

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Kísérletes daganatok angiogenezisének *in vivo*  
vizsgálata PET radiotraccerekkel**

Csorbainé Kis Adrienn

Témavezető: Dr. Trencsényi György



**DEBRECENI EGYETEM**

**Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

Debrecen, 2021

## **Kísérletes daganatok angiogenezisének *in vivo* vizsgálata PET radiotraccerekkel**

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

Írta: Csorbainé Kis Adrienn, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája  
(Experimentális és operatív orvostudományok programja) keretében

Témavezető: Dr. Trencsényi György

Az értekezés bírálói:

Dr. Deák Ádám, PhD

Dr. Tömböly Csaba, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora

tagok: Dr. Deák Ádám, PhD

Dr. Tömböly Csaba, PhD

Prof. Dr. Pávics László, az MTA doktora

Dr. Györke Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
2022. március 17. 13:00 (online)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a [kis.adrienn@med.unideb.hu](mailto:kis.adrienn@med.unideb.hu) e-mail címre küldött üzenettel, a vitát megelőző nap (2022. március 16.) 14 óráig.

## 1. Bevezetés

A WHO becslése szerint 2019-ben Magyarországon 31700 beteg halálát okozta valamilyen rosszindulatú sejtburjánzás (neoplázia), melyet meghalad az ischaemiás szívbetegségben elhunytak (36800) száma. A teljes kardiovasculáris rendszert érintő elhalálozások száma 62100 volt, ami megközelítőleg kétszerese a daganatokban elhunytak számának. Az előzőekben említett vezető halálokok kialakulásában jelentős szerepet játszik a helytelen életmód, úgymint a mozgásszegény életmód, az elhízás, a dohányzás, az alkoholizmus, a helytelen táplálkozás, a stressz. Nem elhanyagolható a prevenció kérdése, mellyel a kardiovasculáris és daganatos megbetegedések késleltethetők vagy elkerülhetők. Kiemelendő a szűrővizsgálatok fontossága is, hiszen ezek segítségével akár korai szakaszban is felismerhetők a kóros elváltozások, így javítva a beteg túlélési esélyeit és hozzájárulva a teljes gyógyuláshoz. Magyarországon az emlő és a tüdő elváltozásainak kimutatására alkalmas szűrések a hagyományos képalkotó berendezések (UH, röntgen) használatán alapszanak és nem elhanyagolható a képalkotás fontossága a diagnózis felállításában és a terápiák hatékonyságának követésében. A nukleáris medicina eszközei a SPECT és PET, keresztmetszeti képalkotó modalitások, melyek leginkább a betegségek diagnosztikájában és a terápiák követésében játszanak szerepet. A PET képalkotás során leggyakrabban alkalmazott izotópok a  $^{11}\text{C}$  ( $T_{1/2}=20$  perc) és a  $^{18}\text{F}$  ( $T_{1/2}=110$  perc). Az elmúlt évtizedekben az orvosbiológiai kutatások fókuszába kerültek más, szintén pozitronemittáló izotópok alkalmazásai, melyek ideálisabb felezési idővel vagy energiával rendelkeznek, esetleg előállításuk nem igényli ciklotron jelenlétét. Az  $^{18}\text{F}$ FDG a leggyakrabban alkalmazott PET radiofarmakon a tumorok diagnosztikájában, stádium meghatározásban, terápia hatékonyság követésében. Fontos azonban megemlíteni, hogy az  $^{18}\text{F}$ FDG nem tumorspecifikus, mivel a fokozott glükózanyagcserével és glükózigénnyel rendelkező szervek, szövetek (gyulladásos területek, agy, szív, izom), valamint a kiválasztásában résztvevő vesék  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele szintén magas. Továbbá ismertek olyan daganatok (jól differenciált pajzsmirigy carcinomák és neuroendokrin tumorok), melyek nem halmozzák az  $^{18}\text{F}$ FDG-t. Ezekből kifolyólag indokoltá váltak más, tumorspecifikus célpontokat (pl. Aminopeptidáz N/CD13) célzó radiotracerek fejlesztése az orvosbiológiai kutatásokban. Az aminopeptidáz N (APN/CD13) az angiogenezis, azaz az új ér képződés folyamatának egyik kulcsfontosságú molekulája. Az APN/CD13 egy közel 1000 aminosavból álló, II-es típusú membránkötött metalloproteináz, mely három fő funkcióval jellemezhető: enzim, receptor és szignalizációs molekula. Normál expressziója megfigyelhető a vese és vékonybél epitelsejteken, az idegrendszerben és mieloid sejteken. Azonban számos humán eredetű klinikai mintán, így

emlő- és prosztatata daganatokban, ovarium-, pajzsmirigy-, colon-, tüdő- és pancreas carcinomákban és melanomákban igazolódott az APN/CD13 pozitivitás. Tumor-homing molekulák azonosítására irányuló fág-display technika segítségével felfedeztek egy aszparagin-glicin-arginin aminosavakat tartalmazó peptidszekvenciát (NGR), mely specifikusan kötődik az APN/CD13 sejtfelszíni molekulához. Az NGR molekula lehetőséget teremt az APN/CD13 molekulát expresszáló daganatok diagnosztikájára például PET képalkotással, valamint daganatellenes szerekkel konjugálva hatékony és kevésbé toxikus kezelést biztosíthat. Az NGR molekula lineáris és ciklikus változatai eltérő képalkotási tulajdonságokkal jellemezhetőek, a ciklikus változat jóval stabilabb és specifikusabb tumorkötési képességgel rendelkezik, mint a lineáris változat. Korábbi munkánkban NOTA kelátorral konjugált ciklikus NGR molekula ( $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)) APN/CD13 specificitását igazoltuk subcutan Ne/De tumoral transzplantált patkányokon *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatokkal. Az alkalmazott  $^{68}\text{Ga}$  radioizotóp PET képalkotás szempontjából ideális fizikai tulajdonságokkal rendelkezik, valamint előállításához nem szükséges ciklotron jelenléte, hiszen egy egyszerű  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátorból költséghatékonyan kinyerhető a  $^{68}\text{Ga}$  izotóp.

## 2. Célkitűzések

A korábban említetteknek megfelelően célul tűztük ki a radiokémiai munkacsoport által előállított, APN/CD13 molekulát célzó radiotracerok diagnosztikai és terápiás hatékonyság monitorozására irányuló alkalmazhatóságának vizsgálatát:

- Vizsgálni kívántuk a hypoxia és angiogenesis kapcsolatát *in vivo* PET és *ex vivo* módszerrel subcutan He/De tumorokon  $^{68}\text{Ga}$  jelzett angiogenesis és hypoxia specifikus radiotracerok felhasználásával.
- Igazolni kívántuk a radiokémiai munkacsoport által előállított négy c(NGR) származék APN/CD13 specificitását, melyhez *in vivo* PET és *ex vivo* vizsgálatokat végeztünk subcutan He/De és Ne/De tumoros állatokon.
- Vizsgálni kívántuk az egyik APN/CD13 specifikus c(NGR) származék alkalmazhatóságát daganatellenes terápia hatékonyság követésére. Ehhez subcutan HT1080 és B16F10 tumoros egereket kezeltünk APN/CD13 gátló kemoterápiás szerekkel (actinonin és bestatin), majd a kezelések hatékonyságát *in vivo* PET képalkotással követtük.
- Igazolni kívántuk az alkalmazott tumorok APN/CD13 pozitivitását western blot vagy immunhisztokémiai módszerrel.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 A vizsgált radiotracerok előállításai

A radiokémiai munkacsoport tagjai  $\alpha\text{v}\beta_3$ , APN/CD13 és hypoxia specifikus radiotracerokat állítottak elő. Az előállítás első lépése a különböző c(NGR) peptidek vagy nitroimidazol kelátorral való konjugálása.

Az  $\alpha\text{v}\beta_3$  receptorhoz kötődő RGD peptid kelátorral konjugált változatát (NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>) kereskedelmi forgalomból szereztük be, melyet további tisztítás nélkül alkalmaztunk a <sup>68</sup>Ga-al történő jelölések során. A c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> peptidet kétféle kelátorral, a p-SCN-Bn-NOTA és NODAGA-NHS-észter-rel is konjugáltuk. A c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> peptideket p-SCN-Bn-NODAGA kelátorral, a nitroimidazol pedig DOTA kelátorral konjugáltuk.

Az így kapott NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>, NOTA-c(NGR), NODAGA-c(NGR), NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>, NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és DOTA-Nitroimidazol prekursorokat szemi- preparatív HPLC-vel megtisztítottuk (peptidek esetében Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlop felhasználásával, 4 ml/perc áramlási sebességgel, nitroimidazol esetében Luna C18 10 μm oszlopon, 5 ml/perc áramlási sebességgel) liofilizáltuk és szerkezetüket ESI-MS segítségével határoztuk meg.

A következő lépés a tisztított prekursorok <sup>68</sup>Ga-al való jelölése volt. A <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generátor eluálásához HCl-t alkalmaztunk, majd az eluátumot pufferteltük. Ezt követően a puffertelt <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub>-hoz hozzáadtuk a peptid prekursorokat és 95°C-on, 5 percig, keverés nélkül inkubáltuk őket. A nitroimidazol esetében az inkubálás szintén 95°C-on, de 15 percig történt. A tisztítási-formulázási lépés során a peptides reakcióelegyet HLB oszlopra, a nitroimidazol reakcióelegyet SPE oszlopra vittük fel, majd fiziológiás sóoldat segítségével nyertük vissza a radiojelölt vegyületeket, melyeket végül sterilre szűrtünk.

Az átadott radiojelölt vegyületek minőségellenőrzése HPLC módszerrel történt, melynél peptidek esetében Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopot használtunk fel, 1,2 ml/perc áramlási sebességgel, a nitroimidazol esetében pedig Luna C18 oszlopot alkalmaztunk.

Végül meghatároztuk a radiojelölt vegyületek LogP értékét és szérumbiztonságát is. A megoszlási hányadost (LogP) oktanol- PBS 1:1 arányú elegyében határoztuk meg kirázásos módszerrel. Ehhez 10 μl vizes fázisban lévő radioaktív vegyületet adtunk 0,5 ml oktanol-t tartalmazó kémcsőbe, majd hozzáadtuk a 0,5 ml PBS-t. Az egyensúlyi állapot eléréséhez erősen

összeráztuk az elegyet, majd 5 percig 20.000 rpm-en centrifugáltuk a mintát. Mindkét fázisból (vizes és oktanolos) három párhuzamos mérést végeztünk. A centrifugacsövek egyenként 100 µl mintát tartalmaztak, melyek radioaktivitását kalibrált gamma számlálón (HEWLETT PACKARD Cobra II Autogama Gamma Counter) mértük meg.

A <sup>68</sup>Ga- radiojelölt vegyületek kémiai stabilitás vizsgálatát PBS-ben végeztük 95°C-on. Különböző időpontokban (0, 30, 60, 90 és 120 perc) 25 µl mintát szűrtünk fel reverz fázisú HPLC-re.

Az enzimikus stabilitás meghatározásához egy törzsoldatot készítettünk 100 µl radioaktív oldatból 1 ml PBS hozzáadásával. 450 µl patkány vagy egér szérumhoz 50 µl-t pipettáztunk a törzsoldatból, majd 37°C-on inkubáltuk az elegyet. Eltérő időpontokban (0, 30, 60, 90 és 120 perc) a törzsoldatból 50 µl mintát pipettáztunk Eppendorf csőbe, amihez ugyanilyen mennyiségű hideg abszolút EtOH-t adtunk. Az üledékek eltávolítása céljából 5 percig 20.000 rpm-en centrifugáltuk a mintánkat, majd ezt követően távolítottuk el a felülúszót. A felülúszót az analitikai HPLC eluensével kihígítottuk majd a standard protokolnak megfelelően végeztük el az analitikai vizsgálatot.

A radiotracerek előállítását és minőségellenőrzését Stéfánné Dénes Noémi és dr. Szücs Dániel végezte.

### 3.2 Sejttenyésztés

A Ne/De sejteket (patkány eredetű mesoblastos nephroma) 10% FBS-sel és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal kiegészített DMEM sejttenyésztő folyadékban és T75-ös sejttenyésztő flaskában tenyésztettük.

A He/De sejteket (patkány eredetű hepatocelluláris carcinoma) 10% FBS-sel és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal kiegészített IMDM sejttenyésztő folyadékban és T75-ös sejttenyésztő flaskában tenyésztettük.

Az ATCC-től származó HT1080 sejteket (humán eredetű fibrosarcoma) 10% FBS-sel és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal kiegészített GlutaMAX™ DMEM sejttenyésztő folyadékban és T75-ös sejttenyésztő flaskában tenyésztettük.

Az ATCC-től származó B16F10 sejteket (egér eredetű melanotikus melanoma) 10% FBS-sel, 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal, 1% MEM nem esszenciális aminosav oldattal (Gibco™) és 1% MEM vitamin oldattal (Gibco™) kiegészített GlutaMAX™ DMEM sejttenyésztő folyadékban és T75-ös sejttenyésztő flaskában tenyésztettük.

A sejteket 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában és 95% páratartalom mellett tenyésztettük sejttenyésztő inkubátorban (ESCO CCL-170B-8) és 2 naponta passzáltuk. Tumor indukcióra a sejtek 5. passzálása után került sor, ekkor a sejteket a sejttenyésztő flaskából eltávolítottuk, megszámloltuk, centrifugáltuk és a kívánt térfogatban vettük fel. A sejtek életképességét tripánkéék festéssel vizsgáltuk mikroszkóp (Olympus CH-2) alatt.

### 3.3 Kísérleti állatok

A kísérleteink első (tumoros n=36; kontroll n=9) és második (tumoros n=64; kontroll n=12) részében felhasznált 16 hetes hím F-344 patkányokat és kísérleteink harmadik részében felhasznált hím 10-12 hetes CB17 SCID (kezelt tumoros n=20; kezeletlen-kontroll n=10) és C57BL/6 (kezelt tumoros n=20; kezeletlen-kontroll n=10) egereket légkondicionált szobában 26±2°C hőmérsékleten, 50±10% páratartalom mellett és mesterséges 12 órás cirkadián megvilágítási körülmények között konvencionális állatházban tartottuk (Állatházi engedély száma: III/6- KÁT- 2015). A F-344 patkányokat IVC-ZJ3 IVC rendszerben, LTE E-004 nyárfa alommal ellátott IVC ketrecekben, a C57BL/6 és CB17 SCID egereket Sealsafe® Blue line IVC rendszerben, sterilizált REHOFIX® kukoricacsutka granulátum alommal tartottuk, sterilizált csapvízzel ad libitum itattuk és sterilizált SDS-VRF1 szemi-szintetikus rágcsálótappal ad libitum etettük. A kísérleteket az Európai Unió és a Magyarországi törvényeknek megfelelően a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága regisztrálta (8/2016/DEMÁB). Amennyiben az állatokon rövid ideig tartó mérsékelt fájdalom jelentkezett, úgy a kísérlet ideje alatt orális fájdalomcsillapítást alkalmaztunk 15 mg/kg/nap ibuprofen hatóanyaggal ad libitum. Az állatokat folyamatosan monitoroztuk és amennyiben distressük fokozódott, a fent említett dózist 30 mg/kg dózissá emeltük.

### 3.4 Tumorindukció

A hím F-344 patkányokat, illetve a hím CB17 SCID vagy C57BL/6 egereket dedikált kisállat inhalációs altatógéppel elaltattuk (indukció: 3% Isoflurán, fenntartás: 1,5% Isoflurán + 0,4 l/perc O<sub>2</sub> + 1,2 l/perc N<sub>2</sub>O). A kísérleti állatok bal válláról a szőrt leborotváltuk, majd fertőtlenítés után a patkányok bőre alá 5x10<sup>6</sup> He/De vagy Ne/De sejtet (150 µl fiziológiás sóoldatban), a CB17 SCID egerek bőre alá 1,5x10<sup>6</sup> HT1080 sejtet (150 µl fiziológiás sóoldatban), a C57BL/6 egerek bőre alá pedig 3x10<sup>6</sup> B16F10 sejtet (150 µl fiziológiás sóoldatban) injektáltunk.

### 3.5 APN/CD13 gátlószeres kezelés

A tumor indukció napjától (1. nap) számított negyedik napon a HT1080 sejtekkel subcutan transzplantált CB17 egereket (n=30) és a B16F10 sejtekkel subcutan transzplantált C57BL/6 egereket (n=30) random módon három csoportra osztottuk: kontroll, bestatin-kezelt (15 mg/kg), actinonin-kezelt (5 mg/kg). A napi bestatin (150 µl Humaqua-ban feloldva) és actinonin (először 10 µl abs. EtOH-ban oldva, majd 140 µl Humaqua-val tovább hígítva) kezeléseket a negyedik naptól kezdve 7 napon keresztül injektáltuk intraperitoneálisan.

### 3.6 *In vivo* PET vizsgálatok

A kisállat PET/MRI vizsgálatokra a Debreceni Egyetem Klinikai Központ területén működő Scanomed Kft. Transzlációs Központjának Preklinikai Laboratóriumában került sor. A kísérletek első részében a subcutan He/De tumoros állatokat (n=27), valamint a kontroll (egészséges) állatokat (n=9)  $10,2 \pm 1,1$  MBq  $^{68}\text{Ga}$  jelzett angiogenezis ( $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és hypoxia ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol) specifikus radiotracerrel vizsgáltuk. A tumornövekedés követésére a tumorindukciótól számított 10. naptól kezdve  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel és  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazzal naponta felváltva vizsgáltuk a subcutan He/De tumoros állatokat.

A radiokémiai munkacsoport által előállított két radiotracer elnevezése az *in vivo* vizsgálatokban c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>-ről c(NGR) (MG1)-re, a c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>-ről pedig c(NGR) (MG2)-re módosul, melyekben az MG rövidítés Prof. Dr. Mező Gábor iránti megbecsülésünkre utal. A kísérletek második részében hím F-344 kontroll (egészséges) (n=12) és subcutan He/De és Ne/De tumoros patkányokat (n=40)  $11 \pm 1$  nappal a tumoros sejtek injektálása után 150 µl fiziológiás sóoldatban  $12,3 \pm 1,2$  MBq  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) radiotracerrel injektáltuk 26 G-s tűvel a farokvénájukon keresztül. Az állatokat a radiotracer injektálása és a vizsgálat alatt inhalációs módszerrel (indukció: 3% Isoflurán fenntartás: 1,5% Isoflurán + 0,4 l/perc O<sub>2</sub> + 1,2 l/perc N<sub>2</sub>O), dedikált kisállat altatógéppel altattuk. A teljes test PET vizsgálatokat (10 perces statikus vizsgálatok) preklinikai nanoScan PET/MRI 1T készülékkel végeztük 90 perccel a radiotracer injektálását követően. Az állatok mozgásának megelőzése céljából és az állandó testhőmérséklet fenntartása miatt a patkányokat speciális patkányágyban vizsgáltuk és a FOV (Field Of View) középpontjába pozicionáltuk. A szövetek és szervek anatómiai lokalizációjának meghatározására T1 súlyozott MRI felvételeket készítettünk.

A kisállat miniPET vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Képző Intézet Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszéken működő miniPET berendezésen végeztük el. Kísérleteink harmadik részében a tumoros (subcutan HT1080 és B16F10) állatokat a tumor indukcióját követő 6. és 11. napon, Isoflurán inhalációs módszerrel, dedikált kisállat inhalációs altatógéppel elaltattuk. Ezt követően az állatok farokvénáján keresztül 26 G-s tűvel 150 µl térfogatban, Salsol-Etanol 2:1 arányú oldatban  $5,5 \pm 0,2$  MBq  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  radiotraceret injektáltunk. A 90 perc inkubálási idő letelte után 20 perces statikus PET felvételeket készítettünk a tumoros területről.

A PET/MRI vizsgálatokból származó PET adatok rekonstrukcióját 3 dimenziós iteratív (3D-OSEM) algoritmussal végeztük. A PET és az MRI képek automatikusan regisztrálásra kerültek a PET/MRI készülék akvizíciós szoftvere (Nucline) által. A rekonstruált, reorientált és regisztrált képeket az InterView™ FUSION képelemző szoftverrel elemeztük.

A miniPET gyűjtésből származó adatok a jelfeldolgozó számítógépre 100BASE-TX Ethernet kapcsolaton keresztül kerülnek át. Az alkalmazott Multi Modal Medical Imaging (M3I) akvizíciós szoftver alkalmas az adatok gyűjtésére és feldolgozásra. Az adatok rekonstrukciójához 2D ML-EM iteratív rekonstrukciót alkalmaz a rendszer. A rekonstruált képeket BrainCAD képelemző programmal értékeltük ki.

A képek elemzése során a tumorok és háttér szervek radiotracer felvételének megállapításához SUVmean, SUVmax és T/M (tumor/izom) SUVmean, T/M SUVmax értékeket határoztunk meg.

### 3.7 Blokkolási vizsgálatok

A blokkolási vizsgálatok során 200 µg jelöletlen, kelátorral konjugált peptidet (NOTA-c(NGR) (kísérletek első része) vagy c(NGR) molekulát (kísérletek második része) injektáltunk 100 µl fiziológiás sóoldatban a subcutan He/De (kísérletek első részében n=9, második részében n=12) és/vagy Ne/De (kísérletek második részében n=12) tumoros állatok laterális farokvénáján keresztül 5 perccel a radiojelölt molekula injektálása előtt. 90 perc inkubálási időt követően az állatokat elaltattuk és PET/MRI vizsgálatokat végeztünk a korábbiakban leírtaknak megfelelően.

### 3.8 *Ex vivo* vizsgálatok

A kísérletek első részében a kontroll (egészséges) és subcutan He/De tumoros kísérleti állatokat a daganatok beültetése után  $9 \pm 1$  nappal (kis méretű tumor, n=3),  $12 \pm 1$  nappal (közepes

méretű tumor, n=3) és 15±1 nappal (nagy méretű tumor, n=3), a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>, <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) és <sup>68</sup>Ga-DOTA-Nitroimidazol radiotraccerekkel végzett PET/MRI vizsgálatok után túlaltattuk. A kísérletek második szakaszában a <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) vagy <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) vagy <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1) vagy <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2) -vel végzett PET/MRI képalkotás után, a tumor indukálása után 11±1 nappal a He/De és Ne/De tumoros (n=64) és kontroll (n=12) állatokat túlaltattuk. A kísérletek harmadik részében a kontroll és kezelt HT1080 (n=30) és B16F10 (n=30) tumoros állatokat a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) -rel végzett PET vizsgálatok után és a tumorindukciót követő 12±1 napon túlaltattuk. Ezt követően az állatok hasüregét, valamint a mellüregét megnyitottuk és a szívből vérmintát vettünk. Apró darabokat távolítottunk el a májból, lépéből, vesékből, gyomorból, vékony- és vastagbélből, izomból, tüdőből, szívből, zsírból és tumorból. A minták tömegét analitikai mérlegen és radioaktivitását kalibrált gamma-számlálóval lemértük, és az értékeket ID%/g-ban fejeztük ki Microsoft Excel szoftver segítségével.

### 3.9 Immunhisztokémia és western blot vizsgálatok

Az immunhisztokémiai vizsgálat első lépéseként a tumoros állatok boncolását követően a tumor minták kiszáradást megelőzendő, fiziológias sóoldattal átitatott gézlapokba csomagoltuk a mintákat. Ezt követően a tumor mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd 6 µm vastag metszeteket készítettünk kriosztáttal. Az elkészült metszeteket 10%-os pufferezett neutrális formalinban fixáltuk. A fixáló kimosását követték az immunhisztokémiai reakciók, melynek első lépése során a metszeteket pH6-os citrát pufferben tártuk fel. Ezt követte az egér-anti patkány CD13 primer antitesttel történő inkubálás 1:50 hígításban 35 percig. A detektáló rendszer HRP polimer (másodlagos antitesthez konjugált tormaperoxidáz) és kromogénjeként használt DAB (3,3 Diaminobenzidin) alapú volt. Ennek során a tormaperoxidáz polimerrel 15 percig inkubáltuk a mintákat, majd PBS pufferrel mostuk. Az előhívás mikroszkópos kontroll mellett történt DAB kromogén felhasználásával. Csapvizes mosással állítottuk le a reakciót, melyet a magfestés, víztelenítés és fedés követett. Pozitív kontrollként az állatokból kipreparált vese mintát használtuk fel, negatív kontrollként a primer antitest nélküli reakció eredménye szolgált. A metszetek kiértékelését 20-szoros nagyításban, Olympus DP72 kamerával ellátott Olympus B72 mikroszkóp alatt Twain Driver Ver 03.01 Image Analyzer szoftver segítségével végeztük. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat Rác Szilvia végezte.

A western blot vizsgálatokhoz a fagyasztott szövetmintákat folyékony nitrogén alatt porlasztottuk dörzsmozsárban, a kapott port TissueLyser II lízis pufferben feloldottuk. Ezt követően a sejteket RIPA pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100,

0,5% nátrium deoxikolát, 1 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF, 1 mM PMSF, proteáz inhibitor koktél) lizáltuk. A szövet homogenizációját követően a mintáinkban fehérjét izoláltunk. A fehérje mintákat (10-40  $\mu\text{g}$ ) 10% SDS poliakrilamid gélen szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra elektrotranszferáltuk. Az 1 órán át TBST tartalmú 5% BSA-val való blokkolás után a membránokat primer antitesttel (hígítás: 1:1000; egér- anti patkány CD13 és egér-anti humán Integrin  $\alpha_v\beta_3$ ) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Egyszeri TBST oldattal való mosás után, a membránokhoz IgG-HRP-vel konjugált másodlagos antitestet adtunk 1:2000 hígításban. A kötéseket felerősített kemolumineszcens reakcióval tettük láthatóvá. Loading kontrolként  $\beta$ -actint használtunk.

### 3.10 Statisztikai analízis

A PET képek analíziséből származó SUV értékeket átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. Az adatok összerendezéséhez Microsoft Excel szoftver használtunk. Az adatok kiértékeléshez kétmintás t-próbát, kétszemponos varianciaanalízist (ANOVA) és Mann Whitney U tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szint  $p \leq 0,05$  és  $p \leq 0,01$  volt.

## 4. Eredmények

### 4.1 Radiokémiai jelölések eredményei

A kelátorral konjugált peptidek és nitroimidazol szintézisei minden esetben sikeresen lezajlottak. A  $^{68}\text{Ga}$ -al való jelölés 15-20 perc alatt végbement. A formulázási lépés után meghatározott radiokémiai tisztaság minden esetben nagyobb volt, mint 95%. A radiotracerek moláris aktivitásai 5,49 és 7,36 GBq/ $\mu\text{mol}$  közöttiek voltak.

A vizsgált radiotracerek LogP értékei -4,07 és -2,29 közöttiek voltak, melyek a tracerok hidrofíli jellegére utalnak.

Mindegyik analóg emelt hőmérsékleten ( $95^\circ\text{C}$ ), 7,4-es pH-n PBS-ben stabilnak (<90%) bizonyult 120 perc letelte után is. Az eredeti szerkezet felbomlása patkány szérumban a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> esetében kifejezett volt, mely a két radiotracer mérsékelt vérbeli stabilitását jelzi.

### 4.2 Hypoxia és angiogenezis vizsgálatának *in vivo* és *ex vivo* eredményei

Vizsgálatainkat kontroll patkányok *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatával kezdtük. Az *in vivo* vizsgálatoknál az egészséges, nem tumorhordozó F-344 patkányokról egésztest PET/MRI-t készítettünk a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) vagy a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol radiotracerek intravénás injektálását követő 90 perc múlva. A PET/MRI felvételekből megállapítható, hogy mindhárom radiotracer a vizeletelvezető rendszeren keresztül ürül ki a szervezetből. Az *ex vivo* vizsgálatok korreláltak az *in vivo* vizsgálatokkal.

A He/De tumorral subcutan transzplantált F-344 patkányokban a He/De tumor  $\alpha_v\beta_3$  receptor expresszió vizsgálatához  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-t, az APN/CD13 expresszió vizsgálatához  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-t, a hypoxia vizsgálatához  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol injektáltunk az állatok farokvénájába, majd 90 perc inkubálási idő után PET/MRI képalkotást végeztünk. A subcutan He/De tumorok mindhárom tracerrel jól azonosíthatóak volt. A bomláskorrigált PET képek kvantitatív és kvalitatív analízise során heterogén tumorszerkezetet és radiotracer felvételt tapasztaltunk a subcutan transzplantált He/De tumorokban mindhárom radiotracerrel. Szignifikáns ( $p \leq 0,01$ ) különbséget tapasztaltunk az avid (radiotraceret halmozó) és nem avid (radiotraceret nem halmozó) területek között.

A  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) APN/CD13 specificitását blokkolási vizsgálattal is alátámasztottuk *in vivo* PET képalkotás segítségével. A SUV értékek kvantitatív elemzése során szignifikánsan

( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabbak voltak a blokkolás során, mint az alapvizsgálatoknál. Ezek az eredmények igazolják a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  APN/CD13 specificitását.

A subcutan He/De tumorok angiogenezisét és hypoxiáját napi rendszerességgel vizsgáltuk felváltva hypoxiát célzó  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazollal}$  és angiogenezist célzó  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)-rel}$ . A kvalitatív PET/MRI vizsgálatok kimutatták, hogy a tumor növekedésével arányosan nőtt a tumoron belüli hypoxia és angiogenezis mértéke is. A hypoxiás és angiogenikus területek méretének változása korrelált a tumor térfogatának változásával, melyet a kvantitatív SUV adatok is alátámasztanak. A tumorok  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  és  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazol}$  felvétele fokozódott a tumor méretének növekedésével. A  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  felvétel korrelált ( $R^2=0,9953$ ) a tumor növekedésének mértékével. Hasonló eredményeket kaptunk a  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazollal}$  végzett vizsgálatok esetén, ahol szintén korrelációt ( $R^2=0,9692$ ) figyeltünk meg az emelkedett  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazol}$  felvétel és a tumortérfogat között. A két radiotracer akkumulációját vizsgálva a tumornövekedés függvényében, azt találtuk, hogy mind a két radiofarmakon fokozott növekedést mutat az idő előrehaladtával, egymással szorosan korrelálva. Az *in vivo* PET vizsgálatokból származó adatokat az *ex vivo* mérési eredmények is megerősítették.

#### 4.3 Különböző c(NGR) származékok *in vivo* és *ex vivo* összehasonlító vizsgálatának eredményei

Kísérleteink második szakaszában 4 különböző c(NGR) származék összehasonlítását végeztük el. Első lépésként kontroll állatokon vizsgáltuk *in vivo* és *ex vivo* módon a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ , a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ , a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG1) és  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG2) radiofarmakonok eloszlását. A PET képek kvalitatív és kvantitatív elemzése során alacsony halmozást figyeltünk meg a hasi és mellkasi szervekben mind a négy vizsgált radiotracer esetében, azonban jelentős halmozás volt látható a vizeletelvezető rendszerben. Nem találtunk szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ) eltérést a vizsgált szervek és szövetek halmozásában egyik radiotracerrel sem. Az *in vivo* PET/MRI eredmények jól korreláltak az *ex vivo* szervi megoszlásos eredményekkel.

A  $^{68}\text{Ga}$ -al jelölt NGR származékok APN/CD13 specificitásának *in vivo* vizsgálatához a subcutan He/De és Ne/De tumoros F-344 patkányokat intravénásan injektáltuk a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG1) vagy  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG2) radiotracerekkel, majd 90 perc inkubálási idő után az állatokat elaltattuk és teljes test PET/MRI vizsgálatokat végeztünk. A subcutan növekedő tumorok jól láthatóak 90

perccel a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  és a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG1) injektálása után, azonban mérsékelt felvételt tapasztaltunk a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG2) esetében, melyet a kvantitatív SUV analízis is alátámasztott. Szignifikánsan ( $p \leq 0,05$  és  $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb tracer felvételt tapasztaltunk a He/De és Ne/De tumorokban a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG2) injektálása után, mint a másik három vizsgált radiotracer esetében, ahol a SUVmean és SUVmax értékek ennek kb. 2-5-szöröse voltak a He/De tumorokban és 1,5-3-szorosai voltak a Ne/De tumorokban. Hasonló tendenciát véltünk felfedezni a tumor-háttér (izom) arányokban mind a két tumor esetében, ahol szintén a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG2) mutatta a legalacsonyabb arányt. Összességében a NOTA és NODAGA kelátorokkal konjugált c(NGR)-ek nagyobb mértékben halmozódtak a He/De és Ne/De tumorokban, mint a NODAGA kelátorral konjugált MG1 és MG2 változatok.

A  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG1) és  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (MG2) APN/CD13 specificitásának igazolására *in vivo* blokkolási vizsgálatokat végeztünk. A PET képek vizuális értékelésekor csökkent akkumulációt láttunk a blokkolt tumorokban, az alapállapothoz viszonyítva. Továbbá, a PET képek SUV analízisekor is szignifikánsan alacsonyabb tracer felvételeket tapasztaltunk a blokkolás hatására, mint az alapvizsgálatoknál. Összességében tehát elmondható, hogy a PET képek kvalitatív és kvantitatív elemzésekor is megerősítést nyert a vizsgált radiotracer APN/CD13 specificitása.

Mind az alap-, mind pedig a blokkolási vizsgálatoknál az *in vivo* PET/MRI eredmények jól korreláltak az *ex vivo* szervi megoszlásos eredményekkel.

#### 4.4 Actinonin és bestatin, mint APN/CD13 gátlószer hatékonyágának vizsgálati eredményei

Kísérleteink utolsó fázisában két természetes APN/CD13 gátlószer, az actinonin és a bestatin hatását kívántuk követni  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  radiotracerrel HT1080 és B16F10 subcutan tumoros állatokon. A tumorindukciótól számított negyedik naptól kezdve, 7 napon keresztül napi egyszeri intraperitoneális actinonin (5 mg/kg) vagy bestatin (15 mg/kg) kezelést kaptak az állatok. A tumor injektálásától számított 6. és 11. napon 20 perces statikus PET felvételeket készítettünk 90 perccel a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  injektálását követően a kontroll-kezeletlen és kezelt (actinonin vagy bestatin) állatok tumoros területéről.

A subcutan HT1080 tumoros állatok PET képeinek kvalitatív analízise során megállapítottuk, hogy mind a kontroll, mind pedig az actinonin-kezelt állatok tumora jól azonosítható volt a 6. és 11. napi PET felvételeken. Ezzel szemben a bestatin-kezelt tumorokat nehéz volt azonosítani

az alacsony  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  felvétel miatt. A PET képek kvalitatív analízisekor is azt találtuk, hogy mind a 6., mind a 11. napon szignifikánsan ( $p \leq 0,05$  és  $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb SUV értékeket kaptunk a bestatin-kezelt tumorokban, mint a kontroll-kezeletlen vagy actinonin-kezelt csoportokban. Meghatároztuk a kontroll és kezelt tumorok kontrasztosságát, azaz a T/M SUVmean értékeket is, mely jelzi a kezelések hatékonyságát. A kontroll csoport 6. és 11. napi T/M SUVmean értékeihez viszonyítva szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb értékeket kaptunk a bestatin-kezelt csoportban, mind a 6. és 11. napon, valamint a 11. napon szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) magasabb értékeket mértünk az actinonin-kezelt csoportban. Az *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatok eredménye jól korrelált az *in vivo* vizsgálati eredményekkel. Magas ID%/g értékeket kaptunk a vesében, ezzel szemben a hasi és mellkasi szervekben alacsonyat. A kezelt és kontroll állatok egészséges szerveinek és szöveteinek  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  felvételében szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ) különbséget nem láttunk. Meghatároztuk a tumor/izom (háttér) ID%/g hányadosokat is, melyek szintén jól korreláltak az *in vivo* képalkotás során kapott T/M SUVmean értékekkel. A kontroll állatok T/M értékeihez viszonyítva szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) magasabb T/M értéket kaptunk az actinonin-kezelt csoportban és szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) alacsonyabb értéket a bestatin-kezelt csoportban.

A B16F10 tumoros állatok esetében is elvégeztük az actinonin és bestatin kezelések hatékonyságának követését  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ -rel. A PET képek vizuális értékelésekor a kontroll csoport tumoraiban magas  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  halmozást, a bestatin- és actinonin-kezelt tumorokban azonban mérsékeltbb halmozást tapasztaltunk. A PET felvételek kvantitatív analízisekor az előzőekben leírtakkal megegyező tendenciát véltünk felfedezni. A kontroll tumorok SUVmean értékei szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) magasabbak voltak, mint a bestatin- vagy actinonin-kezelt csoportok SUVmean értékei. A 6. és 11. nap között jelentős tracerfelvétel emelkedés következett be a kontroll csoportnál, míg ez a fajta emelkedés a két kezelt csoportban elhanyagolható mértékű volt. A HT1080 tumorokhoz hasonlóan a B16F10 tumoroknál is összehasonlítottuk a T/M SUVmean értékeket. Az actinonin- és bestatin-kezelt csoportok T/M SUVmean értékeit a kontroll csoportéhoz viszonyítva szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabbak voltak a 6. és 11. napon. A B16F10 subcutan tumoros állatoknál is elvégeztük az *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatot és az eredmények korreláltak az *in vivo* eredményekkel. Alacsony mellkasi és hasi, valamint magas vese tracerfelvétel volt megfigyelhető a kísérleti állatoknál. Nem volt szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ) különbség a vizsgált szervek és szövetek ID%/g értékeiben a kezelt és a kontroll csoportok között. Azonban a T/M

ID%/g értékekben volt eltérés, jelentősen alacsonyabb T/M értékeket kaptunk a kezelt csoportokban, mint a kontroll csoportban.

A tumorok  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  felvétele mellett azok méretbeli változását is nyomon követtük. Azt találtuk, hogy a kontroll-kezeletlen és az actinonin-kezelt, HT1080 tumoros állatok tumorának mérete a tumorindukciótól számított 4. naptól kezdve a 11. napig folyamatosan növekedett. Azonban a kontroll tumorokhoz képest szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) kisebb tumorméreteket mértünk a bestatin-kezelt csoportban a 4., 6. és 11. napon. A subcutan B16F10 tumoros állatok közül az actinonin- és bestatin-kezelt tumorok méretbeli növekedése elhanyagolható volt. Ezzel szemben a kontroll-kezeletlen B16F10 tumorok jelentősen megnövekedtek a 11. napra.

## 5. Megbeszélés

A daganatok hypoxiája és angiogenezise egy intenzíven kutatott terület a klinikai és preklinikai PET képalkotás és radiógyógyszer fejlesztés területén. A humán klinikai rutinképzés során leggyakrabban az  $^{18}\text{F}$ FDG-t alkalmazzák a daganatok és áttétek kimutatására, azonban ez nem specifikus sem hypoxiára, sem pedig az angiogenikus markerek vizsgálatára, továbbá kevésbé alkalmasak a specifikus daganatellenes (pl. daganat érzékelését gátló) terápia hatékonyságának követésére. Megnőtt tehát az igény ezen folyamatokra specifikus radiotracer fejlesztése iránt. A kutatómunka első fázisában a hypoxia és angiogenesis kapcsolatát vizsgáltuk  $\alpha\text{v}\beta_3$  receptorra specifikus  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel, APN/CD13-ra specifikus  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel és hypoxiára specifikus  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazollal. A vizsgált radiofarmakonok hidrofil tulajdonságára utal a kontroll állatok *in vivo* és *ex vivo* vizsgálataiban megfigyelt vizeletelvezető rendszeren keresztüli ürülési mód. A He/De tumorok transzplantációját követően felváltva hypoxia és angiogenesis specifikus tracerrel vizsgáltuk a tumorokat és meglepő módon már a 10. napon magas  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvételt tapasztaltunk a subcutan He/De tumorok 125 mm<sup>3</sup>-es méreténél. Továbbá, a 11. naptól kezdve egyértelműen elkülöníthetőek voltak a hypoxiás ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol avid) és normoxiás ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol nem avid) régiók, melyet az avid területek szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) magasabb SUV értékei is alátámasztottak. Ezt a fajta heterogenitást más kutatócsoportok is leírták, akik azt találták, hogy az egész tumor akár 50-60%-át is kitehetik a hypoxiás területek. Az irodalomból ismert, hogy az APN/CD13 receptorok ligandjaként ismert NGR molekulák és az  $\alpha\text{v}\beta_3$  receptorokhoz kötődő RGD molekulák alkalmasak ezen receptorok expressziójának vizsgálatára. Kutatócsoportunk korábbi publikációjában, primer vesetumorban (Ne/De) szignifikánsan magasabb tracerfelvételt írtunk le  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel, mint a kereskedelemben kapható  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel. A jelenlegi munkában leírt hepatocelluláris carcinoma modellben szintén megfigyelhető volt ez a típusú különbség a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> halmozásának mértéke között. Ennek oka a He/De tumorokban magasabb mértékben kifejeződő APN/CD13 molekula, melyet western blot vizsgálattal támasztottunk alá. A vizsgált He/De tumoron belül, mind az angiogenesis-, mind a hypoxia specifikus radiotracerrel heterogén tumorszerkezetet azonosítottunk. Kísérleteink alapfeltevése az volt, hogy a hypoxiás és az angiogenikus területek együtt növekednek a tumor térfogatának növekedésével. A feltevésünk igazolódott, mikor azt láttuk, hogy a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvétel emelkedett és erős korrelációt mutatott a tumor térfogatának növekedésével. Továbbá, azt is feltételeztük, hogy a

hypoxia fokozódásával az angiogenezis mértéke növekszik és következményesen a tumor mérete is nő. Ezt a feltételezést indirekt módon megerősítette az a tény, hogy a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvétel fokozódásával erősen korrelált a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) halmozódás is a He/De tumorban. Korábbi vizsgálatainkból ismert, hogy a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) alkalmas Ne/De (mesoblastos nephroma) tumorok kimutatására, most pedig megerősítést nyert, hogy He/De tumorok APN/CD13 expressziójának vizsgálatára is alkalmas az említett radiotracer. Az APN/CD13 és hypoxia specifikus radiofarmakonok jelentősen hozzájárulnak a hypoxia és az angiogenezis kapcsolatának jobb megértéséhez a tumorokban.

Kísérleteink második szakaszában négy különböző c(NGR) származék összehasonlítását végeztük kontroll, valamint He/De és Ne/De tumoros állatokon. Az irodalomból már ismert, hogy az aszparagin-glicin-arginin (NGR) peptidszekvenciák specifikusan kötődnek az APN/CD13 molekulához, ebből kifolyólag más munkacsoportok és saját korábbi vizsgálatainkból is ismert, a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) radiotracer alkalmassága a daganatok APN/CD13 expressziójának kimutatására. A c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> rendkívül jó kémiai inertséggel jellemezhető peptid, mely első vonalban NOTA kelátorral került konjugálásra. Ezt követte a NODAGA kelátorhoz való kapcsolás, ahol a feltételezésünk az volt, hogy nagyon hasonló kémiai tulajdonságokkal lesz jellemezhető a két vegyület. Továbbá, két tioéter ciklizált c(NGR) származék NODAGA kelátorral való konjugálása is megtörtént, ami egy tiourea kötést és egy extra aromás gyűrűt eredményezett, amivel az analógok hidrofil tulajdonságaik a referencia vegyülethez hasonlóan megmaradtak. Az MG1 és MG2 analógok szerkezetüket tekintve csupán egy metil csoportban különböznek egymástól. Az *in vitro* lipofilicitási vizsgálatok azt mutatták, hogy az újonnan szintetizált  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) származékok mindegyike nagy hidrofilicitással jellemezhető (LogP értékek -2,2 és -4,1 közöttiek). Ezt a megfigyelést a kontroll F-344 patkányokon elvégzett *in vivo* PET és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok is alátámasztották, hidrofil tulajdonságaik révén a vizeletelvezető rendszeren keresztül ürülnek és viszonylag alacsony felvétel tapasztalható a hasi és mellkasi szervekben. A  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) relatív magasabb máj-, lép- és tüdőbeli halmozása, a többi farmakonhoz képest kisebb hidrofilicitásából eredhet. Az egészséges szervekbeli alacsony radiotracer halmozódás a képminőséget is javítja, hiszen alacsony háttéraktivitással magas tumor-háttér (pl. izom) arány érhető el, mely megkönnyíti a képek értékelését és a tumorok identifikálását leletezés során. A munka második felében subcutan He/De és Ne/De daganatos F-344 patkányokon vizsgáltuk a négy c(NGR) származék APN/CD13 specificitását, ahol a tumorok mind a négy APN/CD13 receptor kimutatását célzó radiotracerrel beazonosíthatóak voltak, azonban halmozásuk

mértéke eltérő volt. Összességében azt figyeltük meg, hogy a NOTA és NODAGA kelátorokkal konjugált c(NGR) molekulák magasabb akkumulációt mutattak a He/De és Ne/De tumorokban a NODAGA konjugált MG1 és MG2 molekulákhoz viszonyítva. A négy analóg közötti különbség eredhet a kémiai tulajdonságaikból (pl. az MG1 alacsonyabb stabilitása és az MG2 gyengébb kötési képessége), továbbá, annak ellenére, hogy azonos méretű tumorokat vizsgáltuk, jól ismert, hogy az angiogenikus markerek expressziós szintje változik a tumor növekedésével, fokozódhat különböző tumortípusokban és erősen függ a hypoxia jelenlététől és annak fokától is. A vizsgált anyagok APN/CD13 specificitása is igazolást nyert, amikor a blokkolási vizsgálatok során szignifikánsan alacsonyabb felvételt tapasztaltunk a vizsgált tumorokban, mint az alapvizsgálatok esetében. A angiogenezist célzó markerek közül az APN/CD13 egy ígéretes target a PET képalkotás területén, azonban a megfelelő  $^{68}\text{Ga}$  jelölt NGR alapú radiotracer (jelen esetben a legjobb kötési tulajdonságokkal jellemezhető  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) elengedhetetlenek a tumorok angiogenezisének pontos kimutatására és a daganatok érzékelését gátló terápiák hatékonyságának követésére.

Kísérleteink utolsó fázisában az actinonin és bestatin, mint APN/CD13 gátlószerek terápiás hatását követtük  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR)-rel. Dolgozatomban a természetes eredetű gátlószerek családjába tartozó két inhibitorral, a *Streptomyces olivoreticuli*-ből származó bestatinnal és a *Streptomyces Cutter C/2*-ből izolált actinoninnal dolgoztunk subcutan HT1080 és B16F10 tumorokon. Korábbi *in vitro* vizsgálatok igazolták a HT1080 és B16F10 sejtek APN/CD13 pozitivitását, melyet a kutatócsoportunk *in vivo* eredményei is alátámasztottak, mind a két tumortípus a kontroll-kezeletlen állatokban jól vizualizálható volt  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR)-rel. Következő lépésként az actinonin és bestatin kezelések következtek subcutan HT1080 és B16F10 tumorokon, melyek hatását szintén  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR)-rel követtük. Az actinonin gátlószert más kutatócsoportok is vizsgálták. Ők azt találták, hogy *in vitro* körülmények között mind az APN pozitív, mind az APN negatív leukémia és lymphoma sejtvonalakat gátolta. *In vivo* körülmények között azonban csak az egér eredetű leukémiák növekedését gátolta, a humán lymphomákkal szemben hatástalan volt. A kutatócsoportunk eredményei korreláltak ezekkel az eredményekkel, az egér eredetű melanoma (B16F10) tumorok esetében jelentős tracer felvétel- és tumorméretbeli csökkenést tapasztaltunk az actinonin kezelés hatására, azonban a humán eredetű fibrosarcomák esetében az alkalmazott dózizás hatástalannak bizonyult. Lehetséges magyarázatként szolgálhat erre az irodalomból már ismert felvetés, miszerint az APN/CD13 gátlószerek akár immunmodulánsként is működhetnek. Ebből kifolyólag a T és B sejtekkel nem rendelkező, HT1080 tumoral

transzplantált CB17 SCID egerekben ez a hatás nem várható. Egy másik lehetséges ok, ami miatt az actinonin nem fejtette ki gátló hatását a subcutan HT1080 tumorokban, a dozírozásban rejlik. Az eltérő tumortípusok feltételezhetően eltérő dóziszérzékenységgel jellemezhetőek, azonban ennek feltárására dóziszfüggő vizsgálatok szükségesek a továbbiakban. A bestatinnal végzett gátló vizsgálatoknál mind a két daganattípusnál hatásosnak bizonyult. A bestatin-kezelt HT1080 és B16F10 tumorok  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) felvétele és a tumorok mérete jelentősen csökkent a kezelés hatására. A bestatin direkt módon képes gátolni a tumorok növekedését és angiogenezisét az APN/CD13 blokkolása révén, valamint tumorelles immunválaszt is képes generálni azáltal, hogy fokozza a sejt mediálta immunitást, blasztogén és mitogén hatású. Korábbi megfigyelések szerint dózistól és beadás módtól függően, NK sejt gátló vagy aktiváló képességgel is rendelkezik. Feltételezhető tehát, hogy gátló hatását az NK sejtek modulálásán keresztül fejtette ki az NK sejttel rendelkező HT1080 tumoros CB17 SCID és B16F10 tumoros C57BL/6 egerekben. Összefoglalva tehát elmondható, hogy a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) alkalmas radiotracer subcutan HT1080 és B16F10-el transzplantált egerekben az actinonin és bestatin- mint APN/CD13 gátlószerek- terápiás hatásának követésére.

A He/De, Ne/De, B16F10 és HT1080 tumorok APN/CD13 pozitivitását western blot vagy immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazoltuk.

A kutatómunka során kapott új eredmények:

1. A  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) nem csak a subcutan Ne/De tumorok, hanem a subcutan He/De tumorok APN/CD13 expressziójának kimutatására is alkalmas radiotracer.
2. A subcutan He/De tumorok hypoxiájának és angiogenezisének *in vivo* PET vizsgálatokor megállapítottuk, hogy a hypoxiás és az angiogenikus területek együtt növekednek a tumor térfogatának növekedésével, valamint a hypoxia fokozódásával az angiogenezis mértéke is növekszik. Az APN/CD13 és hypoxia specifikus radiofarmakonok jelentősen hozzájárulnak a hypoxia és az angiogenezis kapcsolatának jobb megértéséhez a tumorokban.
3. A kontroll és tumoros (subcutan He/De és Ne/De) állatokon végzett *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatokból nyilvánvalóvá vált a négy vizsgált  $^{68}\text{Ga}$  jelzett c(NGR) származék ( $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2)) hidrofil jellege, hiszen kiürülésük a vizeletelvezető rendszeren keresztül történik, emellett a hasi és mellkasi szervekben kis mértékben dúsulnak.

4. A NOTA és NODAGA kelátorokkal konjugált c(NGR) molekulák magasabb akkumulációt mutattak a He/De és Ne/De tumorokban, mint a NODAGA konjugált MG1 és MG2 analógok, így a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) ígéretes radiotracernek bizonyultak a daganatok angiogenezisének pontos kimutatására.
5. A vizsgált APN/CD13 gátlók közül az actinonin subcutan B16F10 tumorokon, a bestatin subcutan B16F10 és HT1080 tumorokon fejtette ki APN/CD13 gátló hatását.
6. A subcutan HT1080 és B16F10-el transzplantált egerekben az actinonin és bestatin- mint APN/CD13 gátlók- terápiás hatásának követésére alkalmas radiotracer a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR).

## 6. Összefoglalás

Napjainkban a daganatok PET diagnosztikájának alapértelmezett radiofarmakonja az  $^{18}\text{F}$ FDG, mely széles körben alkalmazható, azonban nem tumorspecifikus és bizonyos daganatokban nem halmozódik. A radiobiológiai kutatások egy része ezért a tumorspecifikus radiofarmakonok fejlesztése felé fordult. Egy lehetséges tumorspecifikus célpont a daganatok érképződésének egyik fontos markere, az APN/CD13 sejtfelszíni molekula. Expressziójának *in vivo* vizsgálatára lehetőséget biztosítanak a különböző radioizotópokkal jelzett NGR peptidszekvenciák.

Dolgozatom első részében a tumorok angiogenezisének és hypoxiájának kapcsolatát vizsgáltam ezen folyamatokra specifikus radiotracerek segítségével tumoros állatmodellen. Megállapítottuk, hogy a hypoxiás és angiogenikus területek együtt növekednek a tumor térfogatának növekedésével, melyet a területek fokozódó  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvétele igazolt, továbbá ezen területek radiotracer felvétele korrelációt mutatott a tumor térfogatának növekedésével. Ezen felül a He/De tumorok  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvétele egymással is korrelált, azaz a hypoxia fokozódásával az angiogenesis mértéke is emelkedett. A felhasznált radiotracerek segítséget nyújtanak a hypoxia és angiogenesis kapcsolatának jobb megértéséhez.

A kutatómunka második lépcsőjében négy c(NGR) származék összehasonlító vizsgálata történt kontroll, valamint He/De és Ne/De tumoros állatmodellen. Mind a négy radiotracer hidrofíl tulajdonságokkal rendelkezik, melyet a vizeletelvezető rendszeren keresztüli ürülésük is alátámasztott. A két tumor mind a négy radiotracerrel azonosítható volt, ám a tumorokon belüli halmozódásuk mértékében különbségek mutatkoztak. A  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) gyengébb szérumbiztonsággal, a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) gyengébb kötési képességgel volt jellemezhető. A daganatok diagnosztikájára legalkalmasabb radiotracerek a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) voltak.

Kísérleteink utolsó szakaszában a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR), APN/CD13 gátló kezelések terápiás hatékonyságának követésére való alkalmasságát vizsgáltuk HT1080 és B16F10 tumoros egereken. A kontroll HT1080 és B16F10 tumorok jól azonosíthatóak voltak a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR)-rel. Az actinonin kezelés hatására a B16F10 tumorok, míg bestatin kezelés hatására, mind a HT1080, mind a B16F10 tumorok radiotracer felvétele és mérete jelentősen csökkent. A  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) tehát nem csak a daganatok diagnosztikájára, hanem APN/CD13 gátló terápia hatékonyságának követésére is alkalmas radiofarmakon.

A PET képalkotás területén tehát ígéretes célpontnak bizonyul az APN/CD13 molekula, melynek vizsgálatára alkalmasak a  $^{68}\text{Ga}$  jelzett c(NGR) származékok, mind a tumorok diagnosztikája, mind az APN/CD13 ellenes terápiák hatékonyságának követése során.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Berényi Ervin intézetvezetőnek és Dr. Trencsényi György tanszékvezetőnek, hogy lehetővé tették számomra PhD dolgozatom elkészítését az Orvosi Képző Intézet Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszékén.

Kiemelkedő köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Trencsényi Györgynek, aki BSc képzésemtől kezdve egyengette tudományos pályámat, tőle tanulhattam meg a metodikai alapokat, segítséget nyújtott a tudományos eredmények értelmezésében, a tudományos publikációk írásában.

Köszönettel tartozom Vasné Dr. Garai Ildikónak, a debreceni Scanomed Kft. Transzlációs Kutató Központ orvosigazgatójának, amiért lehetővé tette számunkra az *in vivo* kísérletekhez szükséges PET/MRI készülék alkalmazását.

Köszönet illeti az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport vezetőjét Prof. Dr. Mező Gábort és tudományos segédmunkatársát, Dr. Enyedi Kata Nórárt, amiért lehetővé tették és biztosították számunkra a c(NGR) származékokat.

Hálás köszönet illeti Dr. Kertész Istvánt, Stéfánné Dénes Noémit és dr. Szűcs Dánielt, a PhD munkában megjelenő radiofarmakonok biztosításáért, így segítve az *in vivo* mérések megvalósítását, melyekben a biológiai munkacsoport minden tagja, így Péliné Szabó Judit, Nagy Tamás és Arató Viktória Zsófia kimagasló szerepet vállalt.

Köszönettel tartozom a Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszék minden dolgozójának a támogatásért és segítségért.

Köszönetemet szeretném kifejezni az Orvosi Képző Intézet Radiológia Nem Önálló Tanszékén tudományos segédmunkatársként dolgozó Rácz Szilviának és a Patológiai Intézet vezetőjének Prof. Dr. Méhes Gábornak, az intézet vezető asszisztenseként dolgozó Beke Líviának az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséért, valamint a Patológiai Intézet PhD hallgatójának, dr. Matolay Orsolyának a western blot vizsgálatok elvégzéséért.

Végül szeretném megköszönni férjemnek, Péternek és családomnak a támogató légkör megteremtését és a tőlük kapott folyamatos biztatást.

## 8. Függelék

### Önállóan végzett munka:

- Kísérlettervezés
- He/De, Ne/De, HT1080 és B16F10 sejtek tenyésztése, fagyasztása
- F-344 patkányokban, valamint C57BL/6 és CB17 SCID egerekben tumorindukció
- Állatházi feladatok ellátása
- Állatok Isoflurános altatása
- Radiofarmakonok injektálása
- PET vizsgálatok elvégzése
- *Ex vivo* vizsgálatok elvégzése
- APN/CD13 gátló kezelések elvégzése
- PET felvételek, *ex vivo* eredmények feldolgozása, kiértékelése
- Statisztikai analízis elvégzése

### Közreműködők által elvégzett munka:

- Radiotracerek előállítása (Stéfánné Dénes Noémi és dr. Szücs Dániel)
- Western blot vizsgálatok elvégzése (dr. Matolay Orsolya)
- Immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzése (Rácz Szilvia és Beke Lívia)



Nyilvántartási szám: DEENK/431/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kis Adrienn  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10057295

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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.  
IF: 3.411 (2020)
2. **Kis, A.**, Dénes, N., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Józai, 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
3. **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





**További közlemények**

4. Dénes, N., **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Józai, 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.  
*Appl. Radiat. Isot.* 174, 1-10, 2021.  
IF: 1.513 (2020)
5. Trencsényi, G., **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Ráti, Á., Csige, K., Fenyvesi, É., Szenté, 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
6. Forgács, V., Németh, E., Gyuricza, B., **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Mikecz, P., Mátyus, P., Helyes, 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
7. 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
8. 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





9. 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 <sup>68</sup>Ga- and <sup>44</sup>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
10. Máté, G., Kertész, I., Enyedi, K. N., Mező, G., Angyal, J., Vasas, N., **Kis, A.**, Szabó, É., Emri, M., Bíró, T., Galuska, L., Trencsényi, G.: In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR).  
*Eur. J. Pharm. Sci.* 69, 61-71, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.002>  
IF: 3.773

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,87**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
12,697**

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

Debrecen, 2021.09.03.

