

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Targetspezifikus nyomjelzők alkalmazása experimentális nőgyógyászati tumormodellek *in vivo* onkonukleáris képalkotásában

Dr. Sass Tamás

Témavezető: Dr. Képes Zita, PhD



DEBRECENI EGYETEM
Orvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2026

Targetspezifikus nyomjelzők alkalmazása experimentális nőgyógyászati tumormodellek *in vivo* onkonukleáris képalkotásában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Sass Tamás, okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola
(Elméleti immunológia és allergológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Képes Zita, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Molnár Szabolcs, PhD
Dr. Ritter Zsombor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szegedi Andrea, akadémikus
tagok: Dr. Molnár Szabolcs, PhD
Dr. Ritter Zsombor, PhD
Dr. Kiss Rita, PhD
Dr. Óvári Ignác, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2026. szeptember 24. 13:00

1 Bevezetés

A rosszindulatú daganatos megbetegedések előfordulásának folyamatos növekedése világszerte súlyosbodó egészségügyi problémát jelent. A WHO (World Health Organization) 2022-2024-es becslései alapján 2022-ben közel 10 millió daganat okozta halálesetet és 20 millió új tumoros megbetegedést regisztráltak, mely érték 2050-re várhatóan 77%-kal, 35 millióra emelkedik. Az európai országok közül Magyarország a daganatos megbetegedések statisztikái szempontjából különösen kedvezőtlen helyen áll. A GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) 2022-es adatai szerint Magyarországon a malignus betegségek 100 000 főre jutó éves incidenciája körülbelül 340, míg a halálozás közel 140. Hazánkban a daganatos megbetegedések közül a nőgyógyászati malignus betegségek beleértve az emlő-, cervix- és ováriumtumороkat kimagasló előfordulási gyakorisággal jellemezhetők és jelentős halálóki tényezőt képviselnek. 2012-ben és 2017-ben az Európai Unióban Magyarországon regisztrálták a legmagasabb női emlőrák okozta halálozást, és ez a szám jelenleg is a legmagasabb (OECD Country Cancer Profile 2025 Hungary). A cervixtumороk 2023-ban regisztrált évi 1251 új esettel és 482 halálozással (ICO/IARC), az ováriumtumороk pedig 1012 frissen felfedezett esettel és 702 daganat miatt bekövetkező halálozással szintén magas kockázatú helyen állnak a hazai statisztikában (GLOBOCAN, 2022).

Figyelembe véve a kedvezőtlen adatokat, a daganatos elváltozások korai és pontos felismerése kulcsfontosságú a mielőbbi, hatékony terápia megkezdése érdekében. Az időben elindított célzott kezelés a betegek túlélési esélyeinek javítása mellett hosszú távon jelentős, kedvező egészségügyi, társadalmi, valamint szociális következményekkel is bír. A mindennapi onkológiai diagnosztikában az egyik leggyakrabban alkalmazott képalkotó eljárás a különböző radiofarmakonokkal végzett pozitronemissziós tomográfia (PET/positron emission tomography). Ez a non-invazív, funkcionális leképezési technika lehetővé teszi a primer elváltozások és az áttétek pontos azonosítását, és ezáltal a terápia szempontjából döntő fontosságú stádium meghatározását.

A daganatok kialakulása és progressziója egy többlépcsős, komplex folyamat, melyben a hipoxia és az angiogenezis, azaz az új erek kialakulása központi szerepet töltenek be. Az új erek képződése biztosítja a daganatok megfelelő oxigén- és tápanyagellátását, ezért a neoangiogenezis elengedhetetlen a malignus elváltozások fennmaradásához és növekedéséhez. A tumorok mikrokörnyezetében kialakuló hipoxia aktiválja az érújdonképződési folyamatokat, így elősegíti a tumorok növekedését, és a metasztázisok kialakulását. A hipoxia és az angiogenezis tehát szoros kapcsolatban álló, karcinogenezis szempontjából meghatározó

tumorbiológiai tényezők, ennél fogva a hipoxiaszelektív, illetve az angiogenezis biomarkereit targetáló specifikus nyomjelzők fejlesztése és *in vivo* vizsgálata ígéretes irányt képvisel az onkológiai diagnosztikai hatékonyság növelésében.

Az utóbbi években, az angiogén biomarkerek közé tartozó prosztaglandin E2 (PGE2) az izotópdiagnosztikai kutatások középpontjába került. A ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim által termelt bioaktív lipid számos jelátviteli út aktiválása révén serkenti a tumor-asszociált angiogenezist, és ezáltal a tumorok életben maradását, proliferációját és szervezeten belüli terjedését. Korábbi kutatások igazolták, hogy a glükóz alapú ciklodextrin molekulák, például a random metilezett béta-ciklodextrin (RAMEB) nagy affinitással kötődnek a PGE2-höz, így a radioaktívan jelzett ciklodextrinek kiemelkedő vektorok lehetnek a tumoros érújdonképződés non-invazív megjelenítésében. Továbbá, az érújdonképződés és a hipoxia közötti szoros összefüggés következtében a daganatokban kialakuló csökkent oxigenizáció PET-alapú vizsgálata szintén értékes eszköz az angiogenezis *in vivo* kimutatásában. A tumoros hipoxia detektálására az onkológiai PET vizsgálatok során leggyakrabban használt 2-[¹⁸F]fluoro-2-dezoxi-glükóz ([¹⁸F]FDG) is alkalmazható, azonban tekintettel a nyomjelző nem specifikus karakterére, a szöveti oxigénhiány szelektív kimutatására képes radiojelzett nitroimidazol (NI)-származékokkal ([¹⁸F]FAZA/¹⁸F-jelölt fluoroazomicin arabinozid) történő leképezés pontosabb képet nyújt. A hipoxia/angiogenezis célpontú képalkotás a diagnosztikai pontosság növelésén keresztül elősegíti a megfelelő terápiás döntéshozatalt, melynek szerepe a betegek túlélése szempontjából vitathatatlan. Továbbá, a targetspecifikus radiofarmakonok alkalmazásával lehetőség nyílik a karcinogenezis hátterében álló molekuláris mechanizmusok mélyebb megértésére, mely a jövőben újabb diagnosztikai és terápiás targetek azonosításához vezethet.

Mindezek alapján, kutatásunk célja angiogenezist targetáló, radioaktív ciklodextrin-származékok (*gallium-68 izotóppal jelzett hidroxipropil-béta-ciklodextrin ([⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és random metilezett béta-ciklodextrin ([⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB)) és hipoxiaspecifikus radiofarmakonok *in vivo* diagnosztikai képességének a tanulmányozása különböző típusú experimentális nőgyógyászati tumorokon PET technika alkalmazásával.*

2 Célkitűzések

A fentiek alapján feltételeztük, hogy a radioaktív ciklodextrin-származékok alkalmas molekuláris vektorok lehetnek a tumor-asszociált angiogén folyamatok *in vivo* detektálására emlőtumorokban. Ennélfogva, kutatásunk első részében célul tűztük ki:

1. a ^{68}Ga -jelölt RAMEB és HP β CD molekulák (^{68}Ga]-Ga-NODAGA-HP β CD és ^{68}Ga]-Ga-DOTAGA-RAMEB) angiogenezis kimutatására való diagnosztikai teljesítményének értékelését, valamint

2. a két ciklodextrin-alapú radiofarmakon diagnosztikai képességének és tumorfelvételi sajátosságainak összehasonlítását HER2+ MDA-MB-HER2+ és tripla-negatív 4T1 emlőtumorok preklinikai modelljeiben PET képalkotással.

Kutatásunk további részében vizsgáltuk, hogy az ^{18}F]-FAZA PET és az ^{18}F]-FDG PET képalkotás kombinált használata képes-e az ^{18}F]-FDG önmagában történő alkalmazásából eredő nem specifikusság csökkentésére a tumorhipoxia kimutatásában. Ennek érdekében célul tűztük ki:

3. az ^{18}F]-FAZA és ^{18}F]-FDG nyomjelzők felvételi mintázatainak összehasonlítását különböző biológiai viselkedésű - multidrog-rezisztens (P-glikoprotein pozitív/Pgp+) és multidrog-szenzitív (P-glikoprotein negatív/Pgp-) - humán ovárium- és cervixkarcinóma xenograftokat hordozó súlyos kombinált immunhiányos egérmodellekben (ovárium: Pgp-A2780 és Pgp+ A2780AD; cervix: Pgp- KB-3-1 és Pgp+ KB-V-1).

4. az ^{18}F]-FDG hipoxia azonosítására való hatékonyságának tanulmányozását, valamint az oxigénhiány glükózmetabolizmusra gyakorolt hatásainak vizsgálatát *in vitro* körülmények között.

Preklinikai eredményeink hozzájárulhatnak a malignus elváltozások biológiai viselkedésének részletesebb megértéséhez, ami hosszú távon megteremtheti a személyre szabott daganatdiagnosztika és terápia döntéshozatal alapjait.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Radiofarmakonok

3.1.1 [¹⁸F]FDG szintézise

A radiojelölt glükózmolekulát napi szinten szintetizálják a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Képalkotó Intézet, Nukleáris Medicina Tanszékén az onkológiai betegek [¹⁸F]FDG PET/CT vizsgálatainak kivitelezése céljából. A radiojelzéshez szükséges ¹⁸F⁻ iont ciklotronban hozzák létre ¹⁸O-dúsított víz felhasználásával. Ezt követően a ¹⁸F⁻ iont automatizált FDG gyártó panelre teszik, ahol a prekursor (vízmentes acetonitrilben oldott trifluormetánszulfonil-β-D-mannóz (TATM)) radiojelölése nukleofil szubsztitúció révén történik. A nukleofil szubsztitúció 85 °C-on történik, terméke a 1,3,4,6(TA-[¹⁸F]FDG). Ez a molekula védő acetilcsoportokat hordoz, melyeket savas közegű hidrolízissel távolítanak el sósav alkalmazásával. A hidrolízis magas – 120 °C - hőmérsékleten és nagy nyomás alatt történik. A szintézis végterméke a 2-[¹⁸F]fluor-β-D-dezoxi-glükóz, amit fiziológiás sóoldattal hígítanak a megfelelő koncentrációra.

3.1.2 [¹⁸F]FAZA szintézise

A [¹⁸F]FAZA előállítása *Képes és munkatársai (2024)* által leírt módszer alapján Tanszékünkön történt.

A ciklotronban előállított radionuklidot Sep-Pak Accell Plus QMA gyantán immobilizáltuk, majd 15 mg Kryptofix 2.2.2. és 3,5 mg K₂CO₃ vizes/acetonitriles oldatával a reakcióedénybe juttattuk. A víz eltávolítása céljából az elegyet csökkentett nyomáson és emelt hőmérsékleten beszárítottuk, majd 5 mg prekursor (1-(2,3-diacetil-5-tozil-α-d-arabinofuranozil)-2-nitroimidazol) 1 mL dimetil-szulfoxidban feloldva adtuk hozzá. A reaktort 100 °C-ra fűtöttük és 5 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk. A rendszert 40 °C-ra lehűtöttük, és a reakcióelegyet 2 percig NaOH oldattal (1 mL, 0,1 M) hidrolizáltuk, majd 0,1 M-os esetsavval semlegesítettük. Ezután a nyers reakcióelegyet egy Macherey-Nagel szilárd fázisú extrakció (SPE/solid phase extraction) oszlopsorozaton vezettük át, ami egy kationcserélő (PS-H⁺, nagy), egy anioncserélő (2 db Chromafix PS-OH⁻, nagy), egy semleges alumínium-oxid (Alox N, nagy) és egy fordított fázisú (2 db HR-P, nagy) oszlopból épült fel. Az oszlopsort előzetesen 10 mL EtOH-val aktiváltuk, és 25 mL steril és bakteriális endotoxintól mentes vízzel mostuk át. A [¹⁸F]FAZA-t végül 12 mL 15%-os etanol felhasználásával nyertük ki és 1,7 mL 10%-os NaCl-ot, illetve 0,7 mL 1M NaH₂PO₄-ot tartalmazó gyűjtőfiolába

gyűjtöttük. A radiokémiai tisztaságot radiodetektorral kombinált nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC/high-performance liquid chromatography) ellenőriztük.

3.1.3 [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD szintézise

A prekursor vegyületet (NODAGA-HPβCD) *Hajdu és munkatársai (2019)* hozták létre a 6-Deoxy-6-monoamino-(2-hidroxipropil)-β-ciklodextrin (NH₂-HPβCD, (Cyclolab Kft. Budapest, Magyarország)) és a p-NCS benzil-NODA-GA (NODAGA, (CheMatech, Dijon, Franciaország)) konjugációjával. A prekursor vegyület ⁶⁸Ga radiojelzéséhez a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátort ultra tiszta HCl oldattal (5 mL, 0,1 M) eluáltuk. Ezt követően a legnagyobb mennyiségben aktív anyagot tartalmazó frakcióból 1,2 mL-t nátrium-acetáttal puffereltünk (1M, 170 μL, pH = 4). NaOH oldat (2%, 59 μL) alkalmazásával a minta pH értékét 4,2-re állítottuk. Ezután a keverékhez 20 μL prekursor törzsoldatot (1 mM) adtunk. Tizenöt perc 95 °C-os inkubációt követően a mintát felvittük a Light C18 Sep-Pak oszlopra (Waters, Milford, Massachusetts, USA). A puffer eltávolításához az oszlopot 2 mL vízzel mostuk. A létrehozott végterméket ([⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD) EtOH (96%, 0,5 mL)/izotóniás NaCl oldat 1:2 arányú elegyének segítségével eluáltuk. Az etanoltartalom 10% alá történő csökkentése céljából a terméket 0,9%-os NaCl oldat felhasználásával hígítottuk. Az *in vivo* kísérleteket megelőzően a produktumot sterilre szűrtük. A radiokémiai tisztaságot HPLC-vel határoztuk meg.

3.1.4 [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szintézise

A ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátorból kinyert ⁶⁸Ga eluátumot (1 mL) 1M 160 μL nátrium-acetáttal puffereltük az optimális pH-érték beállítása céljából (pH = 4,3-4,5). Ehhez adtuk hozzá a DOTAGA-RAMEB vizes oldatát (5 μL, 3 mM). A mintát 10 percen keresztül 95 °C-on állni hagytuk, majd a Light C18 Sep-Pak oszlopra juttattuk. A ⁶⁸Ga izotóppal radiojelölt végterméket ([⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB) EtOH (96%)/izotóniás NaCl oldat 1:2 arányú keverékével eluáltuk. A radiokémiai tisztaságot radiodetektorral kombinált fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (RP-HPLC/reversed-phase high-performance liquid chromatography) segítségével határoztuk meg. Az etanoltartalom 10% alá történő csökkentése miatt a produktumot 0,9%-os NaCl oldat felhasználásával hígítottuk. Végül, az *in vivo* alkalmazás előtt a végterméket sterilre szűrtük.

3.2 *In vitro* kísérletes módszerek

3.2.1 Alkalmazott sejtvonalak, sejtenyésztés

3.2.1.1 MDA-MB-HER2+ sejtek

Az MDA-MB-HER2+ emlőrák sejteket az American Type Culture Collection-től (ATCC, Manassas, VA, USA) vásároltuk, és a disztribútor ajánlásai szerint kerültek tenyésztésre. A sejteket 10% hőinaktivált magzati szarvasmarha szérumot (FBS, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)) és 1% antibiotikum oldatot tartalmazó Dulbecco-féle módosított Eagle táptalajban (DMEM + GlutaMAXTM-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)) tenyésztettük. A sejtvonalat T-75 sejtenyésztő flasksokban (12 mL tápoldat) 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban tartottuk (ESCO CCI-170B-8 inkubátor Esco Micro Pte. Kft., Szingapúr). A sejteket 80%-os konfluencia elérését követően hetente három alkalommal passzáltuk és körülbelül 5-8 passzálást követően használtuk fel az *in vivo* vizsgálatokhoz. A transzplantációt megelőzően a sejtek életképességét tripánkéék exklúziós teszttel határoztuk meg, majd pontosan beállítottuk a tumorindukcióhoz szükséges sejtkoncentrációt.

3.2.1.2 4T1 sejtek

A 4T1 tripla-negatív emlőrák sejtvonalat szintén az American Type Culture Collection-től (ATCC, Manassas, VA, USA) szereztük be, és a forgalmazó ajánlásainak megfelelően tenyésztettük. A sejteket 10% hőinaktivált FBS-el kiegészített Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI Medium 1640 + GlutaMAXTM-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)) tápoldatban T-75 sejtenyésztő flasksokban (12 mL tápoldat/T-75 flaska) tenyésztettük. A sejtek inkubálását 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett végeztük (ESCO CCI-170B-8 inkubátor Esco Micro Pte. Kft., Szingapúr). Passzálást 2-3 naponta végeztünk, 80%-os konfluencia elérésekor. A 4T1 sejteket szintén 5-8 passzást követően alkalmaztuk a biológiai vizsgálatokhoz. A sejtranszplantáció előtt a sejtek viabilitását tripánkéék festékek exklúziós módszerrel ellenőriztük, majd ezt követően határoztuk meg a tumorindukcióhoz szükséges sejtszámot és sejtkoncentrációt.

3.2.1.3 Pgp- A2780 sejtek

A Pgp- humán ováriumtumor-sejteket a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A sejteket standard laboratóriumi körülmények között tenyésztettük DMEM táptalajban, amelyet 10% FBS-el egészítettünk ki. A sejtkultúrákat a korábbiakhoz hasonlóan 37°C-on, 5% CO₂-t

és 95% relatív páratartalmat biztosító inkubátorokban tartottuk. A sejtek életképességét tripánkék exklúziós teszttel vizsgáltuk. A sejtek passzálását háromnaponta végeztük.

3.2.1.4 Pgp+ A2780AD sejtek

A Pgp+ A2780AD humán ováriumkarcinóma-sejteket szintén a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A Pgp- párjával összhangban a vizsgált sejtvonal tenyésztése standard laboratóriumi körülmények között történt DMEM, 10% FBS-el kiegészített táptalajban. A sejtvonal fenntartásához a tenyésztést 28 μ M doxorubicin kemoterápiás szer (2 mg/mL doxorubicin-hidroklorid, Doxorubicin-Teva oldatos injekció, Teva Gyógyszergyár Zrt., Magyarország) jelenlétében végeztük. A sejt kultúrákat 37°C-on, 5% CO₂-t és 95% relatív páratartalmat fenntartó inkubátorban tartottuk. A sejtek viabilitását rendszeresen tripánkék exklúziós módszerrel ellenőriztük. A sejtek passzálása háromnaponta történt. A radiofarmakon injektálását megelőző passzálás során a kemoterápiás szert eltávolítottuk a tenyésztőközegekből.

3.2.1.5 Pgp- KB-3-1 sejtek

A Pgp- KB-3-1 humán cervixkarcinóma-sejteket a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete biztosította számunkra. A sejtek tenyésztése standard laboratóriumi körülmények között történt DMEM tápközegeben, 10% FBS-el kiegészítve. A sejt kultúrákat 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂-t és 95% relatív páratartalmat biztosító inkubátorban tartottuk. A sejtek életképességét tripánkék exklúziós módszerrel ellenőriztük, a tenyészeteket háromnaponta passzáltuk.

3.2.1.6 Pgp+ KB-V-1 sejtek

A Pgp+ KB-3-1 humán cervixtumor-sejteket szintén a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete biztosította számunkra. A sejteket standard *in vitro* körülmények között tenyésztettük DMEM tápoldatban, melyet 10% FBS-el egészítettünk ki. A sejtvonal fenntartásához a tenyésztést 20 μ M vinblasztin kemoterápiás szer (1 mg/mL vinblasztin-szulfát, Vinko, Kocak Farma, Gyógyszeripari és Vegyipari Kft., Törökország) jelenlétében végeztük. A sejt kultúrákat 37 °C-on, 5% CO₂-t és 95% relatív páratartalmat fenntartó inkubátorban tartottuk. A sejtek viabilitását tripánkék festéke exklúziós próbával ellenőriztük, a passzálást háromnaponta végeztük. A radiofarmakon injektálását megelőző passzálás során a kemoterápiás szert eltávolítottuk a tenyésztőközegekből.

3.2.2 Kémiai hipoxia indukció

A kémiai hipoxia modellezésére a sejteket (A2780, KB-3-1) 250 μM koncentrációjú kobalt-dikloriddal (CoCl_2 , (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)) kezeltük 24, illetve 48 órán át. A szakirodalmi adatok alapján a CoCl_2 alkalmas a hipoxiás állapot *in vitro* reprezentálására, mivel a HIF-1 α prolil-hidroxilázok aktivitásának blokkolása révén gátolja a HIF-1 α lebomlását.

3.2.3 *In vitro* radiofarmakon-felvételi vizsgálatok

A kontroll és a CoCl_2 -vel kezelt sejteket 1×10^6 sejt/mL koncentrációban 5 mM D-glükózt tartalmazó PBS oldatban (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 10 percen keresztül előinkubáltuk 36 °C-on. Ezt követően a kezeletlen sejtmintához és a CoCl_2 -inkubált sejtcsoporthoz is 0,37 MBq/mL aktivitású [^{18}F]FDG-t adtunk. Az [^{18}F]FDG-inkubációt követően a sejtek radiofarmakon-felvételét hideg PBS oldat hozzáadásával állítottuk le. Ezután a sejteket háromszor mostuk azonos összetételű oldattal, majd kalibrált gamma számlálóval mértük a minták radioaktivitását az [^{18}F] energiaablakában (Canberra-Packard Cobra II típusú gamma számláló, Canberra Packard Central Europe GmbH, Schwadorf, Ausztria).

Az eredményeket a bomlás figyelembevételével korrigáltuk, és a radiofarmakon-felvételt percenkénti beütésszám⁻¹ (cpm/10⁶ sejt)⁻¹ formában adtuk meg. A sejtek radiotrésszer-felvételét az inkubációs aktivitás százalékában (ID%) is kifejeztük, amely azt jelzi, hogy az inkubációs közegben jelen lévő [^{18}F]FDG aktivitás hány százalékát veszi fel 1×10^6 sejt. Tekintettel arra, hogy az [^{18}F]FAZA kizárólag hipoxiás körülmények között képes intracelluláris makromolekulákhoz kötődni, valamint figyelembe véve, hogy a CoCl_2 -indukálta hipoxiát normoxiás környezetben alakítottuk ki, az *in vitro* felvételi vizsgálatokat kizárólag [^{18}F]FDG radiofarmakkal végeztük el.

3.2.4 Western blot analízis

A CoCl_2 -kezelt és kezeletlen kontrollsejtek HIF-1 α , GLUT1 és HK2 expresszióját Western blot analízissel határoztuk meg. Az analízist teljes sejtlizátumok felhasználásával végeztük. Az analízisekhez nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE/Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) alkalmaztunk, amely során 100 μL ötszörös koncentrációjú elektroforézis puffert adtunk a mintákhoz, melyeket ezt követően 10 percig forraltunk. Hatvan μg fehérjét választottunk el 7,5%-os SDS-PAGE gélen. A gél fehérjetartalmát nitrocellulóz membránra vittük át. A sejtmembrán és az antitestek közötti

nem specifikus fehérjekölcsönhatások gátlására 5% zsírszegény száraz tejport tartalmazó PBST-t (foszfátpufferelt sóoldat + 0,05% - 0,1% Tween 20) alkalmaztunk. Blokkolás után a membránokat mostuk és a gyártó ajánlásának megfelelő hígításban az elsődleges antitestekkel (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk. Harminc perc PBST-vel történő mosást követően a membránokat másodlagos antitestekkel (anti-nyúl IgG antitest, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A másodlagos antitesteket 1:1000 hígításban, 1% zsírszegény száraz tejport tartalmazó PBS oldatban alkalmaztuk. A fehérjesávokat kemilumineszcens eljárással detektáltuk a gyártó protokolljának megfelelően (Pierce, Rockford, IL, USA).

3.3 *In vivo* kísérletes módszerek

3.3.1 Kísérleti állatok

Az emlőtumor-modellek létrehozásához 12 hetes, körülbelül 20 grammos nőtény, CB17 súlyos kombinált immunhiányos (SCID/severe combined immunodeficient) egereket használtunk (n = 36), melyeket az Innovo Kft.-től vásároltunk (Isaszeg, Magyarország). A kísérleti állatokat steril laboratóriumi körülmények között, egyénileg szellőztetett ketrecekben (IVC, Techniplast, Buguggiate, Olaszország) tartottuk 26 °C ± 2 °C hőmérsékleten és 55% ± 10% relatív páratartalom biztosítása mellett. Az állatok tartása során 12 órás világos-sötét ciklussal szabályozott mesterséges megvilágítást alkalmaztunk. Továbbá, minden állat számára *ad libitum* steril, félszintetikus rágcsálótápot (Akronom Kft., Budapest, Magyarország), valamint steril ivóvizet biztosítottunk.

A humán eredetű nőgyógyászati tumorok (ovárium, cervix) vizsgálatához szintén CB17 SCID egereket használtunk (12 hetes, nőtény, 18-22 gramm, n = 10, 5 egér KB-3-1/KB-V-1, 5 egér A2780/A2780AD, Innovo Kft., Isaszeg, Magyarország). A kísérleti állatokat steril körülmények között, IVC ketrecekben ellenőrzött hőmérséklet (26 °C ± 2 °C) és páratartalom (55% ± 10%) mellett tartottuk. Az állatok mesterséges megvilágítása automatikusan szabályozott, 12 órás cirkadián ritmus szerint történt. Az egerek *ad libitum* steril félszintetikus takarmányt (Akronom Kft., Budapest, Magyarország) és steril ivóvizet kaptak.

Az állattartás és kezelés a hatályos magyar törvények és az európai jogszabályokkal összhangban történt (2010/63/EU irányelv). Az állatkísérletek a Debreceni Egyetem Munkahelyi és Állatjóléti Bizottságának etikai engedélyével kerültek kivitelezésre (engedélyszám: 8/2016/DEMÁB, 16/2020/DEMÁB).

3.3.2 Szubkután tumorindukció

A daganatos állatmodelleket szubkután tumorsejt-transzplantációval hoztuk létre. A beavatkozásokat minden esetben inhalációs anesztéziában végeztük. Az altatás indukciójához 3% izofluránt (Aerrane/Forane, Baxter Hungary, Budapest, Magyarország/AbbVie Gyógyszerkereskedelmi Kft., Budapest, Magyarország), 0,4 L/min O₂-t és 1,2 L/min N₂O-ot (Linde Healthcare, Budapest, Magyarország) alkalmaztunk, majd a fenntartás során az izoflurán koncentrációját 1,5%-ra csökkentettük. Az anesztéziát dedikált kisállat altatókészülékkel biztosítottuk (Tec3 Isoflurane Vaporizer, Eickemeyer Veterinary Equipment, Luton, Egyesült Királyság).

Az emlőtumor-modellek kialakítása során az egerek bal váll régióját borotváltuk és fertőtlenítettük, majd ezt követően 5×10^6 MDA-MB-HER2+ vagy 4T1 tumorsejtet injektáltunk a bőr alá 100-120 µL térfogatban, DMEM:Matrigel 1:1 arányú keverékében.

A nőgyógyászati daganatmodellek létrehozásához a Pgp- A2780 és KB-3-1 tumorsejtekből 3×10^6 , míg a megfelelő Pgp+ sejtvonalakból 5×10^6 sejtet tartalmazó sejtuszpenziókat alkalmaztunk 150 µL fiziológiás sóoldatban. A Pgp- sejteket az egerek bal, míg a Pgp+ sejteket azok jobb combjába szubkután injektáltuk.

3.3.3 Tumornövekedés monitorozása

A tumorok növekedését tolómérővel követtük. A tumortérfogatot a következő képlet segítségével hetente meghatároztuk:

$$V = (L \times W^2) / 2$$

(V a daganat térfogata (mm³), L a daganat hossza (mm), W a daganat szélessége (mm)).

A méret alapján a tumorokat kis, közepes és nagy méretkategóriákba soroltuk.

3.3.4 *In vivo* pozitronemissziós tomográfia (PET) leképezés

Vizsgálataink első részében, amikor a daganatok már egyértelműen detektálhatók voltak - az emlőtumorsejtek szubkután implantációját követően körülbelül 20 nappal mintegy $40 \pm 4,4$ mm³-es tumortérfogat mellett - valamennyi tumoros kisállatról heti rendszerességgel *in vivo* mikroPET felvételeket készítettünk [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiotrészerekkel (n = 9 4T1, n = 9 MDA-MB-HER2+). A két nyomjelzőt egymást követő napokon alkalmaztuk. A laterális farokvénán keresztül intravénásan (iv.), 100-150 µL fiziológiás sóoldatban oldva, körülbelül 8-10 MBq aktivitású [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD radiofarmakont juttattunk a kísérleti állatokba. Hatvan perces inkubációs időt követően 20 perces statikus PET adatgyűjtést végeztünk a MiniPET-II kamera használatával. Ezt követően,

a következő napon azonos protokoll szerint [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB PET leképezést hajtottunk végre.

A második vizsgálati rész *in vivo* biodisztribúciós vizsgálatait 20 ± 1 nappal a tumorindukciót követően $39,12 \pm 3,34 \text{ mm}^3$ tumortérfogat mellett végeztük. A kísérleti egerekről [^{18}F]FDG, majd 24 órán belül [^{18}F]FAZA PET képalkotás történt a MiniPET-II kamera alkalmazásával. A radiojelzett glükózanalóggal végzett statikus gyűjtést (20 perc) 40 perccel kb. 7 MBq [^{18}F]FDG (200 μL fiziológiás sóoldatban) iv. beadása után indítottuk. A [^{18}F]FAZA nyomjelzővel (iv. 7 MBq 200 μL fiziológiás sóoldatban) statikus, majd dinamikus képsorozatok is készítettünk. A statikus leképezés esetében 120 perces inkubációs időt követően 20 perces gyűjtés történt a tumorokról, még a dinamikus képalkotás a radiotrészter beadásától (0. perc) a 140. percre tartott.

Az *in vivo* vizsgálatokat izoflurán-indukálta inhalációs anesztéziában végeztük. Az altatás indukciójához 3% izofluránt (Aerrane, Forane) 0,4 L/min O_2 -t és 1,2 L/min N_2O -t alkalmaztunk. A fenntartás alatt az izoflurán koncentrációját 1,5%-ra csökkentettük. Az anesztéziát dedikált kisállat altatókészülékkel biztosítottuk (Tec3 Isoflurane Vaporizer, Eickemeyer Veterinary Equipment, Luton, Egyesült Királyság).

3.3.4.1 MiniPET-II kamera

Az *in vivo* vizsgálatokat a preklinikai PET kamerával (MiniPET-II) végeztük. A MiniPET-II kamera a Debreceni Egyetem korábbi DEOEC Nukleáris Medicina Intézet (jelenleg DE ÁOK Orvosi Képalkotó Intézet, Nukleáris Medicina Tanszék), a Magyar Tudományos Akadémia Atommagkutató Intézet és a MEDISO Kft. közös kutatás-fejlesztési együttműködésének eredményeként jött létre.

A kamera 12 detektoregységből áll, amelyek cériummal kevert lutécium-ittrium-ortoszilikát (LYSO) szcintillációs kristályokat és pozícióérzékeny Hamamatsu H9500 fotoelektronsokszorozókat tartalmaznak. A kristálymátrixok 35 x 35 kristályból épülnek fel. Az egyes kristályok mérete $1,27 \times 1,27 \times 12 \text{ mm}^3$. A kristályokat fényvisszaverő anyag választja el egymástól. A detektorok jeleinek digitalizálását négycsatornás adatgyűjtő kártyák végzik, míg az események gyűjtése optikai kapcsolaton keresztül, adatgyűjtő szerver segítségével történik (Cisco Catalyst switch). A rendszer az elsődleges adatokat listamódban tárolja, amely lehetővé teszi különböző fejlett képrekonstrukciós eljárások utólagos alkalmazását. A készülék axiális látótere 48 mm, még a tranzaxiális látómezeje 100 mm, térbeli felbontóképessége pedig 1,1 mm, míg az érzékenysége 11,4%. Kisebb méretének és nagy felbontásának köszönhetően a

MiniPET-II alkalmas a laboratóriumi rágcslókba juttatott radiofarmakonok eloszlásának *in vivo* PET leképezésére.

3.3.4.2 A pozitronemissziós tomográfia (PET) képek elemzése

Az *in vivo* PET vizsgálatokat követően a PET felvételeket vizuálisan majd kvantitatív módon értékeltük. A kvantitatív elemzés során a koronális PET képeken a tumorokra úgynevezett VOI-kat (volume of interest) helyeztünk a Brain CAD képelemző szoftver segítségével. Ezt követően kvantitatív PET paramétereket határoztunk meg. A következő képlet segítségével regisztráltuk a VOI-n belüli radiofarmakon koncentrációt, melyet standard felvételi értékekben (standardized uptake value/SUV) határoztunk meg, maximális (SUV_{max}) és átlagos (SUV_{mean}) formában a következő képlet alapján:

$$\text{SUV} = \text{VOI-n belüli radiofarmakon koncentráció (MBq/mL)} / \text{beadott aktivitás (MBq)} / \text{testsúly (g)}$$

A SUV_{max} a legnagyobb radioaktivitást mutató voxelt jelzi, míg a SUV_{mean} az adott régió valamennyi voxelének átlagos aktivitását tükrözi. Ezen kívül tumor-háttér arányt (tumor-to-muscle ratio/T/M) számoltunk a tumorban és az izomszövetben (háttér) mért SUV értékek összehasonlítására.

$$\text{T/M} = \text{tumor SUV}_{\text{mean}} / \text{izom (háttér) SUV}_{\text{mean}}$$

3.3.5 *Ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok

A tumorfejlődéssel összefüggő ciklodextrin-felvétel változásainak vizsgálatára *ex vivo* biodisztribúciós méréseket végeztünk a PET képalkotással megegyező időpontokban. A korábbiakhoz hasonlóan az egerek laterális farokvénáján keresztül körülbelül 8-10 MBq [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonokat injektáltunk 100-150 µL fiziológiás sóoldatban. Hatvan perccel a nyomjelzők injektálása után az állatokat termináltuk, majd felboncoltuk. A tumorokat teljes egészében eltávolítottuk, és tömegüket analitikai mérleg segítségével meghatároztuk. Ezt követően a daganatok radioaktivitását kalibrált gamma számlálóval határoztuk meg (Perkin-Elmer Packard Cobra, Waltham, MA, USA). A tumorszövet radiofarmakon-felvételét bomláskorrekciót követően határoztuk meg és az eredményeket a beadott dózis grammonkénti százalékában (%ID/g) fejeztük ki.

3.4 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a MedCalc 18.5 statisztikai szoftvercsomag segítségével végeztük (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). A csoportok közötti különbségek vizsgálatára az adatok eloszlásától függően kétmintás t-próbát, kétutas varianciaanalízist (ANOVA), valamint Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. A statisztikai szignifikancia határát $p < 0,05$ értékben határoztuk meg. Az eredményeket átlag $\pm$ szórás (SD) formájában tüntettük fel.

4. Eredmények

4.1 Emlőtumor xenograftok PGE2 termelésének *in vivo* monitorozása ciklodextrin alapú PET radiofarmakonokkal

4.1.1 *In vivo* PET leképezés

A ^{68}Ga -jelzett ciklodextrin-származékok diagnosztikai képességét HER2+ MDA-MB-HER2+ és tripla-negatív 4T1 emlőtumor xenograftokon vizsgáltuk PET technika alkalmazásával. A szubkután tumorindukció minden beoltott állat esetében sikeresnek bizonyult, ugyanis valamennyi egérben a transzplantációt követő körülbelül 20. napon tapintható daganat alakult ki a bal váll régiójában. Ennélfogva minden állatot bevontunk az *in vivo* biológiai vizsgálatokba (MDA-MB-HER2+ = 18 és 4T1 n = 18).

4.1.1.1 MDA-MB-HER2+ tumorok

Az MDA-MB-HER2+ tumorhordozó egerekről készült PET képek vizuális értékelése alapján mindkét nyomjelző kifejezett felhalmozódást mutatott az MDA-MB-HER2+ tumorokban valamennyi vizsgálati időpontban. A tumorok radiofarmakon-felvétele az idő előrehaladtával fokozatos növekedést mutatott, amely különösen a RAMEB molekula esetében volt kifejezett az 50. és a 65. napok között. Továbbá, a ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB PET képeken számottevő háttéraktivitás volt megfigyelhető, míg a HP β CD felvételeken a mellkasi és a hasi régiókban csak minimális nem specifikus radioaktivitást detektáltunk, ami lehetővé tette a tumorok éles körülhatárolását. A szubkután növekvő tumorok halmozásán túl, mindkét PET sorozaton szignifikáns trésszerhalmozás mutatkozott a vesékben, mely a nyomjelzők renális kiválasztására utal.

A vizuális megfigyeléseinket a PET képek kvantitatív analízise is megerősítette. Mindkét ciklodextrin nyomjelző nagy affinitással kötődött a HER2+ tumorokhoz. A SUV értékek elemzése - összhangban a kvalitatív értékeléssel - mindkét radiofarmakon esetében folyamatosan emelkedő trésszerkoncentrációkat mutatott a kísérlet teljes időtartama alatt (^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD: $0,04 \pm 0,006$, $0,06 \pm 0,015$ és $0,07 \pm 0,013$ a 30., 50. és 65. kísérleti napokon, ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: $0,02 \pm 0,003$, $0,03 \pm 0,005$, and $0,06 \pm 0,009$ 30, 50 és 65 nappal az oltást követően). A HP β CD és a RAMEB származék tumorfelvételi értékeinek összehasonlítása során a 35. és az 50. kísérleti napokon a HP β CD molekula szignifikánsan magasabb akkumulációt mutatott a RAMEB vegyülethez képest, azonban az utolsó időpontban (65. nap) ez a különbség már nem mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak ($p \leq 0,05$).

4.1.1.2 4T1 tumorok

A szubkután növekvő tripla-negatív 4T1 tumorok - az MDA-MB HER2+ tumorokhoz hasonlóan - mindkét nyomjelző alkalmazásával egyértelműen azonosíthatóak voltak mindhárom vizsgálati időpontban. Ugyanakkor a tumorfelhalmozódás összességében magasabbnak bizonyult a radiojelezett RAMEB származék esetében különösen a 20. kísérleti napon. A korábbi megfigyelésekkel megegyezően mindkét radiofarmakon esetében folyamatosan növekvő trésherhalmozást észleltünk a kísérleti időszak során, mely a RAMEB vegyület esetében kifejezettebbnek bizonyult.

A vizuális értékelés eredményeit a 4T1 tumorok esetében is kvantitatív PET adatokkal támasztottuk alá. Ennek megfelelően mind a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD, és mind a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB kvantitatív PET analízis erőteljes és specifikus felhalmozódást igazolt a 4T1 tumorokban, a jelintenzitás időbeli fokozódásával. A tumorsejtek transzplantációját követő 10., 15. és 20. napokon mért SUV értékek a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD esetében $0,02 \pm 0,003$; $0,03 \pm 0,006$ és $0,035 \pm 0,004$, míg a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB esetében $0,025 \pm 0,002$; $0,034 \pm 0,004$ és $0,04 \pm 0,005$ voltak. A két nyomjelző összehasonlításakor a RAMEB vegyület minden vizsgált időpontban kissé magasabb tumorfelhalmozódást mutatott, azonban ezek a különbségek egyik időpontban sem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak.

4.1.2 Ex vivo szervi eloszlásos vizsgálatok

Az *in vivo* PET eredmények alátámasztására *ex vivo* boncolásos szervi eloszlásos vizsgálatokat végeztünk.

A 4T1 tumorokban mindkét nyomjelző fokozatosan növekvő akkumulációt mutatott a tumorindukciót követő 10. és 15. napok között. A 15. napon regisztrált csúcstelhalmozódást ([^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: $3,10\% \pm 0,45$ %ID/g; [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD: $2,65\% \pm 0,51$ %ID/g) a 20. napra enyhe csökkenés követte ([^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: $2,35\% \pm 0,38$ %ID/g; [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD: $2,11\% \pm 0,40$ %ID/g). Emellett a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB 4T1 tumorokban mért koncentrációja minden vizsgálati időpontban diszkréten meghaladta a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD értékeit, azonban ezek a különbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak.

Az MDA-MB-HER2+ tumorok esetében a HP β CD molekula szignifikánsan magasabb tumorhalmozást mutatott ($p \leq 0,05$) a RAMEB molekulához képest az első két vizsgálati időpontban (35. nap: [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: $2,727\% \pm 0,48$ %ID/g, [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD: $5,779\% \pm 1,06$ %ID/g; 50. nap: [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB:

4,929% $\pm$ 1,06 %ID/g, [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD: 10,039% $\pm$ 2,09 %ID/g). A daganatok kialakulását követő 65. napon a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD tumorkoncentrációja továbbra is kissé magasabb volt a RAMEB származékhoz képest, azonban ez a különbség már nem érte el a statisztikai szignifikanciát.

Az MDA-MB-HER2+ tumorok radiofarmakon-felvételének időbeli alakulása a 4T1 tumoroknál megfigyelt mintázatot követte: a %ID/g értékek a második vizsgálati időpontig emelkedtek, majd a kísérlet végéig csökkenést mutattak.

4.1.3 [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD- és [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB-felvétel összehasonlítása MDA-MB-HER2+ és 4T1 tumorokban

A biológiai vizsgálatokat követően a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB *in vivo* felvételét tumorméret kategóriák szerint is összehasonlítottuk (kis, közepes méretű és nagy tumorok).

A SUV adatelemzés alapján a radiojelölt HP β CD molekula felvétele szignifikánsan magasabb volt a kis méretű MDA-MB-HER2+ tumorokban, mint a méretben egyező 4T1 daganatok esetében ($p \leq 0,05$). Ez a tendencia a közepes és a nagy tumorméret kategóriákban is fennállt, ahol az MDA-MB-HER2+ tumorok radioaktivitása meghaladta a 4T1 tumorokét, és ezek a különbségek szintén statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak ($p \leq 0,05$). Emellett megfigyelhető volt a HP β CD koncentrációjának fokozatos, a tumorméret növekedésével párhuzamos emelkedése.

A RAMEB származék vonatkozásában a kis és közepes tumorméret-kategóriákban a 4T1 daganatok radiofarmakon-felvétele meghaladta az MDA-MB-HER2+ tumorok aktivitását. Ezzel szemben a nagy méretű tumorok esetében a RAMEB-felvétel a HER2+ elváltozásokban volt magasabb. Fontos megemlíteni azonban, hogy az aktivitáskülönbségek egyik tumorméret kategóriában sem értek el statisztikai szignifikanciát.

4.1.4 A tumornövekedés dinamikájának vizsgálata

Az *in vivo* vizsgálatokkal párhuzamosan értékeltük a két különböző emlőtumor intrinzik növekedési potenciálját. A tripla-negatív 4T1 emlőtumorok növekedési görbéje gyors sejtproliferációt és exponenciálisan növekvő tumorméreteket mutatott; a megfelelő tumorvolumenek a tumorsejtek beültetését követő 10., 15. és 20. napokon rendre $75 \pm 13 \text{ mm}^3$, $212 \pm 24 \text{ mm}^3$ és $342 \pm 30 \text{ mm}^3$ voltak. Ezzel szemben a MDA-MB-HER2+ tumorok lassabban

növekedtek és a tumorméretük a beültetést követő 35., 50. és 65. napon $30 \pm 4 \text{ mm}^3$, $79 \pm 11 \text{ mm}^3$, illetve $128 \pm 22 \text{ mm}^3$ térfogatokat értek el.

4.2 Tumorasszociált hipoxia vizsgálata preklinikai nőgyógyászati tumormodellekben PET képalkotással

4.2.1 *In vitro* vizsgálatok eredményei

A CoCl_2 -al inkubált KB-3-1 és A2780 sejtekben kialakuló hipoxiát és az ahhoz kapcsolódó sejtszintű folyamatokat radiofarmakon-felvételi ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) és molekuláris biológiai módszerekkel (Western blot) vizsgáltuk. Az eredmények alapján a CoCl_2 -kezelés a GLUT1 glükóztranszporter és a HK2 enzim fokozott expresszióját idézte elő.

4.2.1.1 KB-3-1 sejtek *in vitro* vizsgálata

4.2.1.1.1 Sejtszintű $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvétel

A KB-3-1 sejtek $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvétele mindhárom sejtcsoportban (kontroll, 24 és 48 órán át CoCl_2 -inkubált sejtek) folyamatos növekedést mutatott a vizsgálat végéig (60. perc). A legmagasabb radiofarmakon-felvételi értékeket azoknál a sejteknél detektáltuk, amelyeket 24 órán keresztül kezeltünk CoCl_2 -al. A 24 órán át CoCl_2 -kezelt sejtek mindhárom mérési időpontban (15., 30. és 60. perc) szignifikánsan magasabb radioaktivitást mutattak mind a kontrollsejtek, mind pedig a 48 órán keresztül CoCl_2 -vel inkubált KB-3-1 sejtek nyomjelző-felvételéhez képest ($p \leq 0,01$).

4.2.1.1.2 Western blot analízis

A HIF-1 α , a GLUT1 és a HK2 fehérjék expressziójának szintjét Western blot módszerrel határoztuk meg. A CoCl_2 -kezelés időtartamától függően a sejtek eltérő mértékű fehérjefelhalmozódást mutattak. A kezelési időtől függetlenül azonban a CoCl_2 valamennyi vizsgált fehérje mennyiségét növelte a kezelt sejtcsoportokban a kontrollhoz képest, ami összhangban áll a kezelt sejtekben tapasztalt fokozott $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvétellel. A részletes elemzés során a 24 órás CoCl_2 -inkubációt követően a HIF-1 α és a GLUT1 transzporterek szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kezelt sejtekben a kontrollhoz, és a 48 óráig kezelt sejtekhez viszonyítva. Ezzel szemben a HK2 enzim esetében a legmagasabb mennyiséget a 48 órás inkubáció után detektáltuk.

4.2.1.2 A2780 sejtek *in vitro* vizsgálata

4.2.1.2.1 Sejtszintű [¹⁸F]FDG-felvétel

Az A2780 sejtek [¹⁸F]FDG-felvételének elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a CoCl₂-kezelt sejtekben a radiofarmakon akkumulációja minden vizsgált időpontban meghaladta a kontrollsejtekben mért értékeket. Ugyanakkor az inkubációs idő függvényében számottevő eltérések mutatkoztak a kezelt sejtek [¹⁸F]FDG akkumulációjának tekintetében. Az első mérési időpontban (15. perc) nem tapasztaltunk lényeges különbséget a 24, illetve 48 órán át CoCl₂-vel kezelt sejtek radioaktivitása között, azonban a 30. és a 60. percekben a 24 óráig inkubált sejtcsoport [¹⁸F]FDG-felvétele szignifikánsan meghaladta a 2 napig kezelt sejtek halmozását (30. perc: $p \leq 0,05$, 60. perc: $p \leq 0,01$).

4.2.1.2.2 Western blot analízis

Az A2780 sejtek Western blot analízisének eredményei azt mutatták, hogy a hipoxia asszociált HIF-1 α szintje a CoCl₂-vel kezelt sejtekben jelentősen megnövekedett a kezeletlen sejtekhez képest, különösen a 24 órán át inkubált sejtek esetében. Hasonlóképpen az [¹⁸F]FDG transzportjáért felelős GLUT1 transzporter mennyisége, valamint annak foszforilációját biztosító HK2 enzim szintje is emelkedettebb volt a kezelt sejtekben, kiváltképp a 24 órás kezelést követően.

4.2.2 *In vivo* pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok eredményei

A hipoxiás tumorokról statikus és dinamikus PET vizsgálatokat készítettünk a MiniPET-II kisállat PET kamera alkalmazásával.

4.2.2.1 Statikus pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok [¹⁸F]FAZA radiofarmakkal

A tumorindukciót követően körülbelül 20 nappal (20 ± 5 nap), 400 ± 80 mm³-es átlagos tumortérfogat mellett, [¹⁸F]FAZA radiotrészert alkalmazásával PET vizsgálatokat végeztünk a nőgyógyászati tumorokat hordozó kísérleti állatokon. Az érvényben lévő ajánlások alapján 20 perces statikus felvételeket készítettünk a daganatokról (Pgp- A2780, Pgp+ A2780AD, Pgp-KB-3-1 és Pgp+ KB-V-1) a nyomjelző intravénás beadását követően 120 perccel. A kvantitatív PET adatok elemzése alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a tumorok SUV_{mean} értékei között (Pgp- A2780: $0,48 \pm 0,095$, Pgp+ A2780AD: $0,60 \pm 0,015$, Pgp- KB-3-1: $0,37 \pm 0,05$ és Pgp+ KB-V-1: $0,39 \pm 0,03$). A T/M arányokat tekintve az [¹⁸F]FAZA-felhalmozódás minden vizsgált tumorban kétszer-négyszer magasabbnak bizonyult a háttérszövethez képest,

azonban az egyes csoportok közötti különbségek nem voltak statisztikailag szignifikánsak (átlagos T/M arányok: Pgp- A2780: $2,6 \pm 1,29$; Pgp+ A2780AD: $2,8 \pm 1,4$; Pgp- KB-3-1: $3,85 \pm 0,84$; Pgp+ KB-V-1: $4,25 \pm 0,75$).

4.2.2.2 Dinamikus pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok [^{18}F]FAZA radiofarmakkal

A statikus leképezés mellett az [^{18}F]FAZA-felvétel időbeli kinetikájának vizsgálata céljából dinamikus PET felvételeket is készítettünk az egerekről. Az idő-aktivitás görbe elemzése azt mutatta, hogy a hipoxiás tumorrégiók SUVmean értékei a 120. percig folyamatos, exponenciális növekedést mutattak, ezt követően pedig platófázis alakult ki (SUVmean: $0,67 \pm 0,07$). Ezzel szemben a nem hipoxiás háttérszövetben a radiofarmakon felvétele csupán mérsékelt emelkedést mutatott a 30. percig (SUVmean: $0,15 \pm 0,05$), majd - hipoxia hiányában - a nyomjelző kimosódott az sejtekből, ami a trászerekoncentráció folyamatos csökkenését eredményezte a 120. percig (SUVmean: $0,11 \pm 0,05$). Megfigyeltük továbbá, hogy a hipoxiás daganatterület és a háttér közötti felvételi arány (T/M) a radiofarmakon beadását követő 110-120. percben érte el a legmagasabb értéket ($6,2 \pm 0,1$).

4.2.2.3 Pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok [^{18}F]FDG és [^{18}F]FAZA radiofarmakonokkal

A tumorok életképességének, valamint glükózanyagcseréjének jellemzése céljából a hipoxiaspecifikus [^{18}F]FAZA alkalmazásával végzett PET vizsgálatokat [^{18}F]FDG PET leképezéssel egészítettük ki. A két különböző radiofarmakkal végzett képalkotó vizsgálatot minden esetben egy napon belül végeztük el. A 20 perces statikus [^{18}F]FDG PET gyűjtés a radiojelzett glükózanalóg intravénás beadását követően 40 perccel történt. Az [^{18}F]FDG PET felvételek elsősorban a daganatok viabilitásának és metabolikus aktivitásának megítélését szolgálták. Emellett a képelemzés során olyan intratumorális régiók azonosítására is törekedtünk, amelyek fokozott [^{18}F]FDG-felvételt mutattak, és egyidejűleg [^{18}F]FAZA-pozitívnak is bizonyultak.

Az [^{18}F]FDG valamennyi vizsgált tumorxenograftban kifejezetten heterogén eloszlást mutatott, ami a daganaton belüli egyes régiók igen magas glükózmetabolizmusára utal. Jelentős különbséget figyeltünk meg az intenzív [^{18}F]FDG halmozású tumorterületek SUVmean értékei ($2,72 \pm 0,23$) és az alacsony halmozást mutató régiók SUVmean értékei ($1,2 \pm 0,36$) között. Ennél is markánsabb intratumorális felvételi eltéréseket tapasztaltunk az [^{18}F]FAZA nyomjelző

esetében, ahol az erősen [^{18}F]FAZA-pozitív területek radioaktivitása (SUVmean: $0,86 \pm 0,06$) hatszor-hétszer magasabbnak bizonyult az [^{18}F]FAZA-negatív régiókhoz képest (SUVmean: $0,11 \pm 0,05$). Megfigyeltük továbbá, hogy az intenzív [^{18}F]FDG-felvételt mutató intratumorális területek átfedést mutattak a hipoxiás, [^{18}F]FAZA halmozó tumorrégiókkal.

5 Új tudományos megállapítások

1. A radiojelzett ciklodextrinekkal végzett kísérletsorozat eredményei alapján megállapítottuk, hogy a szubkután transzplantációval létrehozott heterotopikus nőgyógyászati xenograft modellek tumorbiológiai karakterisztikája monitorozható *in vivo* PET képalkotással és tumorszelektív nyomjelzőkkel.
2. *In vivo* PET képalkotással és radiojelölt ciklodextrin-származékok alkalmazásával ($[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HP}\beta\text{CD}$) igazoltuk a szubkután transzplantált HER2+ és tripla-negatív emlőtumorsejteket PGE2 expresszióját.
3. Kutatásunk során elsőként igazoltuk, hogy a ^{68}Ga -jelölt ciklodextrin-származékok ($[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HP}\beta\text{CD}$) sikeresen alkalmazhatók HER2+ és tripla-negatív emlőtumorsejteket szubkután preklinikai modelljeinek PET-alapú detektálására.
4. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HP}\beta\text{CD}$ radiofarmakonok a jövőben ígéretes molekuláris vektorok lehetnek az emlőtumorsejteket diagnosztikájában, különös tekintettel a receptornegatív elváltozásokra. Továbbá, a vizsgált ciklodextrin nyomjelzők alkalmas kiindulási molekuláknak bizonyulnak további szénhidrát alapú, angiogenezist targetáló diagnosztikai ágensek fejlesztéséhez emlődaganatok kimutatására.
5. A nőgyógyászati tumormodellek $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ és $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ PET felvételei közötti térbeli átfedések azt mutatták, hogy a magas $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvételű tumorterületek $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ -pozitívak, ami igazolja a hipoxia jelenlétét az emelkedett glükózmétabolizmusú régiókban. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ és $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ egymást kiegészítő alkalmazása lehetővé teszi a hipoxiás tumorterületek pontosabb azonosítását, ami nemcsak a képalkotás diagnosztikai értékét növelheti, hanem jelentős klinikai relevanciával is bírhat. Az alacsony oxigenizáltságú tumorterületek korrekt detektálása elősegítheti a tumorbiológiai folyamatok eddig még ismeretlen aspektusainak megismerését, ami egyéb diagnosztikai és terápiás targetek azonosításához vezethet. Továbbá, az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}/[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ PET-alapú hipoxia egy lehetséges jövőbeli biomarkernek tekinthető a terápiára adott válasz és a klinikai kimenetel előrejelzésében.

Mindemelett, eredményeink alapján az [^{18}F]FDG/[^{18}F]FAZA PET együttes alkalmazása ígéretesnek tűnik a terápiás hatékonyság nyomon követésére, és ezáltal azon betegcsoportok azonosítására, akik profitálhatnak a hipoxiaspecifikus kezelési stratégiák alkalmazásából.

6 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Berényi Ervinnek**, a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet Igazgatójának és **Dr. Trencsényi Györgynek** a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Nukleáris Medicina Tanszék Tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tették PhD kutatásaim elvégzését a Nukleáris Medicina Tanszéken.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat és köszönetemet témavezetőmnek, **Dr. Képes Zitának**, aki munkám során mindvégig támogatott és türelemmel, megértéssel állt mellettem. Szakmai tudására és segítségére mindig számíthattam.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Hajdu Istvánnak** és **Dr. Kertész Istvánnak**, valamint a **radiokémiai munkacsoport** minden tagjának a kísérletekhez szükséges radiofarmakonok előállításáért.

Külön köszönöm **Péliné Dr. Szabó Juditnak** és **Nagy Tamásnak** a preklinikai vizsgálatok elvégzését.

Köszönettel tartozom a Nukleáris Medicina Tanszék minden munkatársának, akik munkájukkal segítették kutatómunkám megvalósulását.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családom minden tagjának, akik egész életemben hittek bennem, és PhD munkám során mindvégig támogattak.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Nyilvántartási szám: DEENK/86/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sass Tamás

Doktori Iskola: Orvostudományi Doktori Iskola

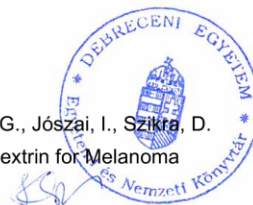
MTMT azonosító: 10074153

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sass, T.**, Péli-Szabó, J., Dienes, R. A., Árkosy, P., Opposits, G., Józai, I., Fekete, A., Fenyvesi, F., Hajdu, I., Trencsényi, G., Képes, Z.: Radiolabelled Cyclodextrins for the Positron Emission Tomography Imaging of Breast Cancer: Preclinical Perspectives.
CTS-Clin. Transl. Sci. 18 (10), 1-9, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cts.70379>
IF: 2.8 (2024)
2. Képes, Z., Hegedűs, É., **Sass, T.**, Csikos, C., Péli-Szabó, J., Szugyiczki, V., Hajdu, I., Kertész, I., Opposits, G., Imrek, J., Balkay, L., Kálmán, F. K., Trencsényi, G.: Concomitant [18F]F-FAZA and [18F]F-FDG Imaging of Gynecological Cancer Xenografts: insight Into Tumor Hypoxia.
In Vivo. 38 (2), 574-586, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/invivo.13476>
IF: 1.8

További közlemények

3. Barkóczi, A., Képes, Z., Péli-Szabó, J., Dienes, R. A., Károlyi, P. K., Papp, T., Kálmán-Szabó, I., **Sass, T.**, Opposits, G., Kertész, I., Hajdu, I., Trencsényi, G., Deák, Á.: Metastasis and angiogenesis: preclinical PET study on hepatocellular carcinoma (He/De) tumor models.
Eur. J. Pharm. Sci. 212, 1-11, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107211>
IF: 4.7 (2024)
4. Képes, Z., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., **Sass, T.**, Esze, R., Opposits, G., Józai, I., Szikra, D., P., Fenyvesi, F., Hajdu, I., Trencsényi, G.: 52Mn-labelled Beta-cyclodextrin for Melanoma Imaging: a Proof-of-concept Preclinical Study.
In Vivo. 38 (6), 2591-2600, 2024.
DOI: <http://doi.org/10.21873/invivo.13735>
IF: 1.8





5. Arató, V. Z., Képes, Z., Péli-Szabó, J., Farkasinszky, G., **Sass, T.**, Dénes, N., Kis, A., Opposits, G., Jósza, I., Kálmán, F. K., Hajdu, I., Trencsényi, G., Kertész, I.: Acute Myelomonoblastic Leukemia (My1/De): a Preclinical Rat Model.
In Vivo. 38 (3), 1064-1073, 2024.
IF: 1.8
6. Szentkereszty, Z., Balog, K., **Sass, T.**, Tóth, D.: Az akut pancreatitis kezelésének aktuális kérdései a sebész szemszögéből.
Orv. Hetil. 165 (15), 563-567, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2024.33032>
IF: 0.9
7. **Sass, T.**, Tóth, F., Susán, Z., Sápy, P., Szentkereszty, Z.: The Role of Negative Pressure Wound Therapy in Severe Acute Pancreatitis.
Clin. Surg. 6 (1), 1-5, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.25107/2474-1647.3130>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,8

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,6**

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

Debrecen, 2026.02.27.

