DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Metasztázisok angiogenezisének *in vivo* vizsgálata peptidalapú PET radiotracerekkel Péliné Szabó Judit

Témavezető: Dr. Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

| T | arta | lomj | njegyzék | 2 |
|---|------|-------|--|----|
| R | övic | dítés | ések jegyzéke | 4 |
| 1 | F | Beve | vezetés | 6 |
| 2 | I | roda | dalmi áttekintés | 9 |
| | 2.1 |] | Pozitronemissziós tomográfia (PET) | 9 |
| | 2.2 | | A daganatok növekedése | 12 |
| | 2 | 2.2.1 | .1 Az angiogenezis | 13 |
| | 2.3 | | Az angiogenezis molekuláris szabályzói | 15 |
| | 2 | 2.3.1 | .1 Integrinek | 16 |
| | 2 | 2.3.2 | .2 Aminopeptidáz-N / CD13 | 18 |
| | 2 | 2.3.3 | .3 Prosztaglandin E2 | 19 |
| | 2.4 | | Angiogenezis vizsgálata in vivo képalkotó módszerekkel | 21 |
| | 2 | 2.4.1 | .1 Az angiogenezist közvetetten megjelenítő farmakonok | 22 |
| | 2 | 2.4.2 | .2 Az angiogenezist közvetlenül megjelenítő farmakonok | 25 |
| | 2.5 | | In vivo metasztázis modellek | |
| | 2 | 2.5.1 | .1 Kémiailag indukált metasztázis modellek | |
| | 2 | 2.5.2 | .2 Transzplantációs tumor modellek | 30 |
| | 2 | 2.5.3 | .3 A subrenal capsule assay (SRCA) modell | 33 |
| 3 | A | Anya | yagok és módszerek | 35 |
| | 3.1 |] | Felhasznált vegyszerek és eszközök | 35 |
| | 3.2 | | Sejtvonalak és fenntartásuk | |
| | 3 | 3.2.1 | .1 Ne/De sejtek | 38 |
| | 3 | 3.2.2 | .2 He/De sejtek | |
| | 3 | 3.2.3 | .3 HT1080 sejtek | |
| | 3 | 3.2.4 | .4 A20 sejtek | 39 |
| | 3 | 3.2.5 | .5 PancTu sejtek | 39 |
| | 3 | 3.2.6 | .6 BxPC3 sejtek | 39 |
| | 3 | 3.2.7 | .7 B16F10 sejtek | 40 |
| | 3.3 |] | Kísérleti állatok | 40 |
| | 3.4 | | Az SRCA műtét | 41 |
| | 3.5 |] | Paratimikális nyirokcsomó átültetése | 42 |
| | 3.6 | , | Tumorok szubkután indukciója | 43 |
| | 3.7 |] | Felhasznált radiofarmakonok | 43 |
| | 3 | 3.7.1 | .1 2-[¹⁸ F]FDG szintézis | 43 |

| | 3.7.2 | 2 [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-cNGR szintézis | 44 | |
|--------|--|---|----|--|
| | 3.7.3 | 3 [⁶⁸ Ga]Ga -NODAGA-RGD szintézis | 45 | |
| | 3.7.4 | 4 [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-HPBCD szintézis | 45 | |
| | 3.7.5 | 5 [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-RAMEB szintézis | 46 | |
| 3 | 5.8 | In vivo vizsgálatok menete | 46 | |
| 3 | 8.9 | MiniPET-II készülék és az adatok feldolgozása | 47 | |
| 3 | 8.10 | <i>Ex vivo</i> vizsgálatok | 49 | |
| 3 | 8.11 | Immunhisztokémiai vizsgálatok | 49 | |
| 3 | 8.12 | Western blot analízis | 50 | |
| 3 | 8.13 | Statisztikai elemzés | 51 | |
| 4 | Erec | dmények | 52 | |
| 4 V | 4.1 Patkányok vesetokja alá ültetett metasztatizáló tumorok és metasztázisaik vizsgálata | | | |
| | 4.1. | 1 A primer Ne/De tumor és az áttétek vizsgálata PET radiofarmakonokkal | 52 | |
| | 4.1.2 | 2 A szekunder Ne/De tumorok és áttéteik vizsgálata radiotracerekkel | 54 | |
| | 4.1.3 | 3 A tercier Ne/De tumorok és áttéteik vizsgálata radiotracerekkel | 57 | |
| | 4.1.4 | 4 Boncolások eredményei | 59 | |
| | 4.1. | 5 A paratimikális nyirokcsomók kvantitatív PET és Western blot elemzése | 60 | |
| 4 | .2 | Ciklodextrin származékok PGE szelektivitásának vizsgálata | 61 | |
| | 4.2. | 1 In vivo PET képalkotás SRCA tumormodell felhasználásával | 61 | |
| | 4.2.2 | 2 In vivo PET képalkotás szubkután tumormodellek felhasználásával | 64 | |
| | 4.2.3 | 3 Kísérleti daganatok radioaktív felvételének <i>ex vivo</i> vizsgálata | 68 | |
| | 4.2.4 | 4 Immunhisztokémiai vizsgálatok | 68 | |
| 5 | Megbeszélés | | 71 | |
| 6 | Összefoglalás | | | |
| 7 | Summary | | | |
| 8 | Irodalomjegyzék | | | |
| 9 | Tárgyszavak | | | |
| 10 | Köszönetnyilvánítás | | | |
| 11 | I Függelék | | | |

Rövidítések jegyzéke

| APN/CD13 | aminopeptidázN |
|-------------------------|---|
| $\alpha_V \beta_3$ | integrin receptor |
| bFGF | bázikus fibroblaszt növekedési faktor / basic fibroblast growth factor |
| Cdc42 | sejtosztódást szabályozó 42-es fehérje / cell division control protein 42 |
| COX | ciklooxigenáz |
| CyD | cyclodextrin |
| ECM | extracelluláris mátrix |
| ERK | extracelluláris jelet szabályozó kináz / extracellular signal-regulated |
| | kinase |
| EP | E-tipusú prostanoid receptor |
| F344 | Fischer 344 patkány törzs |
| FAZA | fluor-azomicin-arabinozid |
| FBS | foetális szarvasmarha szérum |
| 2-[¹⁸ F]FDG | [¹⁸ F]2-fluoro-2-dezoxi-D-glükóz |
| H&E | hematoxilin-eozin |
| HIF-1 | hypoxia indukált faktor-1 / hypoxia-inducible factor-1 |
| HPβCD | (2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin |
| JNK1 | c-Jun N-terminális fehérje kináz 1 / c-Jun N-Terminal Protein Kinase |
| 1 | |
| MISO | mizonidazol |
| MMP | mátrix metaloproteináz |
| NGR | aszparagin-glicin-arginin |
| NODAGA | 1,4,7-triazaciklononán-1-glutársav-4,7-diecetsav |
| NOTA | 1,4,7-triazaciklononán-N,N',N''-triecetsav |
| NSAIDs | nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek |
| PET | pozitron emissziós tomogáfia |
| PGE2 | prostaglandin E2 |
| PTLN | paratimikális nyirokcsomó |
| PSMA | prosztata specifikus membrán antigén |
| RGD | arginin-glicin-aszparagin sav |
| RAMEB | random metilált β-cyclodextrin |

| sc | szubkután |
|-------|---|
| SCC | laphámsejtes karcinóma |
| SCID | többszörösen immunhiányos/ sevre combined immundefficient |
| SPECT | egy foton kibocsájtásos computer tomográfia/ single photon emission |
| | computed tomography |
| SRCA | vesetok alá történő transzplantáció / subrenal capsule assay |
| SUV | standardizált felvételi érték / standardised uptake value |
| T/M | tumor-izom arány |
| VOI | vizsgálat tárgyát képező térfogat /volume of interest |
| VEGF | vaszkuláris endoteliális növekedési faktor / vascular endothelial growth factor |
| VEGFR | vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor / vascular endothelial growth factor receptor |

1 Bevezetés

A rosszindulatú daganatos betegségek és a tumorok által képzett áttétek világszerte egyre nagyobb egészségügyi problémát jelentenek. Az Egyesült Államok Nemzeti Rákkutató Intézet (IARC) becslései szerint 2018-ban világszerte 17 millió új rákos megbetegedés és 9,5 millió rákos halálesetet regisztráltak. Mivel az életkor előrehaladtával a betegség kockázata emelkedik, így a nyugati típusú társadalmakban az elmúlt évek demográfiai folyamatait (népesség növekedés, elöregedés) figyelembe véve az onkológiai ellátás egyre nagyobb kihívással néz szembe. A daganatellenes terápiák fejlesztése folyamatos feladatot jelent a kutatás számára, ugyanakkor az új eredmények tudományos szintről történő transzlációja klinikai gyakorlatba sok időt vesz igénybe. Ez és a személyre szabott terápiák iránti megnövekedett igény, egyaránt növelik a diagnosztikával szembeni elvárásokat.

A daganatok progressziójának egyik fontos feltétele, hogy a primer tumor megfelelő tápanyagellátáshoz jusson a meglévő erekből, vagy pedig új erek kialakulása révén. Ez a folyamat– az angiogenezis – megteremti annak a lehetőségét, hogy a rosszindulatú elváltozás egyes sejtjei az érpályába jussanak, ezáltal növelve az úgynevezett hematogén áttétképződés létrejöttének esélyét. A primer tumorokban nem csak vérerek alakulnak ki, hanem a limfangiogenezis révén új nyirokerek is képződnek és a daganat sejtjei ezeken keresztül is eljuthatnak távoli szervekbe (ez az un. limfogén áttétképzés). Az elmúlt években végzett preklinikai és klinikai vizsgálatok egyaránt bővítették ismereteinket az áttétképződés többlépcsős folyamatáról, azonban továbbra is nyitott kérdés, hogy az áttétek áttétet képeznek-e, vagy mindegyikük az elsődleges lézióból származik. Az áttétek molekuláris expressziós mintázatának pontos ismerete nemcsak az elváltozás pontos felismerését biztosítaná, hanem a meglévő terápiás rendszerek újragondolását is eredményezheti.

Mivel az angiogenezist a tumor progresszió és metasztatisztatikus képessége sarokkövének tekintik, az áttétek és a primer tumoros elváltozások sejtfelszínén expresszálódó neoangiogén mediátorokat/molekulákat célzó nem invazív molekuláris képalkotó technikák értékes diagnosztikai lehetőséget nyújthatnak a daganatos elváltozások időben történő értékeléséhez, valamint a tumor progressziójának gátlására vagy annak lassítására irányuló kezelések bevezetéséhez. Ezenkívül a neoangiogenezis molekuláris jellemzőinek, például a különböző típusú integrineknek, a vaszkuláris endotél növekedési faktornak (VEGF), az eprineknek vagy az aminopeptidáz N-nek (APN/CD13) megjelenítése nem invazív képalkotó technikákkal lehetőséget biztosít a megfelelő antiangiogén kezelés kiválasztására, nyomon követésre,

valamint a pontos terápiás döntéshozatalra, amelyeknek kulcsfontosságú szerepük van a betegek kezelésében.

Az angiogenezis során a VEGF és a VEGFR közötti kölcsönhatás révén megkezdődik az endotélsejtek proliferációja és migrációja, valamint a kapilláris rendszer átalakulása. Ezért a VEGF és receptorainak (VEGFR) túlzott expressziója összefügg a tumor progressziójával, a metasztatikus potenciállal, a mikrovaszkuláris sűrűséggel és a betegek prognózisának romlásával. Mivel az $\alpha_v\beta_3$ integrin is elősegíti a tumor- és endotélsejtek migrációját, így túlzott mértékű kifejeződése a tumor növekedésének, invazivitásának és metasztatizációjának szabályozásában kritikus szerepet tölthet be. Ezenkívül az APN/CD13 is szoros kapcsolatot mutat a tumorokkal kapcsolatos neoangiogenezissel, az angiogén jelek generálásán és modulálásán keresztül, valamint az angiogén erek markereként. A prosztaglandin E2 pedig a ciklooxigenáz-2 (COX-2)/prosztaglandin E2 (PGE2) útvonalon keresztül döntő szerepet játszik a daganat kialakulásában, mivel nem csak gyulladások esetében, hanem a tumorok progresziója során is serkenti az angiogenezist és a limfangiogenezist.

A molekuláris biológia fejlődésével egyre több potenciális tumormarkert fedeznek fel, és ennek megfelelően növekszik az új tumorspecifikus diagnosztikai molekulák száma. A PETképalkotás különösen CT vagy MR eszközzel kombinálva értékes eszköznek tűnik a neoangiogenezis specifikus molekuláris biomarkereinek kimutatásában, ami új területet nyit a primer tumorok és áttéteik sejtfelszíni molekuláris mintázatának mélyebb megértése felé.

Ebben a tekintetben az integrin $\alpha_v\beta_3$ nemcsak a preklinikai vizsgálatokban, hanem a humán klinikai kutatásokban is egyre nagyobb vizsgálati területet képvisel. Az $\alpha_v\beta_3$ integrinek jellemzően a tumoros szövetekben történő emelkedett kifejeződése miatt az integrinspecifikus RGD (Arg-Gly-Asp) szekvenciát tartalmazó, radioaktívan jelzett peptideknek döntő szerepük van a molekuláris onkológiai képalkotásban. Az NGR (Asn-Gly-Arg) peptidszármazékok pedig nagy affinitással kötődnek az APN/CD13-hoz, ezért ezen molekulák rákos elváltozásokba juttatása nem csak a képalkotást teheti lehetővé, hanem az angiogenezis gátlását is, mivel az APN működésének korlátozása akadályozhatja a tumorok vaszkularizációját. A ciklodextrinek a közelmúltban kerültek a nukleáris medicina előterébe, mint potenciális tumorcélzó molekulák. Ezeket a glükóz alapú ciklikus oligoszacharidokat, amelyek hidrofil külső felülettel és lipofil belső üreggel rendelkeznek, ígéretes eszközként jelölték meg az endocitózis alapú gyógyszerhordozó rendszerek elkészítéséhez és vízben oldódó gyógyszerek kifejlesztéséhez. Tekintettel a fent említett kedvező kémiai

tulajdonságokra, a radioaktívan jelölt ciklodextrinek új területet nyithatnak a rosszindulatú daganatok *in vivo* molekuláris képalkotásában. A ciklodextrin származékok közül a véletlenszerűen metilált β-ciklodextrin (RAMEB) bizonyítottan nagy affinitást mutat a PGE2vel való komplexképzésre, emellett a hidroxipropil-béta-ciklodextrin (HPβCD) hatékonysága, kielégítő biztonsági profilja és mérhető tolerálhatósága miatt már figyelemre méltó klinikai figyelmet kapott a terápiás utakon. További jelentős szempont, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD kiemelkedő *in vivo* biodisztribúciója és farmakokinetikája, valamint nagy radiokémiai tisztasága további farmakokinetikai mérések lehetőségét biztosíthatja, és a tumorspecifikus molekuláris képalkotás szempontjából is releváns lehet.

A fent leírtakat figyelembe véve fő célkitűzéseink:

- A neoangiogenezisben részt vevő molekulák expressziójának változásai a primer tumorban és annak áttéteiben jelentősen befolyásolhatják a terápiák hatékonyságát. A vizsgálatunk célja az volt, hogy a sorozatosan transzplantált mezoblasztos nefroma tumor (Ne/De) metasztázisaiban az aminopeptidáz N (APN/CD13) és az α_vβ₃ integrin receptor expressziójának változását ⁶⁸Ga-jelzett NOTA-cNGR és NODAGA-RGD radiotracerekkel értékeljük preklinikai pozitronemissziós tomográfiás (PET) képalkotás segítségével.
- A fenti részletes, korábban közzétett adatok arra ösztönöztek bennünket, hogy megvizsgáljuk a ciklodextrin származékok diagnosztikai értékét a különböző daganatok molekuláris képalkotásában, ami közelebb vihet bennünket a molekuláris célpontokon alapuló tumorellenes terápia végső céljához. Ezért a továbbiakban a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD tumorcélzó potenciáljának felmérését tűztük ki célul non-invazív *in vivo* PET-képalkotás segítségével.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Pozitronemissziós tomográfia (PET)

A klasszikus radiológiai vizsgálati módszerekkel ellentétben a nukleáris medicina területén alkalmazott diagnosztikai leképezések az *in vivo* vizsgálat során emisszió méréssel jelenítik meg a szervezetben zajló patológiás vagy fiziológiás folyamatokat. Ennek érdekében a páciens szervezetébe úgynevezett nyomjelző molekulát juttattnak, amely részt vesz a biológiai folyamatokban. A pozitronemissziós mérésekhez alkalmazott radiofarmakon általában egy targetáló molekulából (pl. glükóz) áll, amelyet egy pozitron sugárzó radioaktív izotóppal (pl. ¹⁸F) jelöltek, ami a sugárzásnak köszönhetően a testen kívülről is nyomon követhető.

A radioaktív nyomjelző felhasználásának elvét Hevesy György az 1920-as években alkotta meg (Hevesy, 1923). A képalkotáshoz szükséges radioaktívan jelzett nyomjelző kiválasztása és kémiai szintézise függ a vizsgálni kívánt fiziológiai és biokémiai anyagcsere-folyamatoktól (pl. véráramlás, anyagcsere, receptorkötés), valamint a radioizotópok tulajdonságaitól úgymint például a felezési idő, illetve a sugárzás típusa.

1. táblázat: A PET technikában leggyakrabban használt radioaktív izotópok jele, felezési ideje és az előállításukhoz szükséges infrastruktúra.

| Izotóp | Felzési idő (perc) | Előállítás helye |
|------------------|--------------------|------------------|
| ¹⁵ O | 2,5 | ciklotron |
| ¹³ N | 9,9 | ciklotron |
| ¹¹ C | 20,4 | ciklotron |
| ¹⁸ F | 109,7 | ciklotron |
| ⁶² Cu | 9,74 | generátor |
| ⁶⁴ Cu | 764,4 | ciklotron |
| ⁶⁸ Ga | 68 | generátor |
| ⁸² Rb | 1,25 | generátor |
| ¹²⁴ | 6019,2 | ciklotron |

Az 1. táblázat a leggyakrabban használt PET izotópok sorozatát foglalja össze. Mivel a 4 leggyakrabban alkalmazott PET izotóp (¹¹C, ¹³N, ¹⁵O és ¹⁸F) felezési ideje viszonylag rövid (20,4 perc, 10 perc, 2 perc, 109 perc), így nagy mennyiségben és lehetőleg gyors radiokémiai módszerek alkalmazásával kell előállítani a nyomjelző molekulákat. Ciklotronnal nem rendelkező PET-diagnosztikai központokba történő szállítás jelenleg szinte kizárólag a ¹⁸F-jelzett nyomjelzők esetében kivitelezhető. Ez továbbra is nehezíti a PET széles körű elterjedését. Az igen költséges, így korlátozott elérhetőségű ciklotron lehetséges alternatíváját jelenthetik a radionuklid generátorok, melyek lehetővé teszik a PET vizsgálatokat ciklotronnal nem rendelkező korházakban. Maga a generátor egy olyan zárt rendszer, amely egy hosszabb felezési idejű anyaelem bomlása során keletkező rövidebb felezési idejű leányelemet képes biztosítani helyi felhasználásra. Ehhez a generátorban az anyaelem egy megfelelő hordozón van megkötve és maga a leányelem meghatározott időközönként rendszeresen kinyerhető, vagyis eluálható. Általában véve a generátorok alacsony költségű viszonylag rugalmas alternatívát kínálhatnak a speciális PET tracer helyszíni előállításához (Dash és mtsa., 2019).

Az elmúlt években a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátor széles körben elterjedt a kutatók körében, és elkezdődött a ⁶⁸Ga-jelzett molekulák klinikai használata is, köszönhetően a közelmúltban elért eredményeknek. A ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátorok alkalmazása a PET-ben előnyös, mivel a ⁶⁸Ge 270 napos felezési ideje biztosítja, hogy a generátor hosszabb ideig használható legyen. A rövid felezési idejű ⁶⁸Ga bomlási jellemzői (t¹/₂ = 68 perc, 89% β + és 11% β EC, E β +, max= 1,92 MeV) alkalmassá teszik a PET-képalkotásra. A 68 perces fizikai felezési idővel a ⁶⁸Ga a gyors diffúziója, és a gyors kiürülése miatt számos képalkotásra használt peptid biológiai felezési idejének is megfelel (Dash és mtsa., 2019).

Általában a biomolekula pozitron emittáló radionukliddal történő jelölésének helyét a megfigyelendő anyagcsere-folyamat és a szükséges biológiai aktivitás alapján választják ki. A sztérikus és elektronikus hatások erősen megváltoztathatják a jelölt molekulák élettani tulajdonságait. Ezért az újonnan kifejlesztett nyomjelzők viselkedésének előrejelzése gyakran nehéz, így széleskörű (kémiai és biológiai) tapasztalatot igényel az új tracerek fejlesztése (Wester, 2007). Sok esetben azonban a molekula és metabolikus tulajdonságai ismertek, így az könnyebben használható a kiválasztott élettani folyamatok megjelenítésére (Mohnike és mtsai., 2016).

A 2-[¹⁸F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz (2-[¹⁸F]FDG) a legismertebb pozitron kibocsájtó radiofarmakon mind a klinikai, mind a preklinikai területeken. Bár a kutatások a meghatározott molekuláris célpontok esetében a nagyobb érzékenység és specificitás elérésére törekszenek, a

diagnosztikai PET-vizsgálatok túlnyomó többségét még mindig egyetlen farmakonnal végzik: a 2-[¹⁸F]FDG-PET jelenleg a vizsgálatok 95%-át teszi ki (Petroni és mtsai., 2020). Az 1990-es évek elejéig a PET képalkotást szinte kizárólag speciális klinikai kutatási környezetben végeztek, kezdetben az agy, később pedig a szív fiziológiájának és patofiziológiájának tanulmányozása céljából (Weber 2006). Az évek során a 2-[¹⁸F]FDG klinikai alkalmazása exponenciálisan nőtt, ahogyan a különböző alkalmazási területek is, bár elsődlegesen az onkológiában alkalmazzák a rákos megbetegedések kimutatására, stádiumának meghatározására és a terápiás válaszok értékelésére (Gallamini és mtsai., 2014).



1. ábra: A PET vizsgálat sematikus ábrázolása.

A PET képalkotás két alapvető jelenségen alapszik. Az első, hogy a pozitron megsemmisülésekor keletkező annihilációs fotonok egymással ellentétes irányban emittálódnak, így a radioaktív bomlás biztosan a két detektált foton által meghatározott egyenesen történt. A mérési technika a becsapódó fotonok koincidenciájának mérését használja fel. Egy detektált esemény akkor tekinthető valódi eseménynek, ha igaz rá, hogy mindkét annihilációs fotont egy előre meghatározott időablakon, illetve energiaablakon belül érzékelte a rendszer. A PET kamerákban a szcintillációs kristálymátrixokhoz fotoelektron sokszorozót (PMT) kapcsolnak, majd az így felépült detektorokból alakítják ki a detektorgyűrűt. A páciens a detektorgyűrű közepébe kerül (1. ábra) így az egymással szemben lévő detektorpárok koincidenciamérő áramkörben való

összekapcsolásával lehetséges a nyomjelző *in vivo* eloszlásának rögzítése, majd rekonstrukciója és kvantifikálása (Wolfgang, 2016).

2.2 A daganatok növekedése

A daganatos elváltozások egyik legfőbb tulajdonsága a folyamatos növekedés. A daganatokban lévő sejtekben a folyamatos osztódás miatt egyre több szabályozási hiba léphet fel, ennek köszönhetően a tumor egyre heterogénebbé válik. Ez a folyamat teszi lehetővé, hogy egyfajta szelekció révén egyre ellenállóbbak legyenek a terápiás eljárásokkal szemben. Azonban a folyamatos növekedéssel a tumor egy idő után eléri azt a mérethatárt, ahol még diffúziós folyamatokkal juthat oxigénhez, illetve a szükséges tápanyagokhoz. Ebben az esetben új vérerek növekedésére van szükség a további progresszióhoz/proliferációhoz, amit már 1971-ben feltételeztek azon megfigyelés alapján, hogy a gyorsan növekvő tumorok erősen vaszkularizáltak, míg a nyugvó tumorok nem (Folkman, 1971). Később Folkman írta le ennek bizonyítékait. Megfigyelése szerint a tumorok lassabb növekedést mutatnak a vaszkularizációt megelőzően, amiből azt a következtetést vonta le, hogy a daganatok növekedéséhez angiogenezisre van szükség (Folkman, 1990). Ennek jelentőségét abban látta, hogy egy esetleges új terápiás célpont lehet a tumorok angiogenezisének gátlása (Folkman, 1991). Egy 2003-ban végzett klinikai vizsgálat bizonyította, hogy az áttétes vastagbéldaganatban szenvedő páciensek túlélése javult, amikor a kemoterápiát vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (VEGF) ellenes antitestekkel kombinálták (Hurwitz és mtsai., 2004). Ezek után számos különböző antitestet hagytak jóvá a rák ellenes terápia részeként, mely az angiogenezis jelátvitelét célozta. Azonban a tapasztalat az, hogy az antiangiogén terápia csak rövidtávon gátolja sikeresen a tumorok növekedését. Ennek a korlátozott hatékonyságnak egy lehetséges magyarázata az, hogy a daganatok alternatív angiogenezis útvonalakat használhatnak, illetve, hogy rezisztencia is kialakulhat az alkalmazott kezeléssel szemben. Ezeken túl pedig a már meglévő erek inkorporációjával a daganatok egy része megkerüli az angiogenezis kényszerét (Kuczynski és mtsai., 2015).

2.2.1 Az angiogenezis

Az érrendszer homeosztázisát számos pro- és anti-angiogén faktor szabályozza. Ha ezek egyensúlyban vannak, az érrendszer nyugodt és az endotél sejtek nem proliferálnak. Fiziológiás körülmények között az endotél sejtek nagyon lassan, csak közel egy év alatt újulnak meg, ami teljes ellentétben áll a tumorokban tapasztaltakkal. A daganatokban túlsúlyba kerülnek a pro-angiogenetikus faktorok, ezzel mintegy átkapcsolva a rendszert és stimulálva az új erek képződését. Az érképzés, érképződés többféleképpen is történhet, a tumor típusától és a környező szövet jellegétől is függően, így akár eltérőek lehetnek a primer tumorban és annak metasztázisában zajló folyamatok.

- Bimbózó angiogenezis: a tumorok növekedése során leggyakrabban ez a folyamat megy végbe (Carmeliet és mtsa., 2011). Ilyenkor a daganatos sejtek nagy mennyiségben angiogen citokineket (pl. VEGF) termelnek. Ennek segítségével a meglévő erek endotél sejtjeit bimbózásra késztetik. A bimbózás a citokin koncentrációgradiens irányába történik. Az új érbimbók képződéséhez a bazális membrán állapota megváltozik, amit az endotél sejtek illetve a stróma sejtek MMPszekréciója is segít. Az endotélsejtek morfológiája is változáson megy keresztül, megnyúlnak és megnyitják intracelluláris kapcsolataikat és belépnek a sejtciklusba. Mivel a termelődő angiogén hatású citokinek mennyisége és arányuk változatos és véletlenszerű, így a beindult bimbózás is egyenetlen, ezért nem feltétlenül alakul ki szabályos érrendszer a tumorban. (2. ábra)
- Posztnatális vaszkulogenezis: a folyamat alapja az, hogy a daganatos sejtek által termelt citokinek (elsősorban VEGF) hatására a csontvelőből endoteliális progrenitor sejtek mobilzálódnak, majd a daganat környezetében differenciálódnak érett endotél sejtekké. (2. ábra)
- 3. Érbekebelezés: az élő szervezetben, a tüdőben és a bőrben olyan magas az érkapillárisok sűrűsége, hogy az megközelíti a diffúziós távolságot. Az ezekben a szövetekben növekvő tumorok a már meglévő erek felhasználásával képesek a tápanyagellátásukat biztosítani. Ebben az esetben a daganat által termelt angiogén citokinek segítik elő a bekebelezett erek endotél sejtjeinek túlélését. (2. ábra)
- 4. Vaszkulogén mimikri: bizonyos daganatok képesek a saját sejtjeikből olyan csatornákat kialakítani, amelyek valódi, működőképes kapcsolatban vannak az érrendszerrel. A csatornát képező tumoros sejtek endoteliális markereket

expresszálnak (pl. $\alpha_v\beta_3$ integrin, vagy VEGF receptorok). Ezekben a daganatokban az endotél sejtekre jellemző enzimek (pl. prosztaglandin-szintáz) is megjelennek. (2. ábra)

- 5. Intuszuszceptív angiogenezis: egyes daganatok képesek kiváltani egy olyan angiogenetikus folyamatot, amely során az endotélsejtek bimbózása az érlumenben történik. A folyamat során az érfal bedomborodik a lumenbe addig, míg a két szemben lévő oldal érintkezik, majd összekapcsolódik. Ezzel gyakorlatilag endotél proliferáció nélkül új érfal jön létre. (2. ábra)
- 6. Glomeruloid angiogenezis: elsősorban a glioblasztómákra jellemző, de emlő- és tüdőrákokban is megjelennek a meglévő erekből kialakuló rendezetlen kapilláris struktúrák. A daganatos sejtek proliferációjuk és migrációjuk közben a velük szoros kapcsolatban lévő eret magukkal húzzák, így abban érhurkok képződnek. Tulajdonképpen a folyamat során a már meglévő érrendszer átrendeződése közben új kapillárisok formálódnak, mindez az endotélsejtek minimális osztódásával kísérve (Döme és mtsai., 2007). (2. ábra)



2. ábra: Új erek képződésének lehetséges módjai, sematikus ábrázolás. 1.: bimbózó angiogenezis, 2.: vaszkulogenezis, 3.: érbekebelezés, 4.: vaszkulogén mimikri, 5.: intuszuszceptív angiogenezis, 6.: glomeruloid angiogenezis.

2.3 Az angiogenezis molekuláris szabályzói

Az angiogenezis számos eltérő molekuláris útvonalon keresztül mehet végbe, melyek több különböző közvetítő molekulát, mediátort igényelnek, amelyeket egy hipoxiás, gyulladásos vagy daganatos sejt bocsájt ki. A daganatok esetében az oxigénszegény környezet miatt el nem hidrolizálódó hipoxia-indukált faktor-1 (HIF-1), az egyik kiváltója lehet az érképződés folyamatának. Emellett egyéb növekedési faktorok és receptoraik, mint például a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) és a fibrobaszt növekedési faktor-2 (FGF-2) a transzformáló növekedési faktor (TGF), az angiopoetinek (Ang1 és 2) a mátrix metalloproteinázok (MMP), az $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin és a VEkadherin, a COX2 és a hatására termelt prosztaglandinE2 (PGE2) illetve az aminopeptidáz-N/CD13 és még számos más mediátor is részt vesz az angiogenezisben. (3. ábra) (Carmeliet és mtsa., 2011). Ezen molekuláris útvonalak és közvetítő molekulák mind célpontjai lehetnek a diagnosztikai és a terápiás beavatkozásoknak. (Asabella és mtsai 2017). Bár az angiogenezist serkentő faktorok közül még mindig a VEGF-et tekintik a legdominánsabb faktornak, az integrinek szintén számos az érképződéshez kapcsolódó folyamatban (adhézió, migráció, proliferáció, differenciálódás, túlélés) játszanak szerepet (Rüegg és mtsa., 2003).



3. ábra: Tumorok angiogenezisében részt vevő mediáló molekulák.

Integrinek 2.3.1

Az integrinek a sejtek extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódását szolgáló molekulacsalád tagjai. Az integrinek két glikoprotein egységből, egy α és egy β részből álló transzmembrán fehérjék (4. ábra). Relatíve kis energiájú kötéseket létesítenek, de mivel igen nagy számban fordulnak elő így a sok kötés viszonylag erős, stabil kapcsolatot eredményez (Velcro-effektus). Az α és a β lánc egymáshoz nem kovalens kötéssel kapcsolódik. Az α láncnak egy 140kD méretű extracelluláris része van diszulfid híddal és négy ionkötő hellyel, melyek Mg²⁺-, vagy Ca²⁺-iont kötnek. Ezen ionokötő helyek telítettsége feltétlenül szükséges az extracelluláris mátrixban lévő fehérjékkel kialakítandó kötésekhez. A β lánc 100kD méretű extracelluláris része alakítja ki a kapcsolatot talin és α -actinin molekulákkal. Az integrinek egy része csak egyetlen fehérjét képes kötni, azonban vannak olyan tagjai a családnak, melyeknek a fibronectin, a laminin és a kollagén is ligandja. Ezen túlmenően azonban az RGD-szekvenciát felismerő ligandkötőhely minden mátrixfehérjében közös. Az integrinek megkönnyítik az endotélsejtek ECM-hez való kötődését, így az endotél sejteken történő növekvő integrin kifejeződés fenntartja a sejtek életképességét, növeli a sejtek érzékenységét a növekedési faktorokkal szemben, és szükséges a migrációhoz (Foubert és mtsa., 2012). Az endotélsejtek akár tíz különböző integrint is expresszálhatnak; $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_{\nu}\beta_3$, $\alpha_{\nu}\beta_5$ és $\alpha_{\nu}\beta_8$ (Serini és mtsai., 2006).



4. ábra: Az integrinek sematikus szerkezete.

Az integrin családon belül az $\alpha_v\beta_3$ több különböző folyamatban is részt vesz, mint például az oszteoklasztok mediálta csontfelszívódás, az angiogenezis, a neovaszkularizáció, és a tumorok invázója, metasztatizálása (Wilder, 2002). Az integrinek közül az $\alpha_v\beta_3$ volt az első, melynek bizonyították a kitüntetett szerepét az új erek képződében. (Brooks és mtsai., 1994). Kimutatták, hogy a fibroblaszt növekedési faktor-2-vel (FGF2), a metalloproteináz MMP-2-vel, az aktivált PDGF-el, az inzulin és VEGF receptorokkal együtt/társulva elősegíti a proliferációt, az inváziót, illetve az apoptózis elkerülését (Brooks és mtsai 1994). Emellett az

is egy fontos tény, hogy az $\alpha_v\beta_3$ gátlása monoklonális antitestekkel, illetve ciklikus RGD peptiddel (antagonista) bizonyítottan akadályozza az angiogenezist (Kumar, 2003).

2.3.2 Aminopeptidáz-N / CD13

A CD13, más néven aminopeptidáz-N (APN) egy multifunkciós metallopeptidáz, amely szerepet játszik a sejtek migrációjában, proliferációjában, az antigénkifejeződésekben, a fehérje lebontásában, a citokin szabályozásban, az extracelluláris mátrix degradációjában, a tumorok inváziójában és a vírusfelismerésben is (Luan és mtsa., 2007, Mina-Osorio, 2008). Maga a fehérje egy erősen glikolizált ~150-240 kDa, II-es típusú membrán metallopeptidáz, amelyet a legtöbb myeloid eredetű sejt expresszál, de nagy mennyiségben fejeződik ki fiziológiásan a vese proximális tubulusaiban, a vékonybélből származó epitél sejteken, a prosztata epitél sejtjeiben, az epevezeték csatornáiban, hízósejtekben, valamint egyes esetekben fibroblasztokban és simaizomsejtekben is (Mina-Osorio, 2008).



5. ábra: Az aminopeptidáz-N sematikus szerkezete.

A CD13-ról kimutatták, hogy a legtöbb daganatos szövet ereiben, valamint a tumor körüli strómában is expresszálódik (Di Matteo és mtsai., 2011). Jelentős tény az is, hogy az angiogenezis folyamatában is részt vesz az angiogén jelek generálásában és modulálásában, a kapilláriscső-képződés folyamatában, valamint az angiogén erek markereként (Mina-Osorio, 2008, Bauvois és mtsa., 2006). Ezzel összhangban megfigyelték azt is, hogy a CD13 hiánya akadályozza a daganatok vaszkularizációját (Guzman-Rojas és mtsai., 2012). Működésének

gátlása anti-CD13 antitestekkel vagy bestatinnal korlátozza az angiogenezist, míg a hipoxia és az angiogén faktorok elősegítik expresszióját az endotélsejtekben (Mina-Osorio, 2008, Bhagwat és mtsai., 2001). Ezen túlmenően pedig a genetikailag módosított CD13-null egereken végzett kísérletek csökkent angiogén választ mutatnak a növekedési faktorokra, illetve hipoxiás körülmények között jelentősen gyengébbnek bizonyult a retina neovaszkularizációjának elősegítése (Rangel és mtsai., 2007). Sajnálatosan a daganatos sejteken kimutatható magas mértékű expressziója a betegek számára rossz prognózissal jár együtt, többek között hasnyálmirigy- (Ikeda és mtsai., 2003) és vastagbélrákban (Hashida és mtsai., 2002), nem kissejtes tüdőrákban (Zhang és mtsai., 2015, Schmidt és mtsai., 2017), malignus pleurális mesotheliomában (Otsuki és mtsai., 2018), hepatoblastomában (Saida és mtsai., 2015) és lágyrészszarkómában (Kessler és mtsai., 2018) is. Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy a CD13 kulcsszerepet játszik az angiogenezisben. (Domínguez és mtsai., 2020).

2.3.3 Prosztaglandin E2

A prosztaglandinok olyan a ciklooxigenáz (COX) által a szövetekben előállított lipidmolekulák, melyek hormonhatással bírnak, illetve gyulladáskeltő hatásukról is ismertek. Húsz szénatomból állnak, és minden esetben tartalmaznak egy öt szénatomos gyűrűt is. A jelátviteli molekulák csoportjába tartoznak. Eltérő szervekben eltérő hatást tudnak kifejteni, akár különböző szervekben egymással ellentétes is lehet a hatásuk. Lokális funkciójuk leginkább a prosztaglandint megkötő receptortól és az ennek következtében a sejten belül elinduló jelektől függ. Rövid élettartamuk miatt csak a termelő sejtre (autokrin hatás), illetve annak közvetlen környezetére fejtik ki hatásukat (parakrin hatás). A többi hormontól eltérnek abban is, hogy nem egy kitüntetett szerv termeli őket, hanem a szervezet szinte összes szervében lokálisan szintetizálódnak.



6. ábra: A prosztaglandin E2 szerkezete.

A prosztaglandin E2-t (PGE2) Kurzok és Leib 1930-ban fedezte fel, és a tudományos érdeklődés azóta sem csökkent irányában. Ez annak is köszönhető, hogy a molekula négy különböző receptoron keresztül különbözőképpen fejti ki a hatását (EP1-4). A COX-1 által termelt PGE2 felelős számos élettani funkcióért, például a vérnyomás, a gasztrointesztinális integritás és a termékenység szabályozásáért. Ezzel szemben a COX-2-mediált PGE2-termelés rövid ideig és magas helyi koncentrációban fordul elő a gyulladás során, amely a sebgyógyulás érdekében serkenti az angiogenezist és a limfangiogenezist. Ezek az események játszódnak le azonban a tumorprogresszió során is (Xin és mtsai., 2012, Lala és mtsai., 2018). A PGE2 négy prosztaglandin E2-receptorra (EP1-EP4) hat, mind parakrin, mind autokrin módon. A COX-2/PGE2 által közvetített limfangiogenezist és angiogenezist elsősorban a PGE2 EP2-hez és EP4-hez való kötődése segíti elő. Ez közvetíti számos pro-limfangiogén és pro-angiogén faktor, mint például a korábban említett VEGF (Majumder és mtsai., 2018) termelését és felszabadulását. Számos tanulmány kimutatta, hogy a COX-2 aktivitásának megnövekedése emelkedett PGE2 szinthez vezet, ami több mechanizmuson keresztül elősegíti az emlőrák progresszióját, növeli az invazivitást, és serkenti a tumorhoz kapcsolódó angiogenezist (Rozic és mtsai., 2001, Xu és mtsai., 2014), több angiogén útvonalon keresztül. Laboratóriumi vizsgálatok során bizonyították, hogy ezen események elsődleges közvetítője a PGE2 EP4receptor (De Paz Linares és mtsai., 2021). Megfigyelték azt is, hogy a PGE2 vastagbél-, nyelőcső-, és gyomorrák esetében egyfajta visszacsatolási hurok révén stimulálja az angiogenezist (7. ábra). A COX-2-eredetű PGE2 indukálja a VEGF és a bFGF termelését, amelyek a COX-2 expressziójának emelkedését és a PGE2 termelésének további fokozását

váltják ki. Ezért ilyen esetekben a PGE2-receptorok és/vagy PGE-szintázok megfelelő célpontjai lehetnek a kezelésnek (Wang és mtsai., 2005).



7. ábra: A PGE angiogenezist stimuláló útvonala (Wang és mtsai., 2005 alapján).

2.4 Angiogenezis vizsgálata in vivo képalkotó módszerekkel

angiogenezis a daganatok progressziójának és metasztázis képzésének Az elengedhetetlen része, ezért a primer tumorok és az áttétek érképződését célzó nem invazív molekuláris képalkotó technikák rendkívül hasznos diagnosztikai lehetőséget nyújthatnak. A SPECT és a PET nemcsak a rosszindulatú elváltozások kimutatásában lehet hasznos, hanem az antiangiogén terápiákra valószínűleg jól reagáló betegek kiválasztásában, illetve a célzott kezelés sikerének megerősítésében is. Ezenkívül a nukleáris képalkotó technikák segíthetnek az új, angiogenezisre irányuló gyógyszerek kifejlesztésében és validálásában is. A képalkotás a három fő pontra fókuszálódik: (I) nem endotélsejtes célpontok, (II) endotélsejtes célpontok és (III) extracelluláris mátrixfehérjék és mátrixproteázok (Asabella és mtsai., 2017). Mivel az angiogenezis egy összetett folyamat, melyben számos közvetítő molekula/receptor szerepet játszik, a molekuláris képalkotás szempontjából is számos potenciális célpont létezik. Ezek a célpontok közvetett célpontokra (pl. glükóz anyagcsere, vagy hipoxia - amelyek csak közvetve állnak összefüggésben az angiogenezissel) (2. táblázat) és közvetlen célpontokra (a sejteken vagy a sejt közelében lévő specifikus receptorok, amelyek közvetlenül kapcsolódnak az angiogenezishez) (3. táblázat) oszthatók (Florea és mtsai., 2021).

2.4.1 Az angiogenezist közvetetten megjelenítő farmakonok

| Tracer | Képalkotó eljárás típusa | Célpont |
|--|--------------------------|-------------------|
| 2-[¹⁸ F]-FDG ^a | PET | glükóz anyagcsere |
| [¹⁸ F]HX4 ^b | PET | hipoxia |
| [¹⁸ F]FMISO ^b | PET | hipoxia |
| [¹⁸ F]FAZA ^b | PET | hipoxia |
| [¹⁸ F]-SAV03° | PET | MMP |
| [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-C6 ^c | PET | MMP |

2. táblázat: Az angiogenezis képalkotásban használt közvetett markerei, a: klinikai alkalmazásban, b: klinikai kutatásban, c: *in vivo* preklinikai vizsgálatokban

Számos az angiogenezist közvetetten megjelenítő PET farmakont ismerünk, ezek közül néhányat sorol fel a 2. táblázat. A 2-[¹⁸F]FDG a legrégebben és igen széles körben alkalmazott tumormarker a PET képalkotó technológiában. Azonban a klasszikus szerepén túl részben az angiogenezis közvetett markereként is használható, amint azt Staruss és munkatársai kimutatták. Munkájuk során megállapították, hogy a 2-[¹⁸F]FDG kinetikáját az angiogenezissel kapcsolatos gének modulálják: bizonyították, hogy a 2-[¹⁸F]FDG transzport sebessége magasabb az emelkedett VEGF-A és angiopoietin-2 expressziójával rendelkező tumorokban (Strauss és mtsai., 2008). Azonban egy Guo és munkatársai által végzett immunhisztokémiai vizsgálatban nem találtak korrelációt az 2-[¹⁸F]FDG felvétel és a mikroerek sűrűsége között (Guo és mtsai., 2006). Ugyanakkor számos tanulmány rámutatott arra, hogy a bevacizumabbal végzett terápia során az 2-[¹⁸F]FDG PET hatékony módszer lehet a túlélés előrejelzésére (De Bruyne és mtsai., 2012, Hwang és mtsai., 2017).

A daganatok hipoxiájának vizsgálata is szolgáltathat közvetett információt az angiogenezisről. Cher és munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy a daganat grádusa, az angiogenezis markerek és a [¹⁸F]FMISO PET között szoros összefüggés van (Cher és mtsai., 2006). A [¹⁸F]FMISO egy olyan ¹⁸F- jelzett nitroimidazol vegyület, mely oxigén jelenlétében a sejtekben oxidálódik, annak hiányában viszont tartósan kötődik egyes sejtkomponensekhez. Egy másik, alternatív PET hipoxia tracer a [¹⁸F]FAZA, amely a MISO-hoz képest jobb farmakokinetikával és biodisztribúcióval rendelkezik, illetve jobb tumor-háttér arányt mutatott a vizsgálatok során (Quartuccio és mtsai., 2018, Stieb és mtsai., 2018). A [¹⁸F]Flortanidazol ([¹⁸F]HX4) egy harmadik generációs nitroimidazol alapú hipoxia marker, mely még jobb eloszlást és még gyorsabb kiürülést mutat (Sanduleanu és mtsai., 2020) és ugyan közvetlen összefüggését az angiogenezissel még nem vizsgálták, de ezen a területen is ígéretes PET radiofarmakon lehet.

A fentieken túl a képalkotás célpontjai lehetnek az intacelluláris mátrixon lévő mátrix metalloprotinázok is, mivel ezek kulcsfontosságú enzimek a daganatok progressziójában, többek között elősegítik a jelátvitelt és az inváziót, valamint az angiogenezisben is szerepet játszanak (Gialeli és mtsai., 2010). Jelenleg 23 különböző MMP ismert, de leginkább az MMP-2 és az MMP-9 (a zselatinázok) került a kutatások középpontjába. Az (2R)-2-[4-(6-[¹⁸F]fluorhex-1-ynyl)-benzolszulfonil-amino]-3-metil-vajsavat ([¹⁸F]F-SAV03) az MMP-2 PET leképezésére fejlesztették ki (Furumoto és mtsai., 2003). Az angiogenezissel való korreláció mértéke azonban még nem bizonyított a képalkotás területén, és további kutatásokra van szükség (Florea és mtsai., 2021).

A prosztata specifikus membrán antigén (PSMA) a prosztatarák jól ismert célpontja, és bár a PSMA nem feltétlenül expresszálódik a nem prosztata eredetű daganatokban, és egyáltalán nem az egészséges érrendszerben, a tumorral kapcsolatos neovaszkuláris endotél sejtekben előfordul a megjelenése. Kimutatták, hogy a PSMA expressziója olyan tumorokban kifejezett, amelyek kritikusan függenek az angiogenezistől (Bostwick és mtsai., 1998). Nevével ellentétben azonban a PSMA számos nem prosztataszövetben is kifejeződik, beleértve a nyálmirigyeket, a veséket és a gasztrointesztinális nyálkahártyát. A PSMA expresszióját számos szolid tumor szövetében (mint például a primer agydaganatok, tüdőrák, emlőrák, gasztrointesztinális tumorok, vesesejtes karcinóma (RCC), adenoid cisztikus és acinus sejtes nyálmirigy karcinóma) és a tumorokhoz kapcsolódó neovaszkuláris endotél sejteken is kimutatták. A PSMA-nak funkcionális szerepe van a tumorokon belüli angiogenezis elősegítésében, ezzel szemben ez a funkció hiányzik a normál szövetekből (Wang és mtsa., 2023) A PSMA jelenléte több daganattípusban is összefüggésben lehet a tumorprognózissal. Ilyenek lehetnek többek között a fej-nyaki laphámsejtes karcinómák, az oszteoszarkóma, a vastagbélrák és a tüdőrák, azonban a mellékvesekéreg és a gyomorkarcinómák esetében nem mutattak ki összefüggést a PSMA felvétel és a tumor stádiumbesorolása között (Backhaus és mtsai., 2018).

Tekintettel a ciklooxigenáz-2 (COX-2)/prosztaglandin E2 (PGE2), a PGE2-receptorok (EP-k) és a karcinogenezis közötti szoros kapcsolatra, számos kutatás indult a mögöttes átfogó molekuláris mechanizmusok intenzív vizsgálatára (Tong és mtsai., 2018). A COX2/PGE2/EP tengely egyes részeit specifikusan célzó molekulák ígéretesek lehetnek a diagnosztikus

képalkotás során például a PGE2-pozitív daganatos elváltozások korai diagnosztikájában, valamint a rosszindulatú elváltozások elleni új terápiás gyógyszerek tervezésében.

Más makrociklusos vegyületekkel összehasonlítva a ciklodextrineket használják messze a legnagyobb mértékben a "gazda-vendég" komplexkémiai alkalmazásokban és az orvosi képalkotásban, szerkezeti előnyeik és a zárványkomplexek kialakítására való robusztus képességük miatt (Wankar és mtsai., 2020, Wang és mtsai., 2020). Egy zárványkomplex úgy jön létre, hogy egy vendégmolekula részben vagy teljesen bezáródik a gazdamolekula belső üregébe (Stella és mtsa., 2008, Del Valle, 2004). A ciklodextrinek általában a hidrofób vegyületekkel képeznek ilyen zárványkomplexeket. (Wang és mtsai., 2020, Rekharsky és mtsa., 1998, Hădărugă és mtsai., 2018). A véletlenszerűen metilált β-CyD (RAMEB) PGE2vel való komplexképzésről Sauer és munkatársai számoltak be először. Vizsgálatuk során in silico szűrés technikát használva a RAMEB mutatta a legnagyobb affinitást a PGE2 felé és a kapilláris elektroforézis kísérletekben is képzett a RAMEB a PGE2-vel zárványkomplexeket(Sauer és mtsai., 2017). Ezen eredmények alapján egy 2020-as tanulmányunkban a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB vegyület szintézisének megvalósítását tűztük ki célul, hogy a tumorok progressziójában és az áttétek kialakulásában fontos szerepet játszó PGE2 specifikus tumort célzó vegyületet nyerjünk. Az előállított vegyületet in vivo BxPC3 (PGE pozitív) és PancTu-1 (PGE negatív) tumort hordozó és egészséges egereken teszteltük. A dinamikus PET képalkotást a beadástól 90 percig végeztük. Eredményeink azt mutatták, hogy a [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB az egészséges állatokban 90 perc elteltével már csak a vesékben és a vizeletben volt detektálható kis mennyiségben, miközben a tumoros állatok esetében felhalmozódása szignifikánsan nagyobb volt a BxPC3 tumorokban, mint a PancTu-1-ben; a vizsgált időtartam alatt a legmagasabb tumor/háttér arányt (T/M) 80-90 perccel az injektálást követően kaptuk. A T/M standardizált felvételi értékek (SUV) 10-szer alacsonyabbak voltak a PancTu-1 tumorokban, mint a BxPC3 tumorokban, összhangban az immunhisztokémiai eredményekkel (Trencsényi és mtsai., 2020). Mindez megerősítette a ⁶⁸Ga-jelzett RAMEB magas PGE2-szelektivitását, illetve bizonyította, hogy a jelölt CyD-származékok alkalmasak pozitron emissziós tomográfiás felhasználásra in vivo preklinikai kisállat modelleken. Készültek már tanulmányok a NODAGA vagy DOTAGA kelátorral konjugált, Gallium-68 (⁶⁸Ga) és Bizmut-205/206 (^{205/206}Bi) kötésű β-ciklodextrin vegyületek diagnosztikai, illetve terápiás célú alkalmazásáról is preklinikai modelleken (Hajdú és mtsai., 2019), (Csige és mtsai., 2022,). Ezekben a tanulmányokban az egészséges egereken végzett dinamikus PET vizsgálatok során hasonló megállapításokra jutottak, vagyis az alkalmazott ciklodextrin származékok - többek között a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβD is - 90 perccel az injektálást követően már csak a vesékben és a vizeletben volt kimutatható. Mindezek a PGE2 pozitív daganatok személyre szabott PET diagnosztikájának kifejlesztését segíthetik elő.

2.4.2 Az angiogenezist közvetlenül megjelenítő farmakonok

A VEGF receptort célzó, ¹²³I- vagy ¹²⁵I-jelzett VEGF165/121 volt a legintezívebben kutatott nyomjelző a kétezres évek elején. Ezeken túl vizsgálták még a [^{99m}Tc]VEGF121, a [¹¹¹In]VEGF165, a [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-VEGF121 és a [⁶⁴Cu]VEGF121, valamint a Bevacizumab két radioaktívan jelölt változatát is. Li és munkatársai már 2001-ben bizonyították, hogy in vitro a [¹²³I]VEGF165 számos emberi daganatos sejthez/szövethez kötődik, miközben elenyésző a halmozódás az egészséges szövetek esetében.

3. táblázat: Képalkotásban használt közvetlen angiogenezis markerek, a: klinikai alkalmazásban, b: klinikai kutatásban, c: *in vivo* preklinikai vizsgálatokban (forrás Florea és mtsai., 2021)

| Tracer | Képalkotó eljárás típusa | Célpont |
|---|-----------------------------|------------|
| [¹²³ I]-VEGF165 ^b | SPECT | VEGF |
| [⁶⁴ Cu]Cu-DOTA-scVEGF ^c | PET | VEGF |
| [^{99m} Tc]Tc-HYNIC-scVEGF ^c | SPECT | VEGF |
| ⁸⁹ Zr-jelzett Bevacizumab ^c | PET | VEGF |
| ¹¹¹ In-jelzett Bevacizumab ^b | SPECT | VEGF |
| ^{99m} Tc-jelzett anti-ED-B fibronektin antitest ^c | SPECT | integrinek |
| ¹²³ I-jelzett anti-ED-B fibronektin antitest ^c | SPECT | integrinek |
| ⁷⁶ Br-jelzett anti-ED-B fibronektin antitest ^c | PET | integrinek |
| [¹⁸ F]F-Galacto-RGD ^b | PET | integrinek |
| [¹⁸ F]fluciclatide ^b | PET | integrinek |
| [¹⁸ F]RGD-K5 ^b | PET | integrinek |
| [¹⁸ F]F-FB-RGD ^c | PET | integrinek |
| [¹⁸ F]F-PEG-RGD2 ^c | PET | integrinek |
| [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-RGD ^b | PET | integrinek |
| ^{99m} Tc-jelzett NGR ^c | SPECT | APN/CD13 |
| [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-c(NGR) ^c | PET | APN/CD13 |
| ⁶⁴ Cu-jelzett NGR ^c | PET | APN/CD13 |

Az ezt követő években több kutatócsoport is foglalkozott radioaktív jóddal jelzett VEGF molekula felhasználásával végzett képalkotással, preklinikai modelleken (Backer és mtsai., 2007, Yoshimoto és mtsai., 2006, Blankenberg és mtsai., 2004). Backer és munkatársai egy preklinikai vizsgálat során tumoros egérmodellen mind a ^{99m}Tc-, mind a ⁶⁴Cu-jelzett scVEGF esetében jelentős, bár heterogén felhalmozódást mutattak ki a tumorok területén (Backer és mtsai., 2007). Mivel azonban a jelölt VEGF molekulák közül csak kevés jutott túl a preklinikai fázison és érte el klinikai vizsgálatokat, ezért egy alternatív módszer került az érdeklődés központjába, a radioaktívan jelölt Bevacizumab. Az előzetes preklinkai vizsgálatokat követően a klinikai tesztek során a ⁸⁹Zr-jelzett bevacizumab használatával végzett PET képalkotás vesekarcinómás betegeken jól értékelhetőnek bizonyult (Nagengast és mtsai., 2007, Oosting és mtsai., 2015). A további vizsgálatok még folyamatban vannak, de a [¹²³I]VEGF vizsgálatokhoz hasonlóan a [⁸⁹Zr]Bevacizumab is hasznos prognosztikai eszköznek bizonyulhat.

Mivel az egészséges endotélsejtek csak elenyésző mértékben fejeznek ki integrineket, viszont a tumoros sejtek felszínén és a tumorokban fejlődő erekben elsősorban az $\alpha_v\beta_3$ nagy mennyiségben van jelen, ezért elsődleges célpontok lehetnek a képalkotásban. Az integrinek célozhatók a viszonylag nagyméretű radioaktívan jelölt fibronektin segítségével. Korábbi vizsgálatok során mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között megfelelő eloszlást és tumor halmozódást mutattak ki a ^{99m}Tc-, ¹²³I-, ¹²⁴I- és ⁷⁶Br- izotópokkal jelzett humán rekombináns anti-ED-B fibronektin antitest fragmentumok esetében (Berndorff és mtsai., 2006, Tijink és mtsai., 2009). Egy klinikai vizsgálat során, amikor ¹²³I-jelzett dimer L19 [L19(scFv)(2)]-et alkalmaztak húsz tüdő-, vastagbél- vagy agydaganatos beteg vizsgálatához (Santimaria és mtsai., 2003), a szerzők a rendkívül agresszív, gyorsan növekedő daganatokban állapítottak meg jelentős halmozódást, így felvetették az esetleges terápiás alkalmazás lehetőségét.

Az antitestfragmentumokhoz képest az RGD peptidszekvencia könnyebben előállítható és könnyebben kezelhető, emiatt gyakrabban alkalmazott. A lineáris és a ciklikus RGD peptidek is felhasználhatóak $\alpha_v\beta_3$ - integrint célzó radiotracerek fejlesztésére. Bár a lineáris változatok *in vitro* vizsgálatokban jobb kötődést mutattak, *in vivo* körülmények között a ciklikus RGD bizonyult jobbnak. Ennek okát abban látják, hogy a lineáris peptidek instabilabbak és érzékenyebbek a proteázokkal szemben (Bogdanowich-Knipp és mtsai., 1999, Tornesello és mtsai., 2017). Ennek megfelelően a legígéretesebb RGD peptidek ciklikusak és kis méretűek. A biodisztribúció és a farmakokinetika javítása érdekében az RGD szerkezetét többen is módosították különböző csoportok segítségével. A [¹⁸F]F-Galacto-RGD az egyik legtöbbet vizsgált változat, mely mind a preklinikai, mind a klinikai vizsgálatokban jó farmakokinetikai

tulajdonságokat mutatott, specifikus kötődés mellett, számos daganattípus esetében (pl: rosszindulatú melanomák, glioblasztómák, fej- és nyaki tumorok, szarkómák, vesesejtes rákok, nem kissejtes tüdőrákok és prosztatarákok). Legfontosabb alkalmazási területe a gliómák lehetnek, mert az egészséges agyszövetben nem mutatott magas halmozódást (Chen és mtsai., 2016). A GE Healthcare által kifejlesztett [¹⁸F]Fluciclatid és a Siemens Molecular Imaging Inc. által kifejlesztett [¹⁸F]RGD-K5 bár megfelelő tulajdonságokat mutattak a preklinikai vizsgálatokban, hosszadalmas és néha bonyolult szintézisük miatt nem tudtak elterjedni (Chen és mtsai., 2016). 2004-ben egy kutatócsoport egy pegilált [¹⁸F]F-PEG-RGD analógot hasonlított fluorobenzoil jelölt változatához ([¹⁸F]F-FB-RGD) és azt találták, hogy a pegilálás jobb tumorfelvételt, de lassabb kiürülést eredményezett (Chen X. és mtsai., 2004). Egy másik lehetséges módosítás a dimerizáció, mely az alapvető szerkezetet nem módosítja, mégis az RGD szekvencia megnövekedett számának köszönhetően javítania kell a molekula affinitását. ^{99m}Tc- és ⁶⁸Ga-jelzett RGD vegyületek esetében is alkalmaztak dimerizációt, mely módosított ugyan a farmakokinetikán, de általában a tumor/háttér arány azonos maradt (Lobeek és mtsai., 2020, Shi és mtsai., 2008). 2011-ben a [68Ga]Ga-NODAGA-RGD szintézisére dolgoztak ki egy igen rövid és jó hozamú előállítási módot és a [68Ga]Ga-DOTA-RGD-vel összehasonlítva gyorsabb kiürülést és jobb tumor/háttér arányt tapasztaltak (Knetsch és mtsai., 2011). A kelátorokon keresztül RGD-hez kapcsolt ⁶⁸Ga- vegyületek preklinikai vizsgálatokban ígéretesnek mutatkoznak, bár a klinikai összehasonlítás még hiányzik (Provost és mtsai., 2019, Pirooznia és mtsai., 2020, Isal és mtsai., 2018). Mind a ¹⁸F-, ⁶⁸Ga-, mind a ^{99m}Tc-jelzett RGD származékok előnyei egyre inkább megmutatkoznak elsősorban fej-nyaki daganatok esetében, de hogy végül melyik változatot kerül be a mindennapi klinikai rutinba az még kérdéses (Zheng és mtsai., 2019, Li és mtsai., 2018, Florea és mtsai., 2021).

Több tanulmány is beszámolt már arról, hogy a CD13 a tumorokban, illetve az ott kialakult erek endotélsejtjeiben fokozott mértékben fejeződik ki, emiatt ideális célpontnak tűnik képalkotás szempontjából is (Ikeda és mtsai., 2003, Pang és mtsai 2016, Shimizu és mtsai., 2002). Kimutatták azt is, hogy az aszparagin-glicin-arginin (NGR) szekvenciát tartalmazó peptidek specifikusan kötődnek a CD13 (aminopeptidáz N) metallopeptidázhoz, és az elmúlt években számos analógját szintetizálták, majd jelölték radioaktív izotóppal. A kezdeti ^{99m}Tc-jelzett monomerekről gyorsan áttértek a kutatók a multimer peptidekre, mivel ezek jobb kötődést mutattak (Ma és mtsai., 2013, Ma és mtsai., 2014, Persigehl és mtsai 2014). Munkacsoportunk 2015-ben végezte a ⁶⁸Ga-jelzett NOTA-c(NGR) farmakon képalkotási tulajdonságainak összehasonlítását a kereskedelmi forgalomban kapható [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]2-vel. Vizsgálataik azt mutatták, hogy egészséges állatokban a [⁶⁸Ga]Ga-

NOTAc(NGR) 90 perccel az injektálás után csak a vesékben és a vizeletben kimuatható, ellentétben a [68Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]2-vel, mely a májban is nagyobb mértékű halmozódást mutatott. A tumoros állatok vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NOTAc(NGR) jelentősen nagyobb mértékben halmozódott mind a primer tumorban, mind a metsztázisokban, miközben az egyéb szervekből gyorsabban kiürült (Máté és mtsai., 2015). Az utóbbi időben is folyamatosan zajlanak a fejlesztések, több új ⁶⁸Ga- és ⁶⁴Cu- jelzett NGR vegyület is megfelelő tumor/háttér arányt mutatott az alkalmazott preklinikai modellekben. A Gao és munkatársai által vizsgált [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-GGGCNGRC felvétele például szignifikánsan nagyobb volt, mint a 2-[¹⁸F]FDG-é a jól differenciált hepatocelluláris karcinóma xenotranszplantátumban, ami alapján a szerzők javasolnák a további klinikai vizsgálatokat. (Gao és mtsai., 2017). Kis és munkatársai több különböző ⁶⁸Ga-jelzett NGR változatot hasonlítottak össze preklinikai modelleken PET/MRI segítségével. Az általuk használt vegyületek közül a primer tumorokban mind a NOTA, mind a NODAGA kelátorral konjugált cNGR magas halmozódást mutatott, ami alapján mind a két molekulát ígéretes angiogenezis markernek tartják (Kis és mtsai., 2020). Egy másik kutatócsoport célja a ⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-NGR (NGR monomer) és a ⁶⁸Ga]Ga-NOTA-(NGR)2 (NGR dimer) összehasonlítása volt. Tapasztalataik alapján mind a két általuk vizsgált vegyület jól halmozódott a tumorokban, azonban az NGR dimer esetében kissé magasabb volt a tumorizom arány, ugyanakkor magasabb halmozódását mutattak ki a májban és a lépben (Israel és mtsai., 2021).

Az NGR peptidek közül még egyet sem vizsgáltak klinikai körülmények között, így a valódi rutinszerű diagnosztikai értékét még nem ismerjük. Azonban nemrégiben Gai és munkatársai készítettek egy kettős receptor ligandot, amelynek kettős célpontja az $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin és az Aminopeptidáz N. A [⁶⁸Ga]Ga-NGR-RGD nagyobb kötési affinitást, célzott hatékonyságot és a tumorból hosszabb kiürülési időt mutatott a monomer [⁶⁸Ga]Ga-NGR-hez és a [⁶⁸Ga]Ga-RGD-hez képest (Gai és mtsai., 2019). Ezek alapján elképzelhető, hogy a klinikai alkalmazásokban, a diagnosztikában és esetleg a terápiában is, a multimer, több receptorral rendelkező peptidek jelenthetik a megoldást.

2.5 *In vivo* metasztázis modellek

Habár napjainkban az *in vitro* körülmények között a háromdimenziós tenyészeteken végzett áttétképződési vizsgálatok jelentősek, ezek a rendszerek csak korlátozott lépések

vizsgálatát teszik lehetővé. Tumorok metasztázisképzésének minden aspektusát nehéz in vitro reprodukálni, így nem követhető talán a legfontosabb, az immunrendszer szerepe. Ebben a tekintetben a laboratóriumi tumoros állatmodellek az in vitro vizsgálatok logikus továbbfejlesztését jelentik. Az in vivo metasztázismodellek kialakítása három lehetséges módszerrel történhet. Ezek közé tartozik a kémiai indukció, amelynek során rákkeltő anyagokat juttattnak az állat szervezetébe a tumor növekedésének és áttétképződésének elősegítésére, a második lehetséges módszer a transzplantációs modellek használata, amely során tumoros sejtek vagy tumordarabok beinjektálását végzik kísérleti állatokba, valamint elérhetőek még különböző genetikailag módosított egérmodellek. A mesterségesen kialakított modellek mellett bizonyos vizsgálatok esetében használnak még elsősorban háziállatként tartott daganatos megbetegedésben szenvedő kutyákat is, ezeket összehasonlító vagy spontán modelleknek is nevezik (Khanna és mtsa., 2005). Az áttétképződés vizsgálatához tökéletes in vivo modell előállítása szinte lehetetlen, mivel egyetlen modell sem képes teljes mértékben modellezni a humán megbetegedések minden folyamatát, illetve a terápiára adott válasz is csak megfelelő keretek között értelmezhető. Ezért a preklinikai vizsgálatok esetében a következtetéseket több platformon elvégzett kísérlet alapján állapítják meg, hogy kiküszöböljék az egyes modellek korlátait.

2.5.1 Kémiailag indukált metasztázis modellek

A kémia rákkeltő anyagok segítségével létrehozott metasztázismodellek közül az egyik legismertebb a DMBA (7,12-dimethylbenz[α]anthracene)/TPA(12-*O*tetradecanoylphorbol-13-acetate) által kiváltott megbetegedés. Magához a primer tumor indukciójához a DMBA-t az állat bőrfelszínén alkalmazzák (Abel és mtsai., 2009). Egy héttel a DMBA kezelést követően kéthetente TPA-t alkalmaznak, hogy serkentsék a tumor növekedését. A DMBA károsodást idéz elő a DNS-ben ezzel növelve a daganat kialakulásához szükséges elváltozások esélyét. A TPA többszöri alkalmazása pedig elősegíti a tumor növekedését azáltal, hogy több jelátviteli útvonal pl. PKC-Ras/MAPK működését/szabályozását befolyásolja (Kemp, 2005, El-Shermerly és mtsai., 1997, Rundhaug és mtsa., 2010). A DMBA alkalmazást követően 6-8 héttel alakulnak ki a jóindulatú elváltozások, majd a promóciós fázis (6-12 hónap) során nő ezek száma és átalakulnak malignus formákká. Amint a daganatos sejtek elérik a dermiszt és a bőr alatti rétegeket megkezdődik a metasztatizáció a lokális nyirokcsomókba és a távoli szervekbe, mint például a tüdő. A módszer legnagyobb előnye, hogy a bőrfelszínen/bőrben növekvő primer tumor könnyen nyomon követhető, azonban a metasztázisok vizsgálata esetén nem ideális, hogy a kezelt állatok mindössze 5 - 10%-ánál alakul ki az invazív laphámsejtes karcinóma, illetve hogy a metasztázisok kialakulása akár 6-12 hónapot is igénybe vehet.



8. ábra: Tumor és metasztázisok kialakulásának idővonala kétlépéses karcinogenezis során.

A humán hepatocelluláris karcinómák leggyakrabban a tüdőbe, a nyirokcsomókba, a mellékvesébe illetve a csontokba képzett áttétekkel rontják a betegek túlélési esélyeit (Kummar és mtsa., 2003). Ennek a megbetegedésnek a vizsgálatához Fischer 344 (F344) fajtájú patkányokban kémiailag indukált tumorok használhatóak. Ha a F344 patkányoknak intraperitoniális injekció formájában egyszeri 100mg / testtömegkilogram dietilnitrózamint (DEN) adunk, akkor májtumor alakul ki az állatokban. Amennyiben további orális adagolásban N-nitrozomorfolint (NMOR) kapnak 14-24 héten keresztül, akkor a kísérleti állatokban minden esetben léziók fejlődnek ki a tüdőben (Futakuchi és mtsai., 1999, Futakuchi és mtsai., 2004).

A kémiailag indukált daganatok esetében elmondhatjuk, hogy nagyon hasznos modellek lehetnek a preklinikai kutatásokban, hiszen a betegség lefolyása rendkívül nagy hasonlóságot mutat a humán megbetegedésekkel, így segítve a tumor formálódás és a metasztázisok kialakulásának komplex vizsgálatát. Azonban a metasztázisok kifejlődéséig bizonytalanul hosszú idő telhet el, ami így nehezíti a kísérlettervezéseket (8. ábra).

2.5.2 Transzplantációs tumor modellek

A transzplantációs metasztázis modellek azon alapulnak, hogy a kísérleti állatba (humán eredetű (xenograft) vagy saját fajtájából származó (syngenic/allograft) tumoros sejteket vagy szövetdarabot juttattnak. Ezekkel a módszerekkel a metasztázisok kialakulásának különböző

molekuláris szintű mechanizmusai vizsgálhatók, illetve az új metasztatizációt akadályozó kísérleti terápiák követésére is alkalmasak.

| Előnyök | Hátrányok |
|---|---|
| A gyógyszerek hatékonysága humán eredetű tumorokon tesztelhető. | Az immunhiányos állatok használata korlátozza az immunrendszer hatásának értékelését. |
| Megőrződik a humán tumor genetikai heterogenitása. | Hosszabb látencia |
| Lehetséges az egyénre szabott molekuláris terápia. | A károsodott endokrin rendszer korlátozza a terápiás alkalmazások tesztelését. |
| többféle terápiát lehet értékelni ugyanazon a sejtmintán | Az eltérő fajok miatt kialakuló interakciók a tumor és mikrokörnyezete között. |
| A tumor körüli sztróma is transzplantálható, ami elősegíti a mikrokörnyezet tanulmányozását | A kísérleti állatok tartása költséges, a speciális patogén mentes körülmények miatt. |
| | Alacsony a metasztázis kialakulásának esélye. |

4. táblázat: Xenograft transzplantációs modellek előnyei és hátrányai.

A xenograft transzplantáció során humán eredetű tumorból származó sejteket vagy szövetdarabokat ültetnek egy erre megfelelő laboratóriumi rágcsálóba. A beültetett idegen sejtek, szövetek kilökődésének gátlását a hordozó állat immunrendszerének elégtelen működésével érik el (4.táblázat). Az ilyen kísérleti állatmodellek létrehozásához genetikailag módosított egértörzseket használnak, mint például a nude, NOD (non-obese diabetes) a SCID (severe combined immundefficiency) és a RAG (recombination activating gene) egértörzsek (Belizario, 2009). A NOD/SCID egerek szervezetében például nincsennek B- és T-sejtjek és természetes ölősejtek (NK), a nude egerekben a B-sejtek, dendritikus sejtek és granulociták funkciója korlátozottnak tekinthető, bár ez az NK-sejtek és makrofágok aktivitásának kompenzációs növekedésével jár együtt. Ezeken túl léteznek olyan, az immunitással szinte egyáltalán nem rendelkező speciális egértörzsek, mint például a NOD/SCID/IL-2Rγ egerek (amelyekből hiányoznak a B-, T- és NK-sejtek, és diszfunkcionális makrofágokat és dendritikus sejteket tartalmaznak) (Belizario, 2009, Ito és mtsai., 2002), amelyeket egyre gyakrabban használnak olyan tumorok metasztázisképző potenciáljának értékelésére, amelyek nem, vagy ritkán képeznek áttétet kevésbé súlyosan immunhiányos egerekben.

A szingénikus transzplantációs modell azt jelenti, hogy a hordozó állat azonos genetikai háttérrel rendelkezik, mint a tumor forrásaként szolgáló állat. Ennek köszönhetően nem csak a tumor és mikrokörnyezetének kapcsolata vizsgálható, hanem az állat immunrendszerének reakciója is (5. táblázat). Mivel az állatok egészséges immunrendszerrel rendelkeznek, így ezek az állatmodellek alkalmasak lehetnek az immunterápiás kutatásokra is (Belizario, 2009). Szingénikus modellként homozigóta beltenyésztett állatokat használnak, így a növekvő tumorok heterogenitása alacsony, ezért különböző módszereket alkalmaznak, hogy a metasztázisra hajlamos/képes sejtek kiszelektálódjanak.

5. táblázat: Szingénikus transzplantációs modellek előnyei és hátrányai.

| Előnyök | Hátrányok |
|--|---|
| A daganat és környezete közötti kölcsönhatás fajon belüli. | Az egér/patkány eredetű transzplantált sejtek/szövetek kisebb humán relevanciával rendelkeznek. |
| A daganatot hordozó állatok egészséges immunrendszerrel rendelkeznek. | A beltenyésztett állatok miatt a genetikai változatosság alacsony. |
| A hordozó állat egészséges endokrin rendszere lehetővé teszi a terápiák tesztelését. | A kezelésekre adott válaszok eltérhetnek a humán esetektől. |
| Az áttétképződés rövidebb látenciája csökkenti a transzláció idejét. | |

Természetesen az, hogy a kísérleti állat testében hová kerül beültetésre a tumoros sejt vagy szövetdarab befolyásolja a metasztázisok kialakulásának helyét és valószínűségét is (Ottewell és mtsai., 2006). A laterális farki vénába injektált sejtek szinte minden esetben a tüdőben hoznak létre áttéteket (Arguello és mtsai., 1988), a közvetlenül a szívbe injekciózott sejtek viszont a máj-, petefészek-, mellékvese-, csont- és agyi metasztázisok kialakulásának gyakoriságát növelik (Ottewell és mtsai., 2006, Arguello és mtsai., 1988), miközben ha a sejteket az állat karotiszába juttatják, az az agyban növekedő metasztázisokat eredményez (Lorger és mtsa., 2010). A szubkután (s.c.) beoltott sejteket gyakran használják a tumorformáló képesség vizsgálatára, mivel a sejtek injektálása és a primer tumor növekedésének vizuális nyomon követése viszonylag egyszerűen kivitelezhető akár egy tolómérő segítségével, viszont ezek metasztázis modellezésére kevésbé alkalmasak. A szubkután tumorimplantátumokat használó modellek egyik fő hátránya, hogy egyértelműen nem reprodukálják a gyakori emberi rákos megbetegedések elsődleges helyét, és nem

ígéretes diagnosztikai potenciállal rendelkező új molekula fejlesztése zajlik, azt követően, hogy a molekula sikeresen átment a különböző *in vitro* teszteken, amelyek arra utalnak, hogy további *in vivo* vizsgálatra alkalmas lehet, hagyományosan a humán tumor xenograftokat használó szubkután transzplantációs modellt alkalmazzák (Bibby, 2004).

A transzplantáció elvégezhető ortotopikus módon is, amikor a tumoros sejt vagy szövet az származási helyével megegyező szöveti környezetbe kerül. Az ortotopikus transzplantációval olyan tumormodellek hozhatók létre, amelyek jobban hasonlíthatnak a humán rákos megbetegedésekre, beleértve a tumor szövettanát, érrendszerét, génexpresszióját, kemoterápiára való érzékenységét, illetve a keletkező metasztázisok kialakulásának folyamatát (Bibby, 2004, Khanna és mtsai., 2000). Ezekben a modellekben sokkal gyakrabban fejlődnek ki metasztázisok, mint a szubkután modellek esetén, és az a tény, hogy a spontán metasztázisok a primer tumorból erednek, lehetőséget nyújt az áttétképződési folyamat számos különböző aspektusának tanulmányozására (Khanna és mtsa., 2005). Az ortotopikus transzplantáció azonban néhány tumortípus (pl. vastagbélrák) esetében technikailag nagyobb felkészültséget igényel, és a primer tumor növekedésének nyomon követésére gyakran összetett *in vivo* képalkotó technikákat érdemes használni (mint például a SPET/CT vagy PET/MR) (Bibby, 2004).

2.5.3 A subrenal capsule assay (SRCA) modell

A vesetok alá ültetett humán tumor xenograftokat eredetileg kemoterápiás szerek hatékonyságának vizsgálatára dolgozták ki (Sakai, 1985, Bogden és mtsai., 1979). A kezdeti vizsgálatokban egy 1mm³-es tumor darabot ültettek be nude egerek bal vesetokja alá (Edelstein, 1986). A tumordarab kis méretének köszönhetően a tumoros szövet túlélése még az új érrendszer kialakulás nélkül is biztosított volt (Edelstein, 1986). Ugyanakkor ez azt is jelenti, hogy a modell segítségével végzett vizsgálatok eredményei a beültetést követő első 2 napban még kevésbé jelezhetik a vizsgált gyógyszerek tumornövekedést gátló hatását, annál inkább a kilökődést elősegítő hatásokat. A kezdeti kutatásokban az egereket az elsőtől a tizedik napig kezelték, majd a beültetett tumordarab méretét a tizenegyedik napon mérték (Edelstein, 1986). A későbbiekben a hordozó állat immunválasza miatt, amelynek kialakulása nagyjából a hetedik napra tehető, a vizsgálatot hat napra rövidítették (Bogden és mtsai 1986).

Az SRCA technika segítségével Uzvölgyi és munkatársai egy új szingénikus állati tumormodellt hoztak létre (Uzvolgyi és mtsai., 1990), amely segítségével a tumorprogresszió, illetve az áttétek kialakulásának preklinikai vizsgálatait végezték. Ennek érdekében myelomonocytás Leukémia (My), mezoblasztos nefroma (Ne) és hepatocelluláris karcinóma (He) sejteket transzplantáltak patkányok bal vesetokja alá. Utóbbi két tumoros sejtvonal kémiailag indukált kísérleti tumorokból származott. Korábban, SRCA modelleken végzett szövettani vizsgálatok a paratimikális nyirokcsomókban mutattak ki neoplasztikus sejteket. Emiatt a vesetok alá történő transzplantáció a paratimikális nyirokcsomóval komplexen ideális eszköznek tűnt a primer tumor metasztatizálásának kutatásaihoz (Paragh és mtsai., 2005). Később a modell preklinikai fejlesztése során sikeresen integrálódott a nukleáris medicina területén végzett kutatásokba is. Pozitron emissziós tomográf segítségével klasszikus PET tracerek úgymint dezoxi-2-[¹⁸F]fluor-D-glükóz (2-[¹⁸F]F-FDG) és [¹¹C]C-metionin alkalmazásával is azonosították mind az elsődleges tumorokat, mind pedig az áttéteket különböző tumoros sejttípusok esetén (Trencsenyi és mtsai., 2009, Trencsenyi és mtsai., 2014).

Mindezek alapján a jövőben az SRCA széles körűen alkalmazható a nukleáris medicinában onkológiai preklinikai vizsgálatokban. A vesetok alá történő tumoros sejtek, szövetek beültetésének segítségével tanulmányozható a primer tumor növekedése és áttétképzése, illetve az angiogenezis egyes folyamatai, mely mind az új daganatellenes vegyületek, mind új izotópdiagnosztikai markerek fejlesztése során hasznosnak bizonyulhat (Képes és mtsa., 2023).

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök

Radiofarmakonok előállítása során használt anyagok:

- QMA Sep-Pak (Plus Light) (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- AG neutralizáló oszlop (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA)
- C18 Sep-Pak Plus (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Alumina Sep-Pak (Plus) (MI-026) töltet (tisztító oszlopsor) (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Kriptofix 2.2.2.-t (Merck, Darmstadt, Németország)
- vízmentes acetonitril (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 14 mg/ml koncentrációjú K2CO3-oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 20 mg TATM (ABX GmBH, Radeberg, Németország)
- 1 M HCl oldat, Normapur (VWR International Kft, Debrecen, Magyarország)
- injekcióhoz való víz (B.Braun Medical Inc, Melsungen, Németország)
- 10 %-os NaCl-injekció (Pharmamagist Kft, Budapest, Magyarország)
- 68Ge/68Ga-generátor (50 mCi, Gallia-Pharm, Eckert and Ziegler Németország)
- 0,1M ultra tiszta HCl (Merck, Darmstadt, Németország)
- c[KNGRE]-NH2 (MTA ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Budapest, Magyarország)
- 0,1 M NaHCO3 puffer (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- *p*-SCN-Bn-NOTA (Macrocycles Inc., Dallas, TX, USA)
- 96%-os EtOH (Merck, Darmstadt, Németország)
- izotóniás sóoldat (Fresenius Kabi Hungary Kft, Budapest, Magyarország)
- NODAGA-[c(RGD)2] (ABX GmBH, Radeberg, Németország)
- 1M –os nátrium acetát oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, MissouriUSA)
- 2%-os NaOH oldat ((Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- Oasis HLB 30mg töltettérfogatú extrakciós oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Light C18 Sep-Pak oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- 6-Deoxy-6-monoamino-(2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (NH2-HPBCD) (Cyclolab Kft. Budapest, Magyarország)

- p-NCS benzyl-NODA-GA (NODAGA) (Chematech, Dijon, Franciaország)
- 6-Monodeoxy-6-monoamino-randomly-methylated-beta-cyclodextrin hydrochloride (NH2-RAMEB) (Cyclolab Kft. Budapest, Magyarország)

Sejttenyésztés során használt vegyszerek:

- RPMI Medium 1640 + GlutaMAXTM-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- IMDM, L-Glutamine, Hepes, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- DMEM + GlutaMAXTM-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- PBS pH 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- FBS, Qualified (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- MEM Non-essential Amino Acid Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- MEM Vitamin Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- Antibioitic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USAk)
- Trypsin-EDTA Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)

Tumor indukció során használt vegyszerek:

- AERRANE (Izoflurán) folyadék inhalációs gőz képzéséhez (Baxter Hungary, Budapest, Magyarország)
- Nurofen szirup (20 mg/ml, Reckitt Benckiser Healthcare, Hull, East Yorkshire, Egyesült Királyság)

Immunhisztokémiai vizsgálathoz használt anyagok:

- 10%-os formadehid
- nyúl monoklonális anti-prosztaglandinE receptor antitest(EP2/PTGER2) (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság)
- HRP-jelölt antinyúl polimer antitestet (Mach2, BioCare Medical, Oacheco, USA)
- VIP-peroxidázt (HRP) (ImmPACT® VIP Substrate, Peroxidase (HRP); Vector Laboratories, Newark, USA)

Western blott vizsgálathoz használt anyagok:

RIPA puffer, összetétele: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium-deoxikolát, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PSMF, 1 mM NaF, proteáz inhibitor koktél
- Pierce BCA reagenst (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 23225)
- 10 %-os SDS poliakrilamid gél (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- nitrozellulóz membrán (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, 1620097)
- 5 % BSA-t tartalmazó TBS-Tween puffer oldat
- egér eredetű anti-patkány CD13 elleni elsődleges anitest (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA)
- peroxidázzal konjugált anti-egér másodlagos antitest (1:2000, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA, 7074)

3.2 Sejtvonalak és fenntartásuk

3.2.1 Ne/De sejtek

A vizsgálatok során alkalmazott mesoblastos nephroma (Ne/De) tumort a Debreceni Egyetemen végzett korábbi kutatás során állították elő a következő módon (Dezső és mtsai., 1991). Pár nappal a születésük után F344 patkányokba 125 µg N-nitrozodimetilamint injektáltak, sóoldatban intraperitoneálisan. Körülbelül 6 hónap elteltével a kialakult tumorokat eltávolították és sejtvonalat hoztak létre.

A Ne/De sejtek tenyésztéshez 10 (V/V)% magzati szarvasmarha szérumot tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápoldatot használtunk, amelyet 1 % antimikotikum-antibiotikum oldattal egészítettünk ki. Az egyrétegű sejtkultúrákat 12 ml tápoldatot tartalmazó T-75 sejttenyésztő flaskában, 5 %-os CO₂ szintet és 95 %-os páratartalmat biztosító inkubátorban (ESCO CCI-170B-8 incubator) 37 °C –on tartottuk. A tenyészetek passzálását hetente 3x végeztük.

3.2.2 He/De sejtek

A vizsgálatok során alkalmazott hepatocelluláris karcinóma (He/De) tumort a Debreceni Egyetemen végzett korábbi kutatás során állították elő a Ne/De sejtekkel megegyező módon.

A He/De sejtek tenyésztéshez 10 (V/V)% magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) tápoldatot használtunk, amelyet 1 % antimikotikum-antibiotikum oldattal egészítettünk ki. Az egyrétegű sejtkultúrákat 12 ml tápoldatot tartalmazó T-75 sejttenyésztő flaskában, 5 %-os CO₂ szintet és 95 %-os páratartalmat biztosító inkubátorban (ESCO incubator) 37°C –on tartottuk. A tenyészetek passzálását hetente 3x végeztük.

3.2.3 HT1080 sejtek

A HT1080 (humán fibroszarkóma) sejtvonalat az ATCC-től (Virginia, USA) vásároltuk. A sejtek tenyésztéshez 10 % magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápoldatot használtunk, amelyet 1 % antimikotikum-antibiotikum oldattal egészítettünk ki. Az egyrétegű sejtkultúrákat 12 ml tápoldatot tartalmazó T-75 sejttenyésztő flaskában, 5 %-os CO₂ szintet és 95 % -os páratartalmat biztosító inkubátorban (ESCO CCI-170B-8 incubator) 37°C –on tartottuk. A tenyészetek passzálását hetente 3x végeztük.

3.2.4 A20 sejtek

Az A20 (egér eredetű B-sejtes limfóma) sejtvonalat az ATCC-től (Virginia, USA) vásároltuk. A sejtek tenyésztéshez 10 % magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium tápoldatot használtunk, amelyet 1 % antimikotikum-antibiotikum oldattal egészítettünk ki és naponta adagoltunk a tápoldatba 50µM mercaptoetanolt. A szuszpenzós sejtkultúrákat 12ml tápoldatot tartalmazó T-75 sejttenyésztő flaskában, 5 %-os CO₂ szintet és 95 % -os páratartalmat biztosító inkubátorban (ESCO CCl-170B-8 incubator) 37°C –on tartottuk. A tenyészetek passzálását hetente 3x végeztük.

3.2.5 PancTu sejtek

A PancTu (humán hasnyálmirigy adenokarcinóma) sejtvonalat az ATCC-től (Virginia, USA) vásároltuk. A sejtek tenyésztéshez 10 % magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium tápoldatot használtunk, amelyet 1% antimikotikum-antibiotikum oldattal egészítettünk ki. Az egyrétegű sejtkultúrákat 12 ml tápoldatot tartalmazó T-75 sejttenyésztő flaskában, 5 %-os CO₂ szintet és 95 % -os páratartalmat biztosító inkubátorban (ESCO CCI-170B-8 incubator) 37°C –on tartottuk. A tenyészetek passzálását hetente 3x végeztük.

3.2.6 BxPC3 sejtek

A BxPC3 (humán hasnyálmirigy adenokarcinóma) sejtvonalat az ATCC-től (Virginia, USA) vásároltuk. A sejtek tenyésztéshez 10 % magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium tápoldatot használtunk,

amelyet 1% antimikotikum-antibiotikum oldattal egészítettünk ki. Az egyrétegű sejtkultúrákat 12 ml tápoldatot tartalmazó T-75 sejttenyésztő flaskában, 5 %-os CO₂ szintet és 95 % -os páratartalmat biztosító inkubátorban (ESCO CCl-170B-8 incubator) 37 °C –on tartottuk. A tenyészetek passzálását hetente 3x végeztük.

3.2.7 B16F10 sejtek

A B16F10 (egér eredetű melanotikus melanoma) sejtvonalat az ATCC-től (Virginia, USA) vásároltuk. A sejtek tenyésztéshez 10 % magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápoldatot használtunk, amelyet 1 % antimikotikum-antibiotukum oldattal illetve MEM nem esszenciális aminosav oldattal (1 (V/V) %); GibcoTM) és MEM vitamin oldattal (1 (V/V) %); GibcoTM) egészítettünk ki. Az egyrétegű sejtkultúrákat 12ml tápoldatot tartalmazó T-75 sejttenyésztő flaskában, 5 %-os CO₂ szintet és 95 % -os páratartalmat biztosító inkubátorban (ESCO CCI-170B-8 incubator) 37 °C –on tartottuk. A tenyészetek passzálását hetente 3x végeztük.

A daganatos sejtek beültetését minden esetben öt-nyolc passzállás után végeztük. A tumor indukciót megelőzően a sejtek életképességét minden esetben trypan-kék kizárásos teszttel ellenőriztük.

3.3 Kísérleti állatok

A Ne/De tumorok és metasztázisaik vizsgálatához, illetve a He/De tumorok vizsgálatához 16 hetes, 250 ± 20 g súlyú, nőstény F344-es patkányokat (n = 30) használtunk. Az állatokat konvencionális állatházban tartottuk, ellenőrzött hőmérséklet (24 °C ± 2 °C) és páratartalom (51 ± 10%) mellett. A mesterséges világítást automatikusan szabályozott 12 órás cirkadián ciklusokban biztosítottuk. A patkányokat ad libitum félszintetikus takarmánnyal (Animalab Kft., Budapest, Magyarország) etettük, és csapvizet kaptak.

A ciklodextrin származékok összehasonlításához a humán eredetű tumorok vizsgálatakor CB17 SCID immunhiányos egereket használtunk (12 hetes hím egereket vásároltunk az Innovo Kft-től, Magyarország; n = 35). Az állatokat steril körülmények között tartottuk IVC ketrecrendszerben (Techniplast, Olaszország), 26 \pm 3 °C hőmérsékleten, 52 \pm 10 % páratartalom mellett, mesterséges megvilágítással, 12 órás cirkadián ciklusban. Steril ivóvíz és félszintetikus takarmány (Akronom Kft., Budapest, Magyarország) ad libitum állt minden állat rendelkezésére.

A B16F10 egér eredetű melanoma vizsgálatára C57BL6 egereket vásároltunk. (n = 10) Az állatokat konvencionális állatházban tartottuk, ellenőrzött hőmérséklet (24 °C \pm 2 °C) és páratartalom (51 \pm 10 %) mellett. A mesterséges világítást automatikusan szabályozott 12 órás cirkadián ciklusokban biztosítottuk. Az egereket ad libitum félszintetikus takarmánnyal (Animalab Kft., Budapest, Magyarország) etettük, és csapvizet kaptak.

A laboratóriumi állatok tartása és kezelése a magyar törvények és az Európai Unió előírásai szerint történt. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága regisztrálta (regisztrációs szám: 16/2020/DEMÁB).

3.4 Az SRCA műtét

A patkányokat a beavatkozáshoz inhalációs kisállat altatógép segítségével (Eickemeyer Research, Tec3, Ghislandi Kft., Magyarország) elaltattuk. Az altatáshoz 3 % Aerrane inhalációs gőzt és vivőgázként 0,4 liter/perc oxigént és 1,2 liter/perc dinitrogén-oxidot alkalmaztunk, az altatás fenntartásához a Aerrane gőz mennyiségét 1,5 %-ra csökkentettük. Az állatok bal oldalán a bordák alatti lumbális régiót szőrtelenítettük (A), fertőtlenítettük, majd a bőrt egy csipesz segítségével elemelve sebészi ollóval bemetszettük (B, C). Ezt követően a bőr alatti izomréteget elmetszettük, így elértük a bal vese területét (D). Az érintett területre izolációs kendőt helyeztünk, majd az állat bal veséjét óvatosan a testen kívülre mozdítottuk (E,F). Az így hozzáférhetővé tett vesét fiziológiás sóoldat használatával tartottuk nedvesen. A capsula renalison egy Irisz olló segítségével apró rést vágtunk (G), majd ezen keresztül az előkészített Gelaspon korongot ültettünk be a kísérleti állatok vesetokja alá (H). A Gelaspon korongra az előkészítés során 1x10⁶ Ne/De sejtet 10 µl fiziológiás sóoldatban szuszpendálva helyeztünk. A beültetést követően a vesét visszaengedtük a testbe, majd az izomréteget összevarrtuk (I,J), a bőrréteget pedig sebkapcsokkal fogtuk össze (K,L). Az állatokat ébredésig felügyeltük, majd fájdalomcsillapítás céljából nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatású, ibuprofen szuszpenziót kaptak (Nurofen szirup 10 mg/kg).



9. ábra: Az SRCA műtét lépései.

3.5 Paratimikális nyirokcsomó átültetése

Az állatokat, melyeknek a vesetokja alatt Ne/De tumor növekedett, 14 nappal a Ne/De sejtek beültetését követően extermináltuk 5 % izoflurán alkalmazásával. Ez követően feltártuk a patkányok mellkasát, az áttétet hordozó nyaki nyirokcsomót eltávolítottuk, majd kisebb darabokra vágtuk. Ezeket a darabokat ültettük be SRCA műtét segítségével újabb állatok vesetokja alá, az előzővel megegyező módon (10. ábra).



10. ábra: A folyamat egy részletének egyszerűsített illusztrációja, Ne/De (mesoblastos nephroma) tumoros kutatás feltüntetésével.

3.6 Tumorok szubkután indukciója

Az egereket a beavatkozáshoz inhalációs altatás segítségével elaltattuk. Az altatáshoz 3 % Aerrane inhalációs gőzt és vivőgázként 0,4 liter/perc oxigént és 1,2 liter/perc dinitrogénoxidot alkalmaztunk, az altatás fenntartásához a Aerrane gőz mennyiségét 1,5 %-ra csökkentettük. Az állatokon a bal lapocka feletti területet szőrtelenítettük, fertőtlenítettük, ezt követően a bőrt egy csipesz segítségével elemelve 100-120 μl 5x10⁶ sejtet tartalmazó fiziológiás sóoldatos sejtszuszpenziót juttattunk egy fecskendő segítségével közvetlenül a bőr alá.

3.7 Felhasznált radiofarmakonok

3.7.1 2-[¹⁸F]FDG szintézis

Az 2-[¹⁸F]FDG előállítása a Nukleáris Medicina Intézetben napi szinten rutinszerűen történik, elsősorban onkológiai betegek diagnosztikai vizsgálatának céljából. A gyártáshoz szükséges ¹⁸F⁻ion létrehozása ciklotronban megy végbe ¹⁸O-dúsított víz felhasználásával. Az

így előállított ¹⁸F⁻iont az automatizált FDG gyártó panelra juttatják, ahol a prekurzor (vízmentes acetonitrilben oldott trifluormetánszulfonil-β-D-mannóz (TATM)) jelölése nukleofil szubsztitúcióval valósul meg. A [¹⁸ F]fluorid reakciója 85°C-on megy végbe a TATM-al. A nukleofil szubsztitúció terméke a 1,3,4,6(TA-[¹⁸F]FDG). A molekula még védő acetil-csoportokat tartalmaz, ezeket savas közegű hidrolízissel távolítják el, amihez sósavat használnak. A hidrolízist magasabb hőmérsékleten (120°C) és nyomás alatt (zárt reakcióedény) végzik. A reakció végterméke, a 2-[¹⁸F]fluor-β-D-dezoxi-glükóz, melyet fiziológiás sóoldat segítségével hígítanak a kívánt koncentráció eléréséig. A 2-[¹⁸F]FDG a vizsgálatok során a szervezet glükóz metabolizmusába bekapcsolódva közvetetten segít megjeleníteni az angiogenetikus folyamatokat.

3.7.2 [68Ga]Ga-NOTA-cNGR szintézis

A c[KNGRE]-NH₂ peptidet az MTA ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai állították elő, majd bocsájtották rendelkezésünkre. A peptid NOTA kelátorral történő konjugációja, már intézetünkben történt. A c[KNGRE]-NH2 peptidből 11,7 mg-ot (20 µmol) 0,9 mL 0,1 M NaHCO₃ pufferben (pH 9,5) feloldottunk, majd hozzáadtunk 12,3 mg (22 µmol) p-SCN-Bn-NOTA-t (Macrocycles Inc., Dallas, TX, USA) 0,1 mL DMSO-ban feloldva. Az elegyből 2 órás szobahőmérsékleten való kevertetést követően szemipreparatív HPLC-s tisztitással nyertük a NOTA-konjugált NGR-analógot (NOTA-c(NGR)). Az így előállított peptid-kelátort használtuk prekurzorként a jelölési reakcióban. A jelzéshez szükséges ⁶⁸Ga-ot a 68Ge/68Ga-generátor 0,1M-os HCl-oldattal történő frakcionált eluciójával nyertük. Ezt követően a legmagasabb aktivitást tartalmazó frakciót puffereltük (nátrium-acetát oldattal), amivel a pH-t ~4,1-re állítottuk be. Ehhez az oldathoz adtuk hozzá a NOTA-c(NGR) oldatot (5 µL 3 mM), majd az elegyet 95 °C-on tartottuk 5 percig. Ezt követően a reakcióelegyet Oasis HLB 30 mg töltettérfogatú extrakciós oszlopra vittük fel, melyet előzőleg aktiváltunk (5ml 96%-os etenollal, majd 10 ml vízzel). Az oszlopot 5 ml vízzel mostuk, majd a radioaktívan jelölt származékot 0,5 ml 96%-os EtOH és izotóniás sóoldat 1:1 arányú oldatával eluáltuk. A végterméket steril szűrőn szűrtük, majd izotóniás sóoldattal tovább hígítottuk felhasználás előtt az etanol koncentráció 10 % alá csökkentése céljából. A jelölt peptid radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével ellenőriztük.

3.7.3 [⁶⁸Ga]Ga -NODAGA-RGD szintézis

A jelöléshez NODAGA-[c(RGD)₂] peptid-kelátor konjugátumot használtunk, melyet az ABX GmbH-tól (Radeberg, Németország) szereztünk be. A ⁶⁸Ga-ot a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátor 0,1M-os HCl-oldattal történő frakcionált eluciójával nyertük. A legtöbb radioaktív anyagot tartalmazó frakciót NaOAc oldattal puffereltük (160 µl, 1M ultra tiszta víz), majd hozzáadtunk 5 µL 3 mM NODAGA-[c(RGD)₂] oldatot. Az így létrejött elegyet 5 percig 95 °C-on (pH = 4,0) inkubáltuk. A reakcióelegyből a radioaktívan jelölt származékot Oasis HLB 30mg töltettérfogatú extrakciós oszlop felszínén kötöttük meg, utána 1ml vízzel mostuk. Az oszlop felszínén megkötődött [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)₂]-t 200 µL EtOH / 0,9 % NaCl vizes oldatának 1:1 arányú keverékével eluáltuk, majd sterilre szűrtük, és felhasználás előtt tovább hígítottuk izotóniás sóoldattal az etanol koncentráció 10 % alá csökkentése céljából. A jelölt peptid radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével ellenőriztük.

3.7.4 [68Ga]Ga-NODAGA-HPBCD szintézis

A prekurzorként használt NODAGA-HPBCD vegyületet a Cyclolab Kft. (Budapest, Magyarország) által gyártott 6-Deoxy-6-monoamino-(2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (NH₂-HPBCD) és p-NCS benzyl-NODA-GA (NODAGA) konjugációjával intézetünkben állították elő (Hajdú és mtsai., 2019). A NODAGA-HPBCD ⁶⁸Ga-al történő jelzéséhez 5 ml 0,1 M ultra tiszta HCl oldattal eluáltuk a [⁶⁸Ge]/[⁶⁸Ga] generátort, majd 1,2 ml-t a legtöbb aktív anyagot tartalmazó frakcióból nátrium-acetát oldattal puffereltük (1M, pH=4, 170 µl), és a keverék pH-ját NaOH (2%, 59 µl) segítségével ~4,2-re állítottuk be. Ezt követte a 20 µl prekurzor törzsoldat (1 mM) hozzáadása a pufferelt keverékhez, majd a reakcióelegyet 95 °C- on tartottuk. 15 perc elteltével az oldatot Light C18 Sep-Pak oszlopra juttattuk, majd az oszlopot 2 ml vízzel mostuk a puffer eltávolításának céljából. A keletkezett [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPBCD-t 0,5 ml 96 % -os EtOH és izotóniás sóoldat 1:2 arányú elegyének felhasználásával eluáltuk az oszlopról. A biológia felhasználáshoz az így eluált végtermék oldatát izotóniás sóoldattal hígítottuk, annak érdekében, hogy az etanol tartalom 10 % alá kerüljön, majd sterilre szűrtük. A termék radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével ellenőriztük.

3.7.5 [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB szintézis

A prekurzorként használt NODAGA-RAMEB vegyületet a Cyclolab Kft. (Budapest, Magyarország) által gyártott 6-Monodeoxy-6-monoamino-randomly-methylated-betacyclodextrin hydrochloride (NH2-RAMEB) és p-NCS benzyl-NODA-GA (NODAGA) konjugációjával intézetünkben állították elő. (Trencsényi és mtsai., 2020). A jelöléshez felhasznált [68Ga]-ot a [68Ge]/[68Ga] -generátor 0,1 M-os HCl-oldattal történő frakcionált eluciójával nyertük, majd a frakciók közül kiválasztottuk a legmagasabb aktivitásút és ebből 1 ml-t puffereltünk nátrium-acetát oldattal (1 M, 160 µl) pH 4,3-4,5 közötti értékre. Ezt követően hozzáadtuk a pufferelt frakcióhoz a NODAGA-RAMEB vizes oldatát (10 µl, 1mM), és a reakcióelegyet 10 percig inkubáltuk 95 °C-on. A reakcióidő elteltével a terméket Light C18 Sep-Pak oszlopon kötöttük meg, majd az oszlop felszínét 2 ml vízzel mostuk a pufferoldat eltávolításának céljából. A tiszta végterméket, a [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et 0,5 ml 96%-os EtOH és izotóniás sóoldat 1:2 arányú elegyének felhasználásával eluáltuk az oszlopról. A biológia felhasználáshoz az így eluált végtermék oldatát izotóniás sóoldattal hígítottuk, annak érdekében, hogy az etanol tartalom 10 % alá kerüljön, majd sterilre szűrtük. A termék radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével ellenőriztük.

3.8 In vivo vizsgálatok menete

Az in vivo biodisztribúciós vizsgálatokat 10 ± 2 nappal a tumorsejtek szubkután injektálása után 95 \pm 8 mm3 -es tumortérfogaton, illetve az SRCA beültetést követően 8 \pm 2 nappal végeztük. A daganatot hordozó állatokat izofluránnal (Aerrane) elaltattuk kisállatinhalációs altatókészülékkel. Az elaltatott állatoknak az oldalsó farokvénán keresztül hozzávetőlegesen 8-10 MBq aktivitású a leképezés kivitelezéséhez szükséges farmakont (2-⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et ¹⁸F]FDG-t, vagy [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD-t, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]-t vagy [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t) fecskendeztünk be 100 -150 ul fiziológiás sóoldatban. A tumoros sejtek vagy tumoros nyirokcsomódarabkák vesetok alá történt transzplantációját követően a 8. naptól kísértük figyelemmel a kísérleti állatok primer tumorának növekedését 2-[¹⁸F]FDG használatával. 50 perc inkubációs idő elteltével, amit az állat ébren a saját ketrecében, nyugalomban töltött - a 2-[18F]FDG farmakon injektálását követően, a MiniPET-II kamera használatával statikus gyűjtést (gyűjtési idő: 20 perc) végeztünk az mellkasi régióról, illetve a tumorosan érintett vesetájékról.

Amikor a primer tumor, és a paratimikális nyirokcsomó az 2-[¹⁸F]FDG használatával készült PET felvételeken vizuálisan jól detektálhatóvá vált, a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)], a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB illetve [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD alkalmazásával végzett PET vizsgálatokra akkor került sor. A ⁶⁸Ga-al jelzett farmakonok esetében az injektálástól 90 perc inkubálási idő telt el, majd következett a 20-20 perces statikus gyűjtés az állatok nyaki-mellkasi illetve vese környéki régiójáról.

A szubkután növekvő tumorok esetében a PET vizsgálatok során 2-[¹⁸F]FDG, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB illetve [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD farmakonokat használtunk.

3.9 MiniPET-II készülék és az adatok feldolgozása

Munkánk során mind az egerek, mind a patkányok vizsgálatát kisállat PET (MiniPET-II) készülék segítségével végeztük. A MiniPET-II kamera egy a 12 detektort teljes 211 mm átmérőjű gyűrűben tartalmazó intézeti fejlesztésű eszköz. A kamera axiális látómezője 48 mm, a transzaxiális látómezője pedig 100 mm hosszúságú (Lajtos és mtsai., 2013). A MiniPET-II kamera vizsgálóágya négy irányba folytonos mozgást lehetővé tevő motorral van felszerelve ezáltal biztosítva a pontos és precíz pozicionálást (11.ábra).

A detektorok LYSO (cériummal kevert lutécium-ittrium-ortoszilikát) szcintillációs kristályokat és pozícióérzékeny Hamamatsu H9500 fotoelektronsokszorozókat tartalmaznak. A kristálymátrixok 35 x 35 kristályból készültek, amelyek mérete 1,27 x 1,27 x 12 mm³. Az egyes kristályok megfelelő fényvisszaverő tulajdonságú ragasztóanyaggal vannak egymáshoz rögzítve. A detektorokból érkező jelek digitalizálását négycsatornás adatgyűjtő kártyák végzik. Az egyedi eseményeket az adatgyűjtő szerver optikai kapcsolaton (Cisco Catalyst switch) keresztül gyűjti. Az elsődleges adatokat a rendszer az úgynevezett listamódban tárolja, annak érdekében, hogy később több fejlett képrekonstrukciós eljárás is alkalmazható legyen. A kutatók számára 2D/3D FBP, ML-EM, OSEM, ART és MAP rekonstrukciós módszerek állnak rendelkezésre. A rekonstrukció eredményeként Bq / ml és SUV skálázott képek állnak rendelkezésre DICOM, MINC és NifTI-1 formátumban. E formátumok közül az első az alapvető képfeldolgozáshoz használható, míg a többi lehetővé teszi a világszerte használt szoftverek (Matlab, SPM, FSL stb.) és a saját fejlesztésű szoftverek (BrainCAD, BrainREG, BrainTrace, BrainLOC) alkalmazását. A MiniPET-képek utólagos feldolgozásának mindenféle módszere elérhető, beleértve az egyszerű CT/PET vagy MRI/PET fúzióra épülő ROI-elemzést és az agyatlasz alapú regionális tracer-kinetikai kiértékelést.



11. ábra: A MiniPET-II készülék.

Az általunk elvégzett vizsgálatok során a rekonstruált képek kiértékeléséhez a BrainCAD képelemző programot használtuk. Az elkészült képek kiértékelése során a radiofarmakon többlethalmozásokat a standardizált felvételi érték (SUV=Standardized Uptake Value) ezen belül a SUVmax, a SUVátlag (SUVmean) illetve a T/M érték segítségével hasonlítottuk össze. A SUV értéke jellemzi, hogy a számunkra informatív területen, VOI-n (Volume Of Interest) belül a radiofarmakon koncentrációja hogyan aránylik a beadott dózis és az állat testtömegének hányadosához.

$$SUV = \frac{VOI-n \text{ belüli koncentráció } [\frac{MBq}{mL}]}{\text{beadott aktivitás } [MBq]/\text{testsúly } [g]}$$

A VOI berajzolása, a BrainCAD képelemző program segítségével vizuális értékelés alapján történt. A VOI-n belüli egyedi térfogatelemek a voxelek.

A SUV átlag (SUVmean) érték az adott VOI-n belüli voxelek SUV értékeinek átlaga.

Az T/M (tumor/muscle) érték megadja, hogy mekkora a SUV értékek közötti differencia a tumor- és az izom-szövetekben így az ezekben a szövetekben halmozódott radiofarmakon mennyisége közötti eltérésről kapunk információt.

 $T/M = \frac{tumor\ szövet\ SUVmean}{Izomzati\ SUVmean}$

3.10 Ex vivo vizsgálatok

Az *ex vivo* vizsgálatok a ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin változatok tumorban történő halmozódásának összehasonlítása céljából készültek. A daganatot hordozó állatoknak 8-10 MBq [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et vagy [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD-t 100-150µl fiziológiás sóoldatban tartalmazó injekciót adtunk az oldalsó farki vénán keresztül. Kilencven perccel a radiofarmakonok intravénás injektálása után az állatokat 5%-os izoflurán alkalmazásával túlaltattuk. A tumorokat eltávolítottuk, tömegüket analitikai mérleg segítségével meghatároztuk, majd a minták radioaktivitását kalibrált gammaszámlálóval (Perkin-Elmer Packard Cobra, Waltham, MA, USA) megmértük. A bomláskorrigált aktivitásértékek felhasználásával a radiotracer felvételét %ID / g szövet értékében fejeztük ki.

3.11 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A kísérleti állatokat az *in vivo* vizsgálatok végeztével 5%-os izoflurán alkalmazásával túlaltattuk, majd a tumorokat eltávolítottuk és a tumormintákat 10%-os formaldehid oldatban fixáltuk. Ezt követően a kísérleti tumorokat parafinba ágyaztuk, majd 4µm vastagságú metszetek készültek belőlük. Az elkészült metszeteket a rutinban szokásos módon parafinmentesítettük, rehidratáltuk és anitgén visszanyerést (pH 6,0) követően használtuk. A mintákat 1:1000 hígításban alkalmazott nyúl monoklonális anti-prosztaglandinE receptor (EP2/PTGER2) (Abcam, USA; kat. sz.: ab167171) antitesttel jelöltük meg. HRP-jelölt antinyúl polimer antitestet (Mach2, BioCare Medical, USA) és Envision DAB detektáló készletet (DAKO-Agilent Technologies, USA) használtunk a specifikus antitestkötés vizualizálásához, majd ezt követően végeztünk hematoxilin ellenfestést. A melanint termelő melanoma (B16F10) esetében VIP-peroxidázt (HRP) (ImmPACT® VIP Substrate, Peroxidase (HRP); Vector Laboratories, Newark, USA) alkalmaztunk az elsődleges antitest láthatóvá tételére. A képalkotáshoz egy DFC495 digitális kamerával felszerelt kutatási mikroszkópot

használtunk LAS képalkotó szoftverrel (Leica Microsystems, BioMarker Kft., Gödöllő) kiegészítve.

3.12 Western blot analízis

A Western blot analízis elvégzéséhez az SRCA műtéten átesett patkányok egészséges veséjéből és nyirokcsomó szövetéből, valamint a primer tumorokból és a nyirokcsomó metasztázisokból vettünk mintákat, és ezeket fagyasztva tároltuk a Western blot vizsgálat megkezdéséig. A vizsgálathoz a daganatos mintákat golyós homogenizátor segítségével 1 ml PBS-ben homogenizáltuk, majd a felülúszót kinyertük és ezzel dolgoztunk tovább. A minták lizálásához RIPA puffert használtunk (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium-deoxikolát, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PSMF, 1 mM NaF, proteáz inhibitor koktél). Az egyes minták fehérjetartalmának meghatározásához Pierce BCA reagenst (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 23225) alkalmaztunk. A mintákból 10µg fehérje lizátum molekulatömeg szerinti elválasztása, molekulasúly marker mellett, 10 %-os SDS poliakrilamid gélen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 26619) történt, majd ezt követte a fehérjesávok nitrozellulóz membránokra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, 1620097) való blottolása. A membránon lévő szabad kötőhelyek blokkolása érdekében a membránt 5 % BSA-t tartalmazó TBS-Tween puffer oldatban áztattuk szobahőmérsékleten 1 óra időtartamon keresztül, majd a jelölést egy éjszakán át 4 °C-on a vizsgált fehérje ellen termeltetett elsődleges anitesttel végeztük (Santa Cruz sc-136484, hígítás: 1:1000). A membránokat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten mostuk TBS-Tween oldattal, majd jelöltük peroxidázzal konjugált anti-egér másodlagos antitesttel (1:2000, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA, 7074). Végezetül a membránokat még kétszer mostuk 10-10 percig TBS-Tween pufferben és egyszer 10 percig TBS-ben. Az antitestekkel jelölt sávok detektálása kemilumineszcens reakcióval (SuperSignal West Pico Solutions, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA, 35060) és ChemiDoc Touch Imaging géldokumentációs rendszerrel (BioRad, Hercules, CA, USA) történt. A sávok intenzitását Image Lab 5.2.1 (BioRad, Hercules, CA, USA) szoftverrel határoztuk meg.

3.13 Statisztikai elemzés

A grafikonokon feltüntetett adatok legalább három független méréssorozat eredményei, átlag \pm SD. A szignifikanciaszint meghatározásához a Student-féle kétmintás t-próbát, a kétirányú ANOVA-t és a Mann-Whitney rangösszegtesztet használtuk. A szignifikancia szintet p<0,05-ben határoztuk meg, és minden statisztikai elemzéshez a kereskedelmi szoftvercsomagot (MedCalc 18.5, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) használtuk.

4 Eredmények

4.1 Patkányok vesetokja alá ültetett metasztatizáló tumorok és metasztázisaik vizsgálata

4.1.1 A primer Ne/De tumor és az áttétek vizsgálata PET radiofarmakonokkal.

A vizsgálat kezdeti lépésében az általunk fenntartott Ne/De sejttenyészetből 1x10⁶ sejtet helyeztünk Gelaspon korongon 16 hetes nőstény F344 patkányok bal veséjének vesetokja alá, majd in vivo PET-képalkotással követtük a Ne/De sejtek tumorformáló képességét és a paratimikális nyirokcsomó metasztatizációját. Az elsődleges tumor növekedését 2-[¹⁸F]FDG radiotracerrel értékeltük. Emellett [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD jelölt peptiddel az $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin, míg az [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR radioligand használatával az APN/CD13 expresszióját vizsgáltuk mind a primer tumorokban mind az áttétekben. Az elkészült bomláskorrigált PET-felvételek kvalitatív elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a vesetok alatt fejlődő primer Ne/De tumorok mindhárom vegyülettel jól értékelhetőek voltak (12.A ábra, fekete nyilak), bár a [68Ga]Ga-NODAGA-RGD alkalmazásakor valamivel alacsonyabb tracerfelvételt észleltünk. A mellkasban lévő paratimikális nyirokcsomómíg 2-[¹⁸F]FDG-vel és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR-rel metasztázisok megfelelően azonosíthatóak voltak, addig [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD-vel sajnos ezek az áttétek nehezebben voltak felismerhetőek (12.B ábra, piros nyilak). A kvalitatív megfigyeléseket a PET-felvételek kvantitatív SUV-adatelemzése is megerősítette. 8 ± 2 nappal a Ne/De sejtek beültetését követően a vesetok alatt növekvő primer tumorok 2-[¹⁸F]FDG felvétele volt a legmagasabb (SUVmean: 7,25±2,62; SUVmax: 14,82±3,21), ezt követte az APN/CD13 expressziót jelző [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR akkumulációja (SUVmean: 4,12±0,56; SUVmax: 10,72 \pm 1,85), majd az $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin specifikus [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD felhalmozódása (SUVmean: 2,05±0,45; SUVmax: 5,77±1,08) (12.C ábra). A metasztatikus sejteket tartalmazó mellkasi paratimikális nyirokcsomók radiotracer-akkumulációját elemezve hasonló, bár mérsékeltebb felvételi értékeket találtunk. A 2-[¹⁸F]FDG felvétel (SUVmean: 4,53±1,58; SUVmax: 13,58±2,89) szignifikánsan magasabb volt (p≤0,01 mellett), mint a ⁶⁸Ga-jelzett radiotracerek akkumulációja. A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR (SUVmean: 0,72±0,12; SUVmax: 1,92±0,58) mennyisége a paratimikális nyirokcsomókban szignifikánsan (p≤0,01 mellett) nagyobbnak adódott, mint a [68Ga]Ga-NODAGA-RGD (SUVmean: 0,11±0,08; SUVmax: 0,46±0,15) aktivitása (12.D ábra). A PET képek értékelhetőségét erősen befolyásolja, hogy

milyen szintű különbség van a farmakon-halmozódásban a tumor és környezete között, ez az úgynevezett tumor-háttér arány (T/M arány), amelynek figyelembevétele különösen fontos egy diagnosztikai radiofarmakon megítélése szempontjából. A T/M arány számítása során azt találtuk, hogy a primer Ne/De malignitások szignifikánsan (p≤0,05) magasabb [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR és [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD nyomjelző akkumulációt mutattak a háttérhez képest, mint a 2-[¹⁸F]FDG alkalmazásakor (12.E ábra). Ugyanakkor az áttétes nyirokcsomómetasztázisok esetében a 2-[¹⁸F]FDG és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR használata nagyobb kontrasztú PET képet eredményezett (12.F ábra).



12. ábra: Vesetok alatt növekvő Ne/De tumort hordozó patkányokon készült *in vivo* PETvizsgálatok eredményei, 8 ± 2 nappal a rákos sejtek SRCA-beültetése után. Reprezentatív, bomláskorrigált, transzaxiális PET-felvételek a vesetok alatt elhelyezkedő primer Ne/Detumorokról (A) és a mellkasban lévő metasztatikus paratimikális nyirokcsomókról (B) 50 perccel a 2-[¹⁸F]FDG és 90 perccel a ⁶⁸Ga-jelzett radiotracerek intravénás injektálását követően. A radiotracer halmozódás kvantitatív SUV-analízise a Ne/De szubrenális tumorokban (C és E) és a metasztatikus paratimikális nyirokcsomókban (D és F). Fekete nyilak: primer Ne/De tumor, piros nyilak: paratimikális nyirokcsomók. SUV: standardizált felvételi érték. T/M: tumor-izom arány. Szignifikancia szintek: $p \le 0,05$ (*) és $p \le 0,01$ (**). Az adatok átlag \pm SD-ben vannak feltüntetve; n = 3 patkány/radiotracer.

4.1.2 A szekunder Ne/De tumorok és áttéteik vizsgálata radiotracerekkel

A második kísérletsorozatban a korábban a patkányok vesetokja alá ültetett Ne/De sejtekből kifejlődött rosszindulatú daganatok által képzett mellkasi paratimikális nyirokcsomóáttétek egy darabját ültettük be újabb F344 patkányok vesetokja alá. In vivo PET képalkotás segítségével értékeltük az SRCA műtét során transzplantált metasztázisok tumorformáló és áttétképző képességét, valamint a kifejlődött "másodlagos" daganatok és áttéteik $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin és APN/CD13 expresszióját 8 ± 2 nappal a műtétet követően. Ebben a vizsgálati szakaszban az elkészített bomláskorrigált PET képek kiértékelése során is azt figyeltük meg, hogy a vesetok alatt növekvő Ne/De-tumorok mindegyik radiotracer használatakor jól elkülönültek a környező szövetektől. Bár a [68Ga]Ga-NODAGA-RGD láthatóan kisebb mennyiségben akkumulálódott a tumorokban ennek ellenére a beültetett metasztázisból kifejlődött primer daganatok mindhárom alkalmazott farmakon segítségével egyértelműen azonosíthatóak voltak (13.A. ábra, fekete nyilak). A kísérleteknek ebben a részében a mellkasi paratimikális nyirokcsomó-metasztázisok is egyértelműen azonosíthatók voltak 2-[¹⁸F]FDG és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR segítségével (13.B. ábra, piros nyilak), míg a [68Ga]Ga-NODAGA-RGD nem mutatott egyértelmű képet. A vizuális értékelések következtetéseit a 8 ± 2 nappal az áttétes nyirokcsomó átültetése után készült PET felvételek kvantitatív SUV-adatelemzése is igazolta (13.C-F ábra). A vesetok alatt növekvő tumorok 2-[¹⁸F]FDG felvétele volt a legmagasabb érték (SUVmean érték: 8,56±2,58; SUVmax: 16,25±3,41). Ezt követte az APN/CD13 specifikus [68Ga]Ga-NOTA-cNGR (SUVmean: 5,23±0,89; SUVmax: 11,41±2,21), s végül a legalacsonyabb felhalmozódást az $\alpha_{v}\beta_{3}$ -integrint célzó [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD mutatta (SUVmean: 2,85±0,52; SUVmax: 6,49±1,12). Ennél alacsonyabb SUV-értékeket találtunk a mellkasi paratimikális nyirokcsomó-metasztázisok esetében, ahol szintén a 2-[¹⁸F]FDG felhalmozódás volt a legmagasabb (5,36±1,69 és 14,75±3,08 volt a SUVmean, illetve az SUVmax érték). A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR használatakor a felvétel (SUVmean: 0,99±0,15; SUVmax: 2,09±0,49) szignifikánsan magasabb volt (p≤0,01), mint a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD esetében (SUVmean: 0,23±0,14; SUVmax: 0,63±0,15) (13.D ábra). Az előző kísérletsorozattal összhangban a transzplantált metasztázisokból vesetok alatt kialakuló Ne/De tumorok esetében is a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD alkalmazásával magasabb tumor-háttér arányt mutattunk ki a 2-[¹⁸F]FDG-hez képest (13.E ábra). A mellkasi metasztatikus nyirokcsomók az elkészült PET felvételeken ebben az esetben is az 2-[¹⁸F]FDG és a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR segítségével voltak jobban láthatóak (13.F ábra).



13. ábra: Ne/De tumort vesetok alatt hordozó patkányok *in vivo* PET képalkotó vizsgálatai 8 \pm 2 nappal a metasztatikus paratimikális nyirokcsomó SRCA beültetését követően. A vesetok alatt elhelyezkedő primer Ne/De tumorok (A) és a mellkasban lévő metasztatikus paratimikális nyirokcsomók (B) reprezentatív, bomláskorrigált, transzaxiális PET-felvételei 50 perccel a 2-[¹⁸F]FDG és 90 perccel a ⁶⁸Ga-jelzett radiotracerek intravénás injektálását követően. A radiotracer felhalmozódásának kvantitatív SUV-analízise a Ne/De szubrenális tumorokban (C és E) és a metasztatikus paratimikális nyirokcsomók. SUV: standardizált

felvételi érték. T/M: tumor-izom arány. Szignifikancia szintek: $p \le 0,05$ (*) és $p \le 0,01$ (**). Az adatok átlag ± SD-ben vannak feltüntetve; n = 3 patkány/radiotracer.

4.1.3 A tercier Ne/De tumorok és áttéteik vizsgálata radiotracerekkel

Vizsgálatunk harmadik részében a kutatás második sorozatából származó metasztatikus, Ne/De rákos sejteket tartalmazó mellkasi paratimikális nyirokcsomó-darabokat ültettünk be a patkányok vesetokja alá, és a kialakuló daganat fejlődését in vivo PETképalkotással követtük nyomon. Ezen túlmenően a tumorok áttétképzését, valamint $\alpha_v\beta_3$ integrin és APN/CD13 expresszióját is vizsgáltuk. Az in vivo PET leképezéseket szintén az SRCA műtétet követő 8 ± 2 nap elteltével végeztük. Ebben a kísérletsorozatban is a korábbiakhoz hasonló eredményeket figyeltünk meg, vagyis a vesetok alatt növekvő Ne/De tumort egyértelműen tudtuk azonosítani mindhárom alkalmazott radiotracerrel. A vesetok alatt fejlődő tumorok, az előző két vizsgálattal megegyező módon, a legalacsonyabb halmozást a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD esetében mutatták (14.A. ábra, fekete nyilak). A vizsgálatnak ebben a részében a mellkasi paratimikális nyirokcsomó-metasztázisokat már minden alkalmazott radiofarmakon segítségével sikerült egyértelműen azonosíthatóvá tenni (14.B. ábra, piros nyilak). A 14. ábra (C-F panelek) mutatja azokat a kvantitatív PET-adatokat, amelyek alátámasztják a vizuális értékelésünket. A vesetumor 2-[¹⁸F]FDG akkumulációja volt a legmagasabb (SUVmean érték: 9,63±2,66; SUVmax: 17,56±3,52), majd az APN/CD13 specifikus [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR felvétele (SUVmean érték: 6,35±1,09; SUVmax: 12,45±2,36), majd az $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin specifikus [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD felhalmozódás (SUVmean: 3,35±0,63; SUVmax: 7,09±1,35). A kísérletnek ebben a részében is alacsonyabb SUV-értékeket mértünk a mellkasi paratimikális nyirokcsomó-metasztázisoknál. A 2-[¹⁸F]FDG felvétel bizonyult a legmagasabbnak 6,33±1,70 és 15,23±3,21 SUVmean és SUVmax értékkel. A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR (SUVmean: 1,56±0,20; SUVmax: 2,78±0,51) és а $[^{68}Ga]Ga-NODAGA-RGD$ (SUVmean: 0,56±0,12; SUVmax: $0,88\pm0,14)$ felhalmozódását összehasonlítva az előbbi magasabb felvételt mutatott (4D ábra). Az áttétből fejlődő Ne/De tumorok esetében a tumor-háttér arány szignifikánsan (p≤0,05) magasabb értékeket mutatott a [68Ga]Ga-NOTA-cNGR és a [68Ga]Ga-NODAGA-RGD esetében, mint a 2-[¹⁸F]FDG esetében (14.E ábra). A 14. ábra F paneljén azonban látható, hogy a mellkasi metasztatikus nyirokcsomók jobban elkülönültek a háttértől a 2-[18F]FDG és a[68Ga]Ga-NOTA-cNGR használatával.



14. ábra: Ne/De tumort hordozó patkányok *in vivo* PET képalkotó vizsgálatai 8 ± 2 nappal a második kísérletből származó metasztatikus paratimikális nyirokcsomó SRCA beültetése után. A vesetok alatt elhelyezkedő primer Ne/De tumorok (A) és a mellkasban lévő metasztatikus paratimikális nyirokcsomók (B) reprezentatív, bomláskorrigált transzaxiális PET-felvételei 50 perccel a 2-[¹⁸F]FDG intravénás injekcióját és 90 perccel a ⁶⁸Ga-jelzett radiotracerek intravénás injekcióját követően. A radiotracer felhalmozódásának kvantitatív SUV-analízise a Ne/De szubrenális tumorokban (C és E) és a metasztatikus paratimikális nyirokcsomók. SUV: standardizált felvételi érték. T/M: tumor-izom arány. Szignifikancia

szintek: $p \le 0,05$ (*) és $p \le 0,01$ (**). Az adatok átlag ± SD-ben vannak feltüntetve; n=3 patkány/radiotracer.

4.1.4 Boncolások eredményei

A tumoros sejtek, illetve a metasztatikus nyirokcsomódarabok beültetését követő 13 ± 1 nappal az állatokat extermináltuk. A túlaltatást követő boncolások során minden esetben a bal oldali vesén jól látható, nagyméretű primer tumor alakult ki (15. ábra A), és mind a bal, mind a jobb oldali paratimikális nyirokcsomó érintettség is egyértelműen megállapítható volt (15.ábra B és C). A veseszövetet infiltráló primer tumorok átlagos mérete 15-17 mm volt, míg az eltávolított nyirokcsomók 4-6 mm nagyságúak voltak. Az eltávolított primer tumorokból és a kimetszett nyirokcsomókból készültek western blot vizsgálatok, illetve a nyirokcsomó darabokat SRCA műtét során újabb patkányok vesetokja alá transzplantáltuk.



15. ábra: A kísérleti állatok boncolásakor készült reprezentatív képek. A: a vesetok alatt kifejlődött NeDe tumor, B: bal és jobb oldali paratimikális nyirokcsomó metasztázis, C: bal oldali paratimikális nyirokcsomó metasztázis.

4.1.5 A paratimikális nyirokcsomók kvantitatív PET és Western blot elemzése.

Tekintettel arra, hogy munkacsoportunk kifejezetten az APN/CD13 neo-angiogén molekula expressziójának a változására volt kíváncsi az áttétes nyirokcsomókban, így a fehérje szintű elemzés során - első körben - csak erre a területre koncentráltunk. Az *in vivo* PET vizsgálatok eredményeiben megfigyelhető volt, hogy a sorozatos átültetések folyamán a mellkasi áttétek [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR halmozása folyamatos emelkedést mutatott. Ezzel összhangban áll a metasztatikus nyirokcsomókban az APN/CD13 fehérje mennyisége is folyamatosan emelkedő tendenciát mutatott az egymást követő átültetések során, amint a 16. ábrán látható.



16. ábra: A metasztatikus paratimikális nyirokcsomók értékelése a sorozatos transzplantációk folyamán. A ábra: a radiotracer felhalmozódásának kvantitatív SUV-analízise a metasztatikus nyirokcsomókban a sorozatos transzplantációk után. B ábra: az APN/CD13 expressziójának Western blot analízise a metasztatikus paratimikális nyirokcsomókban. 1: első nyirokcsomó kísérletsorozat; 2: második nyirokcsomó kísérletsorozat; 3: harmadik nyirokcsomó kísérletsorozat; 4: vese (pozitív kontroll).

4.2 Ciklodextrin származékok PGE szelektivitásának vizsgálata

A tumorok angiogenezise *in vivo* képalkotással közvetett módon is követhető. Erre a célra alkalmas lehet a 2-[¹⁸F]FDG, amely a megnövekedett glükóz anyagcserén keresztül jelezheti az "angiogenezist", illetve a PGE2 specifikus ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin származékok. A következő vizsgálatunk során a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radiofarmakon PET-képalkotó tulajdonságait hasonlítottuk össze különböző állatmodelleken.

4.2.1 In vivo PET képalkotás SRCA tumormodell felhasználásával

A ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin származékok primer tumor- és metasztázis-célzó tulajdonságainak értékeléséhez vesetok alá transzplantált Ne/De tumorral és paratimikális nyirokcsomó áttéttel rendelkező patkányokat használtunk 8 ± 2 nappal a Ne/De tumorsejtek beültetését követően. A bal vese vesetokja alatt növekvő primer Ne/De tumor és a mellkasi paratimikális nyirokcsomó (PTLN) metasztázisok jelenlétét 2-[¹⁸F]FDG PET képalkotással igazoltuk (17. ábra). A kvalitatív képelemzést követően megállapítottuk, hogy a vesetok alatt növekvő primer tumorok jól azonosíthatók mind a [68Ga]Ga-NODAGA-HPβCD, mind a [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB alkalmazásával, azonban az áttétet hordozó paratimikális nyirokcsomó-metasztázisok csak a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-konjugált HPβCD ciklodextrin származékkal voltak kimutathatók (17.A ábra). Ezeket a vizuális megfigyeléseket a SUVadatok kvantitatív értékelése is megerősítette. Az 2-[¹⁸F]FDG akkumulációja mind a tumorban mind a metasztatikus nyirokcsomóban körülbelül kétszer nagyobb értéket mutatott, mint a ⁶⁸Ga-jelzett molekulák esetében, és ez a különbség p≤0,01 mellett szignifikáns volt (17.B ábra és 6. táblázat). Mindazonáltal a tumor-háttér arányt illetően - amely befolyásolja a PET-képek értékelhetőségét - nem találtunk szignifikáns különbséget (p≤0,05) a 2-[¹⁸F]FDG és ⁶⁸Gajelzett ciklodextrin származékok között. Összehasonlítva a két radioaktívan jelölt ciklodextrin származék felhalmozódását a primer Ne/De tumorokban, a [68Ga]Ga-NODAGA-HPBCD esetében magasabb SUV értékeket találtunk (SUVmean: 3,52±0,23; SUVmax: 4,80±0,21), mint a [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB esetében, ahol az SUVmean 2,51±0,19, illetve 3,21±0,35 volt. Ez az alacsonyabb [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB akkumuláció a metasztatikus paratimikális nyirokcsomókban is megfigyelhető volt, ahol a [68Ga]Ga-NODAGA-HPβCD esetében körülbelül 2-szer magasabb SUV értékeket találtak. A primer tumorral ellentétben a paratimikális nyirokcsomók esetében a 2-[¹⁸F]FDG-T/M arányok szignifikánsan ($p \le 0,01$) magasabbak voltak a ⁶⁸Ga-jelzett radiofarmakonokhoz képest. A primer és a szekunder tumorok jelölt ciklodextrin-származék radioaktív felvételének összehasonlítása során, a metasztázisokban szignifikánsan ($p \le 0,01$) alacsonyabb felhalmozódást figyeltünk meg. Ezekkel az eredményekkel összhangban, az elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat során a festés eredménye is alacsonyabb PGE2-receptor-expressziót mutatott a paratimikális nyirokcsomóban (17.C ábra).



17. ábra: A: A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD (piros nyilak), [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB (narancssárga nyilak) és 2-[¹⁸F]FDG (fekete nyilak) felhalmozódásának *in vivo* értékelése miniPET-képalkotás segítségével (Ne/De primer tumorok (SRCA) és a paratimikális nyirokcsomó (PTLN) metasztázisok). B: A PET képek kvantitatív SUV adatelemzése. A PET felvételek és az ebből származó SUV-adatok 8 nappal az SRCA műtét után, illetve 50 és 90 perccel a 2-[¹⁸F]FDG- és ⁶⁸Ga-jelzett tracerek intravénás adagolása után készültek. SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. Az SUV-értékeket átlag ± SD-ben adtuk

meg. A 2-[¹⁸F]FDG és a ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin származékok közötti szignifikancia szintje: $p \le 0,01$ (**). C: A Ne/De primer tumorok (SRCA) és a paratimikális nyirokcsomó (PTLN) metasztázisok szövettani elemzése. Felső sor: Reprezentatív hematoxilin-eozin (H&E) festett tumorszövet. Nagyítás: 20X. Alsó sor: Anti-prosztaglandin E-receptor EP2/PTGER2 antitest immunhisztokémia (PGE2-R), megjelenítve 3,3-diaminobenzidin (DAB) segítségével (barna festés). Nagyítás: 40X.

6. táblázat: A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és a 2-[¹⁸F]FDG felhalmozódásának mennyiségi értékelése a Ne/De primer tumorokban (SRCA) és a paratimikális nyirokcsomó (PTLN) metasztázisokban. A SUV-adatokat 8 ± 2 nappal az SRCA műtét után, valamint 50 és 90 perccel a 2-[¹⁸F]FDG , illetve ⁶⁸Ga-jelzett tracerek intravénás beadása után kaptuk. SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. Az SUV-értékeket átlag ± SD-ben adjuk meg. A 2-[¹⁸F]FDG és a ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin származékok közötti szignifikancia szintje: p≤0,01 (*).

| | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA- | | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA- | | 2-[¹⁸ F]FDG | |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|-------------------------|-------------|
| Tumor | SUVmean | SUVmax | SUVmean | SUVmax | SUVmean | SUVmax |
| Ne/De SRCA | 3,52±0,23 | 4,80±0,21 | 2,51±0,19 | 3,21±0,35 | 7,62±1,25* | 10,36±1,86* |
| Ne/De PTLN | 0,95±0,14 | 1,30±0,16 | 0,45±0,09 | 0,73±0,11 | 4,32±0,85* | 5,27±0,67* |
| Ne/De SRCA (T/M arány) | 3,22±0,19 | 3,05±0,23 | 4,79±0,22 | 4,36±0,36 | 4,85±0,89 | 5,69±1,12 |
| Ne/De PTLN (T/M arány) | 2,32±0,21 | 2,15±0,28 | 3,69±0,29 | 3,06±0,38 | 6,36±1,05* | 7,05±1,59* |

4.2.2 In vivo PET képalkotás szubkután tumormodellek felhasználásával

Az SRCA tumor modellek vizsgálata mellett szubkután növekvő tumorokon is vizsgáltuk a [68 Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és a [68 Ga]Ga-NODAGA-RAMEB tumor célzó tulajdonságait és PGE2-szelektivitását *in vivo* PET képalkotással. A kísérletek során az állatok bőre alá 5x10⁶ sejtet tartalmazó szuszpenziót injektáltunk, majd 10 ± 2 nappal a tumorsejtek beoltása után a kialakult szubkután növekvő kísérleti tumorokra fókuszálva végeztünk képalkotást. A reprezentatív, bomláskorrigált kisállat PET felvételek az 18.A ábrán láthatóak. Az így nyert PET képek minőségi elemzése azt mutatta, hogy a vizsgált szubkután transzplantált tumorok mindegyike egyértelműen azonosítható volt mind [68Ga]Ga-NODAGA-HPβCD-vel mind a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-el. Α farmakonok halmozódásának mértékében azonban jelentős különbségek mutatkoztak az egyes tumortípusok esetében. Azt is megfigyeltük, hogy néhány daganat esetében igen nagy eltérés volt észlelhető a két 68Ga-jelzett radiofarmakon felhalmozódása között ugyanabban a tumorban (HT1080, A20, B16-F10). A [68Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és a [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB tumor célzó képességét a 2-[¹⁸F]FDG radiogyógyszerrel vetettük össze. A 2-[¹⁸F]FDG képek elemzésekor azt találtuk, hogy a HT1080, a PancTu-1 és a BxPC3 tumorok feltűnően alacsony radiogyógyszer-felhalmozódást mutattak, 2-[18F]FDG avid régiók nélkül. Ezeket a vizuális megfigyeléseket a bomláskorrigált PET képek kvantitatív SUV-adatelemzése is megerősítette (18.B. ábra és 7. és 8. táblázat).



18. ábra. A: Reprezentatív bomláskorrigált transzaxiális PET-felvételek a kísérleti tumorokról [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD (piros nyilak), [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB (narancssárga nyilak) és 2-[¹⁸F]FDG (fekete nyilak) intravénás beadását követően. B: A PET-felvételek

kvantitatív SUV-adatelemzése. A PET-képeket és az SUV-adatokat 10 ± 2 nappal a tumoros sejtek szubkután beoltása után, valamint 50 és 90 perccel a 2-[¹⁸F]FDG-, illetve ⁶⁸Ga-jelzett tracerek intravénás injekcióját követően kaptuk. SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. Az SUV-értékeket átlag ± SD-ben adjuk meg.

7. táblázat: A bomláskorrigált PET-képek kvantitatív SUV-adatelemzése. A PET-képeket és a SUV-adatokat 10 ± 2 nappal a tumoros sejtek szubkután beoltása után, valamint 50 és 90 perccel a 2-[¹⁸F]FDG - és ⁶⁸Ga-jelzett tracerek intravénás beadása után kaptuk. SUV: standardizált felvételi érték. Az SUV-értékeket átlag \pm SD-ben adjuk meg.

| | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA- HPBCD | | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA- RAMEB | | [¹⁸ F]FDG | |
|----------|--|---------------|--|-----------|-----------------------|---------------|
| Tumor | SUVmean | SUVmax | SUVmean | SUVmax | SUVmean | SUVmax |
| HT1080 | 0,16±0,01 | 0,32±0,01 | 0,04±0,01 | 0,11±0,03 | 0,55±0,06 | $0,86\pm0,07$ |
| A20 | 0,04±0,01 | 0,15±0,01 | 0,12±0,01 | 0,45±0,10 | 3,82±0,24 | 5,07±0,30 |
| PancTu-1 | 0,05±0,01 | 0,14±0,03 | $0,06\pm0,01$ | 0,17±0,04 | $0,72\pm0,05$ | $1,46\pm0,19$ |
| BxPC3 | 0,20±0,01 | 0,36±0,03 | 0,17±0,02 | 0,25±0,03 | 0,61±0,13 | $1,02\pm0,25$ |
| B16F10 | 0,15±0,01 | 0,28±0,03 | 0,06±0,02 | 0,10±0,03 | $1,84{\pm}0,08$ | 2,91±0,20 |
| Ne/De | 0,30±0,08 | $1,02\pm0,21$ | 0,20±0,05 | 0,66±0,05 | 3,99±1,25 | 11,47±3,82 |
| He/De | 0,23±0,01 | 1,41±0,27 | 0,27±0,03 | 1,28±0,23 | 3,69±1,13 | 10,26±3,22 |

8. táblázat: A tumor-háttér SUV-adatok elemzése a bomláskorrigált PET-felvételeken. A PET-képeket és az SUV-adatokat 10 ± 2 nappal a tumoros sejtek szubkután beoltása után, valamint 50 és 90 perccel a 2-[¹⁸F]FDG - és ⁶⁸Ga-jelzett tracerek intravénás beadása után kaptuk. SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. Az SUV-értékeket átlag \pm SD-ben adjuk meg.

| | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA- | | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA- | | 2-[¹⁸ F]FDG | |
|----------|-------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|-------------------------|---------------|
| | ΗΡβCD | | RAMEB | | | |
| Tumor | T/M | T/M | T/M | T/M | T/M | T/M |
| | (SUVmean) | (SUVmax) | (SUVmean) | (SUVmax) | (SUVmean) | (SUVmax) |
| HT1080 | $4,00\pm0,45$ | 5,30±1,03 | $5,63{\pm}0,92$ | 6,75±1,02 | $1,35\pm0,22$ | $1,20\pm0,19$ |
| A20 | 2,29±0,22 | 2,22±0,53 | 2,16±0,25 | 1,90±0,12 | 4,43±0,59 | 4,17±0,47 |
| PancTu-1 | 5,00±0,65 | 3,67±0,48 | $1,28\pm0,35$ | 1,85±0,29 | $0,80\pm0,14$ | 1,11±0,23 |
| BxPC3 | 2,21±0,25 | 2,08±0,62 | 5,73±0,95 | 5,98±0,68 | $0,76\pm0,14$ | 0,96±0,46 |
| B16F10 | $2,66\pm0,33$ | 3,21±0,58 | $2,51\pm0,47$ | 2,77±0,35 | $2,92{\pm}0,49$ | 2,47±0,52 |
| Ne/De | 5,02±0,63 | 3,81±0,46 | $5,66\pm1,01$ | 3,36±0,67 | $6,04{\pm}0,71$ | $5,88\pm0,85$ |
| He/De | 3,83±0,41 | 4,51±0,58 | 3,69±0,74 | 3,76±0,65 | $5,85{\pm}0,80$ | 5,64±0,78 |

4.2.3 Kísérleti daganatok radioaktív felvételének ex vivo vizsgálata

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB tumor célzó képességének értékeléséhez *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat végeztünk 90 perccel a radiogyógyszer intravénás injektálását követően. Az 9. táblázatban látható, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-konjugált ciklodextrin-molekulák *ex vivo* %ID/g adatai jól korrelálnak az *in vivo* képalkotás során kapott SUV-értékekkel. Az *in vivo* PET vizsgálati eredményekhez hasonlóan a PGE2 pozitív BxPC3, A20, Ne/De és He/De tumorok mutatták a legnagyobb felhalmozódást mindkét ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin-származék használatával. A Ne/De tumorok esetében szignifikáns különbség (p≤0,01) volt megfigyelhető a szubkután és az SRCA transzplantált tumorok radiofarmakon felvétele között.

9.táblázat: A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódásának *ex vivo* értékelése (%ID/g) a kísérleti tumorokban 10 ± 2 illetve az SRCA modell esetében 8 ± 2 nappal a tumorindukció után és 90 perccel az intravénás radioaktív anyag beadását követően. A szubkután (sc.) és SRCA indukált primer és metasztatikus Ne/De tumorok közötti szignifikancia szint 90 percnél: p≤0,01 (*). SRCA: vesetok alá indukált tumor. PTLN: paratimikális nyirokcsomó-metasztázis. A %ID/g értékek átlag ± SD értékként vannak feltüntetve.

| | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-HPβCD | [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-RAMEB | | |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| | (90 min) | (90 min) | | |
| HT1080 | 0,20±0,05 | 0,09±0,02 | | |
| A20 | 0,06±0,03 | 0,15±0,07 | | |
| PancTu | 0,08±0,03 | 0,10±0,02 | | |
| BxPC3 | 0,30±0,06 | 0,36±0,07 | | |
| B16F10 | 0,21±0,09 | $0,32{\pm}0,10$ | | |
| Ne/De sc. | 0,41±0,09 | 0,36±0,08 | | |
| He/De sc. | $0,35{\pm}0,08$ | 0,43±0,11 | | |
| Ne/De SRCA | 2,45±0,41* | 2,13±0,37* | | |
| Ne/De PTLN | 1,75±0,27* | 1,52±0,19* | | |

4.2.4 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A szubkután növekvő kísérleti tumorok prosztaglandin E receptor (EP2) expresszióját immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Az *in vivo* és *ex vivo* radiotracerfelvételi eredményekkel összhangban az A20, BxPC3, B16-F10, Ne/De és He/De tumorsejtek membránjában erős EP2 receptor pozitivitást figyeltünk meg, míg az alacsony prosztaglandin

E2 receptor expresszióval rendelkező HT1080 és PancTu-1 tumorokban alacsonyabb jelintenzitás volt detektálható (19. ábra).



19. ábra: A szubkután növekvő kísérleti tumorok szövettani elemzése 10 ± 2 nappal a tumorsejtek beoltása után. Bal oldal: Reprezentatív hematoxilin-eozin (H&E) festett tumorszövet. Nagyítás: 20X. Jobb oldal: Anti-prosztaglandin E receptor EP2/PTGER2 antitest immunhisztokémia (PGE2-R), megjelenítve 3,3-diaminobenzidin (DAB) (barna festés) és VIP-peroxidáz (lila festés; B16-F10 melanoma). Nagyítás: 40X.

5 Megbeszélés

A daganatos megbetegedések miatt bekövetkező halálozások fő oka az emberi szervezetben kialakult tumorok által képzett áttétek. Az eredeti (primer) daganatok áttétképzése a rákkutatásban szerteágazóan kutatott terület, azonban az áttétek áttétképződésével kapcsolatos vizsgálatok meglehetősen korlátozottak és ellentmondásosak (Tait és mtsai., 2004). Az utóbbi időszakban elvégzett több preklinikai és klinikai kutatás ugyan folyamatosan bővítette ismereteinket a metasztatikus kaszkád folyamatát illetően, azonban továbbra is megoldatlan a kérdés, hogy az áttétek új metasztatikus elváltozásokat alakítanak-e ki, vagy minden áttét az elsődleges elváltozásból származik. Ezért még további meggyőző kísérleti adatokra van szükség a különböző daganattípusokra vonatkozóan annak tisztázására, hogy az áttétek képesek-e tovább metasztatizálni más testrészekbe. A meglévő irodalom terjedelme alapján korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre, amely alátámasztja vagy cáfolja az áttétek metasztatikus potenciálját. Bár érdemes figyelembe venni, hogy a rákos alpopulációk folyamatos változáson és fejlődésen mennek keresztül, ezért egyre növekvő metasztatikus potenciállal rendelkező sejtek alakulnak ki, amelyek képesek áttéteket adni különböző távoli szervekbe is. Előfordulhat azonban az is, hogy az áttétképző sejtek olyan változásokon mennek keresztül, amely a metasztatikus potenciáljuk gyengülését eredményezi. Ez függhet mind a daganat típusától, mind a makrometasztázis progresszióját megelőző nyugalmi stádium időszakának hosszától. Meggyőző kutatási adatok nélkül a végső következtetések levonása akadályokba ütközik. A metasztázisok áttétképző képességének alaposabb megértése nagy jelentőséggel bír a kezelési lehetőségek hatékonyságának maximalizálása és a daganatos betegek túlélési arányának javítása érdekében. Emellett, ha ez a jelenség bizonyos daganattípusokra jellemző, akkor ezen áttétek azonosítása és időben történő megfelelő kezelése lehetővé teszi a daganat progressziójának gátlását. Ezeken túl azonban még egy másik tisztázatlan kérdés, hogy az áttétek expressziós mintázata megegyezik-e a primer tumor sejtfelszíni molekuláris mintázatával (Berkel és mtsa., 2021, Tait és mtsai., 2004).

Dolgozatomban két általam végzett kutatómunka leírása történt. A vizsgálatok első részében sorozatosan transzplantált mezoblasztos nefroma tumor (Ne/De) metasztázisaiban az aminopeptidáz N (APN/CD13) és az $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor expressziójának változását ⁶⁸Gajelzett NOTA-cNGR és NODAGA-RGD radiotracerekkel értékeltük. Majd a második vizsgálatsorozatban összehasonlítottuk a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és a [⁶⁸Ga]Ga-

NODAGA-HPβCD tumort célzó potenciálját illetve diagnosztikai értékét a különböző daganatok molekuláris képalkotásában non-invazív *in vivo* PET-képalkotás segítségével.

A hipoxia és a hipoxia által kiváltott angiogenezis jelentős tényezők a daganatok metasztatizációjának indukciójában. Kutatásunk során a neoangiogén $\alpha_v\beta_3$ integrin és az APN/CD13 expressziójának mértékét *in vivo* PET képalkotó eljárást alkalmazva értékeltük egy szingénikus patkánymodellben, ahol az áttétképződés folyamata követhető volt. Az alkalmazott patkánymodellt korábban Trencsényi és munkatársai írták le (Trencsenyi és mtsai., 2009). Munkájuk lényege, hogy ha a patkányok vesetokja alá rákos sejteket vagy daganatfragmentumokat ültetünk, akkor minden esetben metasztázis képződik a mellkasi paratimikális nyirokcsomóban. Ezt a modellt nyirokterjedéses "kihagyásos" metasztatikus modellnek nevezik. Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre olyan *in vivo* tumormodell, amelyben bizonyítható lenne, hogy az áttétek metasztázisokat képeznek, az áttétek szekvenciális transzplantációját alkalmaztuk a modellezés megoldásaként (10. ábra). Véleményünk szerint a vesetok-paratimikális nyirokcsomó-együttes vizsgálata alkalmas modell lehet az áttétekből keletkező metasztázisok és azok receptor-expressziójának tanulmányozására.

A vesetok alatt növekvő primer Ne/De tumorok és a vizsgálatunkban kialakult mellkasi paratimikális nyirokcsomó-metasztázisok minden esetben jól azonosíthatók voltak 2-[¹⁸F]FDG-vel (amint azt a 12-14. ábra mutatja). A szingénikus SRCA patkány modellt felhasználva munkacsoportunk korábban már vizsgálta a ⁶⁸Ga jelzett RGD és NGR peptidek *in vivo* PET-képalkotás alkalmazhatóságát a neoangiogenezis és az $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin és az APN/CD13 expressziójának kimutatásában (Máté és mtsai., 2015). A vizsgálatok során a vesetok alá transzplantált primer Ne/De tumorok fokozott radioaktivitást mutattak a szubkután tumorokhoz képest. Ennek oka lehet a tumor elsődleges környezete, amelyből hiányzik a megfelelő identikus szöveti környezet és érrendszer a tumorsejtek növekedéséhez illetve az áttétes terjedéshez, ami így vezethet a két primer tumormodellben megfigyelt nyomjelzőanyag-felhalmozódás közötti különbséghez (Borgstrom és mtsai., 2013; Kerbel, 2003). Jelen tanulmányunkban azt tapasztaltuk, hogy a preklinikai PET-vizsgálatokban a Ne/De kémiailag indukált mezoblasztos nefroma tumorok $\alpha_v\beta_3$ integrin és APN/CD13 expressziója egyaránt felismerhető volt - bár eltérő mértékben - [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR radiotracerekkel. Az általunk vizsgált angiogén molekulák közül az integrin $\alpha_{v}\beta_{3}$ expressziója minden esetben alacsonyabb volt, mint az APN/CD13 expressziója, mind az elsődleges rosszindulatú daganatok, mind az áttétek esetében. Ez összhangban volt
korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint a ⁶⁸Ga-jelzett RGD esetében alacsonyabb nyomjelző felvétel ábrázolódott (Máté és mtsai., 2015, Kis és mtsai., 2020).

Az egymást követő áttétes nyirokcsomó transzplantációk következtében azonban a vesetok alatt növekvő tumorok és a mellkasi paratimikális metasztázisok 2-[¹⁸F]FDG, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR felhalmozódásának folyamatos növekedése volt megfigyelhető. A Western blot elemzések is az APN/CD13 fehérje mennyiségének folyamatosan emelkedő tendenciáját mutatták az egymást követő átültetések során. Ebből arra következtethetünk, hogy a tumorok és áttéteik esetében a sorozatos transzplantációk eredményeként megfigyelt glükózanyagcsere fokozódás, valamint a neoangiogenezissel összefüggő $\alpha_v\beta_3$ integrin és APN/CD13 molekulák emelkedett expressziója, amely a tumorok és áttéteik esetében megfigyelhető volt, a metasztázisok fokozott malignitását vetítheti előre (ahogy az 16. ábrán látható).

Kísérleteink következő részének a célja az volt, hogy preklinikai PET segítségével értékeljük a 68Ga jelzett HPβCD és RAMEB ciklodextrin származékok tumorcélzó képességét, és összefüggést találjunk a PGE2-termelés és a radiofarmakon felvétel között a vizsgált kísérleti tumorokban. Vizsgálataink során bár a [68Ga]Ga-NODAGA-HPβCD-vel és [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-vel végzett in vivo PET-képalkotás eredményeképpen a szubkután transzplantált kísérleti tumorok mindegyike azonosítható volt; а nyomjelző felhalmozódásának mértéke között jelentős különbségek mutatkoztak (9. ábra). Ez a megfigyelés vagy a vizsgált tumorok eltérő EP-receptor-profiljával, vagy az adott tumorban és közvetlen környezetében lévő eltérő PGE2-koncentrációval magyarázható. Legjobb tudomásunk szerint azonban a jelenlegi irodalomban nem állnak rendelkezésre pontos adatok a vizsgált tumorok PGE2-receptor-expressziójára vonatkozóan, bár korábbi kutatások már megerősítették az EP-receptorok és a PGE2 jelenlétét egyes sejtvonalakban. Yip-Schneider a BxPC3 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonal emelkedett PGE2-termeléséről számolt be (Yip-Schneider, 2000). Továbbá más munkacsoportok rámutattak, hogy az EP1 és EP2 receptorok aktiválásához jelentősen magasabb PGE2 szintre van szükség (O'Callaghan és Houston, 2015). Egy másik, Takahashi és munkatársai által végzett vizsgálatban a BxPC3 sejtvonalban fokozott PGE2-szekréciót és magas EP2-receptor-expressziót tapasztaltak különböző humán hasnyálmirigydaganat-sejtek jellemzése során in vitro próbák alkalmazásával (Takahashi et al., 2015). Egy kutatásban, amelyben különböző hasnyálmirigyductus adenokarcinóma sejteket értékeltek áramlási citometriával és Western blot-elemzéssel a PancTu-1 sejtvonalak esetében nagyon alacsony COX2-expressziót és PGE2-termelődést

figyeltek meg (Gonnermann és mtsai., 2015). Munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatának eredményei összhangban vannak a fentebb említettekkel, hiszen immunhisztokémiával igazolva a BxPC3 tumorokban figyelemre méltó EP2 receptor jelenlétet, míg a PancTu-1 tumorokban alacsonyabb receptor expressziót figyeltünk meg. Ez megerősítette, hogy a szubkután növekvő BxPC3 tumorok in vivo is megtartották a fentebb leírt tulajdonságukat (Trencsényi et al., 2020). Bár a HT1080 fibroszarkóma sejtek EP-receptor-profilja még nem teljesen tisztázott, egy olyan vizsgálat eredményei alapján, amelyben az 5-Azacitidin COX2expresszióra és PGE-termelésre gyakorolt hatását vizsgálták, azt feltételezzük, hogy a HT1080 sejteken vannak jelen EP-receptorok (Yu és Kim, 2015). Ezen kívül Kim és munkatársai B16-F10 melanoma sejtvonalak alkalmazásával vizsgálták a timosaponin AIII - egy Anemarrhena asphodeloides Bunge-ból származó vegyület - hatását a rákos sejtek migrációjára. Míg a COX2 és a kapcsolódó PGE2 és EP receptorok mennyiségének növekedése elősegíti a melanoma sejtek migrációját in vitro körülmények között, ugyanakkor a timosaponin AIII adagolása a sejtek migrációjának gátlásához vezetett a COX2, PGE2 és EP receptor expressziójának csökkenésével együtt (Kim és mtsai., 2016). Bár a B16-F10 sejtvonalak receptor-expressziós profiljára vonatkozóan nem létezik olyan kutatás, amely kvantitatív adatokat biztosítana, a fenti részletes vizsgálat eredményei alapján feltételezhetjük a B16-F10 melanoma sejtek jelentős EP-receptor és PGE2 expresszióját. Az A20 sejtvonalakat illetően eddig nem áll rendelkezésre EP-receptor-státuszukkal foglalkozó tanulmány, Fedyk és munkatársai azonban a B-limfociták EP-receptorainak különböző altípusainak expresszióját vizsgálták a következő sejtvonalakban: 702/3, CH3 1, CH33, ECH408.1, WEHI-231, CH 12 és CH27. Valós idejű polimeráz láncreakció (RT-PCR), Northern blot és DNS-szekvenáló analízis alkalmazásával a PGE-receptorok EP1, EP3béta és EP4 altípusait kódoló mRNS-t azonosították a transzformált B-limfocitákon (Fedyk és mtsai., 1996). Mivel korábbi irodalmi adatok több B-limfocita sejtvonalon is kimutatták a PGE2-receptorok jelenlétét, feltételezzük, hogy valószínűleg az A20 sejtvonalakon is mutatkozik expresszió. Annak ellenére, hogy a tumoros sejtvonalak receptor-expressziója bizonyos összefüggésekre utalhat a ⁶⁸Ga-jelölt RAMEB és HPβCD felhalmozódásával, a tumorok receptorprofilja és a radiofarmakonfelvétel közötti kapcsolat teljes megerősítése érdekében a jövőben még további vizsgálatok szükségesek.

A HT1080, a PancTu-1 és a BxPC3 tumorokon végzett PET vizsgálatok során megfigyelték, hogy alacsony 2-[¹⁸F]FDG felhalmozódást mutattak, miközben ez a radiofarmakon széles körben használt a daganatos betegségek diagnosztikája során képalkotására és stádium-

meghatározására. Korábbi klinikai és preklinikai vizsgálatok arról is beszámoltak, hogy - az alacsony sejtszám, az alacsony glükózanyagcsere és glükóztranszporter expresszió vagy a kis tumorméret miatt - bizonyos tumortípusok (pl.: jól differenciált pajzsmirigy- és neuroendokrin tumorok, alacsony fokú tüdő adenokarcinóma, vesesejtes rákok) nem 2-[¹⁸F]FDG-avidok, vagy nagyon alacsony farmakon felvételt mutattak. Ezekben az esetekben különösen indokolt lehet egy specifikusabb, a daganat más tulajdonságát célzó radiofarmakon alkalmazása (Flavell és mtsai., 2016; Hofman és Hicks, 2016).

Ebben a munkában a 68Ga-jelzett ciklodextrin származékok tumorcélzó potenciálját Ne/De tumort hordozó patkányokon is vizsgáltuk, 8 ± 2 nappal a tumorsejtek vesetok alá történő műtéti beültetését követően (SRCA műtét). Ahogy ezt már korábban bemutattuk ennek az áttétképző állatmodellnek az a sajátossága, hogy a vesetok alá transzplantált sejtek egy héten belül áttétet képeznek a mellkasban lévő paratimikális nyirokcsomóba. Vizsgálatunkban az előző kísérletsorozatban is alkalmazott szingénikus-ortotópikus transzplantációt végeztük, vagyis F-344-es patkányokból származó mezoblasztos nefroma (Ne/De) tumorsejteket ültettünk be az azonos törzsből származó patkányok vesetokja alá (Trencsényi és mtsai., 2009). Miután in vivo 2-[18F]FDG-PET képalkotással igazoltuk a bal vesetok alatt növekvő primer Ne/De tumorok és a paratimikális nyirokcsomó (PTLN) metasztázisok jelenlétét, elvégeztük a PET képalkotást a [68Ga]Ga-NODAGA-HPβCD-vel és [68Ga]Ga-NODAGA-RAMEB alkalmazásával. Az így készült felvételeken körülbelül 5-10-szer nagyobb ⁶⁸Gajelzett radiotracer felvételt találtuk (17. ábra és 6. táblázat), mint a szubkután Ne/De tumormodellben (18. ábra és 7. táblázat). Ennek a jelenségnek a magyarázata az, hogy a szubkután transzplantációból hiányzik az ortotopikus szöveti mikrokörnyezet. Ezzel szemben az SRCA modellben a tumorsejteket ortotopikus helyre ültetjük be, ahol kedvező mikrokörnyezet van, ami elősegíti a tumorsejtek proliferációját és a távoli metasztázisok kialakulását (Borgstrom és mtsai., 2013).

Az immunhisztokémia eredményeit tekintve az A20, BxPC3, B16-F10, Ne/De és He/De tumorsejtek membránjában erős EP2 receptor pozitivitást mutattunk ki, míg a HT1080 és a PancTu-1 tumorok esetében mérsékeltebb receptor expressziót jelző alacsonyabb jelintenzitást észleltünk. Azonban meg kell jegyezzük azt is, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD-vel és [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB alkalmazásával készült *in vivo* PET vizsgálatok vizuális értékeléskor azt tapasztaltuk, hogy a PGE2 pozitivitás eltérő volt az immunhisztokémiai metszeteken azonosított receptor-pozitivitáshoz képest. A tumorsejtek receptor-expressziójának változása a tumor progressziója során magyarázhatja ezt a jelenséget. A tumor

növekedését a nekrózis, a krónikus gyulladás és a krónikus, valamint a ciklikus hipoxia megjelenése jellemzi, amelyek pozitív korrelációt mutatnak mind a PGE2-termeléssel, mind a PGE2-receptorok expressziójával (Nasry és Martin, 2021). Vizsgálatunkban a kísérleti állatok PET felvétele 10-12 nappal a tumorsejtek injektálását követően történt, majd ezt követte az immunhisztokémiai vizsgálat. Ezért feltételezzük, hogy még nem következett be olyan nagymértékű tumor-differenciálódás és ehhez kapcsolódó PGE2-receptor expresszió növekedés, amely az immunhisztokémiai festéssel kimutatható lett volna. Egy másik dolog, amit figyelembe kell venni, hogy a festés a receptorra specifikus, míg a ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin származékok mind a PGE2-t önmagában, mind a receptorához kötődő PGE2-t jelzik. Így a PET képalkotással vizuálisan erősebb pozitivitást regisztrálhattunk, mivel a radiofarmakonok a PGE2-t (önmagában vagy receptorral együtt) detektálják, míg a festés csak a receptort mutatja, amelynek mennyisége - a korábbi irodalmi adatok alapján - valószínűleg nem volt ennyire kifejezett az általunk vizsgált daganatokban.

A kísérletsorozatok értékelése során a következő korlátokat fogalmaztuk meg:

- Az általunk képalkotásra használt, az intézetünkben fejlesztett MiniPET-II készülékhez nem tartozik anatómiai képalkotó berendezés. Ennek hiánya különösen a kis méretű, de nagyobb aktivitású szövetek esetében (áttétes nyirokcsomó) a valós méretnél nagyobbnak látatja az elkészült bomláskorrigált PET felvételen az adott szövetet, ezáltal nehezítve annak pontos lokalizációját.
- 2. Bár az általunk végzett vizsgálatok során az alkalmazott kísérleti rendszerben kizárólag a daganatokban és a nyirokcsomó metasztázisban volt megfigyelhető ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin akkumuláció, azonban a tumor-asszociált és intratumorális gyulladásos folyamatok mértékének megállapítása további vizsgálatokat igényel.
- 3. Eredményeink arra utalnak, hogy szoros kapcsolat van a PGE2 és a ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin származékok akkumulációja között, de a pontos célzási mechanizmus még mindig nem világos. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a radiotracer először a PGE2-höz kötődik-e, majd együtt kötődnek az EP2-receptorhoz, vagy a farmakon a már EP2-receptorhoz kötött PGE2-t célozza meg. Az is lehetséges, hogy a két folyamat egyszerre zajlik, azonban ezek dinamikája nem teljesen tisztázott. Továbbá ezeket a folyamatokat nagymértékben befolyásolhatja a tumor mikrokörnyezete, annak tulajdonságai (pl.: prosztaglandin-termelés, hipoxia stb.) és az EP2-receptor-sűrűség.

Kísérleteink során az alábbi új eredményeket állapítottuk meg:

1. Az SRCA műtéti technikával létrehozott szingénikus metasztázis állatmodellben leírtuk, hogy mind a primer tumorok (vesetok alatti), mind pedig a metasztázisok biológiai viselkedése leírható és követhető non-invazív képalkotó technikákkal target-specifikus PET radiofarmakonok alkalmazásával.

2. Létrehoztunk egy olyan új, *in vivo* experimentális onkológiai állatmodell-rendszert, amelyben áttétes nyirokcsomók sorozatos transzplantációjával követhető a nyirokcsomó metasztázisok tumor formáló képessége.

3. Preklinikai PET vizsgálatainkban a Ne/De kémiailag indukált mezoblasztos nefroma tumorokban a neo-angiogenezissel összefüggő $\alpha_v\beta_3$ integrin és APN/CD13 expressziója azonosítható volt [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR radiotracerekkel.

4. Az egymást követő áttétes nyirokcsomó transzplantációk következtében a vesetok alatt növekvő tumorok és a mellkasi paratimikális metasztázisok 2-[¹⁸F]FDG, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD és [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR felhalmozódásának folyamatos növekedése volt megfigyelhető, amelyet a Western blot elemzésekkel is igazoltunk.

5. PET képalkotással alátámasztottuk, hogy a Ne/De tumorok és áttéteik esetében a sorozatos nyirokcsomó transzplantációk eredményeként megfigyelt glükózanyagcsere fokozódás, valamint a neo-angiogenezissel összefüggő $\alpha_v\beta_3$ integrin és APN/CD13 molekulák emelkedett expressziója a metasztázisok fokozódó malignitására utal ebben a kísérleti rendszerben.

6. *In vivo* preklinikai PET képalkotással igazoltuk a ⁶⁸Ga-jelzett HPβCD és RAMEB ciklodextrin származékok alkalmazhatóságát a PGE2-receptor pozitív szubkután növekedő daganatok diagnosztikájában.

7. Megállapítottuk, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB alkalmazásával a PGE2 pozitív ortotopikusan és heterotopikusan transzplantált primer tumorok és a kialakuló metasztázisok egyaránt azonosíthatóak.

6 Összefoglalás

Az elmúlt évtizedben számos preklinikai és klinikai kutatás ugyan folyamatosan bővítette ismereteinket a metasztatikus kaszkád folyamatát illetően, azonban továbbra is megoldatlan a kérdés, hogy az áttétek új metasztatikus elváltozásokat alakítanak-e ki, vagy minden áttét az elsődleges elváltozásból származik. Ezzel összefüggésben, a primer tumorokban és metasztázisaikban zajló neo-angiogenezist a tumor progresszió és az áttétképzés egyik sarokkövének tekintik. A daganatban expresszálódó neoangiogén molekulákat célzó új radiofarmakonok és a nem invazív molekuláris képalkotó technikák (pl. PET) értékes diagnosztikai lehetőséget nyújthatnak a daganatban zajló változások értékeléséhez, valamint a tumor progressziójának gátlására irányuló kezelések bevezetéséhez, hatékonyságuk ellenőrzéséhez.

Jelen dolgozatban bemutattuk, hogy SRCA műtéti technikával létrehoztunk egy olyan új, in vivo experimentális onkológiai állatmodell-rendszert, amelyben áttétes nyirokcsomók sorozatos transzplantációjával követhető a nyirokcsomó metasztázisok tumor formáló képessége. Ebben a modellben mind a vesetok alatti primer tumorok, mind pedig a metasztázisok neo-angiogenezissel összefüggő α_vβ₃ integrin és APN/CD13 expressziója leírható és követhető non-invazív képalkotó technikákkal target-specifikus [68Ga]Ga-NODAGA-RGD és [68Ga]Ga-NOTA-cNGR PET radiofarmakonok alkalmazásával. Az egymást követő áttétes nyirokcsomó transzplantációk következtében a vesetok alatt növekvő tumorok és a mellkasi paratimikális metasztázisok 2-[¹⁸F]FDG, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD és ⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR felhalmozódásának folyamatos növekedését tapasztaltuk. Az így – ebben a kísérleti rendszerben – megfigyelhető glükózanyagcsere fokozódás, valamint a neoangiogenezissel összefüggő α_vβ₃ integrin és APN/CD13 molekulák emelkedett expressziója a metasztázisok fokozódó malignitására utalhat. A daganatok neo-angiogenezisét egy közvetettebb jelátviteli rendszerben (COX2-PGE-tengely) vizsgálva in vivo preklinikai PET képalkotással igazoltuk, hogy a ⁶⁸Ga-jelzett HPβCD és RAMEB ciklodextrin származékok alkalmasak a PGE2-receptor pozitív, illetve PGE2-t termelő ortotopikusan és heterotopikusan transzplantált primer tumorok és a kialakuló metasztázisok azonosítására.

A neoangiogenezis molekuláris jellemzőinek, például a különböző típusú integrineknek, az aminopeptidáz N-nek (APN/CD13), illetve a PGE2-nek a nem invazív képalkotó technikákkal történő detektálása lehetőséget biztosít a megfelelő anti-angiogén kezelés kiválasztására, nyomon követésre, valamint a pontos terápiás döntéshozatalra, amelyeknek kulcsfontosságú szerepük van a betegek kezelésében.

7 Summary

Although a great amount of preclinical and clinical research over the past decade has steadily increased our knowledge of the metastatic cascade process, the question of whether metastases develop into new metastatic lesions or whether all metastases arise from the primary lesion remains unresolved. In this context, neo-angiogenesis in primary tumours and their metastases is considered a cornerstone of tumour progression and metastasis. New radiopharmaceuticals targeting neo-angiogenic molecules expressed in tumours and non-invasive molecular imaging techniques (e.g. PET) may provide valuable diagnostic tools to assess changes in tumours and to introduce treatments inhibiting tumour progression and to monitor their efficacy.

In the present work, we have demonstrated that we have established a novel in vivo experimental animal model system for oncology using the SRCA surgical technique, in which the tumor-forming ability of lymph node metastases can be monitored by serial transplantation of metastatic lymph nodes. In this model, both the expression of $\alpha_{v}\beta_{3}$ integrin and APN/CD13 associated with neo-angiogenesis of both primary tumors and metastases in the renal tubules can be described and monitored by non-invasive imaging techniques using target-specific [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD and [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR PET radiopharmaceuticals. Consecutive metastatic lymph node transplantations resulted in a steady increase in the accumulation of 2-[¹⁸F]FDG, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD and [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR in tumors growing under the kidneys and in thoracic parathyroid metastases. The increase in glucose metabolism observed in this experimental system, as well as the increased expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin and APN/CD13 molecules associated with neo-angiogenesis, may indicate the increasing malignancy of metastases. By investigating tumor neo-angiogenesis in a more indirect signaling system (COX2-PGE axis), we demonstrated by in vivo preclinical PET imaging that ⁶⁸Ga-labeled cyclodextrin derivatives HPβCD and RAMEB are suitable for identifying PGE2 receptor-positive and PGE2-producing orthotopically and heterotopically transplanted primary tumors and developing metastases.

The detection of molecular features of neoangiogenesis, such as different types of integrins, aminopeptidase N (APN/CD13) and PGE2, by non-invasive imaging techniques provides the opportunity for appropriate anti-angiogenic treatment selection, monitoring and accurate therapeutic decision-making, which play a key role in the treatment of patients.

8 Irodalomjegyzék

Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. Nat Protoc. 2009; 4 (9): 1350-1362. doi: 10.1038/nprot.2009.120. Epub 2009 Aug 27.

Arguello F, Baggs RB, Frantz CN. A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. Cancer Res. 1988; 48: 6876–6881.

Backer MV, Levashova Z, Patel V, Jehning BT, Claffey K, Blankenberg FG, Backer JM. Molecular imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature with single-chain VEGF-based probes. Nat Med. 2007, 13 (4): 504-509. doi: 10.1038/nm1522.

Backhaus P, Noto B, Avramovic N, Grubert LS, Huss S, Bögemann M, Stegger L, Weckesser M, Schäfers M, Rahbar K. Targeting PSMA by radioligands in non-prostate disease-current status and future perspectives. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2018, 45 (5): 860-877. doi: 10.1007/s00259-017-3922-y.

Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. Med Res Rev. 2006, 26: 88-130

Belizario J. Immunodeficient Mouse Models: An overview. The Open Immunology Journal. 2009, 2: 79–85. doi: 10.2174/1874226200902010079

Berkel C, Cacan E. Metastases from metastases: comparative metastatic potential of human cancer cell lines originated from primary tumors or metastases in various tissues. J Cell Commun Signal. 2021, 15 (3): 461-464. doi: 10.1007/s12079-021-00617-3.

Berndorff D, Borkowski S, Moosmayer D, Viti F, Müller-Tiemann B, Sieger S, Friebe M, Hilger CS, Zardi L, Neri D, Dinkelborg LM. Imaging of tumor angiogenesis using 99mTc-labeled human recombinant anti-ED-B fibronectin antibody fragments. J Nucl Med. 2006, 47 (10): 1707-1716.

Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. Blood. 2001, 97: 652-659.

Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. Eur J Cancer. 2004, 40: 852–857. doi: 10.1016/j.ejca.2003.11.021

Blankenberg FG, Mandl S, Cao YA, O'Connell-Rodwell C, Contag C, Mari C, Gaynutdinov TI, Vanderheyden JL, Backer MV, Backer JM. Tumor imaging using a standardized

radiolabeled adapter protein docked to vascular endothelial growth factor. J Nucl Med. 2004, 45 (8): 1373-1380.

Bogdanowich-Knipp SJ, Chakrabarti S, Williams TD, Dillman RK, Siahaan TJ. Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. J Pept Res. 1999, 53 (5): 530-541. doi: 10.1034/j.1399-3011.1999.00052.x.

Bogden AE, Haskell PM, LePage DJ. et al. Growth of Human Tumor Xenografts Implanted under the Renal Capsule of Normal Immunocompetent Mice. Pathobiology. 1979, 47: 281– 293

Bogden AE, Cobb WR. The Subrenal Capsule Assay (SRCA) Eur J Cancer Clin Oncol. 1986, 22: 1033–1036

Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. Cancer. 1998, 82 (11): 2256-2261.

Borgstrom P, Oh P, Czarny M, Racine B, Schnitzer JE. Co-implanting orthotopic tissue creates stroma microenvironment enhancing growth and angiogenesis of multiple tumors. F1000Res. 2013, 2: 129. doi: 10.12688/f1000research.2-129.v2.

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. Science. 1994, 264: 569–571.

Carmeliet P, Jain RK: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 2011, 473: 298-307

Chen H, Niu G, Wu H, Chen X. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin αvβ3. Theranostics. 2016, 6 (1): 78-92. doi: 10.7150/thno.13242.

Chen X, Park R, Hou Y, Khankaldyyan V, Gonzales-Gomez I, Tohme M, Bading JR, Laug WE, Conti PS. MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with 18F-labeled PEGylated RGD peptide. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004, 31 (8): 1081-1089. doi: 10.1007/s00259-003-1452-2.

Cher LM, Murone C, Lawrentschuk N, Ramdave S, Papenfuss A, Hannah A, O'Keefe GJ, Sachinidis JI, Berlangieri SU, Fabinyi G, Scott AM. Correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in gliomas using 18F-fluoromisonidazole, 18F-FDG PET, and immunohistochemical studies. J Nucl Med. 2006, 47 (3): 410-418.

Csige K, Szabó JP, Kálmán-Szabó I, Dénes NS, Szikra D, Képes Z, Opposits G, Méhes G, Kertész I, Fenyvesi F, Trencsényi G, Hajdu I. In vivo investigation of Gallium-68 and Bismuth-205/206 labeled beta cyclodextrin for targeted alpha therapy of prostaglandin E2 receptor-expressing tumors in mice. Int J Pharm. 2022, 625: 122132. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122132.

Dash A, Chakravarty R.: Radionuclide generators: the prospect of availing PET radiotracers to meet current clinical needs and future research demands. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2019, 9 (1): 30-66.

De Bruyne S, Van Damme N, Smeets P, Ferdinande L, Ceelen W, Mertens J, Van de Wiele C, Troisi R, Libbrecht L, Laurent S, Geboes K, Peeters M. Value of DCE-MRI and FDG-PET/CT in the prediction of response to preoperative chemotherapy with bevacizumab for colorectal liver metastases. Br J Cancer. 2012, 106 (12): 1926-1933. doi: 10.1038/bjc.2012.184.

Del Valle E.M.M. Cyclodextrins and their uses: A review. Process. Biochem. 2004, 39: 1033–1046. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9.

De Paz Linares, G.A.; Opperman, R.M.; Majumder, M.; Lala, P.K. Prostaglandin E2 Receptor 4 (EP4) as a Therapeutic Target to Impede Breast Cancer-Associated Angiogenesis and Lymphangiogenesis. Cancers 2021, 13, 942. doi:10.3390/cancers13050942

Dezso B, Rady P, Mórocz I, Varga E, Gomba S, Poulsen K and Kertai P: Morphological and immunohistochemical characteristics of dimethylnitrosamine-induced malignant mesenchymal renal tumor in F344 rats. J Cancer Res Clin Oncol 1991, 116: 372-378.

Di Matteo P, Arrigoni GL, Alberici L, Corti A, Gallo-Stampino C, Traversari C, et al. Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues. The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society. 2011, 59 (1): 47–59. doi: 10.1369/jhc.2010.956644.

Domínguez JM, Pérez-Chacón G, Guillén MJ, Muñoz-Alonso MJ, Somovilla-Crespo B, Cibrián D, Acosta-Iborra B, Adrados M, Muñoz-Calleja C, Cuevas C, Sánchez-Madrid F, Avilés P, Zapata JM. CD13 as a new tumor target for antibody-drug conjugates: validation with the conjugate MI130110. J Hematol Oncol. 2020, 13 (1): 32. doi: 10.1186/s13045-020-00865-7.

Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am J Pathol, 2007, 170: 1-15.

Edelstein MB. The Subrenal Capsule Assay: A Critical Commentary. Eur J Cancer Clin Oncol. 1986, 22: 757–760

El-Shemerly MY, Besser D, Nagasawa M, Nagamine Y. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13acetate activates the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway upstream of SOS involving serine phosphorylation of Shc in NIH3T3 cells. J Biol Chem. 1997, 272 (49): 30599-602. doi: 10.1074/jbc.272.49.30599.

Fedyk ER, Ripper JM, Brown DM, Phipps RP, A molecular analysis of PGE receptor (EP) expression on normal and transformed B lymphocytes: Coexpression of EP1, EP2, EP3 β and EP4. Mol. Immunol. 1996, 1, 33–45. doi: 10.1016/0161-5890(95)00130-1.

Flavell RR, Naeger DM, Mari AC, Hawkins RA, Pampaloni MH, Behr SC, Malignancies with low fluorodeoxyglucose uptake at PET/CT: Pitfalls and prognostic importance: resident and fellow education feature. Radiographics. 2016, 1, 293–294. doi: 10.1148/rg.2016150073.

Florea A, Mottaghy FM, Bauwens M. Molecular Imaging of Angiogenesis in Oncology: Current Preclinical and Clinical Status. Int J Mol Sci. 2021, 22 (11): 5544. doi: 10.3390/ijms22115544.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971, 285: 1182-1186.

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst. 1990, 82: 4-6.

Folkman J, Ingber D. Inhibition of angiogenesis. Semin Cancer Biol. 1992, 3: 89-96.

Furumoto S, Takashima K, Kubota K, Ido T, Iwata R, Fukuda H. Tumor detection using 18Flabeled matrix metalloproteinase-2 inhibitor. Nucl Med Biol. 2003, 30 (2): 119-125. doi: 10.1016/s0969-8051(02)00393-1.

Futakuchi M, Hirose M, Ogiso T, Kato K, Sano M, Ogawa K, et al. Establishment of an in vivo highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model. Jpn J Cancer Res. 1999, 90: 1196–1202. doi: 10.1111/j.1349-7006.1999.tb00695.x .

Futakuchi M, Ogawa K, Tamano S, Takahashi S, Shirai T. Suppression of metastasis by nuclear factor kappaB inhibitors in an in vivo lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 2004, 95: 18–24. doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03165.x

Foubert P, Varner JA. Integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. Methods Mol Biol. 2012, 757: 471-486. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6_27.

Gallamini A, Zwarthoed C, Borra A. Positron Emission Tomography (PET) in Oncology. Cancers (Basel). 2014, 6 (4): 1821-1889. doi: 10.3390/cancers6041821.

Gai Y, Jiang Y, Long Y, Sun L, Liu Q, Qin C, Zhang Y, Zeng D, Lan X. Evaluation of an Integrin $\alpha\nu\beta3$ and Aminopeptidase N Dual-Receptor Targeting Tracer for Breast Cancer Imaging. Mol Pharm. 2020, 17 (1): 349-358. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01134.

Gao Y, Wang Z, Ma X, Ma W, Zhao M, Fu T, Li G, Wang S, Wang Z, Yang W, Kang F, Wang J. The uptake exploration of 68Ga-labeled NGR in well-differentiated hepatocellular carcinoma xenografts: Indication for the new clinical translational of a tracer based on NGR. Oncol Rep. 2017, 38 (5): 2859-2866. doi: 10.3892/or.2017.5933.

Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS J. 2011, 278 (1): 16-27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.

Guo J, Higashi K, Ueda Y, Oguchi M, Takegami T, Toga H, Sakuma T, Yokota H, Katsuda S, Tonami H, Yamamoto I. Microvessel density: correlation with 18F-FDG uptake and prognostic impact in lung adenocarcinomas. J Nucl Med. 2006, 47 (3): 419-425.

Guzman-Rojas L, Rangel R, Salameh A, Edwards JK, Dondossola E, Kim YG, et al. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012, 109 (5): 1637–1642. doi: 10.1073/pnas.1120790109.

Hădărugă N.G., Bandur G.N., David I., Hădărugă D.I. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. Environ. Chem. Lett. 2018, 17: 349–373. doi: 10.1007/s10311-018-0806-8.

Hajdu I, Angyal J, Szikra D, Kertész I, Malanga M, Fenyvesi É, Szente L, Vecsernyés M, Bácskay I, Váradi J, Fehér P, Ujhelyi Z, Vasvári G, Rusznyák Á, Trencsényi G, Fenyvesi F. Radiochemical synthesis and preclinical evaluation of 68Ga-labeled NODAGA-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (68Ga-NODAGA-HPBCD). Eur J Pharm Sci. 2019, 128: 202-208. doi: 10.1016/j.ejps.2018.12.001.

Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, et al. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. Gastroenterology. 2002, 122 (2): 376–386. doi: 10.1053/gast.2002.31095.

Hevesy G.: The absorption and translocation of lead byplants. A contribution to the application of the method of radioactive indicators in the investigation of the change of substance in plants.

Biochem J 1923, 17: 439-445

Hofman MS, Hicks RJ, How we read oncologic FDG PET/CT. Cancer Imaging 2016, 16, 35. doi: 10.1186/s40644-016-0091-3.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2004, 350 (23): 2335-2342. doi: 10.1056/NEJMoa032691.

Hwang SH, Cho A, Yun M, Choi YD, Rha SY, Kang WJ. Prognostic Value of Pretreatment Metabolic Tumor Volume and Total Lesion Glycolysis Using 18F-FDG PET/CT in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Anti-Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Agents. Clin Nucl Med. 2017, 42 (5):e235-e241. doi: 10.1097/RLU.000000000001612.

Ikeda N, Nakajima Y, Tokuhara T, Hattori N, Sho M, Kanehiro H, et al. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. Clin Cancer Res. 2003, 9 (4): 1503–1508.

Isal S, Pierson J, Imbert L, Clement A, Collet C, Pinel S, Veran N, Reinhard A, Poussier S, Gauchotte G, Frezier S, Karcher G, Marie PY, Maskali F. PET imaging of 68Ga-NODAGA-RGD, as compared with 18F-fluorodeoxyglucose, in experimental rodent models of engrafted glioblastoma. EJNMMI Res. 2018, 8(1): 51. doi: 10.1186/s13550-018-0405-5.

Israel I, Elflein K, Schirbel A, Chen K, Samnick S. A comparison of the monomeric [68Ga]NODAGA-NGR and dimeric [68Ga]NOTA-(NGR)2 as aminopeptidase N ligand for positron emission tomography imaging in tumor-bearing mice. Eur J Pharm Sci. 2021, 166: 105964. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105964.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 2002, 100 (9): 3175-3182. doi: 10.1182/blood-2001-12-0207.

Kemp CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. Semin Cancer Biol. 2005, 15(6): 460-473. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.06.003.

Képes Z, Trencsényi G. Subrenal Capsule Assay - SRCA: The Promising Re-Emergence of a Long-Forgotten Method in Preclinical Nuclear Medical Cancer Diagnostics. J Cancer. 2023, 14(2): 183-192. doi: 10.7150/jca.78599.

Kessler T, Baumeier A, Brand C, Grau M, Angenendt L, Harrach S, Stalmann U, Schmidt LH, Gosheger G, Hardes J, Andreou D, Dreischalück J, Lenz G, Wardelmann E, Mesters RM, Schwöppe C, Berdel WE, Hartmann W, Schliemann C. Aminopeptidase N (CD13): Expression, Prognostic Impact, and Use as Therapeutic Target for Tissue Factor Induced Tumor Vascular Infarction in Soft Tissue Sarcoma. Transl Oncol. 2018, 11 (6): 1271-1282. doi: 10.1016/j.tranon.2018.08.004.

Khanna C, Prehn J, Yeung C, Caylor J, Tsokos M, Helman L. An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. Clin. Exp. Metastasis 2000 18, 261–271.

Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. Carcinogenesis. 2005, 26(3): 513-23. doi: 10.1093/carcin/bgh261.

Kis A, Dénes N, Szabó JP, Arató V, Jószai I, Enyedi KN, Lakatos S, Garai I, Mező G, Kertész I, Trencsényi G. In vivo assessment of aminopeptidase N (APN/CD13) specificity of different 68Ga-labelled NGR derivatives using PET/MRI imaging. Int J Pharm. 2020, 589: 119881. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119881.

Knetsch PA, Petrik M, Griessinger CM, Rangger C, Fani M, Kesenheimer C, von Guggenberg E, Pichler BJ, Virgolini I, Decristoforo C, Haubner R. [68Ga]NODAGA-RGD for imaging $\alpha\nu\beta3$ integrin expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011, 38 (7): 1303-1312. doi: 10.1007/s00259-011-1778-0.

Kuczynski EA, Vermeulen PB, Pezzella F, Kerbel RS, Reynolds AR. Vessel co-option in cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2019, 16 (8): 469-493. doi: 10.1038/s41571-019-0181-9.

Kumar CC. Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. Curr Drug Targets. 2003, 4: 123–131.

Kummar S, Shafi NQ. Metastatic hepatocellular carcinoma. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2003, 15: 288–294. doi: 10.1016/S0936-6555(03)00067-0

Lajtos I, Emri M, Kis SA,Opposits G, Potari N, Kiraly B, Nagy F, Tron L, Balkay L. Performance evaluation and optimization of the MiniPET-II scanner, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A 2013,707, 26-34.

Lala PK, Nandi P, Majumder M. Roles of Prostaglandins in Tumor-Associated Lymphangiogenesis with Special Reference to Breast Cancer. Cancer Metastasis Rev. 2018, 37, 369–384.

Li D, Zhang J, Ji N, Zhao X, Zheng K, Qiao Z, Li F, Lang L, Iagaru A, Niu G, Zhu Z, Chen X. Combined 68Ga-NOTA-PRGD2 and 18F-FDG PET/CT Can Discriminate Uncommon Meningioma Mimicking High-Grade Glioma. Clin Nucl Med. 2018, 43 (9): 648-654. doi: 10.1097/RLU.00000000002233.

Lobeek D, Rijpkema M, Terry SYA, Molkenboer-Kuenen JDM, Joosten L, van Genugten EAJ, van Engen-van Grunsven ACH, Kaanders JHAM, Pegge SAH, Boerman OC, Weijs WLJ, Merkx MAW, van Herpen CML, Takes RP, Aarntzen EHJG, Oyen WJG. Imaging angiogenesis in patients with head and neck squamous cell carcinomas by [68Ga]Ga-DOTA-E-[c(RGDfK)]2 PET/CT. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2020, 47 (11): 2647-2655. doi: 10.1007/s00259-020-04766-2.

Lorger M, Felding-Habermann B. Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. Am J Pathol. 2010, 176: 2958–2971. doi: 10.2353/ajpath.2010.090838

Luan Y, Wu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. Curr Med Chem. 2007, 14: 639-647

Ma W, Kang F, Wang Z, Yang W, Li G, Ma X, Li G, Chen K, Zhang Y, Wang J. (99m)Tclabeled monomeric and dimeric NGR peptides for SPECT imaging of CD13 receptor in tumorbearing mice. Amino Acids. 2013, 44 (5): 1337-1345. doi: 10.1007/s00726-013-1469-1.

Ma W, Wang Z, Yang W, Ma X, Kang F, Wang J. Biodistribution and SPECT imaging study of (99m)Tc labeling NGR peptide in nude mice bearing human HepG2 hepatoma. Biomed Res Int. 2014, 2014: 618096. doi: 10.1155/2014/618096.

Majumder M, Nandi P, Omar A, Ugwuagbo KC, Lala PK. EP4 as a Therapeutic Target for Aggressive Human Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2018, 19 (4): 1019. doi: 10.3390/ijms19041019.

Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. Trends Mol Med. 2008, 14 (8): 361-371. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.003.

Mohnike W, Hör G, Hertel A, Schelbert H. Interdisziplinäre PET/CT- und PET/MR-Diagnostik und Therapie 3. ergänzte und vollständig überarbeitete Auflage 2016, ISBN 978-3-662-48841-6 978-3-662-48842-3 (eBook), doi 10.1007/978-3-662-48842-3 Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, de Jong JR, Hollema H, Brouwers AH, van Dongen GA, Perk LR, Lub-de Hooge MN. In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. J Nucl Med. 2007, 48 (8): 1313-1319. doi: 10.2967/jnumed.107.041301.

Nasry WHS, Martin CK. Intersecting Mechanisms of Hypoxia and Prostaglandin E2-Mediated Inflammation in the Comparative Biology of Oral Squamous Cell Carcinoma. Front Oncol. 2021, 11: 539361. doi: 10.3389/fonc.2021.539361.

Niccoli Asabella A, Di Palo A, Altini C, Ferrari C, Rubini G. Multimodality Imaging in Tumor Angiogenesis: Present Status and Perspectives. Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 1864. doi:10.3390/ijms18091864

Oosting SF, Brouwers AH, van Es SC, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Lub-de Hooge MN, Hollema H, de Jong JR, de Jong IJ, de Haas S, Scherer SJ, Sluiter WJ, Dierckx RA, Bongaerts AH, Gietema JA, de Vries EG. 89Zr-bevacizumab PET visualizes heterogeneous tracer accumulation in tumor lesions of renal cell carcinoma patients and differential effects of antiangiogenic treatment. J Nucl Med. 2015, 56 (1): 63-9. doi: 10.2967/jnumed.114.144840.

Otsuki T, Nakashima T, Hamada H, Takayama Y, Akita S, Masuda T, Horimasu Y, Miyamoto S, Iwamoto H, Fujitaka K, Miyata Y, Miyake M, Kohno N, Okada M, Hattori N. Aminopeptidase N/CD13 as a potential therapeutic target in malignant pleural mesothelioma. Eur Respir J. 2018, 51 (5): 1701610. doi: 10.1183/13993003.01610-2017.

Ottewell PD, Coleman RE, Holen I. From genetic abnormality to metastases: murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies. Breast Cancer Res Treat. 2006, 96: 101–113. doi: 10.1007/s10549-005-9067-x

Pang L, Zhang N, Xia Y, Wang D, Wang G, Meng X. Serum APN/CD13 as a novel diagnostic and prognostic biomarker of pancreatic cancer. Oncotarget. 2016, 7 (47): 77854-77864. doi: 10.18632/oncotarget.12835.

Paragh G, Fóris G, Paragh G Jr, Seres I, Karányi Z, Fülöp P, Balogh Z, Kosztáczky B, Teichmann F, Kertai P. Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastases in rats. Cancer Lett. 2005, 222 (1): 17-22. doi: 10.1016/j.canlet.2004.09.028.

Persigehl T, Ring J, Bremer C, Heindel W, Holtmeier R, Stypmann J, Claesener M, Hermann S, Schäfers M, Zerbst C, Schliemann C, Mesters RM, Berdel WE, Schwöppe C. Non-invasive monitoring of tumor-vessel infarction by retargeted truncated tissue factor tTF-NGR using

multi-modal imaging. Angiogenesis. 2014, 17 (1): 235-246. doi: 10.1007/s10456-013-9391-4.

Petroni D, Menichetti L, Poli M. Historical and radiopharmaceutical relevance of [¹⁸F]FDG. J Radioanal Nucl Chem. 2020, 323, 1017–1031 doi: 10.1007/s10967-020-07013-y

Pirooznia N, Abdi K, Beiki D, Emami F, Arab SS, Sabzevari O, Pakdin-Parizi Z, Geramifar P. Radiosynthesis, biological evaluation, and preclinical study of a 68Ga-Labeled cyclic RGD peptide as an early diagnostic agent for overexpressed $\alpha\nu\beta3$ integrin receptors in non-small-cell lung cancer. Contrast Media Mol Imaging. 2020, 2020: 8421657. doi: 10.1155/2020/8421657.

Provost C, Rozenblum-Beddok L, Nataf V, Merabtene F, Prignon A, Talbot JN. [68Ga]RGD versus [18F]FDG PET imaging in monitoring treatment response of a mouse model of human glioblastoma tumor with Bevacizumab and/or Temozolomide. Mol Imaging Biol. 2019, 21 (2): 297-305. doi: 10.1007/s11307-018-1224-9.

Quartuccio N, Asselin MC. The Validation Path of Hypoxia PET Imaging: Focus on Brain Tumours. Curr Med Chem. 2018, 25 (26): 3074-3095. doi: 10.2174/0929867324666171116123702.

Rangel R, Sun Y, Guzman-Rojas L, Ozawa MG, Sun J, Giordano RJ, Van Pelt CS, Tinkey PT, Behringer RR, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104 (11): 4588-4593. doi: 10.1073/pnas.0611653104.

Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. Chem Rev. 1998, 30; 98 (5): 1875-1918. doi: 10.1021/cr9700150.

Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. Int J Cancer. 2001, 93 (4): 497-506. doi: 10.1002/ijc.1376.

Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. Cancers (Basel). 2010, 2 (2): 436-482. doi: 10.3390/cancers2020436.

Rüegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. Cell Mol Life Sci. 2003, 60 (6): 1135-1157. doi: 10.1007/s00018-003-2297-3.

Saida S, Watanabe K, Kato I, Fujino H, Umeda K, Okamoto S, et al. Prognostic significance of aminopeptidase-N (CD13) in hepatoblastoma. Pediatr Int. 2015, 57 (4): 558–566. doi: 10.1111/ped.12597.

Sakai Y. Subrenal Capsule Assay, a New Sensitivity Test for Antitumor Agents. Gan To Kagaku Ryoho Cancer and Chemotherapy. 1985, 12: 1535–1551

Sanduleanu S, Wiel AMAV, Lieverse RIY, Marcus D, Ibrahim A, Primakov S, Wu G, Theys J, Yaromina A, Dubois LJ, Lambin P. Hypoxia PET Imaging with [18F]-HX4-A Promising Next-Generation Tracer. Cancers (Basel). 2020, 12 (5): 1322. doi: 10.3390/cancers12051322.

Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, Leprini A, Borsi L, Castellani P, Zardi L, Neri D, Riva P. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. Clin Cancer Res. 2003, 9 (2): 571-579.

Sauer RS, Rittner HL, Roewer N, Sohajda T, Shityakov S, Brack A, Broscheit JA. A Novel Approach for the Control of Inflammatory Pain: Prostaglandin E2 Complexation by Randomly Methylated β -Cyclodextrins. Anesth Analg. 2017, 124 (2): 675-685. doi: 10.1213/ANE.00000000001674.

Schmidt LH, Brand C, Stucke-Ring J, Schliemann C, Kessler T, Harrach S, et al. Potential therapeutic impact of CD13 expression in non-small cell lung cancer. PLoS One. 2017, 12(6): e0177146. doi: 10.1371/journal.pone.0177146.

Serini G, Valdembri D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. Exp Cell Res. 2006, 312(5): 651-658. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.020.

Shi J, Wang L, Kim YS, Zhai S, Liu Z, Chen X, Liu S. Improving tumor uptake and excretion kinetics of 99mTc-labeled cyclic arginine-glycine-aspartic (RGD) dimers with triglycine linkers. J Med Chem. 2008, 51 (24): 7980-7990. doi: 10.1021/jm801134k.

Shimizu T, Tani K, Hase K, Ogawa H, Huang L, Shinomiya F, Sone S. CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2002, 46 (9): 2330-2338. doi: 10.1002/art.10517.

Strauss LG, Koczan D, Klippel S, Pan L, Cheng C, Willis S, Haberkorn U, Dimitrakopoulou-Strauss A. Impact of angiogenesis-related gene expression on the tracer kinetics of 18F-FDG in colorectal tumors. J Nucl Med. 2008, 49 (8): 1238-1244. doi: 10.2967/jnumed.108.051599.

Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. Toxicol Pathol. 2008, 36 (1): 30-42. doi: 10.1177/0192623307310945.

Stieb S, Eleftheriou A, Warnock G, Guckenberger M, Riesterer O. Longitudinal PET imaging of tumor hypoxia during the course of radiotherapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2018, 45 (12): 2201-2217. doi: 10.1007/s00259-018-4116-y.

Takahashi T, Uehara H, Ogawa H, Umemoto H, Bando Y, Izumi K. Inhibition of EP2/EP4 signaling abrogates IGF-1R-mediated cancer cell growth: involvement of protein kinase C- θ activation. Oncotarget. 2015, 6 (7): 4829-4844. doi: 10.18632/oncotarget.3104.

Tait CR, Dodwell D, Horgan K. Do metastases metastasize? J Pathol. 2004, 203 (1): 515-518. doi: 10.1002/path.1544.

Tijink BM, Perk LR, Budde M, Stigter-van Walsum M, Visser GW, Kloet RW, Dinkelborg LM, Leemans CR, Neri D, van Dongen GA. (124)I-L19-SIP for immuno-PET imaging of tumour vasculature and guidance of (131)I-L19-SIP radioimmunotherapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009, 36 (8): 1235-1244. doi: 10.1007/s00259-009-1096-y.

Tong D, Liu Q, Wang LA, Xie Q, Pang J, Huang Y, Wang L, Liu G, Zhang D, Lan W, Jiang J. The roles of the COX2/PGE2/EP axis in therapeutic resistance. Cancer Metastasis Rev. 2018, 37 (2-3): 355-368. doi: 10.1007/s10555-018-9752-y.

Tornesello AL, Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. New Insights in the Design of Bioactive Peptides and Chelating Agents for Imaging and Therapy in Oncology. Molecules. 2017, 22 (8): 1282. doi: 10.3390/molecules22081282.

Trencsenyi G, Kertai P, Bako F, Hunyadi J, Marian T, Hargitai Z, Pocsi I, Muranyi E, Hornyak L, Banfalvi G. Renal capsule-parathymic lymph node complex: a new in vivo metastatic model in rats. Anticancer Res. 2009, 29 (6): 2121-2126.

Trencsenyi G, Marian T, Bako F, Emri M, Nagy G, Kertai P, Banfalvi G. Metastatic hepatocarcinoma he/de tumor model in rat. J Cancer. 2014, 5 (7): 548-558. doi: 10.7150/jca.9315.

Trencsényi G, Kis A, Szabó JP, Ráti Á, Csige K, Fenyvesi É, Szente L, Malanga M, Méhes G, Emri M, Kertész I, Vecsernyés M, Fenyvesi F, Hajdu I. In vivo preclinical evaluation of the new 68Ga-labeled beta-cyclodextrin in prostaglandin E2 (PGE2) positive tumor model using positron emission tomography. Int J Pharm. 2020, 576: 118954. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118954.

Uzvolgyi E, Katona A, Kertai P. Tumor Cell Implantation with the Use of Gelaspon® Gelatin Sponge Disc. Cancer Lett. 1990, 51: 1–5 Wang D, Mann JR, DuBois RN. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. Gastroenterology. 2005, 128 (5):1445-61. doi: 10.1053/j.gastro.2004.09.080.

Wang JH, Kiess AP. PSMA-targeted therapy for non-prostate cancers. Front Oncol. 2023, 13: 1220586. doi: 10.3389/fonc.2023.1220586.

Wang X, Parvathaneni V, Shukla SK, Kanabar DD, Muth A, Gupta V. Cyclodextrin Complexation for Enhanced Stability and Non-invasive Pulmonary Delivery of Resveratrol-Applications in Non-small Cell Lung Cancer Treatment. AAPS PharmSciTech. 2020, 21 (5): 183. doi: 10.1208/s12249-020-01724-x.

Wankar J, Kotla NG, Gera S, Rasala S, Pandit A, Rochev YA. Recent advances in host–guest self-assembled cyclodextrin carriers: Implications for responsive drug delivery and biomedical engineering. Adv. Funct. Mater. 2020, 30: 1909049. doi: 10.1002/adfm.201909049

Weber WA. Positron emission tomography as an imaging biomarker. J Clin Oncol. 2006, 24 (20): 3282-3292. doi: 10.1200/JCO.2006.06.6068.

Wester HJ. Nuclear imaging probes: from bench to bedside. Clin Cancer Res. 2007, 13 (12): 3470-3481. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0264.

Wilder RL. Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. Ann Rheum Dis. 2002, 61 Suppl 2: ii96-9. doi: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii96.

Xin X, Majumder M, Girish GV, Mohindra V, Maruyama T, Lala PK. Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model. Lab Invest. 2012, 92(8): 1115-1128. doi: 10.1038/labinvest.2012.90.

Xu L, Stevens J, Hilton MB, Seaman S, Conrads TP, Veenstra TD, Logsdon D, Morris H, Swing DA, Patel NL, Kalen J, Haines DC, Zudaire E, St Croix B. COX-2 inhibition potentiates antiangiogenic cancer therapy and prevents metastasis in preclinical models. Sci Transl Med. 2014, 6 (242): 242ra84. doi: 10.1126/scitranslmed.3008455.

Yoshimoto M, Kinuya S, Kawashima A, Nishii R, Yokoyama K, Kawai K. Radioiodinated VEGF to image tumor angiogenesis in a LS180 tumor xenograft model. Nucl Med Biol. 2006, 33 (8): 963-969. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2006.08.006.

Zhang Q, Wang J, Zhang H, Zhao D, Zhang Z, Zhang S. Expression and clinical significance of aminopeptidase N/CD13 in non-small cell lung cancer. J Cancer Res Ther. 2015, 11 (1): 223–228. doi: 10.4103/0973-1482.138007.

Zheng S, Chen Z, Huang C, Chen Y, Miao W. [99mTc]3PRGD2 for integrin receptor imaging of esophageal cancer: a comparative study with [18F]FDG PET/CT. Ann Nucl Med. 2019, 33 (2): 135-143. doi: 10.1007/s12149-018-1315-3.

9 Tárgyszavak

Aminopeptidáz N, Angiogenezis, [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR), Metasztázis, NGR peptid, Pozitron Emissziós Tomografia, ⁶⁸Ga; ciklodextrin, prostaglandin E2

10 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Berényi Ervin intézetvezetőnek és Dr. Trencsényi György tanszékvezetőnek a lehetőséget hogy elkészíthettem a PhD dolgozatom az Orvosi Képalkotó Klinika Nukleáris Medicina Tanszékén.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Trencsényi Györgynek a PhD tanulmányaim során nyújtott útmutatásért és támogatásért.

Köszönet illeti Prof. Dr. Mező Gábort és amunkacsoportját az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportot, amiért az cNGR peptidet a rendelkezésünkre bocsájtották.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Méhes Gábornak a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Patológiai Intézet vezetőjének és Beke Líviának az immunhisztokémiai festésekért illetve Dr. Matolay Orsolyának a Western blot mérésekért.

És természetesen külön köszönet illeti a Nukleáris Medicina Intézet minden munkatársát ezen belül kiemelten a közvetlen kollegáimat, Dr. Arató Viktóriát, Dr. Kis Adriennt, Nagy Tamást a segítségükért és az általuk nyújtott támogatásért.

Végül de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak a türelmet és a támogatást.

11 Függelék



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: Tárgy: DEENK/439/2023.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Péli-Szabó Judit Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Péli-Szabó, J., Csige, K., Kálmán-Szabó, I., Arató, V. Z., Opposits, G., Jószai, I., Kertész, I., Képes, Z., Méhes, G., Fenyvesi, F., Hajdu, I., Trencsényi, G.: In vivo assessment of tumor targeting potential of 68Ga-labelled randomly methylated beta-cyclodextrin (RAMEB) and 2hydroxypropyl-[béta]-cyclodextrin (HPβCD) using positron emission tomography. *Int. J. Pharm.* 630, 1-8, 2023. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122462 IF: 5.8 (2022)
- Péli-Szabó, J., Dénes, N., Arató, V. Z., Rácz, S., Kis, A., Opposits, G., Képes, Z., Hajdu, I., Jószai, I., Emri, M., Kertész, I., Mező, G., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Neo-angiogenesis of Transplanted Metastases in Subrenal Capsule Assay Induced Rat Model. *In Vivo.* 36 (4), 1667-1675, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.21873/invivo.12878 IF: 2.3

További közlemények

Xálmán-Szabó, I., Bunda, S., Lihi, N., Szaniszló, Z., Szikra, D. P., Péli-Szabó, J., Fekete, A., Gyuricza, B., Szücs, D., Papp, G., Trencsényi, G., Kálmán, F. K.: 61Cu-Labelled radiodiagnostics of melanoma with NAPamide-targeted radiopharmaceutical. *Int. J. Pharm.* 632, 1-9, 2023.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122527
 IF: 5.8 (2022)

4. Csíkos, C., Vágner, A., Nagy, G., Kálmán-Szabó, I., Péli-Szabó, J., Ngo, M. T., Szoboszlai, Z., Szikra, D. P., Krasznai, Z. T., Trencsényi, G., Garai, I.: In Vivo Preclinical Assessment of the VEGF Targeting Potential of the Newly Synthesized [52Mn]Mn-DOTAGA-Bevacizumab Using Experimental Cervix Carcinoma Mouse Model. *Diagnostics*. *13* (2), 236-, 2023. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics13020236 IF: 3.6 (2022)



- 5. Képes, Z., Arató, V. Z., Péli-Szabó, J., Gyuricza, B., Szücs, D., Hajdu, I., Fekete, A., Bruchertseifer, F., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: Therapeutic Performance Evaluation of 213Bi-Labelled Aminopeptidase N (APN/CD13)-Affine NGR-Motif ([213Bi]Bi-DOTAGAcKNGRE) in Experimental Tumour Model: a Treasured Tailor for Oncology. *Pharmaceutics. 15* (2), 1-15, 2023. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15020491 IF: 5.4 (2022)
- 6. Kohler, Z. M., Trencsényi, G., Juhász, L., Zvara, Á., Péli-Szabó, J., Dux, L., Puskás, L. G., Rovó,
 L., Keller-Pintér, A.: Tilorone increases glucose uptake in vivo and in skeletal muscle cells by enhancing Akt2/AS160 signaling and glucose transporter levels. *J. Cell. Physiol.* 238 (5), 1080-1094, 2023.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1002/jcp.30998
 IF: 5.6 (2022)
- 7. Képes, Z., Barkóczi, A., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Arató, V. Z., Garai, I., Árkosy, P., Jószai, I., Deák, Á., Kertész, I., Hajdu, I., Trencsényi, G.: In Vivo Assessments of Mesoblastic Nephroma (Ne/De) and Myelomonoblastic Leukaemia (My1/De) Tumour Development in Hypercholesterolemia Rat Models. *Int. J. Mol. Sci. 23* (21), 1-16, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms232113060 IF: 5.6
- 8. 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/Reperfusionmediated 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
- 9. Csige, K., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Dénes, N., Szikra, D. P., Képes, Z., Opposits, G., Méhes, G., Kertész, I., Fenyvesi, F., Trencsényi, G., Hajdu, I.: In vivo investigation of Gallium-68 and Bismuth-205/206 labeled beta cyclodextrin for targeted alpha therapy of prostaglandin E2 receptor-expressing tumors in mice. *Int. J. Pharm.* 625, 1-10, 2022.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122132
- Képes, Z., Barkóczi, A., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Arató, V. Z., Jószai, I. Deák, Kertész, I., Hajdu, I., Trencsényi, G.: In Vivo Preclinical Assessment of β-Amyloid-Affin [11C]C-PIB Accumulation in Aluminium-Induced Alzheimer's Disease-Resembling Hypercholesterinaemic Rat Model. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1-14, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms232213950 IF: 5.6



- 11. Kálmán-Szabó, I., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Dénes, N., Opposits, G., Jószai, I., Kertész, I., Képes, Z., Fekete, A., Szikra, D. P., Hajdu, I., Trencsényi, G.: PET Probes for Preclinical Imaging of GRPR-Positive Prostate Cancer: comparative Preclinical Study of [68Ga]Ga-NODAGA-AMBA and [44Sc]Sc-NODAGA-AMBA. Int. J. Mol. Sci. 23 (17), 1-17, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms231710061 IF: 5.6
- 12. Szücs, D., Csupász, T., Péli-Szabó, J., Kis, A., Gyuricza, B., Arató, V. Z., Forgács, V., Vágner, A., Nagy, G., Garai, I., Szikra, D. P., Tóth, I., Trencsényi, G., Tircsó, G., Fekete, A.: Synthesis, physicochemical, labeling and in vivo characterization of a DO3AM-based hypoxia sensitive 44Sc-labeled PET probe. Pharmaceuticals (Basel). 15 (6), 1-16, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/ph15060666 IF: 4.6
- 13. Gyuricza, B., Szűcs, Á., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Képes, Z., Szücs, D., Szikra, D. P., Trencsényi, G., Fekete, A.: The Synthesis and Preclinical Investigation of Lactosamine-Based Radiopharmaceuticals for the Detection of Galectin-3-Expressing Melanoma Cells. Pharmaceutics. 14, 1-16, 2022. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14112504 IF: 5.4
- 14. Kis, A., Dénes, N., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Beke, L., Matolay, O., Enyedi, K. N., Méhes, G., Mező, G., Bai, P., Kertész, I., Trencsényi, G.: In Vivo Molecular Imaging of the Efficacy of Aminopeptidase N (APN/CD13) Receptor Inhibitor Treatment on Experimental Tumors Using 68Ga-NODAGA-c(NGR) Peptide. BioMed Res. Inter. 2021, 1-11, 2021. DOI: https://doi.org/10.1155/2021/6642973 IF: 3.246
- 15. Dénes, N., Kis, A., Péli-Szabó, J., Jószai, I., Hajdu, I., Arató, V. Z., Enyedi, K. N., Mező, G., Hunyadi, J., Trencsényi, G., Kertész, I.: In vivo preclinical assessment of novel 68Ga-labelled peptides for imaging of tumor associated angiogenesis using positron emission tomography imaging. BRECENI

Appl. Radiat. Isot. 174, 1-10, 2021. IF: 1.787

16. Gyuricza, B., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Dénes, N., Szűcs, Á., Berta, K., Kis, ASzücs Forgács, V., Szikra, D. P., Kertész, I., Trencsényi, G., Fekete, A.: Synthesis of 68Ga-Labeled cNGR-Based Glycopeptides and In Vivo Evaluation by PET Imaging. Pharmaceutics. 13 (12), 1-14, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13122103 IF: 6.525



- 17. Gyuricza, B., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Szücs, D., Vágner, A., Szikra, D. P., Fekete, A.: Synthesis of Novel, Dual-Targeting 68Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]2 Glycopeptide as a PET Imaging Agent for Cancer Diagnosis. *Pharmaceutics.* 13 (6), 1-13, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13060796 IF: 6.525
- Skaliczki, M., Lukács, B., Magyar, Z. É., Kovács, T., Bárdi, M., Novák, S., Diszházi, G., Sárközi, S., Márton, I., Péli-Szabó, J., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: 4-chloro-orto-cresol activates ryanodine receptor more selectively and potently than 4-chloro-meta-cresol. *Cell Calcium.* 88, 102213, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102213 IF: 6.817
- Kis, A., Dénes, N., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Jószai, I., Enyedi, K. N., Rácz, S., Garai, I., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo assessment of aminopeptidase N (APN/CD13) specificity of different 68 Ga-labelled NGR derivatives using PET/MRI imaging. *Int. J. Pharm.* 589, 1-11, 2020.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119881
 IF: 5.875
- 20. Kis, A., Péli-Szabó, J., Dénes, N., Vágner, A., Nagy, G., Garai, I., Fekete, A., Szikra, D. P., Hajdu, I., Matolay, O., Méhes, G., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo Imaging of Hypoxia and Neoangiogenesis in Experimental Syngeneic Hepatocellular Carcinoma Tumor Model Using Positron Emission Tomography. *Biomed Res. Int. 2020*, 1-10, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.1155/2020/4952372 IF: 3.411
- 21. Trencsényi, G., Kis, A., Péli-Szabó, J., Ráti, Á., Csige, K., Fenyvesi, É., Szente, L., Malanga, M., Méhes, G., Emri, M., Kertész, I., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Hajdu, I.: In vivo preclinical evaluation of the new 68Ga-labeled beta-cyclodextrin in prostaglandin E2 (PGE2) positive tumor model using positron emission tomography. *Int. J. Pharm.* 576, 1-35, 2020.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118954
 IF: 5.875
- Forgács, V., Németh, E., Gyuricza, B., Kis, A., Péli-Szabó, J., Mikecz, P., Mátyus, P., Helves, Z., Horváth, Á. I., Kálai, T., Trencsényi, G., Fekete, A., Szikra, D. P.: Radiosynthesis and preclinical investigation of 11C labelled 3-(4,5- diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime ([11C]SZV 1287). ChemMedChem. 15 (24), 2470-2476, 2020.

DOI: http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202000389 IF: 3.466



- Magyar, Z. É., Diszházi, G., Péli-Szabó, J., Szentesi, P., Collet, C., Csernoch, L., Nánási, P. P., Almássy, J.: The diamide insecticide chlorantraniliprole increases the single-channel current activity of the mammalian skeletal muscle ryanodine receptor. *Gen. Physiol. Biophys.* 38 (2), 183-186, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2019007 IF: 1.07
- Seddik, U., Aglan, H., Trencsényi, G., Péli-Szabó, J., Kertész, I., Kandil, S. A.: Rapid radiosynthesis of two [18F]-labeled nicotinamide derivatives for malignant melanoma imaging.
 Appl. Radiat. Isot. 132, 142-146, 2018.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.12.004

IF: 1.343

- Trencsényi, G., Dénes, N., Nagy, G., Kis, A., Vida, A., Farkas, F., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hunyadi, J., Kertész, I.: Comparative preclinical evaluation of 68Ga-NODAGA and 68Ga-HBED-CC conjugated procainamide in melanoma imaging. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 139, 54-64, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.049 IF: 2.831
- 26. Kertész, I., Vida, A., Nagy, G., Emri, M., Farkas, A., Kis, A., Angyal, J., Dénes, N., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Bai, P., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Experimental Melanoma Tumors Using The Novel Radiotracer 68Ga-NODAGA-Procainamide (PCA). *J. Cancer.* 8 (5), 774-785, 2017.
 DOI: http://dx.doi.org/10.7150/jca.17550
 IF: 3.249
- 27. Nagy, G., Dénes, N., Kis, A., Péli-Szabó, J., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hajdu, I., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: Preclinical evaluation of melanocortin-1 receptor (MC1-R) specific 68 Gaand 44 Sc-labeled DOTA-NAPamide in melanoma imaging. *Eur. J. Pharm. Sci. 106*, 336-344, 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.026
 IF: 3.466

 Trencsényi, G., Kertész, I., Krasznai, Z. T., Máté, G., Szalóki, G., Péli-Szabó, J., Kárpáti, Levi Krasznai, Z., Márián, T., Goda, K.: 2' [18F]-fluoroethylrhodamine B is a promising radiotracer to measure P-glycoprotein function. *Eur. J. Pharm. Sci.* 74, 27-35, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.026 IF: 3.773



29. Krasznai, Z. T., Trencsényi, G., Krasznai, Z., Mikecz, P., Nizsalóczki, E., Szalóki, G., Péli-Szabó, J., Balkay, L., Márián, T., Goda, K.: 18FDG a PET tumor diagnostic tracer is not a substrate of the ABC transporter P-glycoprotein. *Eur. J. Pharm. Sci.* 64C, 1-8, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.08.002
IF: 3.35

30. Krasznai, Z. T., Péli-Szabó, J., Németh, E., Balkay, L., Szabó, G., Goda, K., Galuska, L., Trón, L., Major, T., Hernádi, Z.: Paclitaxel modifies the accumulation of tumor-diagnostic tracers in different ways in P-glycoprotein-positive and negative cancer cells. *Eur. J. Pharm. Sci. 28* (3), 249-256, 2006.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2006.02.006
IF: 2.482

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 128,491 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,1

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

Debrecen, 2023.09.28.

