megelőzésére.

Kontroll csoport ($n=5$)

A kontroll csoport esetében az állatok semmilyen sebészeti beavatkozáson nem estek át (non-I/R). Alcsoportként az iszkémiás csoporttal megegyező logika szerint; bal bulbus- nem műtött-non-I/R ($n=5$) és jobb bulbus-nem műtött-non-I/R ($n=5$), elkülönítettük el. A kontroll csoport állatait ugyanazon az állattartási körülmények között tartottuk, mint az iszkémiás csoportéit továbbá ugyanolyan altatási és eutanázia protokollt alkalmaztunk.

Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia kísérletsorozatban alkalmazott állatok sajátságai és elkülönített csoportok

A kísérletben Fischer-344 típusú, hím patkányokat ($n=15$) alkalmaztunk. Az állatok testsúlya 250-300 gramm között volt. Az állatokat két csoportba osztottuk: iszkémiás csoportba és kontroll csoportba.

Iszkémiás csoport ($n=10$)

A patkányok bal hátsó végtagjában (bal hátsó végtag -műtött-I/R) ($n=10$) iszkémiát majd reperfúziót váltottunk ki. A jobb hátsó végtag ($n=10$) nem esett át beavatkozáson (non-I/R), így az belső kontrollként szolgált.

Kontroll csoport ($n=5$)

A kontroll csoport esetében az állatok ugyan átestek beavatkozáson (altatás, tourniquet felhelyezése), azonban az iszkémia majd az ezt követő reperfúzió nem valósult meg (non-I/R). Alcsoportként az iszkémiás csoporttal megegyező logika szerint; bal hátsó végtag -nem

műtött- non-I/R (n=5) és jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R (n=5), különítettük el. A kontroll csoport állatait ugyanazon állattartási körülmények között tartottuk, mint az iszkémiás csoportéit és ugyanolyan altatási és eutanázia protokollt alkalmaztunk.

Fájdalomcsillapítási protokollok

Beavatkozások alatti fájdalomcsillapítás

A beavatkozások és a képalkotó vizsgálatok (PET) megvalósításánál inhalációs altatást alkalmaztunk (Eickemeyer Isoflo, Németország), 3% izoflurán (Aerrane, Baxter, USA) + 0,4 liter/perc oxigén és 1,2 liter/perc dinitrogén-oxid (Linde, Magyarország) az összes projekt tekintetében.

Posztoperatív fájdalomcsillapítás

A beavatkozás - illetve az ebből adódó károsodások miatt -, az állatokon rövid ideig tartó mérsékelt fájdalom jelentkezésének csillapítása céljából, a kísérlet ideje alatt orális fájdalomcsillapítást alkalmaztunk. Ibuprofen tartalmú fájdalomcsillapítót (~15 mg/kg/nap - 2,5 ml Motrin (Johnson & Johnson, USA) 500 ml vízben) kevertünk az állatok itatópalackjába. Az állatoknak szabad hozzáférésük volt a folyadékhoz.

A kísérletek befejezése

A képalkotó vizsgálatok elvégzése után a kísérleti állatokon eutanáziát alkalmaztunk. Ezt izofluránnal történő túlaltatással valósítottuk meg, 3% izoflurán (Aerrane, Baxter, USA) + 0 liter/perc oxigén és 1,2 liter/perc dinitrogén-oxid (Linde, Magyarország) alkalmazásával.

Iszkémia reperfúzió kiváltásának protokollja

Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell

Az általános érzéstelenítést követően, a patkányok bal szemét ellátó arteria centralis retinae sebészileg lekötésre került. A szemhéjat varratokkal visszahúztuk, az állatok szemébe oxybuprokain tartalmú szemcseppet (Humacain 4 mg/ml, TEVA, Magyarország) cseppentünk helyi érzéstelenítés céljából, majd egy külön erre a célra készített elszorítót (egy polietilén kanülön keresztül vezetett sebészeti varrófonál-hurok) alkalmaztunk az arteria centralis retinae lekötéséhez. A hurkot a szemgolyó mögé helyeztük, lazán a nervus opticus, az arteria centralis retinae, a ciliáris artériák és a retrobulbáris kötőszövet köré. A hurok megfeszítésével és a kanül nervus opticus felszíne felé történő nyomásával az iszkémia kiváltható és a kívánt ideig fenntartható (90 perc). A hurok folyamatos feszesen tartását egy, a sebészeti varróanyagot húzó érfogó biztosította a lekötés ideje alatt.

Egy 120 D-s lencsével makroszkóposan ellenőriztük az iszkémiás állapotot. Az iszkémia ideje alatt a szem kiszáradás elleni védelmét egy karbomer-alapú szemgél (VIDISIC szemgél, Dr. Gerhard Mann Chem.-pharm. Fabrik GmbH, Németország) biztosította. A retina szövetének reperfüziója az elszorító iszkémia utáni felengedésével, így a vér arteria centralis retinae-n keresztüli visszaáramlásával valósult meg. A fertőzések megelőzésére tobramycin tartalmú szemcseppet (TOBREX 3 mg/ml oldatos szemcsepp, Novartis Hungária Kft., Magyarország) használtunk. Az állatok felébredéséig szemük kiszáradás elleni védelmét ismét karbomer alapú szemgél (VIDISIC szemgél, Dr. Gerhard Mann Chem.-pharm. Fabrik GmbH, Németország) biztosította.

Az állatok a beavatkozás alatti testhőmérséklete rektális hőmérőfejen keresztül került regisztrálásra, amelyet fűthető műtőasztal segítségével állandó $37^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten stabilizáltuk.

Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell

Az általános érzéstelenítést követően, a bal hátsó végtagot fertőtlenítettük, ezután a comb proximalis részén azonos magasságban elasztikus gumiszalagot alkalmaztunk (tourniquet), standard módon körbetekerve és azonos szorítóerővel elszorítva, az iszkémia létrehozásához. Ezután 120 perc iszkémia következett, amit pulzoximéterrel és a beavatkozáson átesett végtag cianotikus elszíneződésének megfigyelésével igazoltunk. Az iszkémiát a gumiszalag eltávolításával szüntettük meg.

Az állatok a beavatkozás alatti testhőmérséklete rektális hőmérőfejen keresztül került regisztrálásra, amelyet fűthető műtőasztal segítségével állandó $37^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten stabilizáltuk.

Képalkotási protokoll

Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia

Az okuláris I/R kiváltása utáni 1., 3., 7. és 10. napokon a kísérleti és a kontroll állatokat elaltattuk és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)-t}$ (körülbelül 15 MBq 150 μl fiziológiás sóoldatban) injektáltuk a laterális farokvénán keresztül. Továbbá a 10. napon $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2\text{-t}$ alkalmaztunk (körülbelül 15 MBq 150 μl fiziológiás sóoldatban). Ebben az esetben egymás után két PET vizsgálatot végeztünk a két radiogyógyszer külön-külön történő felhasználásával az injektálások közötti négy óra időkülönbséggel. Az érzéstelenített kísérleti állatok fiziológiás testhőmérsékletét fűtött kameraágy használatával tartottuk fenn. A

radiofarmakon eloszlását az injekció beadása után 90 perccel *in vivo* PET képalkotással (MiniPET-II kisállat PET szkennel, Debreceni Egyetem, Magyarország) határoztuk meg (20 perces statikus PET felvételek). Az utolsó PET vizsgálatot követően az állatokat elaltattuk és a szemeket megfelelő előkészítés után további *ex vivo* vizsgálatoknak vetettük alá (western blot, hisztológia).

Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia

A hátsó végtag I/R kiváltása utáni 1., 3., 5., 7. és 10. napokon egymás után két PET vizsgálatot végeztünk két radiogyógyszer külön-külön történő alkalmazásával. A kísérleti és a kontroll állatokat elaltattuk és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t (10,03±2,69 MBq 150 µl fiziológiás sóoldatban) majd négy órával később [¹⁸F]FDG-t (11,33±1,71 MBq 150 µl fiziológiás sóoldatban) injektáltuk a laterális farokvénán keresztül. Az érzéstelenített kísérleti állatok fiziológiás testhőmérséklete fűtött kameraágy használatával volt fenntartva. A radiofarmakon eloszlását az injekció beadása után 60 perccel *in vivo* PET képalkotással (MiniPET-II kisállat PET szkennel, Debreceni Egyetem, Magyarország) határoztuk meg (20 perces statikus PET felvételek). Az utolsó PET vizsgálatot követően az állatokat elaltattuk és a hátsó végtagból nyert mintákat, megfelelő előkészítés után, további *ex vivo* vizsgálatoknak vetettük alá (western blot, immunhisztokémia).

Western blot

Western blot vizsgálatok a Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia és a Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia kapcsán kerültek elvégzésre. Pozitív kontrollként patkány vese szövetet használtunk.

A kísérleti állatok boncolásából származó mintákat Petri-csészében, fiziológiás sóoldattal átitatott steril mull-lapra helyezve, jégen tárolva hűtött körülmények között átszállítottuk a Debreceni Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Biofarmácia Tanszékre. A Western blot vizsgálatot következő protokoll szerint hajtottuk végre:

A beérkezett szövetmintákat azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és -80 °C-on tároltuk a további feldolgozásig. A szöveti/szervi lizátum elkészítéséhez a mintákat jéghideg M-PER fehérje lízis pufferben (Thermo Fisher Scientific, USA) szuszpendáltuk és lizáltuk, proteáz és foszfatáz inhibitorokkal (SigmaAldrich, USA) kiegészítve. A szövetminták roncsolása Tissue Ruptor (IKA®-WERKE GmbH, Németország) segítségével történt. A sejtlizátum fehérje mennyiségi meghatározását Bradford reagenssel (házi készítésű) végeztük. Az összes mintát 4× Laemmli pufferrel hígítottuk. Minden 95 °C-on 8 percig hőkezelt

fehérjemintából egyenlő mennyiséget (40 µg) vittünk fel a futtatáshoz. A lizátumokat a célfehérje molekulatömegének alapján gélelektroforézissel választottuk el 10%-os nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélen (SDS-PAGE). Molekulatömeg-markerként Precision Plus Protein Dual Color Standard-t (BioRad Laboratories, USA) használtunk. A fehérjéket polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra vittük át (Millipore, USA). Az antitestek nem specifikus kötődésének megakadályozása érdekében 5%-os tej-TBS-Tweennel való blokkolást hajtottunk végre. A membránokat ezután elsődleges antitesttel inkubáltuk (egér-anti-patkány APN/CD13, egy éjszakán át, 4 °C, 1:500 hígítás, sc-13536, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). Az elsődleges antitestekkel való inkubálást HRP-vel jelölt anti-egér IgG másodlagos antitest követte (1:2000 hígítás, Thermo Fisher Scientific, USA). A jelet kemilumineszcenciával detektáltuk. Az egyes sávok intenzitását HPRT-re normalizáltuk (anti-HPRT, 1:1000 HPRT antitest (B-11) egér monoklonális, sc-393901; Cell Signaling Technology, USA). A ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, USA) rendszert használtuk a membránok megjelenítésére és a sávok intenzitásának mennyiségi értékeléséhez.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia vizsgálatok a Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia kapcsán kerültek elvégzésre. Pozitív kontrollként patkány vese szövetet használtunk. A kísérleti állatok boncolásából származó mintákat Petri-csészében, fiziológiás sóoldattal átitatott steril mullapra helyezve, jégen tárolva hűtött körülmények között átszállítottuk a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Radiológiai Tanszékre.

A boncolásból nyert patkány alsó végtag szövetmintát (izom) szénsavhó és petroléter segítségével fagyasztottuk kriomátrixba ágyazva. A szövetmintát kriosztát segítségével 6 mikrométer vastagságú metszeteket készítettünk. A fagyasztott metszeteket közvetlenül tárgylemezre helyeztük, ezt követően 10%-os pufferezett neutrális formalinban rögzítettük 5 percig. A fixálószeret csapvizet mosással távolítottuk el, majd elvégeztük az immunhisztokémiai reakciót a kit gyártói leírása alapján. Az antitestek nem specifikus kötődésének megakadályozása érdekében a szövetmetszeteket blokkoló oldattal kezeltük. A szövetmetszeteket APN/CD13 specifikus primer antitesttel (IHCeasy, Proteintech Germany) inkubáltuk. A szövetmetszeteket egy kimutatható, jelöléshez konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az APN/CD13 jelenlétét a másodlagos antitesthez kapcsolt kromogénnel vizualizáltuk. A tárgylemezeket a következő protokoll szerint víztelenítettük és derítettük, hogy lefedésre kerülhessenek. Az elkészült szövetmetszeteket mikroszkóp alatt vizsgáltuk

(Nikon Eclipse E800, Nikon Corporation, Japán), az APN/CD13 expressziójának hely és intenzitás meghatározásának érdekében.

Szövettan

Szövetteni vizsgálatok a Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia kapcsán kerültek elvégzésre. A kísérleti állatok (iszkémiás és kontroll csoport) exterminációja (állatok életének kioltása, a vér eltávolítása és 0,9%-os fiziológias sóoldattal végzett perfundálás) után a jobb és bal oldali bulbusokat eltávolítottuk. A mintákat Eppendorf csőben, fiziológias sóoldatban, hűtött körülmények között átszállítottuk a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Radiológiai Tanszékre.

A minták beérkezésének napján a bulbusokat beágyazó médiumba helyeztük (Shandon Cryomatrix®, Thermo Scientific, Egyesült Királyság) és kialakítottuk a blokkokat. Ezt követte az alumínium mintartó előkészítése, ami izopentánnal való feltöltéssel és szénsavhóba való elhelyezéssel valósult meg. A mintatartó megfelelő hőmérsékletének elérése után a beágyazó médiummal borított mintablokkok fagyasztásra kerültek a hűtőkeverékbe való mártással. A beágyazó médiummal körbevett bulbusok fagyasztása sagittális élettani sík szerint történt. A fentebb részletezett módon előkészített mintákból kriosztát segítségével 9 µm átmérőjű metszeteket készítettünk -21°C-on (Shandon Cryotome E, Thermo Scientific, Egyesült Királyság). Az elkészült metszeteket fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk (Nikon Eclipse E800, Nikon Corporation, Japán).

Statisztikai analízis

A diagramokon feltüntetett adatok legalább három független mérésorozat eredményei, átlag±SD formában. A szignifikancia meghatározására T-próbát, ANOVA- és Mann-Whitney U-tesztet használtunk. A szignifikancia szint $p \leq 0,05(*)$ és $p \leq 0,01(**)$ volt. Minden statisztikai elemzéshez kereskedelmi szoftvercsomagot (MedCalc 18.5, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) használtunk.

Eredmények

Radiokémia

Projekt 1: [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) és [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ előállításának eredményei

[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) (projekt 1 és projekt 2 esetében) és [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ molekulák előállítása rendben, robusztusan, megfelelő specifikus aktivitással és kiváló radiokémiai tisztasággal valósult meg.

Projekt 2: 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz előállításának eredményei

A 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz molekula előállítása rendben, robusztusan, megfelelő radiokémiai tisztasággal valósult meg.

Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell

APN/CD13 receptor expresszió in vivo longitudinális vizsgálatának eredményei [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET segítségével

A proliferatív diabéteszes retinopátia patkány iszkémiás modelljének segítségével az APN/CD13 receptor expressziójának *in vivo* longitudinális vizsgálatát valósítottuk meg. A kísérletek során [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakkal PET képalkotást végeztünk, hogy a kapott eredmények alapján elemezzük a receptorok jelenlétének változását az idő függvényében.

A PET-képek kvalitatív analízise egyik vizsgálati napon sem mutatott [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódást a kontroll csoport kísérleti állatainak egyik látószervében sem (bal bulbus- nem műtött-non-I/R, jobb bulbus-nem műtött-non-I/R). Ezzel szemben az iszkémiás csoport sebészileg leköttöt látószervei esetén a beavatkozás után 3 nappal jelentős radiofarmakon felhalmozódás volt detektálható (bal bulbus-műtött-I/R). Továbbá markáns radiogyógyszer felvétel volt megfigyelhető az iszkémiás csoport nem leköttöt szemgolyóiban is a beavatkozás után tíz nappal (jobb bulbus-nem műtött-non-I/R).

A bomláskorrigált PET felvételek kvantitatív analízise során, szignifikánsan ($p \leq 0,01$) megnövekedett [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvétel volt detektálható az iszkémiás csoport leköttöt szemeiben (bal bulbus-műtött-I/R), ahol a SUVmean értékek $0,35 \pm 0,06$, $0,29 \pm 0,05$ és $0,33 \pm 0,04$ -nak adódtak 3, 7 és 10 nappal a beavatkozás után.

Az első vizsgált időpontban (1 nappal a beavatkozás után) nem volt szignifikáns különbség az I/R indukált és a nem I/R indukált szemek SUV_{mean} értékei között (iszkémiás csoport bal bulbus-műtött-I/R vs iszkémiás csoport jobb bulbus-nem műtött-non-I/R vs kontroll csoport bal bulbus- nem műtött-non-I/R és kontroll csoport jobb bulbus-nem műtött-non-I/R) ($p \leq 0,05$). A beavatkozás után 3 és 7 nappal az I/R indukált bulbusok (iszkémiás csoport bal bulbus-műtött-I/R) [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvétele körülbelül kétszerese volt a kontroll csoport estén detektált értékekhez viszonyítva, továbbá nem volt megállapítható szignifikáns különbség a radiofarmakon akkumulációban a kontroll és az iszkémiás csoport nem I/R indukált szemei között ($p \leq 0,05$). Ezzel szemben a beavatkozás után 10 nappal megnövekedett [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvétel (SUV_{mean}=0,23±0,06) volt detektálható az iszkémiás csoport nem ligált szemeiben (jobb bulbus-nem műtött-non-I/R). A kontroll csoport bal (SUV_{mean}=0,11±0,05) és jobb (SUV_{mean}=0,09±0,02) bulbusainak SUV_{mean} értékei megközelítőleg kétszer alacsonyabbnak adódtak az iszkémiás csoporthoz képest.

$\alpha V\beta 3$ integrin receptor expresszió in vivo vizsgálatának eredményei [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ PET segítségével

Az $\alpha V\beta 3$ integrin receptor expressziójának meghatározására *in vivo* [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ PET képalkotást alkalmaztunk. A SUV korrigált PET-képek elemzése során nem volt kimutatható emelkedett érték a felhalmozódást tekintve az iszkémiás csoport lekötött szemeiben 10 nappal a beavatkozás útján kiváltott I/R után a többi csoporthoz viszonyítva (iszkémiás csoport bal bulbus-műtött-I/R vs jobb bulbus-nem műtött-non-I/R, kontroll csoport bal bulbus- nem műtött-non-I/R, jobb bulbus-nem műtött-non-I/R). Ezt a megfigyelést megerősítette a kvantitatív SUV analízis, ahol nem volt szignifikáns különbség a SUV_{mean} értékekben sem az iszkémiás csoport ligált (SUV_{mean}=0,61±0,08) és nem ligált (SUV_{mean}=0,57±0,07) csoportjai (iszkémiás csoport bal bulbus-műtött-I/R vs csoport jobb bulbus-nem műtött-non-I/R), sem az iszkémiás és a kontroll csoportok között (SUV_{mean}=0,60±0,08) (iszkémiás csoport bal bulbus-műtött-I/R vs kontroll csoport) ($p \leq 0,05$).

PET vizsgálatok jel-háttér arány (SBR) elemzésének eredményei

A bomlás-korrigált PET képek kiértékelése alapján jel-háttér arány (SBR) elemzést végeztünk el. Az APN/CD13 specifikus [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) molekulát tekintve megállapítást nyert, hogy az iszkémiás csoportban az SBR arány szignifikánsan magasabb volt a beavatkozás utáni 3. (SBR=2,65±0,65) és 7. (SBR=3,51±0,99) napokon, összehasonlítva a

kontroll csoport SBR értékeivel ugyanazon vizsgált időpontokban ($p \leq 0,05$). Tíz nappal a beavatkozás után is magas SBR érték ($SBR=2,11 \pm 0,95$) volt megfigyelhető az iszkémiás csoportban, de ez a különbség nem volt szignifikáns a kontroll csoporttal összehasonlítva ($p \leq 0,05$). A kontroll csoport SBR értékei változatlanok maradtak a vizsgálat alatt, ami arra utal, hogy nem volt specifikus [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódás a vizsgált állatokban. Az $\alpha V\beta 3$ integrin receptor specifikus radiogyógyszer, a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ alkalmazásával tíz nappal az okuláris I/R kiváltása után nem volt tapasztalható szignifikáns különbség az SBR értékek tekintetében az iszkémiás és a kontroll csoportok között ($p \leq 0,05$).

Western blot és szövettan vizsgálatok eredményei

Az APN/CD13 és $\alpha V\beta 3$ molekulák expresszióját tíz nappal a beavatkozás követően vizsgáltuk Western blot technikával. Az APN/CD13 kifejeződésének kimutatásához patkány veseszövetet használtunk pozitív kontrollként, mivel ezen szövetről ismert, hogy magas szintű expressziót mutat. Ez lehetővé tette a Western blot eljárás hatékonyságának és specifitásának megerősítését, valamint alapvető referenciapontként szolgált a többi vizsgált mintához képest. Az okuláris szövetmintákon végzett APN/CD13 expressziójának elemzése során szignifikánsan magasabb mennyiség volt detektálható az iszkémiás csoport ligált bulbusaiban (bal bulbus-műtött-I/R), mint ugyanezen állatok nem leköttöt szemeiben (jobb bulbus-nem műtött-non-I/R), valamint a kontroll csoportban ($p \leq 0,05$). Az iszkémiás csoport nem ligált (jobb bulbus-nem műtött-non-I/R) és a kontroll csoport látószervei között nem mutatkozott szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$).

A hisztológiai vizsgálatok a retina súlyos szerkezeti károsodását igazolták a ganglion sejtrétegben (GCL), az inner plexiform rétegben (IPL), valamint a belső és külső nukleáris rétegekben (INL és ONL) az iszkémiás csoport ligált bulbusai esetén (bal bulbus-műtött-I/R). A hematoxilín-eozin (HE) festésű szövettani mintákban a ganglion sejtréteg alkotóinak számában jelentős csökkenés volt tapasztalható, amely a celluláris szétesésre és elhalásra utal. Az inner plexiform rétegben a terület elmosódottsága és a fiziológiás szerkezet elvesztése volt megfigyelhető. A belső nukleáris réteg (INL) sejtjei körében karyolízis (a sejtmagok feloldódása) és karyopiknózis (a sejtmagok zsugorodása) volt észlelhető, amely a súlyos sejtkárosodás jele. Ezen felül a külső nukleáris réteg (ONL) sejtjei között a sejtmagok rendezettsége felborult. A mintákban felfedezhető volt az extracelluláris tér relatív növekedése, ami az intercelluláris összeköttetések gyengülésének a következménye lehet. A kontroll csoport mintáiban a sejtrétegek szerkezete és denzitása normális volt és nem mutatott eltéréseket.

Az $\alpha\beta 3$ integrin receptor expressziót szintén elemeztük a kísérleti csoportokban. Az $\alpha\beta 3$ integrin receptor kimutatásához ugyancsak patkány veseszövetet alkalmazva pozitív kontrollként. Az eredmények alapján az $\alpha\beta 3$ receptor kifejeződésében nem volt tapasztalható szignifikáns különbség sem az iszkémiás, sem a kontroll csoport mintái között ($p \leq 0,05$). Az $\alpha\beta 3$ receptor expressziójának szintje mind a ligált, mind a nem ligált szemek esetében hasonló volt és nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll csoport értékeihez képest ($p \leq 0,05$).

Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell

APN/CD13 receptor expresszió in vivo longitudinális vizsgálatának eredményei [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET segítségével

Az akut alsó végtagi iszkémia patkány iszkémiás modelljének segítségével az APN/CD13 receptor expressziójának *in vivo* longitudinális vizsgálatát valósítottuk meg. A vizsgálatok során [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakonnal PET képalkotást végeztünk, ennek a célja az volt, hogy a kapott eredmények alapján elemezzük a receptorok jelenlétének változását az idő függvényében.

A kísérletben [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakonnal végzett PET vizsgálati eredményeket hasonlítottunk össze a I/R (iszkémia-reperfúzió) sérülésen átesett hátsó végtagokat vizsgálva, a nem I/R indukált hátsó testrészekkel összevetve az iszkémiás csoportban, valamint a non-IR hátsó végtagokat a kontroll csoportban, hogy feltárjuk az iszkémia-reperfúzió által okozott hatásokat az APN/CD13 receptor mintázatának vonatkozásában.

A vizuális értékelés során megállapítást nyert hogy az iszkémiás csoportban az I/R hátsó végtagok (bal hátsó végtag -műtött-I/R) felvétele fokozatos növekedést mutatott az iszkémia indukcióját követően az első naptól a hetedik napig, majd a 10. napon éles csökkenés volt megfigyelhető a [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételében. Ezzel szemben, alacsonyabb radioaktivitás volt detektálható a non-I/R hátsó testrészekben (iszkémiás és kontroll csoport).

A vizuális elemzéssel összhangban megfigyelhető volt, hogy folyamatosan nőtt a SUVmean értéke az I/R hátsó lábokban az iszkémiás csoport esetén (bal hátsó végtag -műtött-I/R) az első naptól (SUVmean: $0,090 \pm 0,005$) a hetedik napig (SUVmean: $0,230 \pm 0,015$). A SUVmean értékek a hetedik napon ($0,230 \pm 0,015$) bizonyultak a legmagasabbnak, amit éles csökkenés követett a 10. napon ($0,123 \pm 0,010$). Az iszkémiás csoportban az I/R hátsó végtagokban (bal hátsó végtag -műtött-I/R) az iszkémia kiváltását követő ötödik, hetedik és tizedik napokon

szignifikánsan emelkedett [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódás volt detektálható a normálisan perfundált hátsó lábához képest ugyanazon kohort esetén (jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R), a SUVmean értékek pedig $0,138\pm 0,010$, $0,230\pm 0,015$ és $0,123\pm 0,010$ voltak az I/R hátsó testrészes esetében az ötödik, hetedik és tizedik napokon, illetve $0,085\pm 0,012$, $0,088\pm 0,015$ és $0,093\pm 0,011$ a non-I/R hátsó lábakon ugyanazokon a mérési időpontokban ($p \leq 0,05$). A *longitudinális vizsgálat* maximuma [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételi értéke esetén a hetedik napon volt megfigyelhető.

Az elvégzett vizsgálatok értékelése során nem volt kimutatható szignifikáns különbség az I/R és a non-I/R hátsó végtagok között a beavatkozásra átesett állatokban a SUVmax értékek tekintetében (iszkémias és kontroll csoport) ($p \leq 0,05$). Azonban az első és a harmadik napokon a lekötetést követően nem volt megállapítható szignifikáns különbség az I/R és a non-I/R hátsó lábak SUVmean értékei között az iszkémias csoportban (SUVmean értékek: $0,090\pm 0,005$ és $0,100\pm 0,007$ az első és harmadik napon, illetve $0,080\pm 0,005$ és $0,075\pm 0,006$ az első és harmadik napon; $p \leq 0,05$). Ezenkívül az ötödik és a hetedik napi vizsgálati időpontokban az I/R hátsó testrészek (bal hátsó végtag -műtött-I/R) közel 2-3-szorosan magasabb [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételt mutattak, mint a normálisan perfundált végtagok (jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R) az iszkémias csoportban. Továbbá az I/R hátsó végtagok radiofarmakon felhalmozódása (SUVmean: $0,138\pm 0,010$ (ötödik nap) és $0,230\pm 0,015$ (hetedik nap)) körülbelül kétszer, háromszor magasabbnak adódott, mint a kontroll csoport egészséges állatainak bármelyik lába esetén ugyanabban a mérési időpontban (bal hátsó végtag -nem műtött- non-I/R SUVmean: $0,070\pm 0,004$ (ötödik nap) és $0,073\pm 0,008$ (hetedik nap); jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R SUVmean: $0,070\pm 0,005$ (ötödik nap) és $0,071\pm 0,009$ (hetedik nap)). Emellett nem volt kimutatható jelentős különbség az iszkémias csoport non-I/R hátsó végtagjainak és a kontroll csoport non-I/R hátsó testrészeinek [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételében, sem a kontroll csoport bal és jobb non-I/R hátsó végtagjai között ($p \leq 0,05$).

Metabolizmus in vivo longitudinális vizsgálatának eredményei [^{18}F]FDG PET segítségével

Az akut alsó végtagi iszkémia patkány iszkémias modelljének segítségével nem specifikus *in vivo* longitudinális vizsgálatot valósítottunk meg. A vizsgálatok során [^{18}F]FDG radiofarmakkal PET képalkotást végeztünk, ezt azzal a céllal valósítottuk meg hogy a kapott eredmények alapján elemezzük a radiofarmakon felhalmozódásának változását az idő függvényében.

A vizsgálatok során kvantitatív PET adatelemzést végeztünk, amely alapján megfigyelhető volt a [¹⁸F]FDG felhalmozódásának folyamatos növekedése az iszkémiás csoport bal hátsó végtag -műtött-I/R végtagjaiban az 1. (SUVmean: 0,70±0,26) és a 7. (SUVmean: 1,18±0,32) vizsgálati időpontok között, amelyet a 10. napon csökkenés követett (SUVmean: 0,59±0,30). Ez a tendencia hasonlóságot mutat a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) vizsgálatok eredményeivel. Emellett a 3. (SUVmean: 0,90±0,28), 5. (SUVmean: 1,09±0,30) és 7. (SUVmean: 1,18±0,32) napokon az I/R hátsó végtagok (iszkémiás csoport, bal hátsó végtag -műtött-I/R) [¹⁸F]FDG koncentrációja szignifikánsan magasabb volt ugyanezen csoport non-I/R hátsó lábainak (jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R), valamint a kontroll csoport ugyanezen a kísérleti napokon mért non-I/R testrészeinek (bal hátsó végtag -nem műtött- non-I/R és jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R) értékeihez képest ($p \leq 0,05$); ezen túlmenően az I/R hátsó végtagokban körülbelül 2-3-szoros mennyiségű radioaktivitás volt detektálható, mint ugyanazon állatok non-I/R hátsó lábaiban.

Sem az iszkémia indukcióját követő 1. napon, sem a 10. napon nem volt tapasztalható szignifikáns különbség az iszkémiás csoport I/R és non-I/R hátsó végtagjainak metabolikus aktivitása között (SUVmean értékek az 1. napon 0,70±0,26 és 0,65±0,21, a 10. napon pedig 0,59±0,30 és 0,51±0,17) ($p \leq 0,05$). Hasonlóképpen, az I/R hátsó lábak [¹⁸F]FDG halmozása nem tért el a kontroll csoport non-I/R hátsó testrészeinek felvételi értékeiben a beavatkozást követő 1. és 10. napokon ($p \leq 0,05$).

Western blot vizsgálatok eredményei

Az APN/CD13 molekulák kifejeződését Western blot technikával elemeztük mindkét állatcsoportban. Az APN/CD13 fehérje expresszió szignifikánsan magasabb szintje volt detektálható az iszkémiás csoport I/R hátsó végtagjaiban (bal hátsó végtag -műtött-I/R) az iszkémiás csoport és a kontroll csoport non-I/R hátsó lábaihoz képest az iszkémia indukcióját követő 1., 3., 5., 7. és 10. napokon ($p \leq 0,05$). Továbbá nem volt tapasztalható jelentős különbség az iszkémiás csoport nem-iszkémiás hátsó testrészeinek (jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R) és a kontroll csoport (non-I/R) alcsoportjainak fehérje expressziója között. A fehérje kifejeződés az 1., 3., 5., 7. napokon folyamatos növekedést mutatott majd a 10. napon jelentős csökkenés volt megfigyelhető. A vizsgálati eredmények tanúsága szerint, az expresszió maximuma a hetedik napon volt megállapítható.

Immunhisztokémia vizsgálatok eredményei

A kísérleti csoportok végtagjainak izomszöveti mintáit immunhisztokémiai vizsgálatnak vetettük alá. Ez annak érdekében történt hogy követhessük az APN/CD13 expresszió iszkémiához kapcsolódó időbeli változásait molekuláris szinten. A vizsgálat során az APN/CD13 fehérje jelenlétét barna festődés jelezte, amely lehetőséget biztosított a változások szöveti szintű vizualizálására és kvalitatív elemzésére. Az iszkémiás és a kontroll csoportok vázizomszöveiteinek receptoriális mintázatának összehasonlítása érdekében elemeztük a western blott vizsgálattal megegyező módon elkülönített mintákat, azzal ekvivalens logika szerint. Az összehasonlítás során a minták ugyanazon protokoll szerint kerültek előkészítésre és feldolgozásra, hogy biztosítsuk az eredmények összevethetőségét.

Az első napon az iszkémiás csoport iszkémián átesett végtagjainál (bal hátsó végtag -műtött-I/R) gyenge, elszórtan megjelenő barna festődés volt megfigyelhető az iszkémiás végtag izomszövetében, amely a fehérje alacsony szintű jelenlétére utalt. A harmadik napra a festődés intenzitása egyértelműen fokozódott, és a festett területek mérete is jelentősen megnövekedett, jelezve az expresszió emelkedését és az érintett sejtek nagyobb számát és a hetedik napra a barna festődés elérte a maximális intenzitást, amely az APN/CD13 kifejeződés csúcspontját tükrözte az iszkémián átesett szövetekben. Ezt követően az APN/CD13 expresszió intenzitása enyhén csökkent a beavatkozás utáni 10. napon, jelezve a molekuláris folyamatok változását.

Az iszkémiás csoport nem leköttött hátsó lábai (jobb hátsó végtag -nem műtött-non-I/R) esetén alig észlelhető APN/CD13 pozitivitás volt megfigyelhető, továbbá hasonló eredményre jutottunk a kontroll csoport normálisan perfundált (non-IR) hisztológiai metszetei esetén is. A kontroll csoport ezen non-I/R mintái negatív kontrollként szolgáltak az APN/CD13 expresszió vizsgálatához, biztosítva az eredmények hitelességét és specifikusságát.

A patkány veseszövet pozitív kontrollként volt alkalmazva az APN/CD13 kifejeződés kimutatására, mivel ezen szövetről ismert, hogy magas szintű expressziót mutat. A fentebb ismertetett alkalmazás oka az immunhisztokémiai eljárás hatékonyságának és specifitásának megerősítése. A veseszöveten detektált intenzív barna festődés nagy bizonyossággal jelezte az APN/CD13 jelenlétét, amely alapvető referenciapontként szolgált a többi vizsgált mintához képest.

Az értekezés új tudományos eredményei

Kutatómunkánk elvégzése során a következő új eredmények születtek:

- Az *első kísérletsorozatban*, proliferatív diabéteszes retinopátia patkány állatmodellben, összefüggést mutattunk ki az iszkémia-reperfúzió által inicializált angiogenikus folyamatokban részt vevő APN/CD13 receptor expressziójának mértéke és a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódásának SUVmean értékei között, PET képalkotás segítségével.
- Longitudinális vizsgálatot végeztünk az 1., 3., 7. és 10. napokon az I/R után, ahol megvizsgáltuk a radiojelölt molekula felhalmozódásának időbeli változásait.
- Ezek alapján a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) alkalmas radiotrészter az APN/CD13 iszkémia-reperfúzió által kiváltott expressziójának mennyiségi és időbeli változásainak kimutatására sebészetileg kiváltott diabéteszes retinopátia patkánymodellben.
- A *második kísérletsorozatban*, akut alsó végtagi iszkémia állatmodellben, összefüggést mutattunk ki az iszkémia-reperfúzió által inicializált angiogenikus folyamatokban részt vevő APN/CD13 receptor expressziójának mértéke és a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR), valamint a glükóz metabolizmus változása és a [¹⁸F]FDG felhalmozódásához köthető SUVmean értékek között, PET képalkotás segítségével.
- Longitudinális vizsgálatot végeztünk az 1., 3., 5., 7. és 10. napokon az I/R után, ahol megvizsgáltuk a radiojelölt molekulák felhalmozódásának időbeli változásait.
- Arra a következtetésre jutottunk hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) alkalmas radiotrészter az iszkémia-reperfúzió által kiváltott APN/CD13 expressziójának, továbbá a [¹⁸F]FDG a glükóz metabolizmus mértékének mennyiségi és időbeli változásainak kimutatására az akut alsó végtagi iszkémia állatmodellben.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Berényi Ervin Klinikaigazgató Úrnak és Dr. Trencsényi György Tanszékvezető Úrnak, hogy támogatták doktori értekezésem elkészítését.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Trencsényi Györgynek, aki a doktori munkám során hasznos tanácsokkal látott el, és mindenben segítette kutatásaimat.

Köszönöm a DE OKI Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszék minden munkatársának, valamint a közlemények társszerzőinek munkáját a kutatási feladatok elvégzésében és dokumentálásban.

Köszönöm a kooperációs partnereink munkáját az MTA ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportnak, a DE Gyógyszerésztudományi Kar Biofarmácia Tanszéknek, valamint a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Radiológiai Tanszéknek.

Zárásként köszönöm családom, elsősorban feleségem támogatását, amely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/130/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Farkasinszky Gergely

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Farkasinszky, G.**, Péli-Szabó, J., Károlyi, P. K., Rácz, S., Dénes, N., Papp, T., Király, J., Szabó, Z., Kertész, I., Mező, G., Halmos, G., Képes, Z., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Acute Hindlimb Ischaemia in Rat Model: a Pre-Clinical PET Study. *Pharmaceutics*. 16 (4), 1-14, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16040542>
IF: 4.9 (2023)
2. **Farkasinszky, G.**, Dénes, N., Rácz, S., Kis, A., Péli-Szabó, J., Opposits, G., Veres, G., Balkay, L., Kertész, I., Mező, G., Hunyadi, J., Trencsényi, G.: In Vivo imaging of Ischemia/Reperfusion-mediated Aminopeptidase N Expression in Surgical Rat Model Using Ga-NOTA-c(NGR). *In Vivo*. 36 (2), 657-666, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/invivo.12750>
IF: 2.3





További közlemények

3. Arató, V. Z., Képes, Z., Péli-Szabó, J., **Farkasinszky, G.**, Sass, T., Dénes, N., Kis, A., Opposits, G., Józai, I., Kálmán, F. K., Hajdu, I., Trencsényi, G., Kertész, I.: Acute Myelomonoblastic Leukemia (My1/De): a Preclinical Rat Model.
In Vivo. 38 (3), 1064-1073, 2024.
IF: 1.8 (2023)
4. Girgis, M. M. F., **Farkasinszky, G.**, Fekete, K., Fekete, I., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Horváth, L.: Seriousness and outcomes of reported adverse drug reactions in old and new antiseizure medications: a pharmacovigilance study using EudraVigilance database.
Front. Pharmacol. 15, 1-17, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2024.1411134>
IF: 4.4 (2023)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,4

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,2

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.04.03.

