

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Sass Tamás

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

DEBRECENI EGYETEM

ORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Sass Tamás

Témavezető: Dr. Képes Zita



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2026**

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	6
1 BEVEZETÉS.....	14
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	16
2.1 POZITRONEMISSZIÓS TOMOGRÁFIA (PET).....	16
2.1.1 PET a preklinikumban.....	20
2.2 DAGANATOK NÖVEKEDÉSE, ANGIOGENEZIS	20
2.2.1 Az angiogenesis típusai.....	22
2.2.2 Az angiogenesisben részt vevő legfontosabb molekuláris markerek.....	22
2.2.2.1 Szolubilis szabályozó faktorok.....	22
2.2.2.1.1 Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)	22
2.2.2.1.2 Angiopoietinek (Ang 1 és Ang 2).....	23
2.2.2.1.3 Fibroblaszt növekedési faktor (FGF)	24
2.2.2.1.4 Transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β).....	24
2.2.2.1.5 Vérlemezske eredetű növekedési faktor (PDGF).....	25
2.2.2.2 Membrán kötött szabályozó faktorok.....	25
2.2.2.2.1 $\alpha_v\beta_3$ Integrin.....	25
2.2.2.2.2 Efrin-B2.....	25
2.2.2.2.3 Vaszkuláris endoteliális kadherin (VE-kadherin).....	26
2.2.2.3 Plasminogén aktivátor/Plazmin rendszer (PA/plazmin).....	26
2.2.2.4 Mátix metalloproteinázok (MMP).....	26
2.2.2.5 Aminopeptidáz N/CD13 (APN/CD13).....	27
2.2.2.6 Prostaglandin E2 (PGE2).....	28
2.3 CIKLODEXTRINEK	29
2.4 AZ ANGIOGENEZIS IN VIVO DIAGNOSZTIKÁJA	31
2.4.1 Ciklodextrinek szerepe az angiogenesis diagnosztikájában	31
2.4.2 Hipoxiaspecifikus nyomjelzők szerepe az angiogenesis diagnosztikájában.....	33
2.5 IN VIVO TUMORMODELLEK	34
2.5.1 Transzplantációs modellek.....	34
3 CÉLKITŰZÉSEK.....	38
4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	39
4.1 FELHASZNÁLT VEGYSZEREK ÉS ESZKÖZÖK.....	39
4.2 RADIOFARMAKONOK.....	41
4.2.1 [^{18}F]FDG szintézise.....	41
4.2.2 [^{18}F]FAZA szintézise.....	41
4.2.3 [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD szintézise.....	42
4.2.4 [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szintézise.....	42
4.3 IN VITRO KÍSÉRLETES MÓDSZEREK	43

4.3.1	ALKALMAZOTT SEJTVONALAK, SEJTNYÉSZTÉS	43
4.3.1.1	MDA-MB-HER2+ sejtek.....	43
4.3.1.2	4T1 sejtek.....	43
4.3.1.3	Pgp- A2780 sejtek.....	43
4.3.1.4	Pgp+ A2780AD sejtek.....	44
4.3.1.5	Pgp- KB-3-1 sejtek.....	44
4.3.1.6	Pgp+ KB-V-1 sejtek.....	44
4.3.2	KÉMIAI HIPOXIA INDUKCIÓ	45
4.3.3	IN VITRO RADIOFARMAKON-FELVÉTELI VIZSGÁLATOK	45
4.3.4	WESTERN BLOT ANALÍZIS	45
4.4	IN VIVO KÍSÉRLETES MÓDSZEREK	46
4.4.1	KÍSÉRLETI ÁLLATOK	46
4.4.2	SZUBKUTÁN TUMORINDUKCIÓ.....	47
4.4.3	TUMORNÖVEKEDÉS MONITOROZÁSA	47
4.4.4	IN VIVO POZITRONEMISSZIÓS TOMOGRAFIA (PET) LEKÉPEZÉS.....	47
4.4.4.1	MiniPET-II kamera	48
4.4.4.2	A pozitronemissziós tomográfia (PET) képek elemzése	49
4.4.5	EX VIVO BIODISZTRIBÚCIÓS VIZSGÁLATOK	50
4.5	STATISZTIKAI ANALÍZIS.....	50
5	EREDMÉNYEK.....	51
5.1	EMLŐTUMOR XENOGRAFTOK PGE2 TERMELÉSÉNEK IN VIVO MONITOROZÁSA CIKLODEXTRIN ALAPÚ PET RADIOFARMAKONOKKAL	51
5.1.1	IN VIVO PET LEKÉPEZÉS	51
5.1.1.1	MDA-MB-HER2+ tumorok.....	51
5.1.1.2	4T1 tumorok.....	54
5.1.2	EX VIVO SZERVI ELOSZLÁSOS VIZSGÁLATOK	57
5.1.3	[⁶⁸ Ga]GA-NODAGA-HPBCD- ÉS [⁶⁸ Ga]GA-DOTAGA-RAMEB-FELVÉTEL ÖSSZEHASONLÍTÁSA MDA-MB-HER2+ ÉS 4T1 TUMOROKBAN.....	60
5.1.4	A TUMORNÖVEKEDÉS DINAMIKÁJÁNAK VIZSGÁLATA	61
5.2	TUMORASSZOCIÁLT HIPOXIA VIZSGÁLATA PREKLINIKAI NŐGYÓGYÁSZATI TUMORMODELLEKBEN PET KÉPALKOTÁSSAL.....	62
5.2.1	IN VITRO VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	62
5.2.1.1	KB-3-1 SEJTEK IN VITRO VIZSGÁLATA	63
5.2.1.1.1	Sejtszintű [¹⁸ F]FDG-felvétel.....	63
5.2.1.1.2	Western blot analízis	63
5.2.1.2	A2780 SEJTEK IN VITRO VIZSGÁLATA	64
5.2.1.2.1	Sejtszintű [¹⁸ F]FDG-felvétel.....	64
5.2.1.2.2	Western blot analízis	65
5.2.2	IN VIVO POZITRONEMISSZIÓS TOMOGRAFIA (PET) VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	65
5.2.2.1	Statikus pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok [¹⁸ F]FAZA radiofarmakonnal....	65

5.2.2.2	<i>Dinamikus pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok [^{18}F]FAZA radiofarmakonnal</i>	
	66	
5.2.2.3	<i>Pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok [^{18}F]FDG és [^{18}F]FAZA radiofarmakonokkal.....</i>	68
6	MEGBESZÉLÉS.....	72
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	81
8	SUMMARY.....	83
9	ÚJ TUDOMÁNYOS MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	85
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	87
10.1	HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	87
10.2	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ÉS EGYÉB IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK HITELESÍTETT LISTÁJA	106
11	TÁRGYSZAVAK.....	108
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	109
13	FÜGGELÉK.....	110

Rövidítések jegyzéke

[¹²⁴ I]IAZA	¹²⁴ I-jelölt iodoarabinofuranozil
[¹⁸ F]FAZA	¹⁸ F-jelölt fluoroazomicin arabinozid
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz
[¹⁸ F]FETNIM	¹⁸ F-jelölt fluoroeritronitroimidazol
[¹⁸ F]FMISO	¹⁸ F-jelölt fluoromizonidazol
¹¹ C	szén-11 izotóp
¹²⁴ I	jód-124 izotóp
¹³ N	nitrogén-13 izotóp
¹⁵ O	oxigén-15 izotóp
¹⁸ F	fluor-18 izotóp
^{205/206} Bi	bizmut-205/206 izotóp
⁵² Mn	mangán-52 izotóp
⁶² Cu	réz-62 izotóp
⁶⁴ Cu	réz-64 izotóp
⁶⁸ Ga	gallium-68 izotóp
⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga	Germánium-68/Gallium-68
⁸² Rb	rubídium-82 izotóp
aFGF	savas fibroblaszt növekedési faktor (acidic fibroblast growth factor)
Ang1	angiopoietin-1
Ang2	angiopoietin-2
Arg-Gly-Asp	arginin-glicin-aszpartát/RGD
Asn-Gly-Arg	aszparagin-glicin-arginin/NGR
α _v β ₃	integrin receptor
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factors)
CoCl ₂	kobalt-diklorid
COX	ciklooxygenáz enzim
COX-1	ciklooxygenáz-1 enzim
COX-2	ciklooxygenáz-2 enzim
CT	komputertomográfia, számítógépes metszeti képalkotás (computed tomography)
DOTAGA	p-NCS-Bz-DOTA-GA
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)

EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
EP	prosztaglandin receptor
EPH B4	efrin receptor B4
ERK	extracelluláris jel-szabályozott kináz (extracellular signal-regulated kinase)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FGFR	fibroblaszt növekedési faktor receptor (fibroblast growth factor receptor)
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GLUT1	1-es típusú glükóztranszporter
GLUT3	3-as típusú glükóztranszporter
HGF	hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
HIF1	hipoxia indukált faktor 1 (hypoxia inducible factor)
HK2	hexokináz 2 enzim
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (high-performance liquid chromatography)
HP β CD	hidroxipropil-béta-ciklodextrin
HRE	hipoxia-válasz elem (hypoxia-response element)
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICO	Catalan Institute of Oncology
KeV	kiloelektronvolt
LYSO	lutécium-ittrium-ortoszilikát
MeV	megaelektronvolt
MMP	mátrix metalloproteináz (matrix metalloproteinase)
MRI	mágnesesrezonancia képalkotás (magnetic resonance imaging)
MT-MMP	membránhoz kötött mátrix metalloproteináz (membrane-type matrix metalloproteinase)
NH ₂ -HP β CD	6-Deoxy-6-monoamino-(2-hidroxipropil)- β -ciklodextrin
NI	nitroimidazol
NK	natural killer (NK sejt: természetes ölősejt)
NOD	non-obese diabetes
NODAGA	p-NCS-benzil-NODA-GA
NP-1	neuropilin-1

NP-2	neuropilin-2
NSCLC	nem kissejtes tüdőrák (non-small cell lung cancer)
PA	plazminogén aktivátor
PA/plazmin	Plazminogén aktivátor/Plazmin rendszer
PAI-1	1-es típusú plazminogén aktivátor inhibitor (plasminogen activator inhibitor-1)
PBS	foszfátpufferelt sóoldat (phosphate-buffered saline)
PBST	foszfátpufferelt sóoldat + 0,05% - 0,1% Tween 20
PDGF	trombocita eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor)
PDGFR	trombocita eredetű növekedési faktor receptor (platelet derived growth factor receptor)
PET	pozitronemissziós tomográfia (positron emission tomography)
PGE2	prosztaglandin E2
Pgp	P-glikoprotein
PKC	protein-kináz C
RAG	recombination activating gene
RAMEB	random metilezett béta-ciklodextrin
RP-HPLC	fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (reversed-phase high-performance liquid chromatography)
rtg	röntgen
SCID	súlyos kombinált immunhiányos (severe combined immunodeficient)
SD	szórás (standard deviation)
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SPE	szilárd fázisú extrakció (solid phase extraction)
SPECT	egyfoton-emissziós számítógépes metszeti képalkotás (single-photon emission computed tomography)
SUV	standard felvételi érték (standardized uptake value)
T/M	tumor-háttér arány (tumor-to-muscle ratio)
T _{1/2}	felezési idő
TATM	trifluormetánszulfonil-β-D-mannóz
TGF-β	transzformáló növekedési faktor-β (transforming growth factor-β)
TNF-α	tumor nekrozis faktor-α (tumor necrosis factor-α)

tPA	szöveti típusú plazminogén aktivátor (tissue-type plasminogen activator)
UH	ultrahang
uPA	urokináz típusú plazminogén aktivátor (urokinase-type plasminogen activator)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGF-A	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A
VEGFR-1	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor-1
VEGFR-2	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor-2
VE-kadherin	vaszkuláris endoteliális kadherin
VOI	vizsgált térfogat (volume of interest)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
α -CD	alfa-ciklodextrin
β -CD	béta-ciklodextrin
γ -CD	gamma-ciklodextrin

ABSZTRAKT (magyar)

HÁTTÉR: A nőgyógyászati malignus megbetegedések és áttétek növekvő előfordulási gyakorisága indokolja a korai diagnosztikát és ezáltal a mielőbb megkezdett hatékony terápia alkalmazását, melynek következtében a tumorszelektív biomarkereket célzó diagnosztikai vektorok fejlesztése és *in vivo* tesztelése az onkológiai alapkutatások kiemelt területévé vált. Figyelembe véve a hipoxia és a prosztaglandin E2 (PGE2) tumor-asszociált angiogenezisben betöltött központi szerepét, munkánk során célul tűztük ki különböző, tumorspecifikus (hipoxia- és angiogenezis-targetált) radiofarmakonok *in vivo* diagnosztikai képességének vizsgálatát és összehasonlítását nőgyógyászati tumorok preklinikai modelljeiben pozitronemissziós tomográfia (PET) alkalmazásával.

MÓDSZEREK: A kutatás első részében gallium-68 (^{68}Ga) izotóppal jelölt, PGE2-t célzó ciklodextrin alapú nyomjelzőket (^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD (^{68}Ga -jelölt hidroxipropil-béta-ciklodextrin) és ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (^{68}Ga -jelölt random metilezett béta-ciklodextrin)) szintetizáltunk, melyek biológiai karakterisztikáját és diagnosztikai potenciálját CB17 súlyos immunhiányos egerekben létrehozott MDA-MB-HER2+ és tripla-negatív 4T1 emlőtumor xenograftokon *in vivo* dinamikus és statikus PET leképezéssel, valamint *ex vivo* boncolásos szervi eloszlásos mérésekkel vizsgáltuk. Munkánk második részében a hipoxiaszelektív ^{18}F]FAZA (^{18}F -fluoroazomicin arabinozid) és ^{18}F]FDG (2- ^{18}F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz) radiofarmakonok tumor-asszociált hipoxia leképezésére való alkalmazhatóságát vizsgáltuk P-glikoprotein negatív (PgP-) A2780 és Pgp+ A2780AD ováriumtumor-, valamint Pgp- KB-3-1 és Pgp+ KB-V-1 cervixkarcinóma-modelleken PET technikával. A hipoxia jelenlétét *in vitro* radiofarmakon-felvételi mérésekkel és Western blottal igazoltuk.

ERDMÉNYEK: MDA-MB-HER2+ és 4T1 tumorok mind a ^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD mind a ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB alkalmazásával azonosíthatók voltak, ugyanakkor a nyomjelzők tumormérettől függő, eltérő mértékű halmozást mutattak az egyes emlőtumor típusokban. A nőgyógyászati tumorok PET felvételeinek elemzése során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Pgp- és Pgp+ elváltozások ^{18}F]FAZA-felvétele között. A dinamikus mérések kb. a 110. percben regisztrált tumor-háttér arányok biztosították a legjobb kontrasztú ^{18}F]FAZA PET képek készítését a hipoxiás és normoxiás tumorterületek elkülönítéséhez. Ugyan valamennyi ovárium- és cervixtumor heterogén halmozást mutatott mind az ^{18}F]FAZA és mind az ^{18}F]FDG alkalmazásával, a hipoxiaspecifikus ^{18}F]FAZA esetén tapasztalt

jelentősebb intratumorális felvételi különbségek igazolják azt, hogy a nyomjelző az [^{18}F]FDG-hez képest magasabb diagnosztikai teljesítményt mutatott a hipoxia detektálásában. Az [^{18}F]FAZA és az [^{18}F]FDG PET képek közötti térbeli átfedések megerősítik, hogy a hipoxia döntően a magas glükózmétabolizmusú területeken fordul elő.

KÖVETKEZTETÉS: Eredményeink alapján a ^{68}Ga -jelölt HP β CD és a RAMEB ígéretes PET vektorok az emlőtumorsek *in vivo* diagnosztikájában. Továbbá megállapítottuk, hogy a gold-standard [^{18}F]FDG PET vizsgálat [^{18}F]FAZA PET-tel történő kiegészítése klinikai hozzáadott értéket képviselhet a hipoxiás tumorterületek pontosabb detektálásában, mely a diagnosztika pontosságának növelése mellett jelentős terápiás relevanciát is hordoz.

Kulcsszavak: angiogenezis, ciklodextrin, [^{18}F]FDG, [^{18}F]FAZA, hipoxia, nőgyógyászati xenograftok, prosztataandrogén E2 (PGE2), pozitronemissziós tomográfia (PET), preklinikum, radiofarmakon.

ABSZTRAKT (angol)

BACKGROUND: The increasing incidence of gynaecological malignancies and their metastases justifies early diagnosis and therefore the prompt initiation of effective therapy, as a result of which the development and *in vivo* investigation of diagnostic vectors targeting tumor-selective biomarkers has become a priority area of basic oncological research. Considering the key role of hypoxia and prostaglandin E2 (PGE2) in tumor-associated angiogenesis, we aimed to investigate and compare the *in vivo* diagnostic capability of different tumor-specific (hypoxia - and angiogenesis-targeted) radiopharmaceuticals in preclinical models of gynaecological tumors applying positron emission tomography (PET).

METHODS: In the first part of our research, we synthesized gallium-68 (^{68}Ga) isotope-labelled, PGE2-targeting cyclodextrin-based radiotracers (^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD (^{68}Ga -labelled hydroxypropyl-beta-cyclodextrin) and ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (^{68}Ga -labelled random methylated beta-cyclodextrin)), and tested their biological characteristics and diagnostic potential using *in vivo* dynamic and static PET imaging as well as *ex vivo* organ distribution measurements on MDA-MB-HER2+ and triple negative 4T1 breast tumor xenografts established in CB17 severely combined immunodeficient mice. In the second part of our work, we investigated the feasibility of the hypoxia-selective [^{18}F]FAZA (^{18}F -fluoroazomycin arabinoside) and [^{18}F]FDG (2- ^{18}F fluoro-2-deoxy-D-glucose) radiotracers in the detection of tumor-associated hypoxia in P-glycoprotein negative (PgP-) A2780 and Pgp+ A2780AD ovarian tumor, and Pgp- KB-3-1 and Pgp+ KB-V-1 cervical carcinoma models using PET. The presence of hypoxia was confirmed by *in vitro* radiopharmaceutical uptake measurements and Western blotting.

RESULTS: MDA-MB-HER2+ and 4T1 tumors were identified using both ^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD and ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB, however, the tracers showed tumor size dependent different levels of accumulation in each breast tumor type. Upon analyzing the PET images of the gynaecological tumors, no significant difference was observed between the [^{18}F]FAZA uptake of the Pgp- and Pgp+ lesions. Tumor-to-background ratios recorded at approximately the 110th minutes of dynamic measurements provided the best contrast [^{18}F]FAZA PET images for the delineation of hypoxic and normoxic tumor regions. Although all ovarian and cervical tumors showed heterogeneous uptake with both [^{18}F]FAZA and [^{18}F]FDG, the more significant intratumoral uptake differences observed with hypoxia-specific [^{18}F]FAZA confirm the superior diagnostic performance of the tracer compared to [^{18}F]FDG in

detecting hypoxia. Spatial overlaps between the [^{18}F]FAZA and [^{18}F]FDG PET images confirm that hypoxia predominantly occurs in areas of high glucose metabolism.

CONCLUSION: Based on our results, ^{68}Ga -labelled HP β CD and RAMEB are promising PET vectors for the *in vivo* diagnostics of breast cancer. Furthermore, we concluded that the addition of [^{18}F]FAZA PET to the gold-standard [^{18}F]FDG PET scan may represent a clinical added value in the more accurate detection of hypoxic tumor areas, which besides increasing the accuracy of diagnostics also carries significant therapeutic relevance.

Keywords: angiogenesis, cyclodextrin, [^{18}F]FDG, [^{18}F]FAZA, hypoxia, gynaecological xenografts, prostaglandin E2 (PGE2), positron emission tomography (PET), preclinical, radiopharmaceutical.

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 (Wojtyla és mtsai., 2021), 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 (Michiels, 2004). 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 (Pan és mtsai., 2016; Tong és mtsai., 2018) serkenti a tumor-asszociált angiogenezist, és ezáltal a tumorok életben maradását, proliferációját és szervezeten belüli terjedését (Wang és Dubois, 2006). Korábbi kutatások igazolták, hogy a glükóz alapú ciklodextrin molekulák, például a random metilezett béta-ciklodextrin (RAMEB) nagy affinitással kötődnek a PGE2-höz (Sauer és mtsai., 2017), 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 háttérében álló molekuláris mechanizmusok mélyebb megértésére, mely a jövőben újabb diagnosztikai és terápiás targetek azonosításához vezethet.

Mindezek alapján, kutatásunk célja angiogenezist targetáló, radioaktív ciklodextrin-származékok és hipoxiaspecifikus radiofarmakonok *in vivo* diagnosztikai képességének a tanulmányozása különböző típusú experimentális nőgyógyászati tumorokon PET technika alkalmazásával.

2 Irodalmi áttekintés

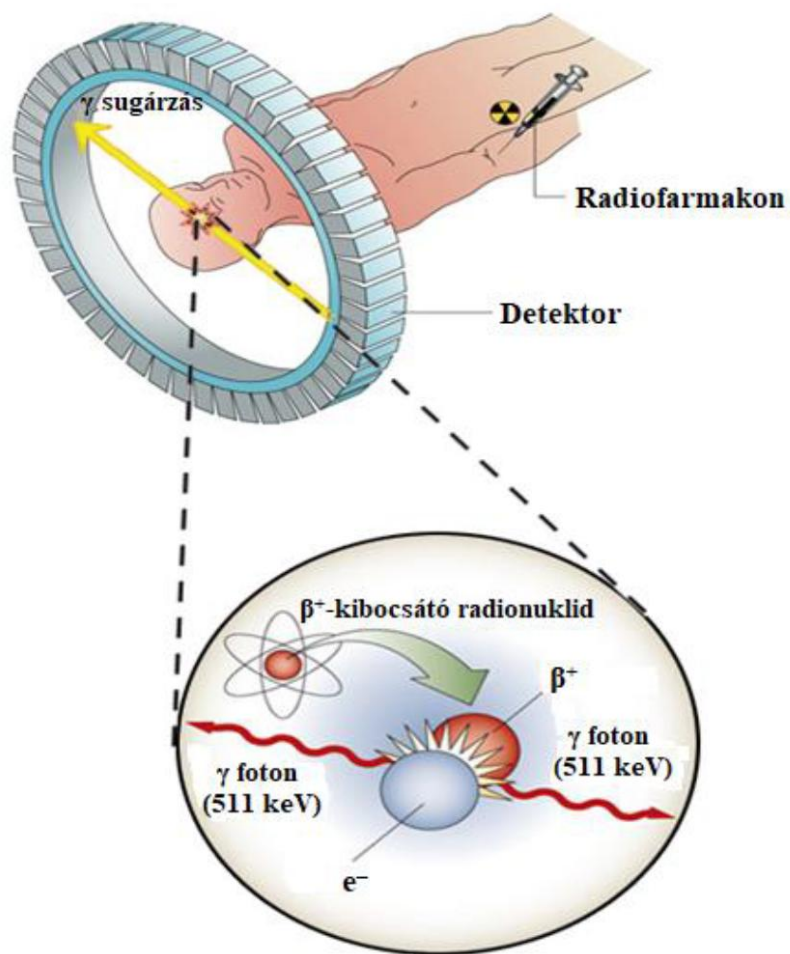
2.1 Pozitronemissziós tomográfia (PET)

Az izotópdiagnosztikai molekuláris képalkotó technikák, köztük az egyfoton-emissziós számítógépes metszeti képalkotás (SPECT/single-photon emission computed tomography) és a PET lényegesen hozzájárulnak a különböző kórélettani folyamatok korai detektálásához. Ezen képalkotó módszerek alapját a radioaktív nyomjelzés képezi, melynek elvét Hevesy György dolgozta ki, munkásságáért 1943-ban kémiai Nobel-díjat kapott. A radioaktív nyomjelzés fizikai alapja - miszerint egy adott elem különböző izotópjai azonos kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek - teszi lehetővé, hogy ha egy biológiailag aktív molekula valamely elemét kicseréljünk annak radioaktív izotópjára, akkor az az eredeti vegyülettel azonos módon vesz részt a biológiai folyamatokban. Mindez biztosítja a radioaktív anyag szervezetben belüli eloszlásának, illetve az általa megjelenített fiziológiás és patofiziológiás folyamatoknak az *in vivo* monitorozását a kibocsátott sugárzás megfelelő technikával (SPECT, PET) történő detektálása révén.

Napjainkban az izotópdiagnosztikai modalitások közül a PET tekinthető az onkológiai diagnosztika gold-standard módszerének. A PET egy non-invazív, emissziós detektáláson alapuló funkcionális képalkotó eljárás, mely alkalmas a szervezetben történő élettani és patológias biológiai folyamatok megjelenítésére (pl.: anyagcsere, vérellátás, hipoxia). A hagyományos radiológiai vizsgálómódszerekkel (ultrahang (UH), röntgen (rtg), számítógépes metszeti képalkotás (CT/computed tomography), mágnesesrezonancia képalkotás (MRI/magnetic resonance imaging)) szemben a technika óriási előnye, hogy a patológias folyamatokat idejekorán, a morfológiai, anatómiai változások megjelenése előtt képes detektálni.

A PET leképezés során pozitronsugárzó izotóppal jelzett targetáló molekulát, úgynevezett radiofarmakont, radiógyógyszert vagy más néven nyomjelzőt juttatnak az emberi szervezetbe (1. ábra). Az emissziós képalkotás az annihiláció jelenségén alapul. A pozitronsugárzó izotóp bomlásakor keletkező pozitron elektronnal történő találkozása annihilációt eredményez, melynek során kettő, egymással 180° -ban ellentétes irányban emittált, azonos energiájú (0,511 MeV) γ -foton keletkezik (Pettinato és mtsai., 2006). A PET berendezésben egymással szemben lévő detektorpárok a γ -fotonok koincidens detektálása révén rögzítik az annihilációs eseményeket. Ugyanazon idő- és energiaablakon belül érzékelt fotonpárok jól definiálható egyeneseket (line of response) határoznak meg, melyek mentén az annihiláció megvalósult. Az egyenesek metszéspontjainak rekonstrukciója lehetővé teszi a

radiotrészter térbeli eloszlásának meghatározását (Lewellen, 2010). Mivel a nyomjelzők szelektív affinitást mutatnak a vizsgált molekuláris célpontokhoz, a targetmolekulát nagyobb mennyiségben tartalmazó szervekben/szövetekben emelkedett jelintenzitás látható. Attól függően, hogy az injektált nyomjelző milyen biokémiai és molekuláris folyamatokban vesz részt, a PET technika alkalmas a szervek és a szövetek funkcionális állapotának *in vivo* jellemzésére.



1. ábra A pozitronemissziós tomográfia (PET) képalkotás működési elve (Gabriel Gonzalez-Escamilla; <https://multimodalneuroimaging.wordpress.com/2015/04/28/c-positron-emission-tomography/>)

A PET diagnosztikában leggyakrabban alkalmazott radionuklidokat az **1. táblázat** szemlélteti.

1. Táblázat A PET diagnosztikában leggyakrabban alkalmazott radioizotópok jele, felezési ideje és a szintézishez szükséges berendezés

Radioaktív izotóp	Felezési idő (perc)	Előállítás
^{15}O	2,5	ciklotron
^{13}N	9,9	ciklotron
^{11}C	20,4	ciklotron
^{18}F	109,7	ciklotron
^{62}Cu	9,74	generátor
^{64}Cu	764,4	ciklotron
^{68}Ga	67,71	generátor
^{82}Rb	1,25	generátor
^{124}I	6019,2	ciklotron

^{11}C : szén-11 izotóp, ^{62}Cu : réz-62 izotóp, ^{64}Cu : réz-64 izotóp, ^{18}F : fluor-18 izotóp, ^{68}Ga : gallium-68 izotóp, ^{124}I : jód-124 izotóp, ^{13}N : nitrogén-13 izotóp, PET: pozitronemissziós tomográfia; ^{82}Rb : rubídium-82 izotóp, ^{15}O : oxigén-15 izotóp.

Az izotópok előállítása ciklotronnal vagy generátorral történik. Jelenleg a fluor-18 (^{18}F)-jelzésű molekulák szállítása megoldott, így a ciklotronnal nem rendelkező PET laboratóriumokban generátor hiányában is van lehetőség PET vizsgálatok végzésére. Fontos hangsúlyozni azonban, hogy az izotóp relatíve rövid felezési ideje miatt ($T_{1/2} = 109,7$ perc) a szállítás is csak korlátozott távolságon belül kivitelezhető. A ciklotronnal történő izotópgyártás magas költségei és jelentős infrastrukturális háttere miatt azonban széles körben nem elérhető. A ciklotron berendezéssel nem felszerelt központokban gyakran radionuklid-generátorokat alkalmaznak a PET radiofarmakonok szintéziséhez szükséges pozitronsugárzó izotópok előállítására. A generátor egy zárt rendszer, melyben egy hosszabb felezési idejű anyaizotóp bomlásakor keletkező rövidebb felezési idejű leányizotóp bizonyos időközönként kinyerhető (eluálható), ezáltal gazdaságos lehetőséget biztosít a PET nyomjelzők helyben történő előállítására (Dash és Chakravarty, 2019).

Az utóbbi években a gallium-68 (^{68}Ga) izotóppal történő radiojelzés egyre elterjedtebb (Szabó és mtsai., 2023), melynek előállításához Germánium-68/Gallium-68 ($^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$) generátor szükséges. Az anyaelem (^{68}Ge) hosszú felezési ideje ($T_{1/2} = 270$ nap) alacsony

költségű $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorok alkalmazására ad lehetőséget. Az előnyös fizikai és bomlási karakterisztikának ($T_{1/2} = 67,71$ perc, $E\beta^+_{\text{átlag}} = 830$ KeV, $E\beta^+_{\text{max}} = 1,92$ MeV), illetve gyors kiürülésnek köszönhetően a ^{68}Ga tökéletesen alkalmas PET diagnosztikai felhasználásra, és számos képalkotásban használt peptid radiojelölésére, így összességében potenciális alternatívája az általánosan használt radioizotópoknak (Breeman és mtsai., 2011).

Az onkológiai PET diagnosztikában számos radiógásgyógyszer áll rendelkezésre. A radiofarmakonok két fő kategóriáját különböztetjük meg: aspecifikus és specifikus nyomjelzők. Az előbbiek a malignus elváltozásokra jellemző intenzív metabolikus aktivitást (pl.: megnövekedett glükóz-, lipid- és aminosav-anyagszere) és proliferációt jelenítik meg, míg a specifikus trászerek egyedi molekuláris targetekhez kötődnek (pl.: receptorok, antigén) a tumorokon. (Garai és Varga, 2018)

A mindennapi onkológiai diagnosztikában a legáltalánosabban használt radiofarmakon az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. A radiojelzett glükózmolekulával végzett PET leképezés lehetővé teszi a különböző szövetek/szervek glükózanyagcseréjének *in vivo* vizsgálatát. A jelöletlen glükózmolekulához hasonlóan az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ is a GLUT1 és a GLUT3 glükóztranszportereken keresztül jut be a sejtekbe. A radiofarmakont a hexokináz-II (HK2) enzim foszforilálja, azonban szemben a normál cukormolekulával a foszforilációt követően az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ nem vesz részt további biokémiai átalakulásban, hanem a sejtekben felhalmozódik, mely PET képalkotást tesz lehetővé (Garai és Varga, 2018). A daganatos sejtek többsége fokozott glükózmetabolizmust mutat, ami az egészséges sejtekkel összehasonlítva magasabb trászervfelvételt okoz, ezért az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET alkalmas számos malignus lézió detektálására, illetve progressziójának nyomon követésére. Fontos megemlíteni, hogy több tumortípus, például vese-, máj- vagy petefészekdaganatok alacsony $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ aviditást mutat, így vizsgálatukra a radiojelölt cukormolekula nem megfelelő. Továbbá néhány szerv, köztük az agy, a szív, a vesék és a húgyhólyag fiziológiásan is magas $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvétellel ábrázolódik, ezért ezen szervek vonatkozásában az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET képalkotás nem specifikus. Ezen felül gyulladásos és fertőzőes folyamatokban is emelkedett $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ halmozást tapasztalhatunk, ami fals pozitív malignitás gyanúját keltheti. Mindezeket figyelembe véve, megállapítható, hogy egyre nagyobb az igény olyan szelektív radiofarmakonok létrehozására, melyek a malignus elváltozások specifikus detektálására képesek.

2.1.1 PET a preklinikumban

A preklinikai PET képalkotás lehetőséget teremt az újonnan létrehozott, tumorspecifikus nyomjelzők experimentális tumormodelleken történő *in vivo* biológiai karakterizálására. Segítségével tanulmányozható az adott molekula farmakokinetikája, *in vivo* biodisztribúciója, valamint tumortargetáló képessége laboratóriumi állatokban (pl.: egér, patkány, nyúl, majom) létrehozott tumorokon. A kísérleti állatok kis mérete miatt a humán diagnosztikában használt PET kamera nem nyújt optimális felbontású képeket, ezért a preklinikumban alkalmazott készülékek méretben kisebbek, de felépítésüket tekintve a humán berendezésekkel azonosak. A humán PET készülékekhez hasonlóan a technika segítségével megvalósítható a kisállatokban végbemenő biokémiai folyamatok megjelenítése. Az eljárás non-invazív jellegének köszönhetően lehetséges egy adott radiofarmakon ugyanazon kísérleti állat felhasználásával történő *in vivo* eloszlásának ismételt vizsgálata, mely jelentősen csökkenti az egyedek közötti variabilitást. Továbbá, ez kevesebb kísérleti alany felhasználását is eredményezi, mely nemcsak költséghatékonyság szempontjából kedvező, hanem összhangban van a kísérletekhez használt modellállatok számának csökkentésére irányuló kutatási gyakorlattal („Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. törvény, illetve az állatkísérletekről szóló 40/2013. (II. 14.) kormányrendelet).

Az újonnan létrehozott radiógyógyszerekkel végzett preklinikai vizsgálatok kiemelkedő szerepet töltenek be a gyógyszerfejlesztés folyamatában. Ugyan a tudományos eredmények jelentős transzlációs potenciállal bírnak, továbbra is nyitott kérdés, hogy a preklinikai eredmények milyen mértékben extrapolálhatók a humán diagnosztikába. Ez felveti az eredmények körütekintő értékelésének, illetve az experimentális PET kutatások különböző fajokon történő kivitelezésének szükségességét. Bár a magas eszközigeny és költségek eredményeképp a kisállat PET napjainkban csak kevés intézetben elérhető, kimagasló érzékenysége és diagnosztikai értéke miatt egyre nagyobb érdeklődés övezi a biológia, a gyógyszerészeti tudományok és a biotechnológia területén.

2.2 Daganatok növekedése, angiogenezis

A tumorok növekedéséhez, progressziójához és az áttétek kialakulásához a megfelelő tápanyag- és oxigénellátás kulcsfontosságú. A tumorok kezdetben nem rendelkeznek saját vaszkulaturával, hanem a környezetükből diffúzió útján nyerik a fennmaradásukhoz szükséges tápanyagokat és oxigént. Egy bizonyos méret elérését követően azonban a tumorsejtek már nem képesek diffúzió révén fedezni a fennmaradásukhoz szükséges perfúziós és metabolikus

igényüket, ezért túlélésükhöz új erek képződése válik szükségessé. Ilyenkor, az alacsony oxigénszintek, hipoxia mellett aktiválódik a hipoxia indukált faktor 1 (HIF1/hypoxia inducible factor), mely elindítja az angiogenezis, azaz az érújdonképződés folyamatát (Rezvani és mtsai., 2011). A HIF1 HIF1 α és HIF1 β alegységekből épül fel (Rezvani és mtsai., 2011). A HIF1 β normál oxigénellátottságú sejtekben permanensen jelen van, míg ezzel szemben a HIF1 α kizárólag hipoxiás sejtekben expresszálódik, ugyanis oxigén jelenlétében a HIF1 α prolil hidroxiláz enzim által hidroxilálódik (Rezvani és mtsai., 2011). Hipoxiás körülmények között, például daganatos sejtekben, a prolil hidroxiláz aktivitása csökken, mely a HIF1 α stabilizációjához és felhalmozódásához vezet. A stabilizálódás után a HIF1 α a sejtmagba transzlokálódik, ahol heterodimert képez a HIF1 β -val, majd a célgének hipoxia-válasz eleméhez (HRE/hypoxia-response element) kötődve számos, angiogenezisben kulcsfontosságú gén transzkripcióját stimulálja, többek között a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF/vascular endothelial growth factor), a trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF/platelet-derived growth factor), vagy a tumor nekrosis faktor- α (TNF- α /tumor necrosis factor- α) (Carmeliet, 2000; Simons, 2005; Wenger és mtsai., 2005). Ezen folyamatok a bazálmembrán és az extracelluláris mátrix lebontására képes proteázok termelésére serkentik az endotélsejteket, ezáltal elősegítve extravazációjukat és proliferációjukat, ami végső soron új, azonban instabil kiserek létrejöttét eredményezi (Nussenbaum és Herman, 2010). A hipoxia kialakulása tehát az angiogenezis legfőbb mozgatórugója. Alacsony oxigenizáció mellett az érképzést segítő (proangiogén) és gátló (antiangiogén) szabályozó faktorok közötti fiziológias egyensúly felborul, és túlsúlyba kerülnek a proangiogén faktorok, megtörténik az úgynevezett angiogén átkapcsolás, azaz az „angiogenic switch” (Ribatti és mtsai., 2007). Mindez elősegíti a tumorok autonóm vaszkuláris hálózatának kialakulását, biztosítva az életben maradás, a növekedés és a szervezeten belüli terjedés feltételeit.

A tumoros érújdonképződés során újonnan kifejlődött erek számos specifikus receptort és sejtfelszíni molekulát kifejeznek, melyek ígéretes biomarkerek lehetnek a malignus elváltozások és áttétek szelektív kimutatásában, illetve célzott terápiájában. Ezen biomolekulákat célzó diagnosztikai és terápiás próbák segítségével lehetővé válik a daganatok korai, pontos detektálása, és ezáltal a hatékony kezelés mielőbbi megkezdése, mely végeredményben hozzájárulhat a személyre szabott onkológiai diagnosztika és terápia alapjainak megteremtéséhez.

2.2.1 Az angiogenezis típusai

Az angiogenezis folyamata többféle mechanizmuson keresztül is megvalósulhat. Megkülönböztetünk bimbózó angiogenezist, posztnatális angiogenezist, intuszuszeptív angiogenezist, glomeruloid angiogenezist, illetve vaszkulogén mimikri és érbekebelezés révén megvalósuló angiogenezist. A *bimbózó angiogenezis*, vagy más néven daganat által gerjesztett angiogenezis a tumor-asszociált érújdonképződés leggyakoribb formája (Carmeliet és Jane, 2011). Ennek folyamán a tumorsejtek különböző citokineket termelnek, például VEGF-t, PDGF-t és hepatocita növekedési faktort (HGF/hepatocyte growth factor), melyek beindítják a jelen lévő endotélsejtek bimbózását. Az endotélsejtek morfológiája megváltozik, megnyúlnak, aktiválódik a sejten belüli kommunikáció és belépnek a sejtciklusba. A *posztnatális angiogenezis* során a tumorsejtek által szekretált citokinek hatására csontvelőből származó endotélprogenitor-sejtek kerülnek a perifériás véráramba, melyek a tumor mikrokörnyezetében érett endotélsejttekké alakulnak. Az *intuszuszeptív* vagy hasadásos érújdonképződés folyamán a meglévő vérér gyakorlatilag kettéosztódik. A *glomeruloid angiogenezis* során a daganatokban a vese glomerulusaihoz hasonló, rendezetlen érhálózatok alakulnak ki. Ez az érújdonképződési forma leginkább agresszív agydaganatokra például glioblasztómákra vagy tüdőtumorokra jellemző. A *vaszkulogén mimikri* a tumor-asszociált érképzés sajátos formája. Ebben az esetben a tumorok malignus sejtekből felépülő csatornákat bocsátanak az erekhez, melyek segítségével kapcsolatot létesítenek az érhálózattal. Az *érbekebelezés* mechanizmusával történő érújdonképződéskor nem alakulnak ki új véredények, hanem a tumorok a rendelkezésre álló vaszkulaturát használják saját tápanyag- és oxigénellátásuk garantálása céljából. Érbekebelezéssel elsősorban gazdag érhálózatú területeken kialakuló tumorok (pl.: bőr, tüdő) esetében találkozhatunk.

2.2.2 Az angiogenezisben részt vevő legfontosabb molekuláris markerek

Az angiogenezis szabályozásában számos molekuláris faktor vesz részt, melyeket részletesen az alábbiakban ismertetek.

2.2.2.1 Szolubilis szabályozó faktorok

2.2.2.1.1 Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)

A VEGF-ok kiemelkedő szerepet töltenek be az érújdonképződés folyamatában. A VEGF-ok közül a VEGF-A a legjobban karakterizált és a leginkább tanulmányozott (Otrock és mtsai., 2007). A VEGF egy tumorok által szekretált citokin, mely alapvető jelentőségű mind a

normál, fiziológias, mind pedig a tumor-asszociált angiogenezis folyamatában (Rini, 2005). A VEGF-A sejtfelszíni, transzmembrán, tirozin-kináz receptorokon keresztül érvényesíti biológiai hatásait; a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor-1 (VEGFR-1) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor-2 (VEGFR-2) a vaszkuláris endotélsejteken, míg a neuropilin receptorok (NP-1, NP-2) az idegsejteken és a vaszkuláris endotéliumban fejeződnek ki (Dvorak, 2002). Korábbi adatok alapján a 2-es típusú VEGFR a VEGF-A proangiogén hatásainak a legfőbb közvetítője (Ferrara és mtsai., 2003). Receptoraktivációt követően a VEGF-A különböző jelátviteli utak aktiválásán keresztül indukálja többek között az endotélsejtek proliferációját, a nitrogén-monoxid mediálta vazodilatációt, illetve a hematopoetikus őssejtek csontvelői mobilizációját (Hood és mtsai., 1998; Ferrara és mtsai., 2003). A VEGF-A több, angiogenezishez kapcsolható folyamatban részt vesz, például a sebgyógyulásban, az ovulációban, a vérnyomás fenntartásában, a menstruációban és a terhességben (Brown és mtsai., 1992). Továbbá, a VEGF-A valamennyi humán szolid tumorban és néhány hematológiai rosszindulatú megbetegedésben is kifejeződik (Ferrara és mtsai., 2003).

A VEGF-B a VEGF család másik fontos képviselője. Néhány korábbi kutatásban beszámoltak a VEGF-B angiogén mechanizmusokban való részvételéről (Mould és mtsai., 2003; Silvestre és mtsai., 2003), azonban pontos *in vivo* szerepe egyelőre nem ismert (Otrock és mtsai., 2007).

A VEGF-C, VEGF-D és VEGF-E további fontos citokinek, melyek szintén hatékonyan aktiválják az érújdonképződést (Cao és mtsai., 1998; Marconcini és mtsai., 1999; Meyer és mtsai., 1999).

2.2.2.1.2 Angiopoietinek (Ang 1 és Ang 2)

Az angiopoietinek (Ang 1 és Ang 2) és a Tie receptorok fontos szerepet töltenek be az erek fenntartásában, növekedésében és stabilizációjában (Carmeliet, 2003; Otrock és mtsai., 2007). A Tie receptorok (Tie1 és Tie2) a VEGFR-okhoz hasonló expressziós mintázatot mutatnak (Yancopoulos és mtsai., 1998). Magas Tie1 mRNS expressziót azonosítottak az embrionális vaszkuláris endotéliumban, az angioblasztokban, az endokardiumban, és a pulmonális kapillárisokban, míg alacsony kifejeződést detektáltak a felnőtt endokardiumban (Korhonen és mtsai., 1994). A Tie2 mRNS hasonló embrionális kifejeződést mutat a Tie1 mRNS-el (Dumont és mtsai., 1994).

Korábbi adatok igazolják, hogy az angiopoietinek a Tie2 receptorhoz kötődnek (Otrock és mtsai., 2007). Az Ang1 a leginkább tanulmányozott angiopoietin, mRNS-e a 9-11. embrionális napokon kimutatható a szívizomban, majd a vérereket körülvevő mezenhimában (Davis és mtsai., 1996). Az Ang2 szigetszerű expressziót mutat, és kifejeződik a dorzális aortában, míg felnőttkorban kizárólag a vaszkuláris remodelláció területein fordul elő (Maisonpierre és mtsai., 1997).

2.2.2.1.3 Fibroblaszt növekedési faktor (FGF)

A savas és bázikus fibroblaszt növekedési faktorok (aFGF és bFGF/acidic fibroblast growth factor és basic fibroblast growth factor) heparinkötő fehérje mitogének, melyek szintén kiemelkedő szerepet játszanak az érújdonképződés folyamatában (Thomas, 1987). Az FGF-ek a targetsejtek felszínén található nagy affinitású tirozin-kináz FGF receptorokhoz (FGFR/fibroblast growth factor receptor) kötődve fejtik ki biológiai hatásaikat (Otrock és mtsai., 2007). Az angiogén tulajdonságú FGF-ek (FGF1, FGF2, FGF4) FGFR1 vagy FGFR2 receptorok aktivációján keresztül endotélsejt proliferációt indukálnak (Cross, 2001). Ezen felül az FGF-ek fokozzák az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA/urokinase-type plasminogen activator) és a mátrix metalloproteinázok (MMP/matrix metalloproteinase) szintézisét az endotélsejtekben, illetve modulálják az uPA receptorok expresszióját az endotélsejtek felszínén, amivel hozzájárulnak az angiogenezis első fázisaiban végbemenő extracelluláris mátrix degradációhoz (Mignatti és Rifkin, 2000; Otrock és mtsai., 2007)

2.2.2.1.4 Transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β)

A transzformáló növekedési faktor- β fehérjék (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3/transforming growth factor- β 1, β 2, β 3) egy evolúciós szempontból igen konzervált citokincsaládot képviselnek, szerkezetük és funkciójuk az evolúció alatt szinte alig változott (Massague, 1990). A fehérjék prototípusa a TGF- β 1 (Massague, 1990). A TGF- β fehérjék II-es típusú receptorokon keresztül proangiogén és antiangiogén hatásokat egyaránt kifejthetnek (Otrock és mtsai., 2007, van den Driesche és mtsai., 2003). Alacsony dózisban a TGF- β 1 fokozza az angiogén faktorok és a proteinázok termelését, mellyel hozzájárul az angiogén átkapcsoláshoz, míg magas dózisokban gátolja az endotélsejtek növekedését, elősegíti a bazálmembrán újraképződését, valamint aktiválja a simaizomsejtek differenciálódását és toborzását (Carmeliet, 2003).

2.2.2.1.5 Vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF)

A PDGF-t először trombocitákból izolálták, majd fibroblasztokban, asztrocitákban, keratinocitákban, epitélisejtekben és egyéb sejttípusokban is azonosították (Heldin, 1999; Otsu és mtsai., 2007). A PDGF A és B láncokból felépülő homodimer (PDGF-AA vagy PDGF-BB) vagy heterodimer (PDGF-AB) formájában fordul elő (Otsu és mtsai., 2007). Ugyan a PDGF angiogenezisben betöltött szerepe nem teljesen tisztázott, *in vitro* és *in vivo* eredmények alapján feltételezhető, hogy részt vesz az érképződés folyamatában. A PDGF serkenti a tenyésztett periciták és simaizomsejtek proliferációját, melyekről kimutatták, hogy kifejezik a PDGF- β receptort (Edelberg és mtsai., 1998; Heldin, 1999). Továbbá, korábbi eredmények igazolták a PDGF szerepét a tumorpericiták toborzásában, és ezáltal a kapillárisok kialakulásában, mely *in vivo* is alátámasztja az angiogenezis folyamatában való részvételét (Betsholtz, 2004).

2.2.2.2 Membrán kötött szabályozó faktorok

2.2.2.2.1 $\alpha_v\beta_3$ Integrin

Az integrin $\alpha_v\beta_3$ egy transzmembrán fehérje, mely egymáshoz kapcsolódó alfa és béta glikoprotein alegységekből áll. Az integrinek meghatározó szerepet töltenek be az érújdonképződés folyamatában, és ezáltal a tumorok lokális növekedésében, illetve az áttétek kialakulásában (Wilder, 2002). Alegységei segítségével a fehérje számos sejtalkotóhoz képes kötődni, többek között oldékony ligandokhoz, különböző sejtfelszíni molekulákhoz, valamint az extracelluláris mátrix komponenseihez (Eble és Haier, 2006). A sejtalkotókkal létrejött kötődést követően a receptor a sejtben különféle anyagcserével kapcsolatos, sejtadhéziós, sejtproliferációs és antiapoptotikus folyamatokat indít el (Kumar, 2003).

A tumorsejtek, illetve a vérerek nagy számban fejezik ki az integrineket, így megfelelő targetpontok lehetnek a tumordiagnosztika számára is (Liu és mtsai., 2008.). Az Arg-Gly-Asp (Arginin-Glicin-Aszpartát/RGD), illetve az RGD szekvenciát tartalmazó molekulák képesek szelektív kapcsolatot létrehozni az integrinreceptorokkal, ennél fogva, a radioaktív izotópokkal jelölt RGD molekulák alkalmasak az integrin pozitív malignus elváltozások azonosítására, ezáltal tumordiagnosztikára (Chen és mtsai., 2016).

2.2.2.2.2 Efrin-B2

Az efrin receptorok és ligandjaik fontos szerepet töltenek be a vérerek fejlődésében (Otsu és mtsai., 2007). Az efrin-B2 és receptora (Efrin receptor B4/EPH B4) például az

artériás és vénás határfelületeken lokalizálódik a primer kapilláris plexus kialakulását követően, azonban még annak angiogenezis által mediált átépülése előtt (Wang és mtsai., 1998).

2.2.2.2.3 Vaszkuláris endoteliális kadherin (VE-kadherin)

A vaszkuláris endoteliális kadherin (VE-kadherin) szintén fontos szerepet tölt be az érújdonképződés folyamatában. A VE-cadherin egy transzmembrán doménből, egy citoplazmatikus farokrészből és egy öt kalmodulegységet tartalmazó extracelluláris doménből áll (Nollet és mtsai., 2000). Az érintegritás fenntartása szempontjából meghatározó endotélsejtek közötti adhézió VE-kadherinből áll (Giannotta és mtsai., 2013). Az endotéladhézió elősegítése mellett, a VE-kadherin a regenerációban, a vaszkulogenezisben, az angiogenezisben, a gyulladásban és a tumorprogresszióban is aktívan részt vesz (Viallard és Larrivé, 2017).

2.2.2.3 Plazminogén aktivátor/Plazmin rendszer (PA/plazmin)

A Plazminogén aktivátor/Plazmin rendszer (PA/plazmin) zimogén plazminogénből, plazminból, szöveti típusú plazminogén aktivátorból (tPA/tissue-type plasminogen activator), uPA-ból, plazminreceptorokból, plazminogén receptorokból, plazmin inhibitorból és plazminogén inhibitorból áll. A plazmin egy széles spektrumú proteáz, mely számos extracelluláris fehérjét hidrolizál, köztük a fibrint (Otrock és mtsai., 2007). Az uPA és a tPA olyan szerin proteázok, melyek a plazminogént aktiválják (Otrock és mtsai., 2007). Számos korábbi *in vitro* és *in vivo* kísérlet bizonyította a PA/plazmin rendszer részvételét az angiogenezis folyamatában (Bajou és mtsai., 1998; Carmeliet és Collen, 2000). Az 1-es típusú plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1/plasminogen activator inhibitor-1) például központi szerepet tölt be a tumorinvázió, az áttétképződés, illetve a tumor-asszociált érújdonképződés szabályozásában (Chorostowska-Wynimko és mtsai., 2004). Továbbá, kutatási eredmények beszámolnak arról, hogy az angiogenezist elsődlegesen indukáló hipoxia fokozza az urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor és a PAI-1 termelését az endotélsejtekben (Kroon és mtsai., 2000; Uchiyama és mtsai., 2000).

2.2.2.4. Mátrix metalloproteinázok (MMP)

A bazálmembrán lebontása nélkülözhetetlen az új erek kialakulásához (Otrock és mtsai., 2007). A MMP-k olyan enzimek, melyek az extracelluláris mátrix átalakításában és átépítésében vesznek részt. A MMP-k két alapvető csoportját különböztetjük meg: szekretált

MMP-k és membránhoz kötött MMP-k (MT-MMP/membrane-type matrix metalloproteinase) (Pepper, 2001). A szekretált MMP-k csoportjába tartoznak többek között a kollagenázok, nevezetesen a MMP-1, MMP-8 és a MMP-13, a stromelizinek (MMP-3, MMP-10, MMP-11), és a zselatinázok, úgy mint a zselatináz A/MMP-2 és a zselatináz B/MMP-9 (Pepper, 2001). A MT-MMP-k közül említendő a MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP és a MT4-MMP (Pepper, 2001; Otrrock és mtsai., 2007). Fiziológias körülmények között a MMP-ket alacsony szöveti expresszió jellemzi, ugyanakkor szöveti átépülés során, például sebgyógyulás, vagy tumorképződés esetén, rövid időn belül nagy mennyiségben képesek kifejeződni. A MMP-k expresszióját több hormon és citokin is aktiválhatja, például az epidermális növekedési faktor (EGF/epidermal growth factor), a HGF, a FGF, a VEGF, a PDGF vagy a TGF- β .

Korábbi eredmények alapján a MMP-k számos, angiogenesishez kapcsolódó folyamatban részt vesznek, egyebek mellett beleértve az extracelluláris mátrix degradációját, az endotélsejtek invázióját (Chun és mtsai., 2004), és migrációját (Galvez és mtsai., 2001), a kapillárisstruktúrák kialakulását (Langlois és mtsai., 2004), illetve a tumorképződéshez szükséges angiogén átkapcsolást (Bergers és mtsai., 2000).

2.2.2.5 Aminopeptidáz N/CD13 (APN/CD13)

Az aminopeptidáz N (APN), CD13, egy erősen glikozilált, Zn^{2+} -dependens, membránhoz kötött metalloproteáz, ami kulcsszerepet tölt be az angiogenesis szabályozásában. A receptor hét doménből áll, melyet 967 aminosav alkot (Luan és Xu, 2007). Az I-es domén a citoplazmatikus rész, a II-es domén egy transzmembrán szakasz, a III-VII-es domének extracellulárisan helyezkednek el (Luan és Xu, 2007). Az V-ös és a VI-os domének felelősek az aktiválódásért, hiszen a Zn^{2+} -kötőhely ezeken a doméneken található (Luan és Xu, 2007). Az extracelluláris mátrix fehérjéinek degradációja, proangiogén és antiangiogén fehérjék termelésének fokozása, illetve különböző szignáltranszdukciós utak aktiválása révén kapcsolódik be az angiogenesis folyamatába (Mina-Osorio, 2008).

Számos daganattípus esetében - beleértve a melanóma malignumot, a prosztatata-, tüdő-, emlő- és petefészekdaganatokat - a receptor fokozott expressziója figyelhető meg (Guzman-Rojas és mtsai., 2012; Wickström és mtsai., 2011). Az APN/CD13 expresszió szintje pozitív korrelációt mutat a daganatok malignitásának mértékével és agresszivitásával. Ennek megfelelően az APN/CD13 meghatározó biomarkernek tekinthető, mely nemcsak diagnosztikai, hanem terápiás célpontként is ígéretes lehetőségeket hordoz. Az APN/CD13 specifikus ligandjaként ismert az Asn-Gly-Arg (aszparagin-glicin-arginin, NGR) tripeptid,

amely nagy affinitással és szelektivitással kötődik a receptorhoz (Pasqualini és mtsai., 2000). Következésképp az NGR tripeptid szekvenciát hordozó molekulák radiojelzett származékai lehetőséget teremtenek az APN/CD13 pozitív tumorok és metasztázisaik izotópdiagnosztikai modalitással történő azonosítására, valamint célzott kezelésére.

2.2.2.6 Prostaglandin E2 (PGE2)

A PGE2 egy bioaktív lipid, mely ciklooxygenáz (COX) enzimek által arachidonsavból keletkezik (Tong és mtsai., 2018). A COX enzimeknek két izotípusa ismert, a ciklooxygenáz-1 (COX-1) és a COX-2 (Tong és mtsai., 2018). A legtöbb szövetben konstitutív módon expresszáldó COX-1 a bazális PGE szint fenntartásáért felelős, mely a szövetek homeosztázisának biztosításához elengedhetetlen (Chen és Smyth, 2011; Wang és Dubois, 2010). Ennek megfelelően a COX-1 termelte PGE2 fontos szerepet tölt be számos fiziológias folyamatban, például a vérnyomás vagy a termékenység szabályozásában. A COX-1 enzimmel ellentétben, a COX-2 fiziológias körülmények között a legtöbb szövetben nem, vagy csak kismértékben mutatható ki, azonban erősen indukálható, ezért gyulladásos stimulusok hatására gyorsan, fokozott mértékben képes expresszáldni (Tong és mtsai., 2018). Következésképp, a COX-2 enzim által termelt PGE2 részt vesz többek között a gyulladásos folyamatokban, valamint a sebgyógyulásban, melynek során serkenti az új vérerek és nyirokerek képződését. Fontos megemlíteni azonban, hogy a PGE2 nemcsak a gyulladásához társuló angiogenezist serkenti, hanem központi szerepet tölt be a tumor-asszociált érújdonképződés szabályozásában is (Wang és Dubois, 2006). Korábbi tanulmányok szoros összefüggést mutattak ki a COX-2 mediált PGE2 termelés, valamint a tumorképződés és tumornövekedés között (Sandler és Dubinett, 2004; Wang és Dubois, 2006). A PGE2 szerepe a tumorprogresszióban komplex, hatását több jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül fejti ki. Serkentő G fehérjéhez kapcsolt prostaglandin receptorokhoz történő kötődését követően (EP1-EP4), a PGE2 különböző tumor-asszociált intracelluláris jelátviteli utat iniciál, melyek közül elsősorban kiemelendő az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR/epidermal growth factor receptor) stimulációja, a protein-kináz C (PKC) által szabályozott extracelluláris jel-szabályozott kináz (ERK/extracellular signal-regulated kinase) foszforilációja, és a G-fehérje-függő β -katenin aktivációja (Madrigal-Martínez és mtsai., 2018; Pan és mtsai., 2016; Tong és mtsai., 2018; Wang és Dubois, 2006; Wu és mtsai., 2010). Ezen molekuláris mechanizmusok aktiválása révén a PGE2 hozzájárul a tumor-asszociált angiogenezis indukciójához, elősegíti a tumorsejtek invázióját, illetve gátolja az antitumor hatású természetes immunfolyamatokat

(Wang és Dubois, 2006). Mindezek mellett a PGE2 mediálta tumorproliferáció és az apoptózisgátlás szintén a tumorok fennmaradását és növekedését szolgálja (Wang és Dubois, 2006).

A fentiekkel összhangban, számos korábbi preklinikai tanulmány is beszámolt arról, hogy a COX-2 fokozott aktivitása emelkedett PGE2 szintet eredményez, ami több mechanizmuson keresztül hozzájárul az emlőrák progressziójához, növeli a tumorsejtek invazivitását, valamint elősegíti a tumor-asszociált angiogenezist (Rozic és mtsai., 2001; Xu és mtsai., 2014). Továbbá, *Ma és munkatársai* mérsékeltebb tumornövekedést észleltek EP2 knock-out egerekben a vad típusú állatokhoz képest, ami szintén alátámasztja a COX-2/EP/PGE2 útvonal tumorigenezisben betöltött kiemelt szerepét (Ma és mtsai., 2015).

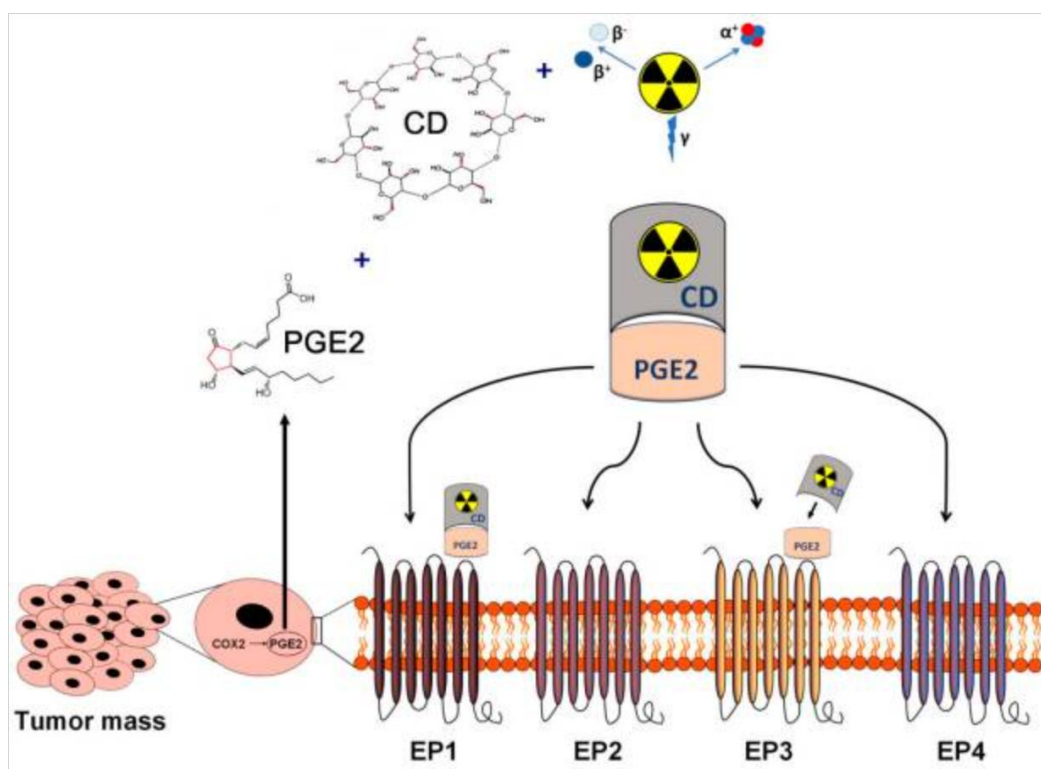
A fentiek alapján elmondható, hogy a PGE2 és receptorai kulcsszerepet töltenek be a karcinogenezis patofiziológiájában. Ennélfogva, mind a PGE2 és az EP receptorok ígéretes molekuláris targetek lehetnek a PGE2 pozitív primer malignus léziók és áttétek *in vivo* diagnosztikájában.

2.3 Ciklodextrinek

A ciklodextrinek és különböző származékaik napjainkra a klinikai és preklinikai kutatások meghatározó fókuszpontjává léptek elő. A ciklodextrinek D-(+)-glükopiranoz molekulákból álló, csonkakúp alakú oligoszacharidok, melyek egy hidrofób belső üreggel és egy hidrofil külső felszínnel rendelkeznek (Del Valle, 2004; Loftsson és mtsai., 2005; Szejtli, 1982; Szejtli, 1998). A glükózegységek számától függően a molekulák három fő csoportját különítjük el: alfa-ciklodextrin (α -CD), béta-ciklodextrin (β -CD) és gamma-ciklodextrin (γ -CD). Fizikokémiai tulajdonságaiknak köszönhetően a ciklodextrinek igen jelentős zárványkomplexbé képző (host-guest komplex) tulajdonsággal rendelkeznek, ami növeli a beágyazott vendégmolekula (guest) oldhatóságát, stabilitását, illetve elősegíti annak célzott szállítását (Del Valle, 2004; Loftsson és Brewster, 1996; Rajewski és Stella, 1996; Wang és mtsai., 2020). A zárványképzés következtében a ciklodextrinek (host) belső üregébe zárványként ágyazott vendégmolekula (guest) ellenállóvá válik az oxidatív hatásokkal, a magas hőmérséklettel, a látható fénnel és az ultraibolya sugárzással szemben, továbbá védett a párolgástól és a szublimációtól is (Singh és mtsai., 2002; Del Valle, 2004). A ciklodextrinek kiváló komplexképző affinitásának köszönhetően lehetővé válik számos gyógyszer, többek között kemoterápiás szerek, illetve anti-ateroszklerotikus gyógyszerek célzott szállítása, ami elősegíti

a személyre szabott kezelési megközelítések kialakítását és elterjedését (Akkın és mtsai., 2022; Gao és mtsai., 2022; Karthic és mtsai., 2022).

Fontos megemlíteni továbbá, hogy a ciklodextrinek jelentős komplexképző affinitást mutatnak a karcinogenezisben központi szerepet betöltő PGE2-vel is. A β -ciklodextrinek PGE2-vel történő komplexképző képességét *Hirayama és munkatársai* már 1984-ben igazolták (Hirayama és mtsai., 1984). A β -ciklodextrinek családjába tartozó RAMEB PGE2 komplexálásáról *Sauer és kollégái* korábbi *in vitro* kísérletükben számoltak be elsőként (Sauer és mtsai., 2017). Ezen irodalmi eredmények alapján feltételezhető, hogy a radioaktív izotópokkal jelzett ciklodextrinek potenciális eszközök lehetnek a PGE2-t expresszáló tumorok *in vivo* detektálásában, illetve célzott kezelésében (**2. ábra**). Mindezek alapján a diagnosztikai és terápiás felhasználású ciklodextrinek szintézise, *in vivo* biológiai, valamint farmakokinetikai vizsgálata számos kutatócsoport kiemelt tudományos érdeklődésének tárgyát képezi (Csige és mtsai., 2022; Hajdu és mtsai., 2019; Trencsényi és mtsai., 2020).

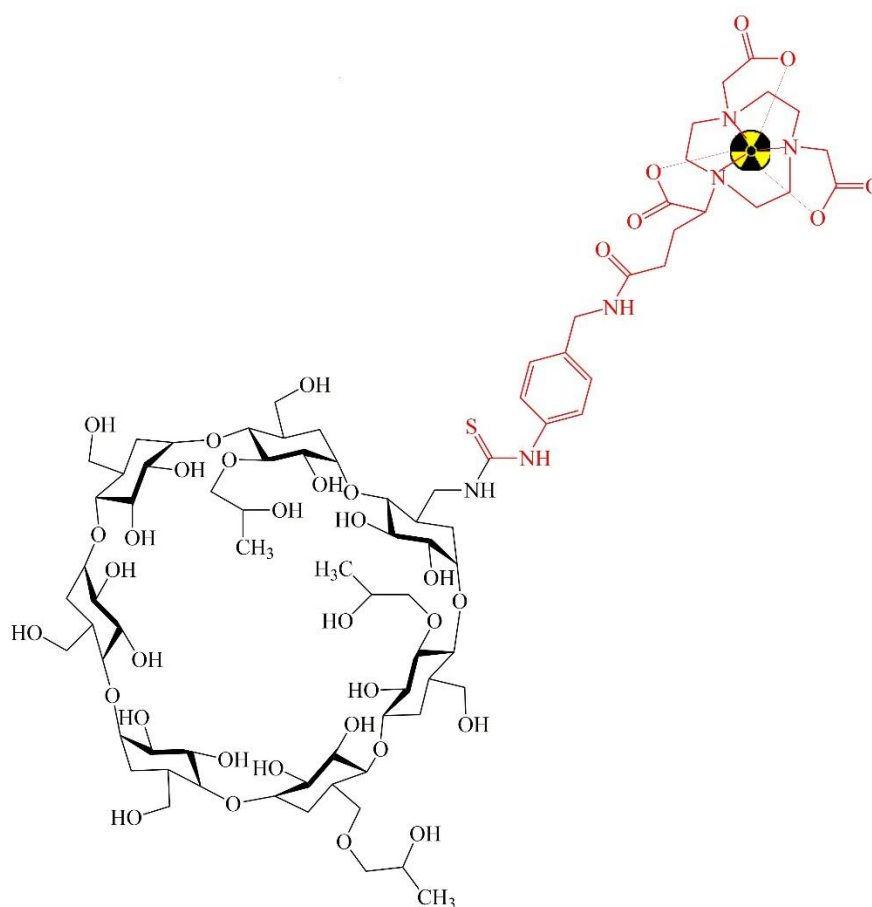


2. ábra PGE2 pozitív tumorok detektálása és célzott radioterápiája radiojelzett ciklodextrin-származékokkal CD: ciklodextrin, PGE2: prosztoglandin E2, EP1-EP4: prosztoglandin receptor. (Képes és mtsai., 2023)

2.4 Az angiogenesis *in vivo* diagnosztikája

2.4.1 Ciklodextrinek szerepe az angiogenesis diagnosztikájában

Hajdu és munkatársai 2019-ben elsőként állítottak elő PGE2 pozitív malignus daganatok detektálására alkalmas radioaktívan jelzett ciklodextrin-származékot (Hajdu és mtsai., 2019) (**3. ábra**).



3. ábra A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD kémiai szerkezete

⁶⁸Ga: gallium-68 izotóp, HPβCD: hidroxipropil-béta-ciklodextrin, NODAGA: *p*-NCS-benzil-NODA-GA.

Az újonnan létrehozott molekula (⁶⁸Ga-jelzett hidroxipropil-béta-ciklodextrin/[⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD) farmakokinetikáját preklinikai körülmények között, egészséges BALB/c egereken tanulmányozták *in vivo* PET/CT és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok alkalmazásával. Dinamikus PET vizsgálataik eredményei a

radiofarmakon renális exkrécióját igazolták, amit a vizeletelvezető rendszerben (vesék, húgyhólyag) regisztrált emelkedett radiofarmakon-felvétel verifikált, míg egyéb hasi és mellkasi szervekben jelentéktelen mennyiségű radioaktivitást tapasztaltak (Hajdu és mtsai., 2019). *Hajdu és munkacsoportja* megfogalmazta, hogy a gyors elimináció és az elhanyagolható háttéraktivitás optimális feltételeket teremt a PGE2-t expresszáló tumorok pontos detektálásához (Hajdu és mtsai., 2019). Az előnyös szervi eloszlási profil ösztönözte a radiojelzett ciklodextrin-származékok experimentális tumormodelleken történő tesztelését, valamint újabb ciklodextrin alapú PET próbák szintézisét.

A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD vizsgálatát követően a munkacsoport egy újabb β -ciklodextrin-származék, a RAMEB sikeres radiojelölését valósította meg ([^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB), melynek tumorcélzó képességét PGE2 pozitív (BxPC-3) és PGE2 negatív (PancTu-1) pankréasz adenokarcinóma xenograftokon tanulmányozta *in vivo* és *ex vivo* egyaránt (Trencsényi és mtsai., 2020). A HP β CD vegyülettel összhangban a biológiai mérések a RAMEB molekula gyors renális kiválasztódását igazolták. Továbbá, a biodisztribúciós eredményeik szignifikánsan magasabb [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-felvételt mutattak a PGE2 pozitív elváltozásokban a PGE2 negatív tumorokkal összehasonlítva, mely eredmény alapján *Trencsényi és munkatársai* bizonyították, hogy a radiojelölt ciklodextrinek alkalmasak a PGE2 pozitív tumorok azonosítására, és ezáltal potenciálisan alkalmas eszközök lehetnek ezen elváltozások diagnosztikájában (Trencsényi és mtsai., 2020).

A fentiekkel egyetértésben több későbbi preklinikai munka is megerősítette a ciklodextrin alapú PET farmakonok PGE2 affinitását, illetve felhasználásukat PGE2 expresszáló tumorok *in vivo* diagnosztikájára (Csige és mtsai., 2022; Dienes és mtsai., 2025; Képes és mtsai., 2024; Szabó és mtsai., 2023). *Szabó és munkatársai* például számos eltérő PGE2 expressziós profillal jellemezhető tumormodellel - beleértve HT1080 humán fibroszarkóma, PancTu-1 és BxPC-3 humán pankréasz adenokarcinóma, B16F10 egér melanóma, A20 egér B sejtes limfóma, Ne/De patkány mezoblasztos nefróma és He/De patkány hepatocelluláris karcinóma - tesztelték és hasonlították össze a ^{68}Ga -jelölt RAMEB és HP β CD PGE2 szelektivitását és *in vivo* diagnosztikai képességét (Szabó és mtsai., 2023). Ezen felül készültek tanulmányok más radioizotópokkal jelzett ciklodextrin-származékokkal is (Csige és mtsai., 2022; Dienes és mtsai., 2025; Képes és mtsai., 2024). Az alfa sugárzó bizmut-205/206 ($^{205/206}\text{Bi}$) és a diagnosztikus ^{68}Ga izotópokkal jelzett RAMEB ([$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB és [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB) nyomjelzőkkel végzett kísérleteikben *Csige és munkatársai* arra a megállapításra jutottak, hogy a radioaktív ciklodextrinek a diagnosztika mellett újszerű, ígéretes terápiás megközelítéseket is kínálhatnak a daganatok célzott alfa

radioterápiájában (Csige és mtsai., 2022). Végül, az utóbbi években a mangán-52-vel (^{52}Mn) jelölt RAMEB (^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB) vonatkozásában megjelent biztató eredmények a késői PET leképezés, illetve a hosszabb tumorbiológiai folyamatok *in vivo* feltérképezésének lehetőségét sugallják (Dienes és mtsai., 2025; Képes és mtsai., 2024).

2.4.2 Hipoxiaspecifikus nyomjelzők szerepe az angiogenesis diagnosztikájában

Figyelembe véve az érújdonképződés és a hipoxia közötti szoros összefüggést, a hipoxia kimutatására alkalmas nyomjelzők szintén értékes eszközök az angiogenesis *in vivo* detektálásában. Mivel az alacsony oxigenizáltságú sejtek fokozott mértékben expresszálják a glükózmétabolizmusban központi szerepet betöltő GLUT1 és GLUT3 glükóztranszportereket (Mellanen és mtsai., 1994; Murakami és mtsai., 1992), illetve a HK2 enzimet, a gold-standard radiojelzett glükózanalóg alkalmas nyomjelző a tumorokban előforduló hipoxia kimutatására. Számos preklinikai vizsgálat igazolja az ^{18}F]FDG-felvétel és az oxigénhiányos sejtek, illetve a hipoxiás tumorrégiók közötti korrelációt (Clavo és mtsai., 1995; Clavo és Wahl, 1996; Kubota és mtsai., 1994). *Burgman és munkatársai* például hipoxia-indukálta ^3H]FDG-felvétel emelkedésről számoltak be MCF7 humán emlőtumorsejtekben (Burgman és mtsai., 2001). Fontos kiemelni azonban, hogy az ^{18}F]FDG nem tekinthető specifikus nyomjelzőnek, felvétele nemcsak malignus elváltozásokban, hanem gyulladásokban és fertőzőes folyamatokban is emelkedett (Pijl és mtsai., 2021). Az ígéretes eredmények ellenére mindez megnehezíti a tumorhipoxia ^{18}F]FDG PET-alapú kimutatását, mely további hipoxiaszelektív nyomjelzők kifejlesztését tette szükségessé.

A radioaktív izotópokkal jelzett NI-származékok olyan radiofarmakonok, melyek specifikusan képesek az alacsony oxigenizáltságú, hipoxiás területek megjelenítésére PET technikával. A nukleáris medicinában alkalmazott NI vegyületek legjelentősebb képviselői az ^{18}F -fluoromizonidazol (^{18}F]FMISO), az ^{18}F]FAZA, az ^{18}F -fluoroeritronitroimidazol (^{18}F]FETNIM) és a ^{124}I - iodoarabinofuranozil (^{124}I]IAZA) (Nguyen és Kim, 2023). Ezek a molekulák passzív diffúzióval jutnak be a sejtekbe, ahol a nitroreduktáz enzim által redukálódnak (Lee és Scott, 2007). Alacsony oxigéntenzio esetén (pl.: tumorsejtekben) a nyomjelző tovább redukálódik, majd kovalens kötést létesít az intracelluláris makromolekulákkal, ami lehetővé teszi a sejten belüli felhalmozódását és detektálását (Lee és Scott, 2007). Normoxiás állapotban (egészséges sejtek) azonban a redukált forma visszaoxidálódik és a nyomjelző kimosódik a sejtekből (Lee és Scott, 2007). Korábbi

eredmények szoros összefüggést találtak a tumorgrádus, több vizsgált hipoxiamarker (VEGF-R1 és Ki67) és az [^{18}F]FMISO-halmozás között (Cher és mtsai., 2006). Az elsőgenerációs [^{18}F]FMISO NI alapú radiofarmakonhoz képest a második generációs [^{18}F]FAZA alacsony lipofilitása fokozott felvételt és gyors kiürülést biztosít az off-target szervekből, ami kedvezőbb farmakokinetikát és hipoxia/normoxia arányt eredményez (Huang és mtsai., 2021; Kumar és mtsai., 1999; Souvatzoglou és mtsai., 2007). Tripla-negatív MDA-MB231 és ösztrogénreceptor-pozitív MCF7 emlőtumor (Dos Santos és mtsai., 2023), SiHa cervixrák (Busk és mtsai., 2013), illetve EAC nyelőcsőtumor (Melsens és mtsai., 2018) preklinikai modelljeivel végzett megelőző kísérletek megerősítették az [^{18}F]FAZA hipoxiaszelektív radiofarmakonként való alkalmazhatóságát (Sorger és mtsai., 2003).

2.5 *In vivo* tumormodellek

Ahogy az fentebb már említésre került az onkológiai felhasználású radiofarmakonok diagnosztikai kompetenciájának tesztelése preklinikai rendszerekben, experimentális tumormodelleken történik. A kísérletes onkológiai modellek létrehozására több módszer is rendelkezésre áll: *karcinogenezis* (kémiai indukcióval létrehozott vagy sugárzás hatására indukált modellek), *transzplantáció* (szubkután vagy intravénás transzplantációs modellek) és *genetikai módosítás*. Ezeken felül léteznek úgynevezett spontán modellek is. Az optimális modell létrehozása kulcsfontosságú, hiszen a tumor és mikrokörnyezetének pontos ábrázolása hozza létre a megfelelő körülményeket a vizsgálandó radiofarmakon értékeléséhez. Lényeges megemlíteni, hogy nincs olyan ideális modell, mely a humán daganatos megbetegedéseket minden szempontból képes reprezentálni. Ez felhívja a figyelmet a kísérleti eredmények kritikus értelmezésére és a preklinikai kutatások több szinten való elvégzésének létjogosultságára.

2.5.1 Transzplantációs modellek

A preklinikai onkológiai kutatásokban leginkább a transzplantációs modellek alkalmazása terjedt el. Ennek során humán (xenograft modellek) vagy saját fajból (szingén/allograft modellek) származó tumorsejteket vagy tumorfragmentumokat juttatnak a laboratóriumi állatokba. A donor és befogadó állat fajtája alapján tehát a transzplantációs modellek két különböző típusát különböztetjük meg: *xenograft modell* és *szingenikus modell*.

A xenograft modellek főbb jellemzőit a **2. Táblázat** foglalja össze.

2. Táblázat Xenograft modellek jellemzői

ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK
a gyógyszerek terápiás hatékonysága humán eredetű tumorokon vizsgálható	az immunhiányos állatokba történő transzplantáció miatt korlátozott az immunrendszer működésének vizsgálata
idő- és költséghatékony	hosszú ideig tart a tumorok növekedése
számos tumortípus felhasználható	alacsony metasztázisképző potenciál
a humán tumor genetikai heterogenitása, hisztológiai jellemzői és fenotípusa megőrzött	magas állattartási költségek (az immunhiányos állatok speciális steril környezetet igényelnek)
könnyen reprodukálható	interakciók alakulhatnak ki a tumor és a stróma között a donor és a recipiens fajok különbözősége miatt
lehetséges a tumor mikrokörnyezetének vizsgálata is, mivel a tumorstróma is átültethető	
több terápia értékelhető ugyanazon a mintán	

A xenograft transzplantáció lényege, hogy humán tumorból származó tumorsejtek vagy szövetrészletek kerülnek beültetésre az állatokba. A heterológ sejtek/szövetek kilökődésének megakadályozása érdekében a beültetés során immunhiányos kisállatokat használnak. Számos genetikailag módosított egértörzs elérhető, melyek alkalmasak a transzplantáció kivitelezésére többek között: nude (csupasz), NOD (non-obese diabetes), SCID (severe combined immunodeficient/súlyos kombinált immunhiányos), RAG (recombination activating gene) (Belizario, 2009). A nude egerekben a B-sejtek, a dendritikus sejtek és a granulociták működése korlátozott, ellenben ennek ellensúlyozására a természetes ölüsejtek (natural killer cell/NK-sejt) és a makrofágok aktivitása fokozott. A NOD és a SCID egerek esetében hiányoznak mind a B-sejtek, a T-sejtek és az NK-sejtek. Továbbá érdemes megemlíteni a NOD/SCID/IL-2R γ egértörzset is, mely azon túl, hogy nem rendelkezik sem B-, T- és NK-sejtekkel, elégtelen funkciójú makrofágokat és dendritikus sejteket tartalmaz (Belizario, 2009; Ito és mtsai., 2002).

A xenograft modellekkel szemben, a szingén transzplantációs modellek esetében a donor és a recipiens állat genetikai állománya azonos, azaz a transzplantálandó tumoros

sejtvonal vagy tumorfragmentum a fogadó állattal megegyező törzsű állatból származik. A megegyező genetikai összetételnek köszönhetően a szingén transzplantáció során egészséges immunrendszerrel rendelkező rágsálókat használnak. Ez egyrészt lehetővé teszi a tumor-immunrendszer kapcsolatának vizsgálatát, másrészt biztosítja az immunterápia hatásának értékelésére irányuló kísérletek kivitelezését is (Belizario, 2009). Továbbá, a szingén modellek a tumor-stróma kölcsönhatások tanulmányozására is lehetőséget nyújtanak. Érdemes kiemelni azonban, hogy az inbred törzsek használata miatt a növekvő daganatok genetikai heterogenitása alacsony, mely befolyásolhatja az eredmények transzlálhatóságát. A szingén modellek legfontosabb jellemzőit a **3. Táblázat** mutatja be.

3. Táblázat Szingén modellek jellemzői

ELŐNYÖK	HÁTRÁNYOK
intraspecifikus kölcsönhatás a tumor és mikrokörnyezete között	a rágsáló eredetű tumorsejtek és szövetrészek nem képesek teljes mértékben reprezentálni a humán tumorokat
a daganatos rágsálók egészséges immunrendszerrel jellemezhetők	alacsony genetikai variabilitás a beltenyészet miatt
terápiás hatás értékelésére irányuló kísérletek kivitelezése biztosított	a terápiás válaszreakciók különbözhetnek a humán klinikai eredményektől

A transzplantációs modelleket nemcsak a donor és a befogadó állat fajtája alapján, hanem az átültetés lokalizációja szerint is csoportosíthatjuk. Ez alapján elkülönítünk *ortotopikus* és *heterotopikus* transzplantációs modelleket.

Ortotopikus átültetésről beszélünk, amennyiben a graftot a szervezeten belül anatómiailag az eredeti helyére ültetik vissza. Ezáltal az ortotopikus modellek jobban tükrözik a humán tumoros elváltozásokat szövettani típusuk, a vaszkulaturájuk, génexpressziós mintázatuk, a kemoterápiás érzékenységük, illetve a metasztatizációs képességük szempontjából is (Bibby, 2004; Khanna és mtsai., 2000). Ilyen típusú transzplantációhoz immunokompetens és immunodeficiens laboratóriumi állatok egyaránt alkalmazhatóak. Ezen modellek óriási előnye a magas metasztatizációs hajlam, mely lehetővé teszi az áttétképződés folyamatának részletes tanulmányozását. Az ortotopikus modellek segítségével jól vizsgálható a tumorok mikrokörnyezete és a tumor-stróma kölcsönhatások is. Ezek mellett a modelltípus alkalmas a daganatellenes szerek hatásosságának értékelésére a primer elváltozásokban és a

metasztatikus léziókban is, illetve az immunológiai ellenőrző és immunelkerülési mechanizmusok vizsgálatára is lehetőséget teremt. Összességében az ortotopikus modelleket leginkább a tumor mikrokörnyezetének vizsgálatára, valamint a lokális tumornövekedés és a metasztázisképződés tanulmányozására használják. A modell hátrányai közé tartozik azonban, hogy létrehozása idő- és munkaigényes folyamat, valamint a létrehozott tumorok *in situ* növekedésének monitorozásához képalkotó módszerek alkalmazása szükséges.

Heterotopikus transzplantáció során a tumorsejteket vagy a szövetrészletet anatómiailag nem az eredeti helyére ültetik vissza. Leggyakoribb formája a szubkután transzplantáció, mely során a graftot a kísérleti állat bőre alá injektálják (váll, lágyék régió). A szubkután modellek létrehozása módszertanilag egyszerű, és könnyen reprodukálható. A primer tumorok relatíve gyorsan kialakulnak, és szemben az ortotopikus modellekkel a tumornövekedés vizsgálata hagyományos tolómérővel (kaliper mérés) is lehetséges. A módszer hátrányai között említendő, hogy a szubkután modellek esetében ritkábban alakul ki áttét, így a metasztázisképződés folyamatának tanulmányozására nem megfelelő. Továbbá, a szubkután növekvő daganatok kevésbé modellezik jól a humán elváltozásokat, amit az eredmények értelmezésekor figyelembe kell venni. A technikai előnyök és a tumornövekedés követésének egyszerűsége miatt az újonnan fejlesztett diagnosztikai és terápiás anyagok *in vivo* tesztelésére leginkább a szubkután transzplantációs modellek használata terjedt el.

3 Célkitűzések

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

1. a ^{68}Ga -jelölt RAMEB és HP β CD molekulák (^{68}Ga -NODAGA-HP β CD és ^{68}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 emlőtumorsejt 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 glükózzáanyagcseréjére 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 terápiás döntéshozatal alapjait.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált vegyszerek és eszközök

Radiofarmakonok szintézise során használt anyagok

- QMA Sep-Pak (Plus Light) (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- AG neutralizáló oszlop (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA)
- C18 Sep-Pak Plus (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Alumina Sep-Pak (Plus) (MI-026) töltet (tisztító oszlopsor) (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Macherey-Nagel SPE oszlopsor (Symetron Kft., Budapest, Magyarország)
- Light C18 Sep-Pak oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Kryptofix 2.2.2. (Merck, Darmstadt, Németország)
- vízmentes acetonitril (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 14 mg/mL koncentrációjú K_2CO_3 -oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 20 mg TATM (ABX GmbH, Radeberg, Németország)
- 1M HCl oldat (Normapur) (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország)
- 0,1M ultra tiszta HCl (Merck, Darmstadt, Németország)
- $^{68}Ge/^{68}Ga$ generátor (50 mCi, Gallia-Pharm, Eckert and Ziegler Németország)
- 96%-os EtOH (Merck, Darmstadt, Németország)
- izotóniás sóoldat (Fresenius Kabi Hungary Kft., Budapest, Magyarország)
- 1M-os nátrium acetát oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 2%-os NaOH oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 6-monodeoxi-6-monoamino-random-metilezett-béta-ciklodextrin hidroklorid (NH₂-RAMEB) (Cyclolab Kft. Budapest, Magyarország)
- 6-deoxy-6-monoamino-(2-hidroxipropil)- β -ciklodextrin (NH₂-HP β CD) (Cyclolab Kft. Budapest, Magyarország)
- p-NCS-benzil-NODA-GA (NODAGA) (CheMatech, Dijon, Franciaország)
- p-NCS-Bz-DOTA-GA (DOTAGA) (CheMatech, Dijon, Franciaország)

Sejtenyésztés során használt anyagok

- DMEM + GlutaMAXTM-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- RPMI Medium 1640 + GlutaMAXTM-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

- FBS, Qualified (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Antibioitic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 2 mg/mL doxorubicin-hidroklorid (Doxorubicin-Teva oldatos injekció, Teva Gyógyszergyár Zrt., Magyarország)
- 1 mg/mL vinblasztin-szulfát (Vinko, Kocak Farma, Gyógyszeripari és Vegyipari Kft., Törökország)
- Trypsin-EDTA Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- PBS pH 7,2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

***In vitro* vizsgálatok során használt anyagok**

- kobalt-diklorid (CoCl₂) (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- PBS pH 7,2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- PBST (foszfátpufferelt sóoldat + 0,05% - 0,1% Tween 20)
- anti HIF-1 α , GLUT-1, és HK2 elsődleges antitestek (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)
- másodlagos antitestek (anti-rabbit IgG; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Tumorindukció során használt vegyszerek

- Aerrane (izoflurán) folyadék inhalációs gőz képzéséhez (Baxter Hungary, Budapest, Magyarország, OGYI-T-08993)
- Forane (izoflurán) oldat inhalációs gőz képzéséhez (AbbVie Gyógyszerkereskedelmi Kft., Budapest, Magyarország, OGYI-T-1414/01)
- O₂ (Linde Healthcare, Budapest, Magyarország; OGYI-T-20607)
- N₂O (Linde Healthcare, Budapest, Magyarország, OGYI-T-21090)
- Matrigel Matrix (Corning, New York, USA)
- fiziológiás sóoldat (0,9 % NaCl)

PET leképezés során használt anyagok

- Aerrane (izoflurán) folyadék inhalációs gőz képzéséhez (Baxter Hungary, Budapest, Magyarország, OGYI-T-08993)
- Forane (izoflurán) oldat inhalációs gőz képzéséhez (AbbVie Gyógyszerkereskedelmi Kft., Budapest, Magyarország, OGYI-T-1414/01)
- O₂ (Linde Healthcare, Budapest, Magyarország; OGYI-T-20607)
- N₂O (Linde Healthcare, Budapest, Magyarország, OGYI-T-21090)

4.2 Radiofarmakonok

4.2.1 [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.

4.2.2 [¹⁸F]FAZA szintézise

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

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. Az [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.

4.2.3 [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD szintézise

A prekursor vegyületet (NODAGA-HPβCD) Hajdu és munkatársai 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 (Hajdu és mtsai., 2019). 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.

4.2.4 [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.

4.3 *In vitro* kísérletes módszerek

4.3.1 Alkalmazott sejtvonalak, sejtenyésztés

4.3.1.1 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 + GlutaMAX™-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)) tenyésztettük. A sejtvonalat T-75 sejtenyésztő flakákban (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 tripánkék exklúziós teszttel határoztuk meg, majd pontosan beállítottuk a tumorindukcióhoz szükséges sejtkoncentrációt.

4.3.1.2 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 + GlutaMAX™-I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)) tápoldatban, T-75 sejtenyésztő flakákban (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 passzázst követően alkalmaztuk a biológiai vizsgálatokhoz. A sejtranszplantáció előtt a sejtek viabilitását tripánkék festékeexklúziós módszerrel ellenőriztük, majd ezt követően határoztuk meg a tumorindukcióhoz szükséges sejtszámot és sejtkoncentrációt.

4.3.1.3 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 sejt kultúrákat 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.

4.3.1.4 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 sejt vonal tenyésztése standard laboratóriumi körülmények között történt DMEM, 10% FBS-el kiegészített táptalajban. A sejt vonal fenntartásához a tenyésztést 28 µM 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.

4.3.1.5 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.

4.3.1.6 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 sejt vonal fenntartásához a tenyésztést 20 µM 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 festékexklúziós

próbával ellenőriztük, a passzálást háromnaponta végeztük. A radiofarmakon injektálását megelőző passzálás során a kemoterápiás szert eltávolítottuk a tenyésztőközeggől.

4.3.2 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 (Huang és mtsai., 2003; Zhang és mtsai., 2014).

4.3.3 *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 sejtminthoz és a CoCl_2 -inkubált sejtsoporthoz 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 radiotréser-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 $\times 10^6$ 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.

4.3.4 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).

4.4 *In vivo* kísérletes módszerek

4.4.1 Kísérleti állatok

Az emlőtumor-modellek létrehozásához 12 hetes, körülbelül 20 grammos nőstény, 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, nőstény, 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).

4.4.2 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 sejtszuspenziókat alkalmaztunk 150 µL fiziológiás sóoldatban. A Pgp- sejteket az egerek bal, míg a Pgp+ sejteket azok jobb combjába szubkután injektáltuk.

4.4.3 Tumornövekedés monitorozása

A tumorok növekedését tolmérővel 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.

4.4.4 *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 [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és [^{68}Ga]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 [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD 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 képsorozatokot is készítettünk. A statikus leképezés esetében 120 perces inkubációs időt követően 20 perces gyűjtés történt a tumorokról, még a dinamikus képalkotás a radiotrészert beadásától (0. perc) a 140. percre tartott.

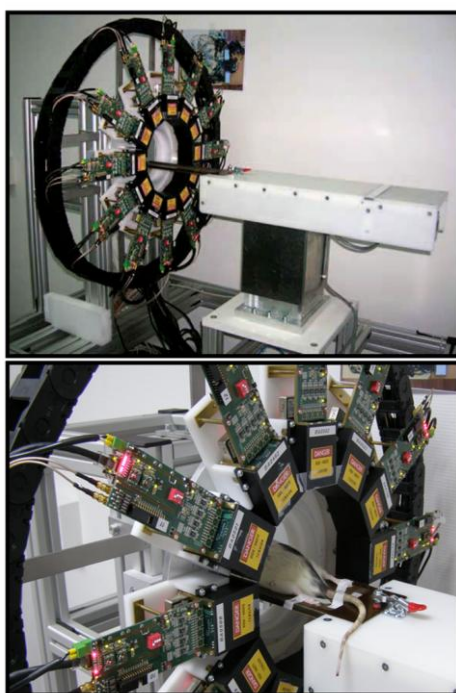
Az *in vivo* vizsgálatokat izoflurán-indukálta inhalációs anesztéziában végeztük. Az altatás indukciójához 3% izofluránt (Aerrane, Forane) 0,4 L/min O_2 -t és 1,2 L/min N_2O -t alkalmaztunk. A fenntartás alatt az izoflurán koncentrációját 1,5%-ra csökkentettük. Az anesztéziát dedikált kisállat altatókészülékkel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

4.4.4.1 MiniPET-II kamera

Az *in vivo* vizsgálatokat a preklinikai PET kamerával (MiniPET-II) végeztük (4. ábra). 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 kristálmátrixok 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.



4. ábra MiniPET-II kamera (saját készítésű ábra)

4.4.4.2 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 (SUVmax) és átlagos (SUVmean) formában a következő képlet alapján:

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

A SUV_{max} a legnagyobb radioaktivitást mutató voxel 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.

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

4.4.5 *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.

4.5 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 ± szórás (SD) formájában tüntettük fel.

5 Eredmények

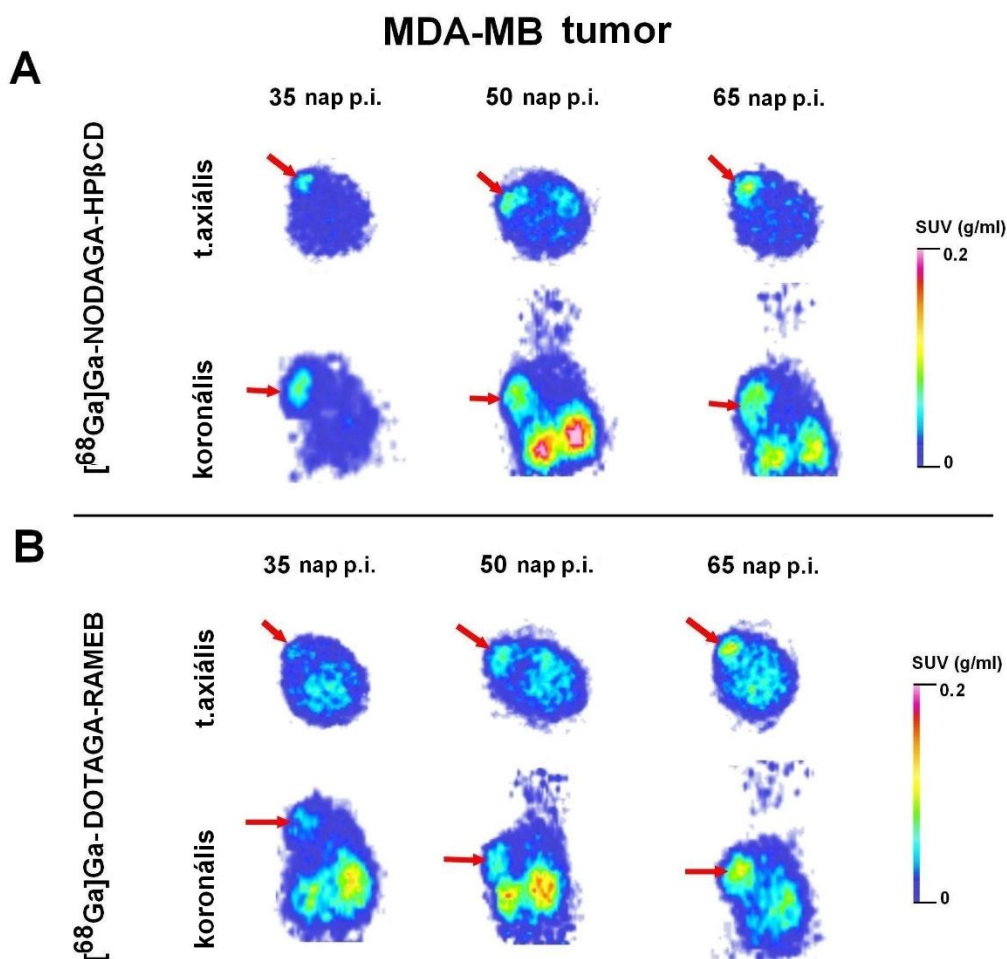
5.1 Emlőtumor xenograftok PGE2 termelésének *in vivo* monitorozása ciklodextrin alapú PET radiofarmakonokkal

5.1.1 *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).

5.1.1.1 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 (**5. ábra**). 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 (**5. ábra B panel**). Továbbá, a ^{68}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 (**5. ábra A panel**). A szubkután növekvő tumorok halmozásán túl, mindkét PET sorozaton szignifikáns trésszerhalmozás mutatkozott a vesékben, mely a nyomjelzők renális kiválasztására utal.

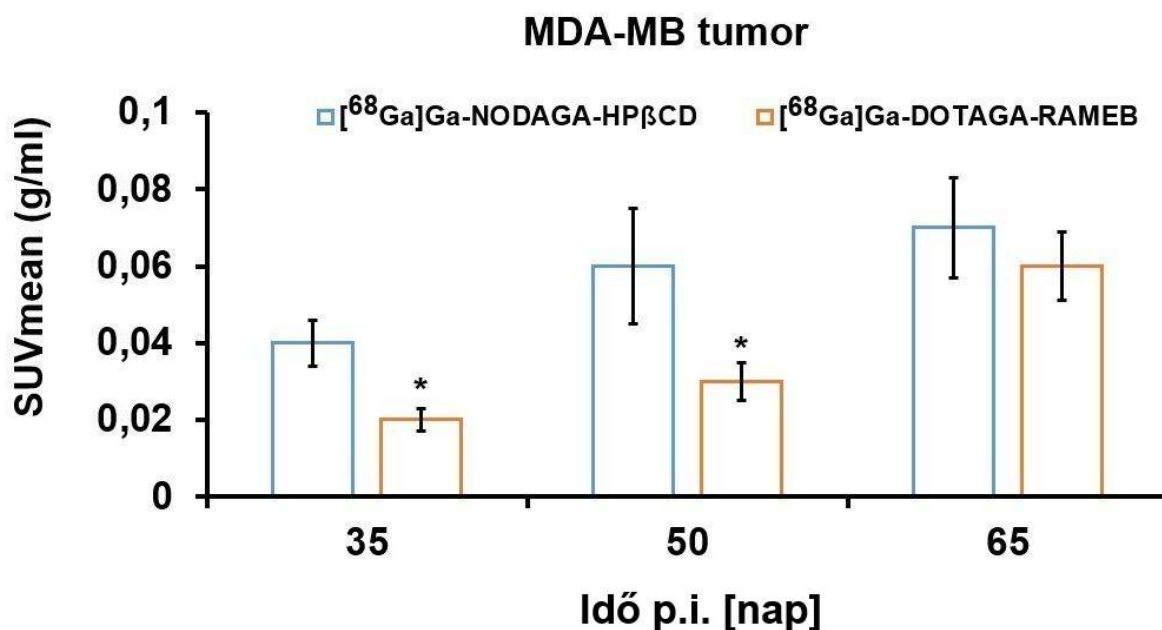


5. ábra MDA-MB-HER2+ tumorhordozó egerek *in vivo* PET felvételei

Bomláskorrigált, tranzaxiális és koronális PET felvételek MDA-MB-HER2+ emlőtumoros egerekről 35, 50 és 65 nappal a tumorindukciót követően és 60 perccel a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD (A panel) és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (B panel) radiofarmakonok intravénás injektálása után. Piros nyilak: szubkután növekvő tumorok. *PET*: pozitronemissziós tomográfia; *p.i.*: post injection/injektálást követően.

A vizuális megfigyeléseinket a PET képek kvantitatív analízise is megerősítette. Mindkét ciklodextrin nyomjelző nagy affinitással kötődött a HER2+ tumorokhoz (5. ábra, 4. Táblázat). A SUV értékek elemzése - összhangban a kvalitatív értékeléssel - mindkét radiofarmakon esetében folyamatosan emelkedő trézerkoncentrációkat mutatott a kísérlet teljes időtartama alatt ([⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD: $0,04 \pm 0,006$, $0,06 \pm 0,015$ és $0,07 \pm 0,013$ a 30., 50. és 65. kísérleti napokon, [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: $0,02 \pm 0,003$,

$0,03 \pm 0,005$ és $0,06 \pm 0,009$ 30, 50 és 65 nappal az oltást követően, **6. ábra**). 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 ($p \leq 0,05$).



6. ábra MDA-MB-HER2+ tumorok radiofarmakon-felvételének kvantitatív PET analízise

MDA-MB-HER2+ tumorhordozó CB17 SCID egerek kvantitatív SUV analízise 35, 50 és 65 nappal a tumorindukciót követően és 60 perccel a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonok intravénás injektálása után. Az adatokat átlag $\pm$ SD formájában tüntettük fel. $p \leq 0.05$ (*). $n = 3$ tumoros egér/radiofarmakon/vizsgálati időpont.

PET: pozitronemissziós tomográfia; p.i.: post injection/injektálást követően; SCID: severe combined immunodeficient/súlyos kombinált immunhiányos; SD: standard deviation/szórás; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.

4. Táblázat MDA-MB-HER2+ tumorok kvantitatív SUV analízise

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonok *in vivo* akkumulációjának kvantitatív értékelése MDA-MB-HER2+ tumorhordozó egerekben a tumorindukciót követő 30., 50. és 65. napokon, 60 perccel a radiofarmakonok intravénás

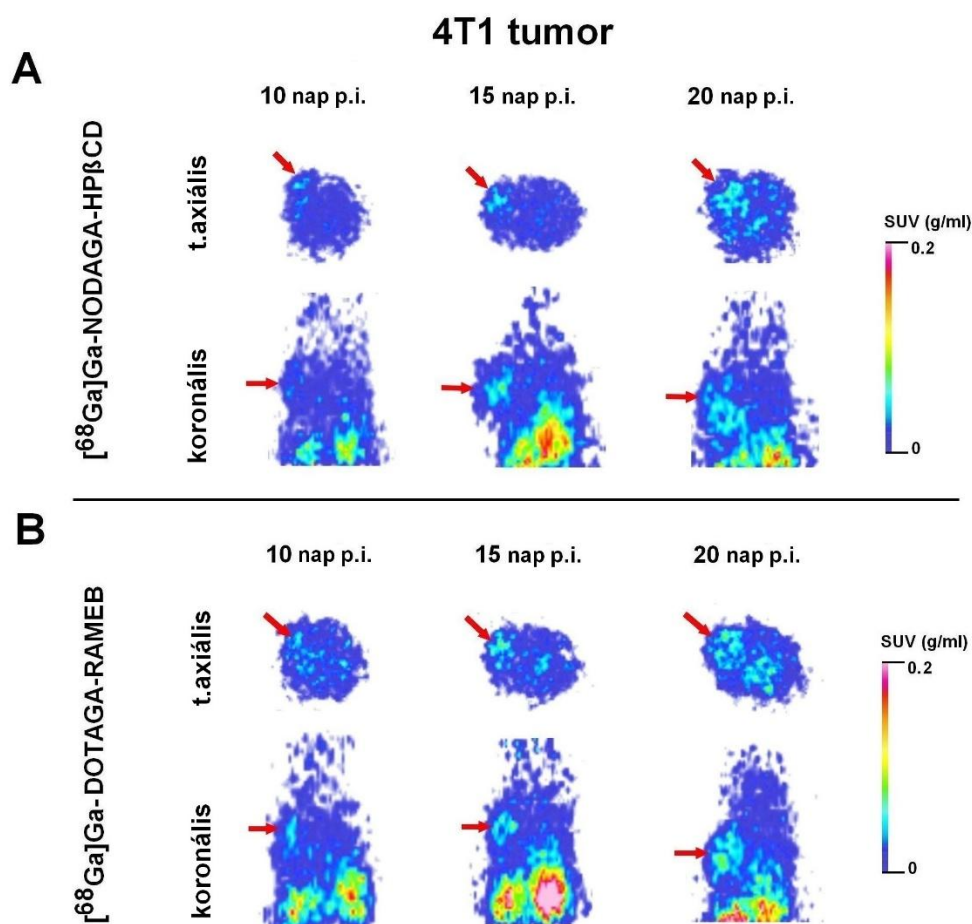
injektálását követően. A tumorok radioaktivitása SUV_{mean} értékekben került kifejezésre. Az adatok átlag ± SD formátumban szerepelnek (n = 3 tumoros egér/radiofarmakon/vizsgálati időpont).

MDA-MB-HER2+	[⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-HPβCD	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB
nap p.i.	SUV _{mean}	SUV _{mean}
30	0,04 ± 0,006	0,02 ± 0,003
50	0,06 ± 0,015	0,03 ± 0,005
65	0,07 ± 0,013	0,06 ± 0,009

p.i.: post injection/injektálást követően; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.

5.1.1.2 4T1 tumorok

A szubkután növekvő tripla-negatív 4T1 tumorok - az MDA-MB HER2+ tumorokhoz hasonlóan - mindkét nyomjelző alkalmazásával egyértelműen azonosíthatóak voltak mindhárom vizsgálati időpontban (**7. ábra**). 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 trésszerhalmozást észleltünk a kísérleti időszak során, mely a RAMEB vegyület esetében kifejezettebbnek bizonyult (**7. ábra**).

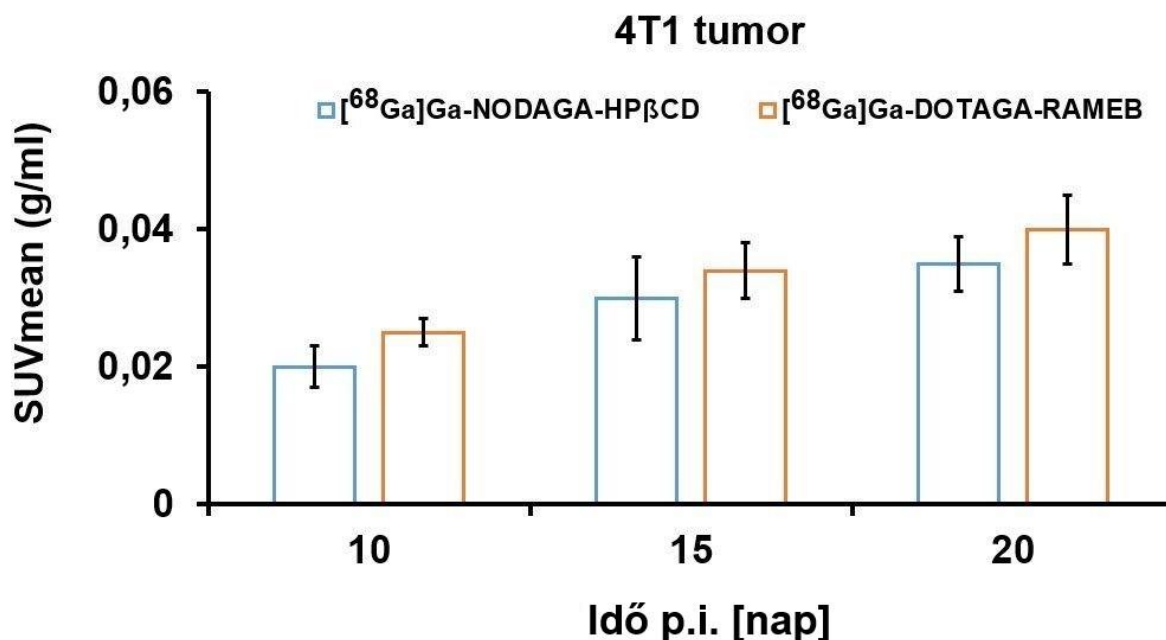


7. ábra Tripla-negatív 4T1 tumorhordozó egerek *in vivo* PET felvételei

Bomláskorrigált, tranzaxiális és koronális PET felvételek tripla-negatív 4T1 emlőtumoros egerekről 10, 15 és 20 nappal a tumorindukciót követően és 60 perccel a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD (A panel) és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (B panel) radiofarmakonok intravénás injektálása után. Piros nyilak: szubkután növekvő tumorok. *PET*: pozitronemissziós tomográfia; *p.i.*: post injection/injektálást követően.

A vizuális értékelés eredményeit a 4T1 tumorok esetében is kvantitatív PET adatokkal támasztottuk alá (8. ábra, 5. Táblázat). Ennek megfelelően mind a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD, és mind a [⁶⁸Ga]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 [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD esetében $0,02 \pm 0,003$; $0,03 \pm 0,006$ és $0,035 \pm 0,004$, míg a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB esetében $0,025 \pm 0,002$; $0,034 \pm 0,004$ és $0,04 \pm 0,005$ voltak (8. ábra, 5.

Táblázat). A két nyomjelző összehasonlításakor a RAMEB vegyület minden vizsgált időpontban kissé magasabb tumorfelhalmozódást mutatott, azonban ezek a különbségek egyik időpontban sem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak.



8. ábra Tripla-negatív 4T1 xenograftok radiofarmakon-felvételének kvantitatív PET analízise

Tripla-negatív 4T1 tumorhordozó CB17 SCID egerek kvantitatív SUV analízise 10, 15 és 20 nappal a tumorindukciót követően és 60 perccel a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonok intravénás injektlása után. Az adatokat átlag ± SD formájában tüntettük fel. n = 3 tumoros egér/radiofarmakon/vizsgálati időpont.

PET: pozitronemissziós tomográfia; p.i.: post injection/injektlást követően; SCID: severe combined immunodeficient/súlyos kombinált immunhiányos; SD: standard deviation/szórás; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.

5. Táblázat Tripla-negatív xenograftok radiofarmakon-felvételének kvantitatív SUV analízise

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonok *in vivo* akkumulációjának kvantitatív értékelése tripla-negatív 4T1 tumorhordozó egerekben a tumorindukciót követő 10., 15. és 20. napokon, 60 perccel a radiofarmakonok intravénás injektlását követően. A tumorok radioaktivitása SUVmean értékekben került kifejezésre. Az

adatok átlag $\pm$ SD formátumban szerepelnek. n = 3 tumoros egér/radiofarmakon/vizsgálati időpont.

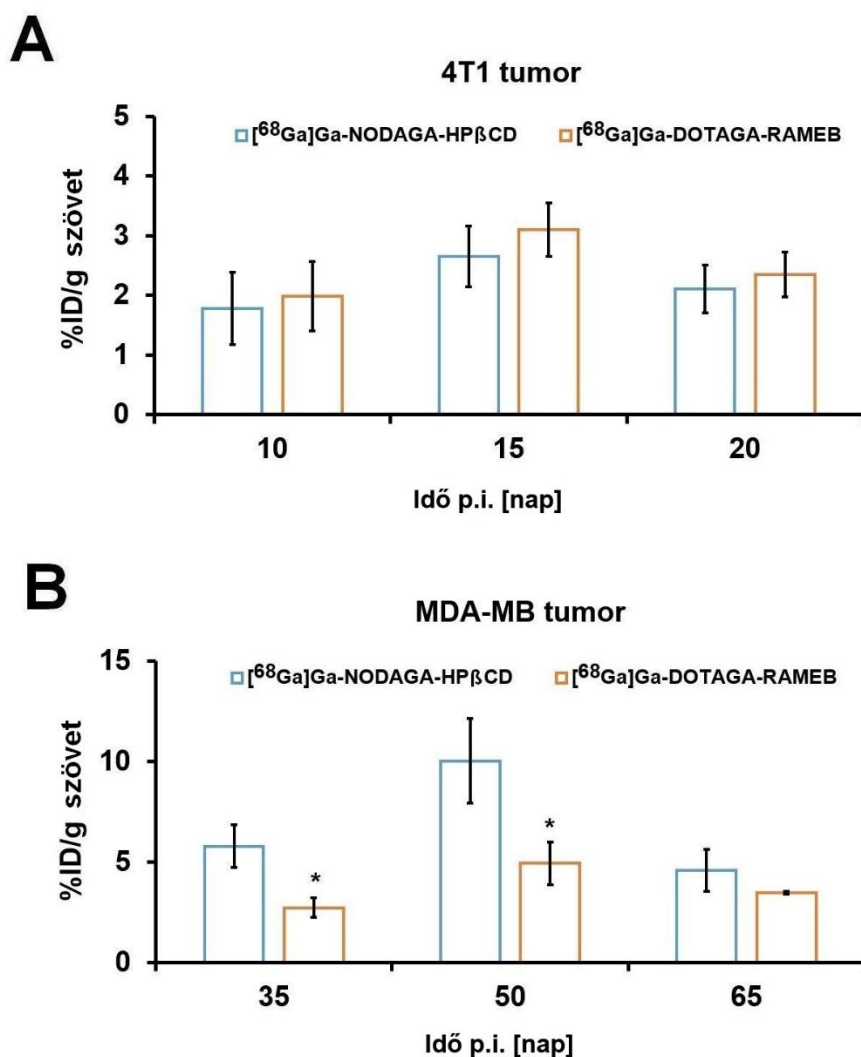
4T1	[⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-HPβCD	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB
nap p.i.	SUVmean	SUVmean
10	0,02 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,002
15	0,03 $\pm$ 0,006	0,03 $\pm$ 0,004
20	0,04 $\pm$ 0,004	0,04 $\pm$ 0,005

p.i.: post injection/injektálást követően; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.

5.1.2 *Ex vivo* szervi eloszlásos vizsgálatok

Az *in vivo* PET eredmények alátámasztására *ex vivo* boncolásos szervi eloszlásos vizsgálatokat végeztünk (9. ábra, 6. Táblázat és 7. Táblázat).

A 4T1 tumorokban mindkét nyomjelző fokozatosan növekvő akkumulációt mutatott a tumorindukciót követő 10. és 15. napok között (9. ábra A panel, 6. Táblázat). A 15. napon regisztrált csúcshalmozódást ([⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: 3,10% $\pm$ 0,45 %ID/g; [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD: 2,65% $\pm$ 0,51 %ID/g) a 20. napra enyhe csökkenés követte ([⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: 2,35% $\pm$ 0,38 %ID/g; [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD: 2,11% $\pm$ 0,40 %ID/g). Emellett a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB 4T1 tumorokban mért koncentrációja minden vizsgálati időpontban diszkrétan meghaladta a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD értékeit, azonban ezek a különbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak (9. ábra A panel, 7. táblázat).



9. ábra *Ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok eredményei

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonok tumorfelvételének *ex vivo* értékelése tripla-negatív 4T1 (A panel) és MDA-MB-HER2+ (B panel) xenograftokban a nyomjelzők intravénás beadása után 60 perccel, valamint a tumorindukciót követő 10., 15. és 20. napokon (4T1), illetve a 35., 50. és 65. napokon (MDA-MB-HER2+). Vizsgálati csoportonként és időpontonként 3 állat. * $p \leq 0,05$. A %ID/g értékek átlag $\pm$ SD formában kerültek megadásra. *p.i.*: a tumorsejtek beadását követően.

6. Táblázat Tripla-negatív 4T1 xenograftok radiofarmakon-felvételének *ex vivo* értékelése

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonok akkumulációjának *ex vivo* vizsgálata tripla-negatív 4T1 tumorhordozó egerekben a

tumorindukciót követő 10., 15. és 20. napokon, illetve 60 perccel a radiofarmakonok intravénás injektálását követően. A tumorok radioaktivitását %ID/g értékekben fejeztük ki. Az adatok átlag $\pm$ SD formában kerültek megadásra, $n = 3$ tumoros egér/radiofarmakon/vizsgálati időpont).

4T1	[⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-HP β CD	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB
nap p.i.	%ID/g tissue	%ID/g tissue
10	1,78 $\pm$ 0,61	1,99 $\pm$ 0,58
15	2,65 $\pm$ 0,51	3,10 $\pm$ 0,45
20	2,11 $\pm$ 0,40	2,35 $\pm$ 0,38

p.i.: a tumorsejtek beadását követően.

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: [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: 2,727% $\pm$ 0,48 %ID/g, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HP β CD: 5,779% $\pm$ 1,06 %ID/g; 50. nap: [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB: 4,929% $\pm$ 1,06 %ID/g, [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HP β CD: 10,039% $\pm$ 2,09 %ID/g) (**9. ábra B panel, 7. Táblázat**). A daganatok kialakulását követő 65. napon a [⁶⁸Ga]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 (**9. ábra B panel**).

7. Táblázat MDA-MB-HER2+ xenograftok radiofarmakon-felvételének *ex vivo* értékelése

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HP β CD és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakonok akkumulációjának *ex vivo* vizsgálata MDA-MB-HER2+ tumorhordozó egerekben a tumorindukciót követő 35., 50. és 60. napokon, illetve 60 perccel a radiofarmakonok intravénás injektálását követően. A tumorok radioaktivitását %ID/g értékekben fejeztük ki. Az adatok átlag $\pm$ SD formában kerültek megadásra, $n = 3$ tumoros egér/radiofarmakon/vizsgálati időpont.

MDA-MB	[⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-HPβCD	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB
nap p.i.	%ID/g tissue	%ID/g tissue
35	5,78 ± 1,06	2,73 ± 0,48
50	10,04 ± 2,09	4,93 ± 1,06
65	4,59 ± 1,04	3,46 ± 0,08

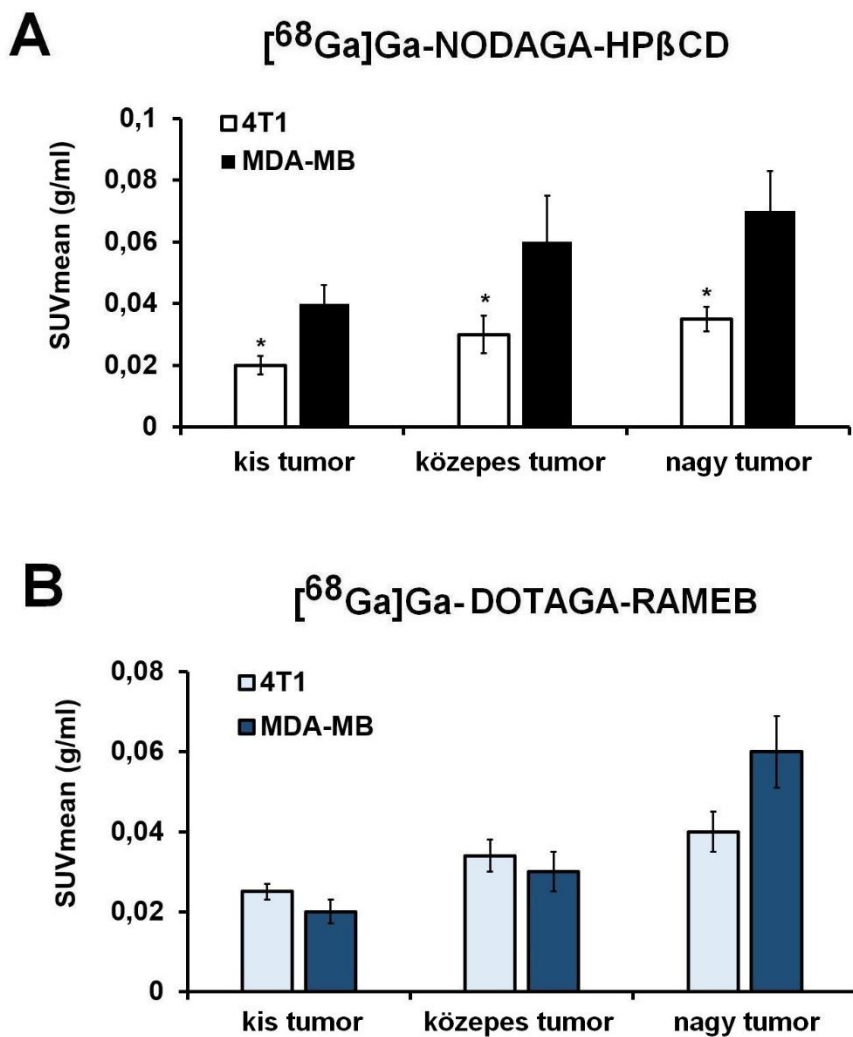
p.i.: a tumorsejtek beadását követően.

5.1.3 [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD- és [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB-felvétel összehasonlítása MDA-MB-HER2+ és 4T1 tumorokban

A biológiai vizsgálatokat követően a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB *in vivo* felvételét tumorméret kategóriák szerint is összehasonlítottuk (kis, közepes méretű és nagy tumorok) (10. ábra).

A SUV adatelemzés alapján a radiojelölt HPβCD molekula felvétele szignifikánsan magasabb volt a kis méretű MDA-MB-HER2+ tumorokban, mint a méretben egyező 4T1 daganatok esetében ($p \leq 0,05$) (6. ábra A panel). 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 ($p \leq 0,05$) (10. ábra A panel). Emellett megfigyelhető volt a HPβCD 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 (10. ábra B panel). Ezzel szemben a nagy méretű tumorok esetében a RAMEB-felvétel a HER2+ elváltozásokban volt magasabb (10. ábra B panel). Fontos megemlíteni azonban, hogy az aktivitáskülönbségek egyik tumorméret kategóriában sem érték el statisztikai szignifikanciát.



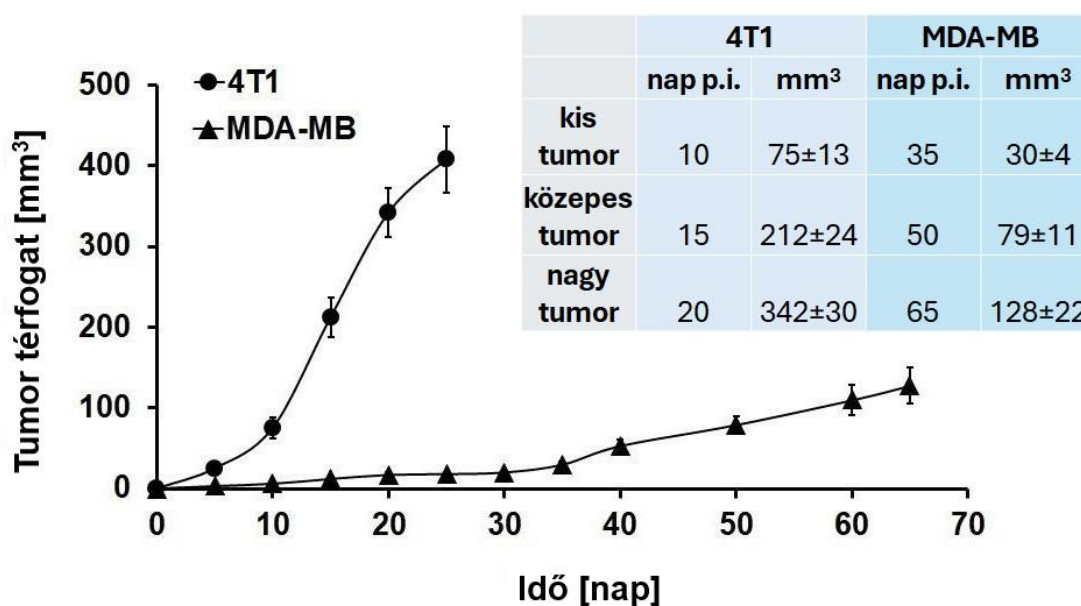
10. ábra A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HP}\beta\text{CD}$ és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ radiofarmakonok tumorfelhalmozódása a tumorméret függvényében

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HP}\beta\text{CD}$ (A panel) és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ (B panel) tumorméret-függő felhalmozódásának összehasonlítása MDA-MB-HER2+ és 4T1 daganatokban. Az SUV értékek (g/mL) átlag $\pm$ SD formában kerültek megadásra. *SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.*

5.1.4 A tumornövekedés dinamikájának vizsgálata

Az *in vivo* vizsgálatokkal párhuzamosan értékeltük a két különböző emlőtumor intrinzik növekedési potenciálját (**11. ábra**). A tripla-negatív 4T1 emlőtumорок növekedési görbéje gyors sejtprolifерációt 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. A két, eltérő biológiai viselkedésű emlőtumor növekedési dinamikáját a **11. ábra** szemlélteti.



11. ábra A 4 T1 és az MDA-MB-HER2+ tumorok növekedési dinamikájának összehasonlítása

A tumornövekedési görbe gyors proliferációt jelez az agresszív 4 T1 tumorok esetében, míg a HER2+ tumorok növekedése fokozatos. A két tumormodell proliferációs különbségeit a jobb oldalon található táblázat szemlélteti, három növekedési fázis példáján keresztül: kis, közepes és nagy tumorok.

5.2 Tumorasszociált hipoxia vizsgálata preklinikai nőgyógyászati tumormodellekben PET képalkotással

5.2.1 *In vitro* vizsgálatok eredményei

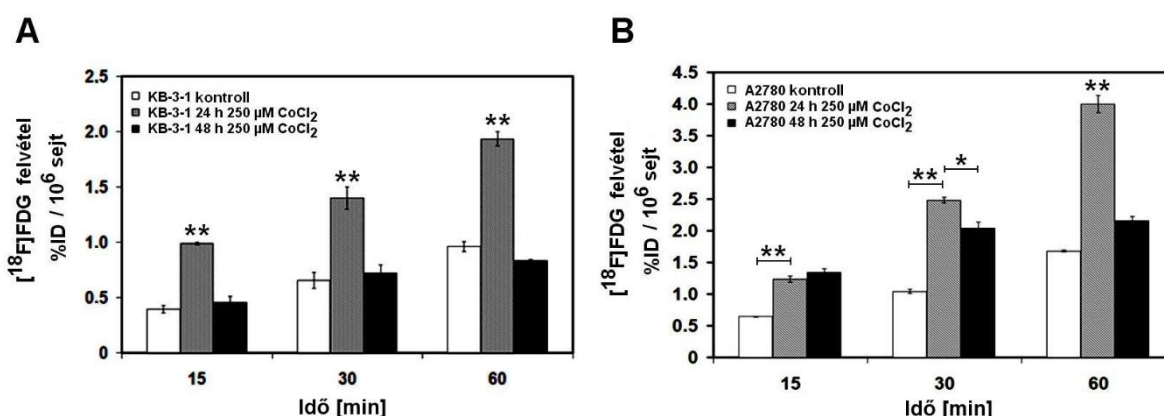
A CoCl_2 -al inkubált KB-3-1 és A2780 sejtekben kialakuló hipoxiát és az ahhoz kapcsolódó sejtszintű folyamatokat radiofarmakon-felvételi ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) és molekuláris

biológiai módszerekkel (Western blot) vizsgáltuk. Az eredmények alapján a CoCl_2 -kezelés a GLUT1 glükóztranszporter és a HK2 enzim fokozott expresszióját idézte elő.

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

5.2.1.1.1 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) (**12. ábra A panel**). 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 ($p \leq 0,01$) (**12. ábra A panel**).



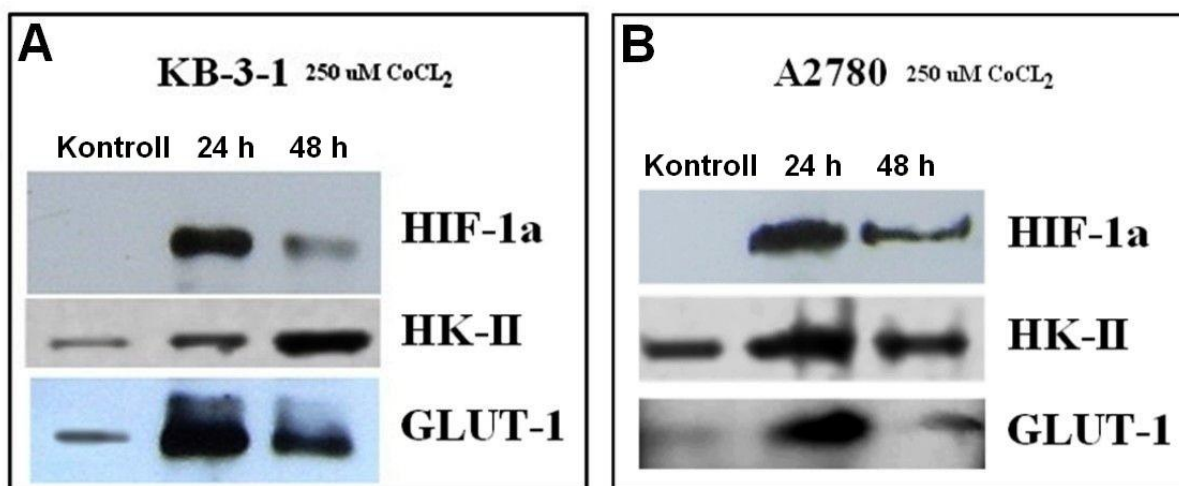
12. ábra KB-3-1 és A2780 sejtek $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvétele

A panel: 24, illetve 48 órán keresztül CoCl_2 -vel inkubált KB-3-1 sejtek, valamint a kezeletlen kontroll KB-3-1 sejtek $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvétele. B panel: CoCl_2 -vel 24, illetve 48 órán át kezelt A2780 sejtek, valamint a kezeletlen kontroll A2780 sejtek $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -felvétele. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. A2780: *humán ováriumtumor*; CoCl_2 : *kobalt-diklorid*; $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$: $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-2-dezoxi-D-glükóz}$; KB-3-1: *humán cervixtumor*.

5.2.1.1.2 Western blot analízis

A HIF-1 α , a GLUT1 és a HK2 fehérjék expressziójának szintjét Western blot módszerrel határoztuk meg (**13. ábra A panel**). 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}F]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 (13. ábra A panel).



13. ábra CoCl_2 -vel kezelt KB-3-1 és A2780 sejtek, valamint kezeletlen kontrollsejtek Western blot analízise

A HIF-1 α , a HK2 enzim és a GLUT1 transzporter expressziójának mértéke CoCl_2 -vel inkubált KB-3-1 (A panel) és A2780 (B panel) sejtekben, valamint a megfelelő kontroll KB-3-1 (A panel) és A2780 (B panel) sejtekben. *A2780*: humán ováriumtumor; *CoCl_2* : kobalt-diklorid; *GLUT*: 1-es típusú glükóztanszporter; *HIF-1 α* : hipoxia indukált faktor-1 α ; *HK2*: hexokináz 2 enzim; *KB-3-1*: humán cervixtumor.

5.2.1.2 A2780 sejtek *in vitro* vizsgálata

5.2.1.2.1 Sejtszintű [^{18}F]FDG-felvétel

Az A2780 sejtek [^{18}F]FDG-felvételének elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a CoCl_2 -kezelt sejtekben a radiofarmakon akkumulációja minden vizsgált időpontban meghaladta a kontrollsejtekben mért értékeket (12. ábra B panel). Ugyanakkor az inkubációs idő függvényében számottevő eltérések mutatkoztak a kezelt sejtek [^{18}F]FDG akkumulációjának tekintetében. Az első mérési időpontban (15. perc) nem tapasztaltunk lényeges különbséget a 24, illetve 48 órán át CoCl_2 -vel kezelt sejtek radioaktivitása között, azonban a 30. és a 60.

percekben a 24 óráig inkubált sejtcsoport [^{18}F]FDG-felvétele szignifikánsan meghaladta a 2 napig kezelt sejtek halmozását (30. perc: $p \leq 0,05$, 60. perc: $p \leq 0,01$).

5.2.1.2.2 Western blot analízis

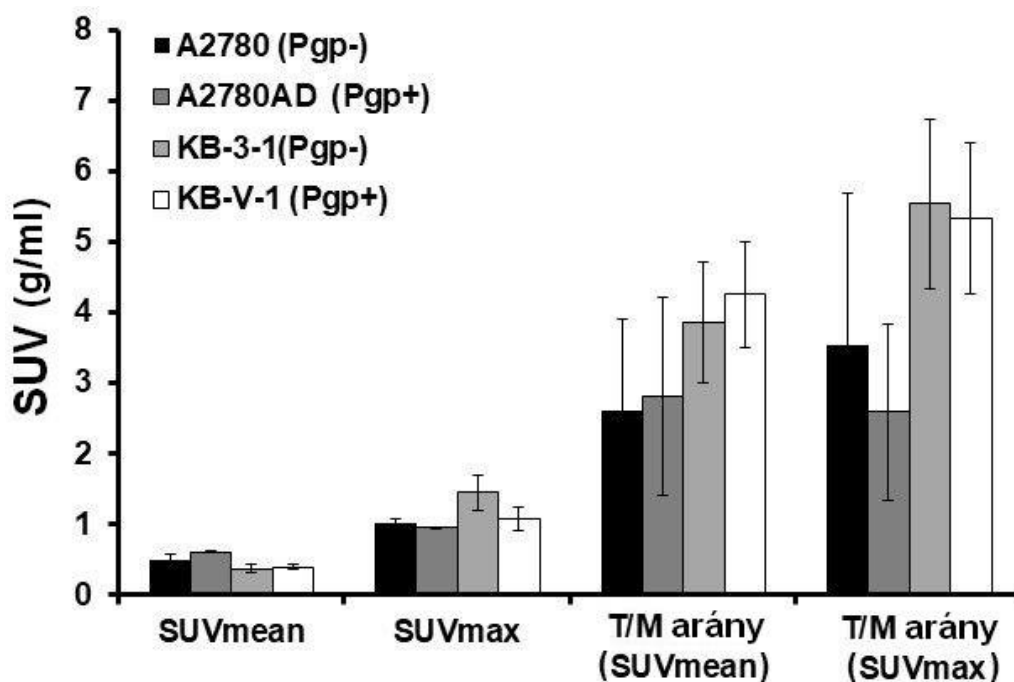
Az A2780 sejtek Western blot analízisének eredményei azt mutatták, hogy a hipoxia asszociált HIF-1 α szintje a CoCl₂-vel kezelt sejtekben jelentősen megnövekedett a kezeletlen sejtekhez képest, különösen a 24 órán át inkubált sejtek esetében (**13. ábra B panel**). Hasonlóképpen az [^{18}F]FDG transzportjáért felelős GLUT1 transzporter mennyisége, valamint annak foszforilációját biztosító HK2 enzim szintje is emelkedettebb volt a kezelt sejtekben, kiváltképp a 24 órás kezelést követően (**13. ábra B panel**).

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

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

5.2.2.1 Statikus pozitronemissziós tomográfia (PET) vizsgálatok [^{18}F]FAZA radiofarmakkal

A tumorindukciót követően körülbelül 20 nappal (20 ± 5 nap), $400 \pm 80 \text{ mm}^3$ -es átlagos tumortérfogat mellett, [^{18}F]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: $0,39 \pm 0,03$) (**14. ábra**). A T/M arányokat tekintve az [^{18}F]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: $4,25 \pm 0,75$) (**14. ábra**).



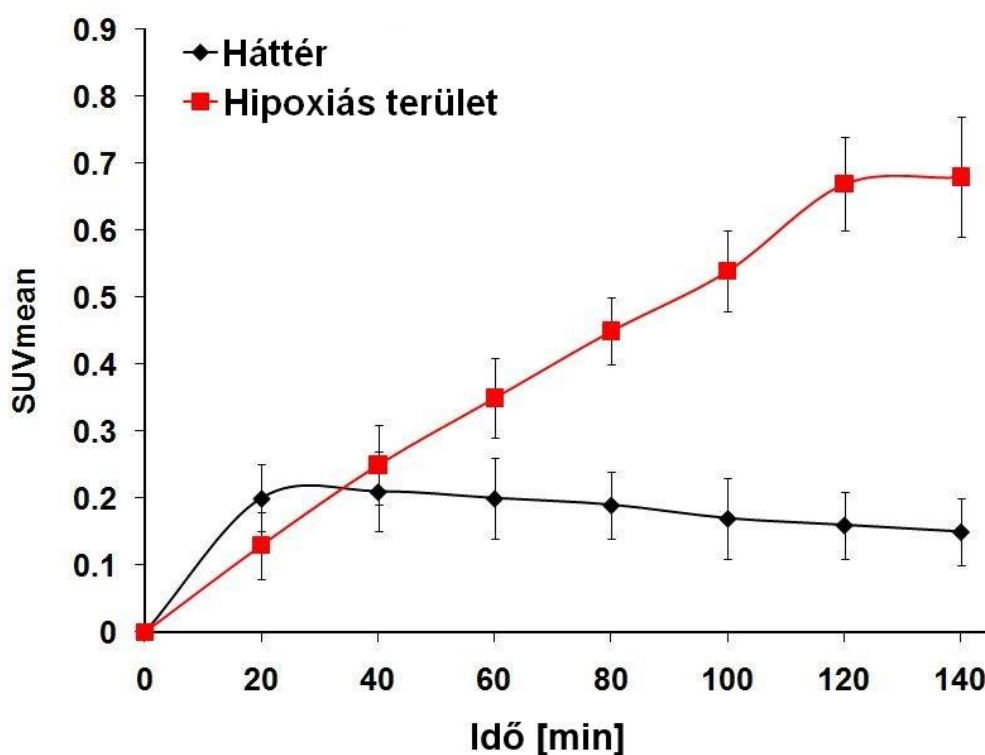
14. ábra *In vivo* [^{18}F]FAZA-felvétel kvantitatív értékelése a vizsgált Pgp+ és Pgp- tumor xenograftokban

A tumorok [^{18}F]FAZA akkumulációja SUV (SUVmean és SUVmax) értékekben kerül feltüntetésre, valamint megadjuk a T/M arányokat is (átlagos és maximális értékek). [^{18}F]FAZA: [^{18}F]F-fluoroazomycin-arabinozid; Pgp: P-glikoprotein; Pgp- A2780: Pgp- humán ováriumtumor; Pgp+ A2780AD: Pgp+ humán ováriumtumor; Pgp- KB-3-1: Pgp- humán cervixtumor; Pgp+ KB-V-1: Pgp+ humán cervixtumor; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték; T/M: tumor-to-muscle ratio/tumor-izom arány.

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

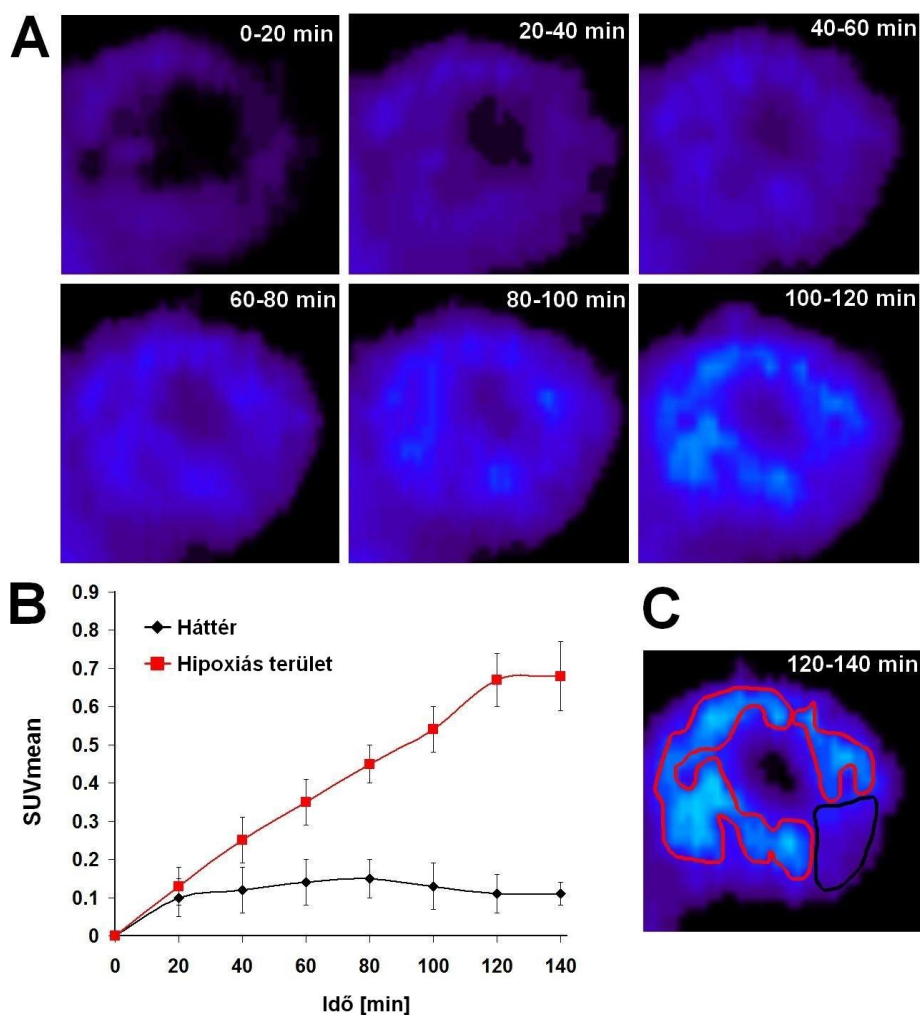
A statikus leképezés mellett az [^{18}F]FAZA-felvétel időbeli kinetikájának vizsgálata céljából dinamikus PET felvételeket is készítettünk az egerekről (15. ábra és 16. ábra B Panel). Az idő-aktivitás görbe elemzése azt mutatta, hogy a hipoxiás tumorrégiók SUVmean értékei a 120. percig folyamatos, exponenciális 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

trészerkoncentráció 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 ($6,2 \pm 0,1$). A **16. ábrán** egy Pgp- KB-3-1 xenograft modellről készült reprezentatív dinamikus PET képsorozaton is szemléltetjük a nyomjelző biodisztribúciójának dinamikáját (**16. ábra A és C panel**). A dinamikus vizsgálat során a felvételeket 20 perces időablakokban összegezve ábrázoltuk, a radiofarmakon beadásától (0. perc) a mérés végéig (140. perc).



15. ábra [^{18}F]FAZA-felvétel kinetikája

Az idő-aktivitás görbe az [^{18}F]FAZA-felvétel időbeli alakulását szemlélteti a hipoxiás tumorrégiókban és a nem hipoxiás háttérszövetben. [^{18}F]FAZA: [^{18}F]F-fluoroazomycin-arabinozid; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.

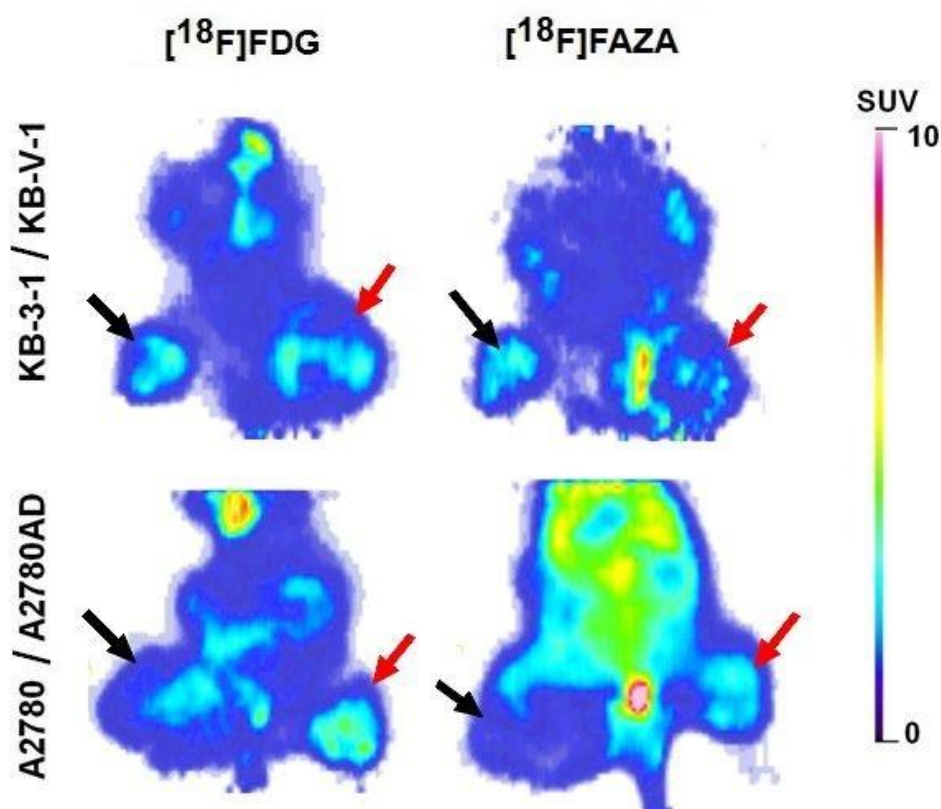


16. ábra [^{18}F]FAZA-felvétel kinetikája hipoxiás tumorrégióban és nem hipoxiás területen
A és C panelek: reprezentatív, bomlás-korrigált [^{18}F]FAZA PET felvételek Pgp- KB-3-1 xenografról az injektálástól (0. perc) a dinamikus felvétel végpontjáig (140. perc), 20 perces időintervallumokban ábrázolva. B panel: [^{18}F]FAZA-felvétel időbeli kinetikája a hipoxiás (piros vonal) tumorterületen és a nem hipoxiás (fekete vonal) régióban. *Pgp- KB-3-1*: *Pgp-humán cervixtumor*; *SUV*: *standardized uptake value/standard felvételi érték*.

5.2.2.3 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 (**17. ábra**). 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 glükózanalog 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.

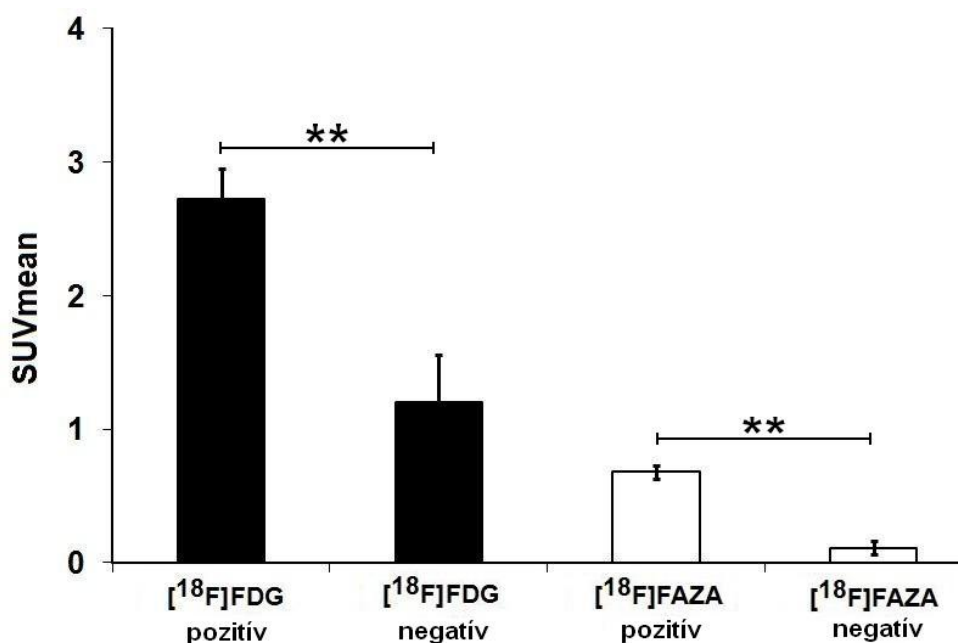


17. ábra [^{18}F]FDG és [^{18}F]FAZA PET vizsgálatok KB-3-1, KB-V-1, A2780 és A2780AD tumorhordozó SCID egerekről

Reprezentatív, bomlás-korrigált koronális [^{18}F]FDG (első oszlop) és [^{18}F]FAZA (második oszlop) PET felvételek KB-3-1/KB-V-1 (felső sor) és A2780/A2780AD (alsó sor) xenograftokról. A fekete nyilak a Pgp-, a piros nyilak a Pgp+ tumorokat jelölik. [^{18}F]FDG: [^{18}F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz; [^{18}F]FAZA: [^{18}F]F-fluoroazomycin-arabinozid; PET:

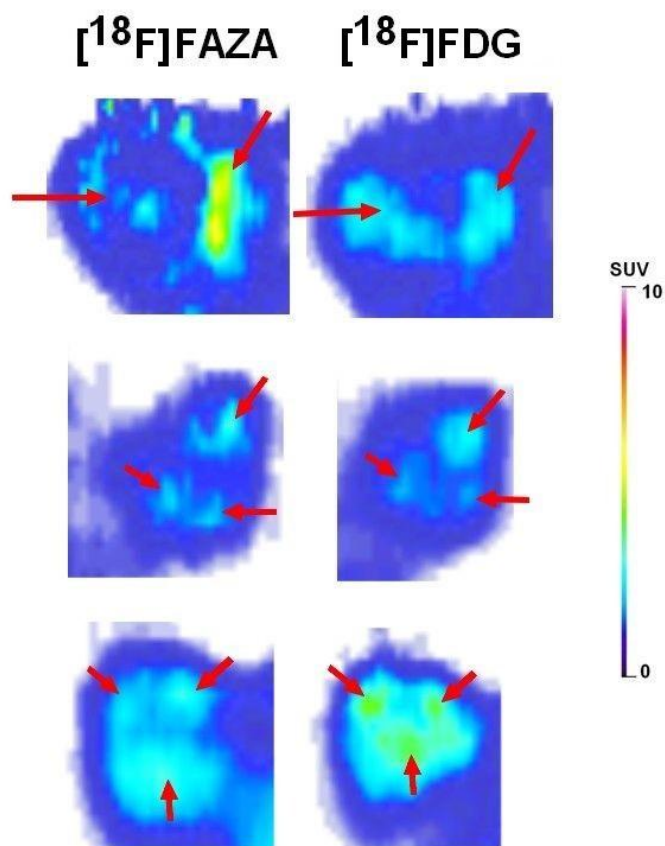
pozitronemissziós tomográfia; Pgp: P-glikoprotein; Pgp- A2780: Pgp- humán ováriumtumor; Pgp+ A2780AD: Pgp+ humán ováriumtumor; Pgp- KB-3-1: Pgp- humán cervixtumor; Pgp+ KB-V-1: Pgp+ humán cervixtumor; SCID: severe combined immunodeficient/súlyos kombinált immunhiányos; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.

Az [^{18}F]FDG valamennyi vizsgált tumorxenograftban kifejezetten heterogén eloszlást mutatott, ami a daganaton belüli egyes régiók igen magas glükózmétabolizmusára 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: $0,11 \pm 0,05$) (18. ábra). Megfigyeltük továbbá, hogy az intenzív [^{18}F]FDG-felvételt mutató intratumorális területek átfedést mutattak a hipoxiás, [^{18}F]FAZA halmozó tumorrégiókkal (19. ábra).



18. ábra Az intratumorális [^{18}F]FDG- és [^{18}F]FAZA radiofarmakon-felvétel kvantitatív értékelése

$[^{18}\text{F}]\text{FDG}/[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ -pozitív (+), illetve negatív (-) intratumorális régiók átlagos SUVmean értékei. $**p \leq 0,01$. *SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.*



19. ábra Hipoxiás tumorterületek $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ és $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET felvételei

Reprezentatív, bomlás-korrigált, koronális PET képek szemléltetik az $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ (első oszlop) és az $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (második oszlop) radiofarmakonok hipoxiás tumorokban mutatott felvételi mintázatát. A piros nyilak a két radiofarmakon felvételének térbeli átfedéseit jelölik. *PET: pozitronemissziós tomográfia; SUV: standardized uptake value/standard felvételi érték.*

6 Megbeszélés

Figyelembe véve a PGE2 és az EP receptorok tumor-asszociált angiogenezisben betöltött központi szerepét, feltételeztük, hogy ezen faktorokat célzó molekuláris vektorok értékes eszközök lehetnek az emlőrák *in vivo* molekuláris képalkotásában. A radiojelzett ciklodextrinekkal végzett, PGE2 túltermelő tumorok azonosítására irányuló korábbi, ígéretes preklinikai kísérleti eredmények (Csige és mtsai., 2022; Trencsényi és mtsai., 2020) arra inspirálták kutatócsoportunkat, hogy jelen kísérletünkben teszteljük a radioaktívan jelölt ciklodextrin nyomjelzők alkalmazhatóságát emlőtumorok diagnosztikájában. Ennélfogva kutatásunk első részében különböző, ^{68}Ga izotóppal jelölt ciklodextrin-származékok (HP β CD és RAMEB) diagnosztikai hatékonyságát értékeltük és hasonlítottuk össze különböző receptorstátuszú experimentális emlőtumor-modellekben (MDA-MB-HER2+ és 4T1) *in vivo* PET technika és *ex vivo*, boncolásos szervi eloszlásos vizsgálatok segítségével. További céljaink között szerepelt a tumorok PGE2 termelése és a ciklodextrin alapú radiofarmakonok felvétele közötti összefüggések vizsgálata is.

A radiojelölt ciklodextrinekkal végzett *in vivo* vizsgálati eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mind a szubkután transzplantált tripla-negatív 4T1, mind pedig a receptorpozitív MDA-MB-HER2+ tumorok jól ábrázolódtak a PET felvételeken, ami igazolja, hogy a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD radiofarmakonok ígéretes PET diagnosztikai ágensek lehetnek az emlőrákok *in vivo* detektálásában. Legjobb ismereteink alapján ez az első tanulmány, amely a ciklodextrin alapú PET próbák emlődiagnosztikai alkalmazhatóságáról számol be. Eredményeinkkel egyetértésben számos korábbi preklinikai munkában is beszámoltak a radiojelzett ciklodextrin-származékok onkodiagnosztikai hasznosíthatóságáról (Csige és mtsai., 2022; Képes és mtsai., 2024; Szabó és mtsai., 2023; Trencsényi és mtsai., 2020). Ezekben a kutatásokban a RAMEB és a HP β CD molekulák különböző izotópokkal jelölt változatait (^{68}Ga , ^{213}Bi , ^{52}Mn) sikerrel alkalmazták eltérő daganattípusok, például fibroszarkóma, B-sejtes limfóma, malignus melanóma, hasnyálmirigy-adenokarcinóma vagy mezoblasztos nefróma PET technikával történő detektálására (Csige és mtsai., 2022; Képes és mtsai., 2024; Szabó és mtsai., 2023; Trencsényi és mtsai., 2020).

A ciklodextrinek PGE2-vel történő kiváló komplexképző képessége alapján (Sauer és mtsai., 2017; Szabó és mtsai., 2023) a detektált tumorfelvételek a vizsgált emlőtumor xenograftok PGE2 pozitivitását tükrözhetik, mely összhangban áll korábbi, 4T1 sejtvonalakon kapott eredményekkel (Mitsuhashi és mtsai., 2004). Ámbár az alkalmazott tumorok pontos

PGE2 expressziós mintázata még nem teljeskörűen feltárt; adataink arra utalnak, hogy a tumorokban regisztrált radioaktivitás összefüggést mutathat a tumoros mikrokörnyezetben mérhető PGE2 koncentrációval, valamint a daganatok EP receptor expressziójával. Ezen hipotézisünk összhangban áll Szabó és munkatársainak (2023) megfigyeléseivel, akik közvetlen kapcsolatot írtak le a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB/[^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD-felvétel és az immunhisztokémiai módszerrel meghatározott PGE2 szintek között több preklinikai tumormodellben, többek között B16F10 melanóma, A20 limfóma és BxPC-3 pankréasz adenokarcinóma-modellekben (Szabó és mtsai., 2023).

Az *in vivo* PET képalkotás eredményei alapján tehát mindkét emlőtumor jól ábrázolódott mindkét ciklodextrin alapú nyomjelzővel, azonban a két emlőtumor radiofarmakon-felvételei között jelentős különbségek mutatkoztak. Ez a megfigyelés a 4T1 és az MDA-MB-HER2+ elváltozások különböző EP receptorprofiljával, illetve a tumorokon belüli és a tumorok környezetében mérhető eltérő PGE2 szintekkel magyarázható. Különbségeket találtunk továbbá egy adott tumortípuson belül a két ciklodextrin-származék akkumulációja között is. Ugyan a RAMEB és a HP β CD tumorkoncentrációja szoros összefüggésben állhat a PGE2 és receptorainak jelenlétével, a ciklodextrin vegyületek eltérő intratumorális felvételi értékei mögött számos más tényező is felmerül. Ebben a vonatkozásban feltételezzük, hogy a RAMEB és a HP β CD molekulák célmolekulához való affinitásában mutatkozó különbségek, valamint az esetleges nem specifikus, off-target aktivitások magyarázatot adhatnak a PET szondák daganattípuson belül megfigyelt halmozási különbözőségeire. Továbbá a két ciklodextrin eltérő farmakokinetikai tulajdonságai, illetve az ehhez köthető különböző kimosódási (wash-out) dinamikák szintén hozzájárulhatnak a radiofarmakonok egyazon tumoron belül megfigyelt felvételi mintázatai között tapasztalt különbségekhez.

A radiofarmakon-felvételi különbözőségek ellenére mindkét trésszer esetében az idő előrehaladtával folyamatosan növekvő tumorakkumuláció volt kimutatható. Feltételezésünk szerint a fokozott angiogenezis, valamint a proangiogén faktorok (PGE2 és receptorai) emelkedett szintje együttesen eredményezheti ezt a felvételi tendenciát, ami valószínűsíthetően súlyosabb malignitásra és nagyobb metasztázisképző hajlamra utalhat. Hozzá kell tenni azonban, hogy ezen hipotézis teljeskörű igazolásához részletes immunhisztokémiai és Western blot vizsgálatok szükségesek. Továbbá szükséges megemlíteni, hogy a két tumortípus trésszerfelvételeinek közvetlen összehasonlítását az eltérő időpontokban végzett képalkotás is korlátozza (4T1: a tumorsejtek injektálását követő 10., 15. és 20. napokon vs. MDA-MB-HER2+: 35., 50. és 65. napokon).

Az emlőtumorokkal végzett kutatásunk második részében vizsgáltuk a tumornövekedés kinetikáját, illetve azt, hogy van-e különbség a nyomjelzők felvételének mértéke között a különböző méretű - kis, közepes és nagy - emlőtumorokban. Megfigyeléseink alapján megállapíthatjuk, hogy mind a gyorsan növekvő 4T1, mind pedig a lassabb ütemben proliferáló MDA-MB tumorok kimutatható mértékű radioaktivitást halmoztak fel minden mérési időpontban mindkét nyomjelzővel. Mindezeket figyelembe véve arra a következtetésre jutottunk, hogy függetlenül a tumornövekedési potenciáltól, a ^{68}Ga -jelölt RAMEB és a HP β CD is kitűnően alkalmas a malignus emlőtumorok molekuláris diagnosztikájára. Ez a megállapítás összhangban áll a fentebb részletezett *in vivo* eredményeinkkel is.

Annak ellenére, hogy mindkét alkalmazott radiofarmakonnal mindkét daganattípus sikerrel azonosítható volt, a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD diagnosztikai teljesítménye számottevő eltéréseket mutatott a tumor típusától és méretétől függően, mely jelentős klinikai relevanciával bírhat. A PET adatok elemzésekor azt tapasztaltuk, hogy a HP β CD származék - tumormérettől függetlenül - jobb teljesítményt mutatott a HER2+ elváltozások detektálásában. Ezzel ellentétben azonban, a RAMEB származék tumortargetáló képességét nagymértékben befolyásolta a tumor mérete. E szerint a RAMEB molekula a kis és közepes méretű 4T1 elváltozások, illetve a nagy méretű MDA-MB-HER2+ tumorok kimutatásában bizonyult eredményesebbnek. A két nyomjelző között tapasztalt méretfüggő tumorhalmozási különbségek ellenére, a nagy tumorok esetében mindkét nyomjelző az MDA-MB tumorokat vizualizálta jobban a 4T1 tumorokhoz képest. Ennek háttérében azt feltételezzük, hogy a receptorpozitív MDA-MB tumorokhoz képest a tripla-negatív emlőtumorok agresszívebb természete korábbi tumor dedifferenciációhoz és következményes csökkent angiogén aktivitáshoz vezet, ami végül alacsonyabb PGE2/EP receptorszintet és ciklodextrinfelvételt eredményez. Továbbá érdemes megemlíteni, hogy a tumorok leképezési ideje közötti különbségek, a hipoxia vagy a krónikus gyulladás jelenléte szintén befolyásolhatja az egyes tumorok aktivitását.

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy a PGE2 és az EP receptorok szelektív célzása révén a radioaktívan jelölt ciklodextrinek új, kimagasló specificitással rendelkező alternatívát jelenthetnek az onkonukleáris képalkotás gold-standardjának számító [^{18}F]FDG-vel szemben. A ciklodextrin alapú PET ágensek alkalmazásával lehetőség nyílik az [^{18}F]FDG bizonyos korlátainak - például bizonyos emlőtumor altípusok esetében (lobuláris vagy alacsony grádusú elváltozások) észlelhető alacsony specificitás vagy csökkent szenzitivitás - a kiküszöbölésére. Ezen felül, figyelembe véve a PGE2/EP receptorok nőgyógyászati malignus megbetegedésekben betöltött prognosztikai relevanciáját, ezek a nyomjelzők fontos

prognosztikai információkkal is szolgálhatnak (Dietlmeier és mtsai., 2020; Semmlinger és mtsai., 2018). Továbbá, a ciklodextrin alapú PET vektorok különösen értékesek lehetnek alacsony vagy heterogén [^{18}F]FDG-felvételt mutató daganatokban, valamint olyan klinikai kontextusban, ahol az angiogenezis a tumorprogresszió fő mozgatórugója. Összességében tehát, a radiojelzett ciklodextrinek szélesítik az emlőrák molekuláris képalkotásában jelenleg rendelkezésre álló diagnosztikai ágensek spektrumát. Ezen kívül, a ciklodextrinek terápiás izotópokkal való radiojelzésének lehetősége biztosítja a vegyületek teranosztikumként történő felhasználását is, ami a pontos diagnosztika mellett célzott onkológiai kezelést is lehetővé tesz.

Vizsgálatunk második részében célunk volt annak értékelése, hogy az [^{18}F]FAZA PET és az [^{18}F]FDG PET kombinált használata képes-e az [^{18}F]FDG önmagában történő alkalmazásából eredő nem specifikusság csökkentésére a tumorhipoxia kimutatásának vonatkozásában. Ennek érdekében multidrog-rezisztens (Pgp+) és multidrog-szenzitív (Pgp-) humán ovárium- és cervixkarcinóma xenograftokat hordozó SCID egérmodellekről (petefészek: A2780 Pgp- és A2780AD Pgp+; méhnyak: KB-3-1 Pgp- és KB-V-1 Pgp+) [^{18}F]FDG PET és [^{18}F]FAZA PET felvételeket készítettünk, majd összehasonlítottuk a hipoxiás tumorok radiofarmakon-felvételi mintázatait. A vizsgálat sorozat keretén belül Western blot analízis és *in vitro* [^{18}F]FDG-felvételi mérések (KB-3-1 és A2780 sejtek) is történtek a hipoxia jelenlétének igazolására.

A Western blot eredmények alapján - melyek a HIF-1 α , a GLUT1 transzporter és a HK2 enzim fokozott expresszióját mutatták a CoCl₂-kezelt sejtekben - megállapíthatjuk, hogy a hipoxia indukció mindkét sejtvonalban sikeres volt. Ezen megállapítás összhangban van más kutatócsoportok eredményeivel (Busch és mtsai., 2010; Guo és mtsai., 2006; Vengellur és LaPres, 2004). Kísérletünkhöz hasonlóan, *Vengellur és LaPres*, *Busch és munkatársai*, valamint *Guo és munkatársai* szintén CoCl₂-t használtak hipoxia létrehozására különböző típusú sejtekben, például egér embrionális fibroblasztokban (Vengellur és LaPres, 2004), humán keratinocitákban (Busch és mtsai., 2010) és leukémiás sejtekben (Guo és mtsai., 2006). Eredményeinkkel egyetértésben, munkájuk során igazolták a HIF-1 α fokozott kifejeződését CoCl₂ alkalmazásával összefüggésben. A prolil-hidroxiláz enzim aktivitásának gátlásával a CoCl₂ stabilizálja a HIF-1 α -t, ami számos fehérje, többek között a GLUT1 glükóztranszporter és a HK2 enzim fokozott transzkripciójához vezet (Hayashi és mtsai., 2004; Mathupala és mtsai., 2001; Vengellur és LaPres, 2004). Bár ezzel összhangban mindkét CoCl₂-inkubált sejtvonal - függetlenül az inkubáció hosszától - fokozott mértékű GLUT1 és HK2 expressziót mutatott a kontrollsejtekhez képest, a különböző ideig (24 vagy 48 óra) inkubált sejtek fehérjeexpressziójának mértékében megfigyelt különbségek arra utalhatnak, hogy a GLUT1 és

a HK2 transzkripcióját a hipoxia jelenlétén kívül egyéb más tényezők is meghatározhatják. Ezen kívül valószínűsítjük, hogy a 48 órán keresztül CoCl_2 -kezelt KB-3-1 sejtekben észlelt alacsonyabb GLUT1 és magasabb HK2 szintek a 24 órán át inkubált KB-3-1 sejtekhez képest arra utalhatnak, hogy ebben a sejttypusban a glükózfelvétel nagy része 24 órán belül megtörténik, magyarázva a magasabb GLUT1 expressziót a 24 óráig kezelt sejtekben, míg a HK2 enzim mediálta glükózmétabolizmus javarészt 24 óra után következik be. Ezzel szemben az A2780 sejtek Western blot analízise azt mutatta, hogy a GLUT1 és a HK2 enzim kifejeződése is a 24 órás inkubációt követően volt a legmagasabb, ami azt jelezheti, hogy maga a sejttypus is befolyásolja a fehérjék transzkripcióját. Eredményeinkkel egyetértésben *Clavo és munkatársai* szintén fokozottabb GLUT1 expressziót tapasztaltak a hipoxiának (1,5% O_2) kitett petefészekdumorsejtekben a légköri oxigén (20% O_2) alatt lévő sejtekhez képest (*Clavo és mtsai.*, 1995). *Burgman és kollégái* azonban nem tapasztaltak hipoxia indukálta HIF-1 α /GLUT1/HK2 emelkedett kifejeződésre utaló jeleket MCF-7 emlőtumorsejtekben (*Burgman és mtsai.*, 2001), ami szintén alátámasztja hipotézisünket, miszerint e fehérjék expresszióját számos tényező együttesen határozhatja meg.

A sejtszintű [^{18}F]FDG-felvételi mérések vonatkozásában megállapítottuk, hogy mindkét CoCl_2 -vel inkubált, hipoxiás sejtvonal - a HIF-1 α jelenlétével összefüggésben - magasabb *in vitro* radiofarmakon-akkumulációt mutatott a kontroll, kezeletlen sejtekhez képest. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az [^{18}F]FDG-felvétel mérése sikeresen alkalmazható módszer a kémiai indukált hipoxia jelenlétének kimutatására.

A KB-3-1 sejtek esetében a Western blot analízisek eredményei összhangban voltak az *in vitro* radiofarmakon-felvételi vizsgálatok eredményeivel. Ezen sejtvonal esetében a CoCl_2 inkubáció után egy nappal megfigyelt legmagasabb HIF-1 α és GLUT1 expresszióknak megfelelően, a legmagasabb [^{18}F]FDG-felvételt szintén 24 óra után regisztráltuk, ami megerősíti a radiofarmakon-halmozás mértéke és az alacsony oxigenizáció közötti pozitív korrelációt. Az A2780 sejtvonal kapcsán a hasonló Western blot és radiofarmakon-felvételi mérési eredmények szintén alátámasztják az [^{18}F]FDG akkumuláció és a hipoxia közötti szoros összefüggést. Korábbi irodalmi adatok szintén az [^{18}F]FDG/ ^{3}H]FDG koncentrációjának emelkedéséről számoltak be alacsony oxigenizáltságú mikrokörnyezetben fej-nyaki laphámrák (UT-SCC-5 és UT-SCC-20) (*Minn és mtsai.*, 1996), valamint androgénfüggetlen (PC-3) és androgénérzékeny (LNCaP) prosztaták sejtvonalakban (*Hara és mtsai.*, 2006), mely egyetértésben van jelenlegi eredményeinkkel. Hasonlóképpen, *Pedersen és társszerzői* is megnövekedett [^{18}F]FDG koncentrációt tapasztaltak CPH B54 humán kissejtes tüdődumor (SCLC) sejtekben összhangban a megnövekedett GLUT1 transzporter szintekkel (*Pedersen és*

mtsai., 2001). Továbbá, humán daganatsejtek radiotrézser-halmozását különböző oxigénkoncentrációjú légköri körülmények között (0-20%) vizsgálva, *Clavo és munkatársai* szintén emelkedettebb [^{18}F]FDG-felvételt figyeltek meg HTB 77 IP3 petefészek- és HTB 63 melanóma tumorsejtekben anoxiás és hipoxiás (0%, 1,5%, 5% O_2) körülmények között összehasonlítva a normoxiás állapottal (20% O_2) (Clavo és mtsai., 1995). Mindezek alapján elmondható, hogy az [^{18}F]FDG radiofarmakon-felvételi mérési eredményeink igazolták a hipoxia jelenlétét mindkét vizsgált sejtvonalban.

A hipoxia vizsgálatsorozat második részében *in vivo* [^{18}F]FDG PET és [^{18}F]FAZA PET felvételeket készítettünk cervix- és ováriumtumor xenograftokról, annak vizsgálata céljából, hogy a duális PET képalkotás hordoz-e releváns többletinformációt a tumor-asszociált hipoxia vonatkozásában. A statikus [^{18}F]FAZA PET képek elemzése során valamennyi nőgyógyászati tumortípus esetében heterogén radiofarmakon-akkumulációt tapasztaltunk, mely a hipoxiás régiók tumoron belüli egyenlőtlen eloszlására utal. Ez a felvételi mintázat nagyrészt összefüggésben állhat a hipoxia kialakulásának dinamikus jellegével, a tumoros mikrokörnyezetben hipoxia hatására kialakuló változásokkal, adaptív metabolikus változásokkal illetőleg a tumorprogresszióval összefüggő eltérésekkel. Eredményeinkkel egyetértésben, korábbi megfigyelések HCT116 kolorektális tumor xenograftokban szintén inhomogén [^{18}F]FAZA-halmozásról tanúskodnak (Hammond és mtsai., 2014). Hasonlóképpen, [^{18}F]FAZA-t vagy az első generációs NI-származék [^{18}F]FMISO-t alkalmazó korábbi klinikai tanulmányokban is heterogén hipoxiamintázatot tapasztaltak előrehaladott stádiumú nem kissejtes tüdőtumороk (NSCLC) és fej-nyaki malignitások esetében (Bollineni és mtsai., 2013; Kerner és mtsai., 2016; Lee és mtsai., 2009).

A vizuális értékelést az [^{18}F]FAZA PET képek kvantitatív elemzése követte, mely során SUV és T/M értékek kerültek meghatározásra. A multidrog-rezisztens és multidrog-szenzitív elváltozások [^{18}F]FAZA-felvételeinek összehasonlítása során nem mutatkozott szignifikáns különbség azok SUVmean értékei között, ami arra utal, hogy a PgP jelenléte nem befolyásolta a tumorok nyomjelzőfelvételét a vizsgálati időszak alatt. Ezen feltevésünk megerősítéséhez ugyan hosszabb kísérleti időszakok szükségesek, feltételezzük, hogy az [^{18}F]FAZA hasonló diagnosztikai pontossággal bír terápiaszzenzitív és terápiarezisztens elváltozásokban egyaránt, mely klinikai szempontból lényeges megállapítás lehet. A tumorok háttérhez képest tapasztalt 2x-4x magasabb [^{18}F]FAZA akkumulációja magas kontrasztú PET képek készítését tette lehetővé, ami biztosítja a hipoxiás tumorrégiók pontos elkülönítését a normál, megfelelő oxigenizáltságú szövetektől. A tapasztalt jobb képminőség az [^{18}F]FAZA kedvező oldhatósági tulajdonságainak tulajdonítható, amelyek lehetővé teszik a fokozott tumorfelvételt és a vérből

történő gyors kiürülést, ezáltal jobb jel-zaj arányt biztosítva már a korai vizsgálati időpontokban is. Eredményeink összhangban állnak SCCVII laphámkarcinóma experimentális modellekben korábban meghatározott tumor-háttér arányokra vonatkozó preklinikai adatokkal (Busk és mtsai., 2009). Friss vizsgálati adatok alapján továbbá elmondhatjuk, hogy az [^{18}F]FAZA T/M arányai meghaladják más NI-származékok értékeit, például az [^{18}F]FMISO és az [^{124}I]IAZA esetében közöltek (Piert és mtsai., 2005; Reischl és mtsai., 2007).

A statikus leképezést követően az [^{18}F]FAZA-felvétel időbeli kinetikájának tanulmányozására dinamikus PET felvételeket is készítettünk. Az idő-aktivitás görbék elemzése során megállapítottuk, hogy a hipoxiás tumorterületek nyomjelzőfelvétele a 120. percre exponenciális növekedést mutatott, majd egyensúlyi fázis alakult ki. A megfigyeléseinkhez hasonlóan az [^{18}F]FAZA aktivitása spontán malignus daganatos kutyák hipoxiás tumor régióiban is körülbelül 120 perc elteltével érte el a platófázist (Choen és mtsai., 2023). Ezzel szemben a nem hipoxiás szövetekben a radiofarmakon-felvétel vizsgálatunk 30. percében érte el maximumát, majd ezt követően a trésszerű gyors kimosódását tapasztaltuk. Ennek hátterében az áll, hogy hipoxia hiányában a sejtek által felvett [^{18}F]FAZA reaktív (redukált) formája intracellulárisan reoxidálódik, ami a nyomjelző normoxiás sejtekből történő kimosódásához vezet (Foo és mtsai., 2004). Ezzel szemben Choen és munkatársai az [^{18}F]FAZA maximális háttérkoncentrációját később, a nyomjelző beadását követően 60 perccel regisztrálták (Choen és mtsai., 2023). Munkánkhoz hasonlóan, korábbi preklinikai kutatások során is a nyomjelző injektálása után 2 órával regisztrálták a legmagasabb T/M értékeket (Peeters és mtsai., 2015). Peeters és kollégái R1 rhabdomyosarkóma hordozó WAG/Rij patkányokkal végzett kísérletükben az [^{18}F]FAZA injektálását követő 2 órával mérték a maximális T/M arányt ($4,0 \pm 0,5$). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a hipoxiás és normoxiás területek [^{18}F]FAZA-val történő legjobb megkülönböztetésére a kétórás vizsgálati időpont lehet a legoptimálisabb.

Valamennyi tumor-xenografról az [^{18}F]FAZA PET képalkotást követően [^{18}F]FDG PET leképezés is történt. Az [^{18}F]FAZA-felvételhez hasonlóan inhomogén [^{18}F]FDG-felvételt tapasztaltunk a tumorokban. Figyelembe véve, hogy az [^{18}F]FDG-felvételt döntően meghatározó GLUT transzporterek kifejeződését a hipoxia-asszociált HIF-1 α regulálja (Bollineni és mtsai., 2013; Semenza, 2000), a tapasztalt heterogén [^{18}F]FDG radiofarmakon-felvételi mintázat szintén megerősíti a hipoxia egyenlőtlen eloszlását a vizsgált nőgyógyászati tumorokon belül. Továbbá, a magas [^{18}F]FDG-felvételű és az [^{18}F]FDG-felvétel nélküli/alacsony [^{18}F]FDG-felvételű tumor régiók SUVmean értékei között regisztrált jelentős különbségek eltérő tumoron belüli glikolitikus aktivitásra és glükózmetabolizmusra utalnak.

Eredményeinkhez hasonlóan, számos preklinikai modellben például LS174T (Dearling és mtsai., 2004) és HT29 kolorektális tumorokban (Li és mtsai., 2014), az MDA-MB-231 emlőtumorban (Li és mtsai., 2014), valamint az A549 (Li és mtsai., 2014; Wyss és mtsai., 2006), H520 és H596 NSCLC-ben (Wyss és mtsai., 2006), a Caki vesesejtes karcinómában (Wyss és mtsai., 2006) vagy az SK-N-BE neuroblasztómában (Wyss és mtsai., 2006) szintén a megnövekedett [^{18}F]FDG-felvétel és a hipoxia szoros korrelációját igazolták.

Az [^{18}F]FDG intratumorális eloszlásával összhangban a tumorokon belüli [^{18}F]FAZA-felvétel is egyenlőtlen volt, mely megfigyelés még inkább megerősíti a hipoxia heterogén eloszlását a jelenleg vizsgált tumorokban. Ámbár mindkét radiofarmakon esetében szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a trésszer-avid és a nem halmozó tumorrégiók SUVmean értékei között, az intratumorális radiofarmakon-felvételi különbségek sokkal nagyobbak bizonyultak az [^{18}F]FAZA esetében, ami a hipoxia detektálásában mutatott nagyobb specificitására utal a radiojelzett glükózanalóghoz képest. Az [^{18}F]FAZA magasabb specificitását továbbá az is alátámasztja, hogy kizárólag hipoxiás körülmények között akkumulálódik a sejtekben, míg az [^{18}F]FDG-felvétele a hipoxia következtében fokozott metabolizmusú malignus szövetekben és bizonyos jóindulatú folyamatokban, például gyulladásban vagy fertőzésben is egyaránt emelkedett.

Lényeges azonban megjegyezni, hogy az [^{18}F]FDG nem specifikus jellege miatt a magas radioaktivitású tumorterületek halmozásának hátterében a hipoxia mellett tumor-asszociált gyulladásos folyamatok is állhatnak. Továbbá, a normoxiás sejtekben kifejeződő HIF-1 α szintén hozzájárulhat a nem specifikus [^{18}F]FDG-felvételhez (Brown és Wilson, 2004; Talks és mtsai., 2004). Mindezek mellett érdemes megemlíteni, hogy a rendelkezésre álló irodalmi eredmények ellentmondásosak az [^{18}F]FDG-halmozás és a hipoxia közötti összefüggés vonatkozásában (Mees és mtsai., 2009). Egyes tanulmányok például megkérdőjelezték a nyomjelző hipoxia detektálásában való alkalmazhatóságát (Christian és mtsai., 2010; Lopci és mtsai., 2014). Mindezeket értékelve és figyelembe véve a részletezett ígéretes [^{18}F]FAZA PET eredményeket, feltételezzük, hogy a NI-származékkal végzett PET leképezés potenciális kiegészítője lehet az [^{18}F]FDG PET képalkotásnak.

A statikus PET leképezéseket követően összehasonlítottuk a két nyomjelzővel készült felvételeket annak vizsgálata érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az [^{18}F]FDG PET képalkotás [^{18}F]FAZA PET-tel történő kiegészítése képes-e az [^{18}F]FDG PET leképezésből adódó lehetséges álpozitív eredmények kiküszöbölésére. Továbbá, az [^{18}F]FDG avid tumorrégiókban fennálló hipoxia igazolására elemeztük az [^{18}F]FDG és az [^{18}F]FAZA PET képek közötti térbeli átfedéseket. A PET képek között megfigyelt térbeli korreláció

megegerősítette a hipoxiás területek jelenlétét az [^{18}F]FDG-pozitív, azaz metabolikusan aktív tumorregiókon belül. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a hipoxia legnagyobb valószínűséggel a fokozott metabolikus aktivitású tumorterületeken fordul elő függetlenül az egyébként heterogén intratumorális jelenlététől. Mivel a magas [^{18}F]FDG-felvételű tumorregiók nagyobb valószínűséggel mutattak [^{18}F]FAZA-pozitivitást, és az [^{18}F]FDG halmozás pozitívan korrelált a hipoxia jelenlétével, feltételezzük, hogy az [^{18}F]FDG-felvétel mértéke és a léziók SUV értékei alapján előrejelezhető, hogy a megnövekedett glükózanyagcsere hátterében az alacsony oxigénellátottság vagy más, nem specifikus folyamatok állnak. Meg kell említeni továbbá, hogy a két radiofarmakon felvételi mintázatai közötti részleges átfedés azt sugallja, hogy a tumorhipoxia és a glükózmetabolizmus nem feltétlenül állnak mindig egymással összefüggésben. Ezzel összhangban, *Bollineni és kollégái* által végzett klinikai vizsgálatban szintén eltéréseket tapasztaltak az [^{18}F]FDG és az [^{18}F]FAZA biodisztribúciója között agresszív NSCLC tumorokban (Bollineni és mtsai., 2013). Ezen kívül, korábbi humán NSCLC PET tanulmányokban egyaránt különbségeket mutattak ki a radiojelzett glükózanalóg és a hipoxiaspecifikus [^{18}F]FMISO NI-származék akkumulációja között, mely ugyancsak egyetértésben van megállapításainkkal (Cherk és mtsai., 2006; Gagel és mtsai., 2006). Ezekkel szemben, *Wyss és kollégái* különböző humán tumorokat hordozó nude egerekkel végzett vizsgálatukban (U87 glioblasztóma, PC-3 és DU-145 prosztatatumor, CLS-2 húgyhólyag tumor) azonos [^{18}F]FDG- és [^{18}F]FMISO-felvételi mintázatról számoltak be (Wyss és mtsai., 2006). Hasonlóan, R3327-AT anaplasztikus prosztatatumor- és FaDu laphámsejtes karcinóma-modellekkel végzett preklinikai kutatásban az [^{18}F]FDG PET és az [^{18}F]FMISO PET felvételek lényegében azonosnak tekinthető radiofarmakon-felvételi eloszlást mutattak (Zanzonico és mtsai., 2006).

Jóllehet az [^{18}F]FDG- és [^{18}F]FMISO trésszerhalmozások között tapasztalt eltérések hátterében álló pontos molekuláris mechanizmus nem teljesen tisztázott, a tény, hogy az [^{18}F]FDG-felvételt több különböző tényező is befolyásolja - többek között a mikrokeringés, a HIF-1 α expresszió, a glükózmetabolizmusban szerepet játszó enzimek és transzporterek, a tumorsejt - tumortérfogat arány vagy a proliferáció mértéke - adhat némi magyarázatot a megfigyelt különbségekre (Bos és mtsai., 2002).

7 Összefoglalás

A nőgyógyászati malignus megbetegedések incidencia- és prevalencianövekedése egyre sürgetőbb egészségügyi kihívást jelent, ami a preklinikai kutatásokat innovatív diagnosztikai és terápiás megközelítések irányába tereli. A tumor-asszociált érújdonképződés és hipoxia központi szerepet töltenek be a malignus daganatok fennmaradásában, progressziójában, valamint az áttétképződés folyamatában. Következésképp a PGE2 molekulához nagy affinitással kötődő, pozitronsugárzó izotóppal jelölt ciklodextrin-származékok és a szöveti oxigénhiányt szelektíven kimutató nyomjelzők ígéretes diagnosztikai ágensek lehetnek a nőgyógyászati tumorok PET leképezéssel történő kimutatásában.

Kutatásunk első részében PGE2-t célzó, ^{68}Ga -jelölt ciklodextrin-származékokat (^{68}Ga]-Ga-NODAGA-HP β CD és ^{68}Ga]-Ga-DOTAGA-RAMEB) szintetizáltunk, melyek emlőtumorkok *in vivo* diagnosztikájára való alkalmazhatóságát különböző receptorstátuszú emlőtumor xenograftokon értékeltük preklinikai PET modalitással és *ex vivo* körülmények között boncolásos szervi eloszlásos vizsgálatok végzésével. A PET felvételek vizuális elemzésével összhangban a kvantitatív analízis alapján is igazoltuk, hogy a szubkután növekvő receptorpozitív MDA-MB-HER2+ és a tripla-negatív T41 tumorok is mindkét ciklodextrin alapú radiofarmakkal egyértelműen azonosíthatóak valamennyi mérési időpontban, ami a vizsgált tumorok PGE2 pozitivitására utalhat. A tumorok idővel emelkedő ^{68}Ga]-Ga-NODAGA-HP β CD- és ^{68}Ga]-Ga-DOTAGA-RAMEB-felvételének igazolásával feltételezzük az angiogén aktivitás fokozódását, és ezáltal az elváltozások növekvő agresszivitását és metasztatikus potenciálját. A tumor-asszociált angiogenezis COX2/PGE2/EP receptor mediált molekuláris útvonal mentén történő *in vivo* tanulmányozása során tehát megállapítottuk, hogy a vizsgált radiojelzett ciklodextrin molekulák alkalmas diagnosztikai ágensek az emlőtumorkok *in vivo* detektálására, különös tekintettel az agresszív növekedési dinamikájú receptornegatív típusra. Továbbá, a ciklodextrinek terápiás hatású sugárzást kibocsátó radionuklidokkal történő jelzése akár célzott radiokezelési lehetőséget is jelenthet, ami a ciklodextrinek teranosztikai alkalmazhatóságát sugallhatja.

További vizsgálatainkban a hipoxiaspecifikus ^{18}F]-FAZA PET ^{18}F]-FDG PET képalkotással kombinált alkalmazásának hozzáadott értékét vizsgáltuk eltérő típusú és biológiai viselkedésű ovárium- és cervixtumor-modelleken PET technikával. Az intratumorális radiofarmakon-felvételi mintázatok összehasonlításával igazoltuk az ^{18}F]-FAZA fokozott specificitását és ezáltal magasabb diagnosztikai teljesítményét a hipoxia kimutatásának vonatkozásában, ami az ^{18}F]-FDG PET ^{18}F]-FAZA PET-tel való kiegészítésének klinikai

megalapozottságára utal. Az alacsony oxigenizáltságú tumorterületek pontos azonosítása a tumorok hipoxiaprofiljának megismerésén keresztül elősegíti az optimális, daganattípushoz igazított terápiás döntéshozatalt.

Összességében, a radioaktív HP β CD és RAMEB, valamint az [^{18}F]FAZA PET-tel kiegészített [^{18}F]FDG PET vizsgálat mindennapi nőgyógyászati onkológiai betegellátásba történő bevezetése a diagnosztikai pontosság növelése mellett jelentős terápiás vonatkozással is bír, ugyanis a célzott, PET-alapú kezelési stratégiák alkalmazása hozzájárulhat a személyre szabott onkoterápia alapjainak a megteremtéséhez.

8 Summary

The increasing incidence and prevalence of gynaecological malignancies poses an increasingly urgent public health challenge, that directs preclinical research towards innovative diagnostic and therapeutic approaches. Tumor-associated angiogenesis and hypoxia play a central role in the survival, progression, and metastatic spread of malignant tumors. Therefore, PGE2-affine cyclodextrin derivatives labelled with positron-emitting isotopes and radiopharmaceuticals capable to selectively detect tissue hypoxia could be promising diagnostic agents for the detection of gynaecological tumors using PET imaging.

In the first part of our research, we synthesized ^{68}Ga -labelled cyclodextrin derivatives targeting PGE2 (^{68}Ga]-Ga-NODAGA-HP β CD and ^{68}Ga]-Ga-DOTAGA-RAMEB) and evaluated their applicability for the *in vivo* diagnostics of breast cancer on experimental breast tumor models with different receptor status applying preclinical PET and *ex vivo* biodistribution studies. In correlation with the visual assessment of the PET images, quantitative PET analysis also strengthened that both subcutaneously growing receptor positive MDA-MB-HER2+ and triple negative T41 tumors can be clearly visualized with both cyclodextrin-based radiopharmaceuticals at all measurement time points, which may indicate the PGE2 positivity of the investigated tumors. By confirming the increasing accumulation of ^{68}Ga]-Ga-NODAGA-HP β CD and ^{68}Ga]-Ga-DOTAGA-RAMEB in both tumors over time, we hypothesize the enhancement of angiogenic activity, thereby the increasing aggressiveness and metastatic potential of the lesions. Therefore, during the *in vivo* study of tumor-associated angiogenesis along the COX2/PGE2/EP receptor-mediated molecular pathway, we concluded that the examined radiolabelled cyclodextrin molecules are promising diagnostic agents for the *in vivo* detection of breast cancer, especially with regard to the receptor negative type characterised by aggressive growing potential. Furthermore, radiolabelling cyclodextrins with therapeutic isotopes may even represent a targeted radiotherapeutical approach, which may suggest the theranostic applicability of cyclodextrins.

In the next part of our studies, we investigated the added value of combining hypoxia-specific ^{18}F]-FAZA PET with ^{18}F]-FDG PET imaging in different types of ovarian and cervical tumor xenografts with distinct biological behaviour using PET modality. By comparing the intratumoral radiopharmaceutical uptake patterns, we verified the increased specificity and thus the higher diagnostic performance of ^{18}F]-FAZA in hypoxia detection, which indicates the clinical validity of supplementing ^{18}F]-FDG PET with ^{18}F]-FAZA PET. Accurate identification

of low oxygenated tumor regions - via understanding the hypoxia profile of the tumors - contributes to optimal therapeutic decision-making adjusted to the tumor type.

Overall, the introduction of radioactive HP β CD and RAMEB, as well as [^{18}F]FDG PET combined with [^{18}F]FAZA PET into everyday gynaecological oncology care not only increases diagnostic accuracy, but also has significant therapeutic implications, as the use of targeted, PET-based treatment strategies may contribute to the establishment of the basis of personalized oncotherapy.

9 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.

10 Irodalomjegyzék

10.1 Hivatkozott közlemények jegyzéke

Akkın S, Varan G, Aksüt D, Malanga M, Ercan A, Şen M, Bilensoy E. A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with 5-FU. *Int J Pharm.* 2022; 623:121940. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121940.

Bajou K, Noël A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D, Foidart JM. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med.* 1998; 4(8):923–928. doi: 10.1038/nm0898-923.

Belizário JE. Immunodeficient mouse models: an overview. *Open immunol J.* 2009; ;2(1):79–85.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(10):737–744. doi: 10.1038/35036374.

Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(4):215–228. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.005.

Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer.* 2004; 40(6):852–857. doi: 10.1016/j.ejca.2003.11.021.

Bollineni VR, Kerner GS, Pruim J, Steenbakkers RJ, Wiegman EM, Koole MJ, de Groot EH, Willemsen AT, Luurtsema G, Widder J, Groen HJ, Langendijk JA. PET imaging of tumor hypoxia using 18F-fluoroazomycin arabinoside in stage III-IV non-small cell lung cancer patients. *J Nucl Med.* 2013; 54(8):1175–1180. doi: 10.2967/jnumed.112.115014.

Bos R, van Der Hoeven JJ, van Der Wall E, van Der Groep P, van Diest PJ, Comans EF, Joshi U, Semenza GL, Hoekstra OS, Lammertsma AA, Molthoff CF. Biologic correlates of

(18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *J Clin Oncol*. 2002; 20(2):379–387. doi: 10.1200/JCO.2002.20.2.379.

Breeman WA, de Blois E, Sze Chan H, Konijnenberg M, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. (68)Ga-labeled DOTA-peptides and (68)Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. *Semin Nucl Med*. 2011; 41(4):314–321. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2011.02.001.

Brown JM, Wilson WR: Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(6):437–447. doi: 10.1038/nrc1367.

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*. 1992; 176(5):1375–1379. doi: 10.1084/jem.176.5.1375.

Burgman P, Odonoghue JA, Humm JL, Ling CC. Hypoxia-induced increase in FDG uptake in MCF7 cells. *J Nucl Med*. 2001; 42(1):170–175.

Busch W, Kühnel D, Schirmer K, Scholz S. Tungsten carbide cobalt nanoparticles exert hypoxia-like effects on the gene expression level in human keratinocytes. *BMC Genomics*. 2010; 11:65. doi: 10.1186/1471-2164-11-65.

Busk M, Horsman MR, Jakobsen S, Hansen KV, Bussink J, van der Kogel A, Overgaard J. Can hypoxia-PET map hypoxic cell density heterogeneity accurately in an animal tumor model at a clinically obtainable image contrast? *Radiother Oncol*. 2009; 92(3):429–936. doi: 10.1016/j.radonc.2009.08.026.

Busk M, Mortensen LS, Nordsmark M, Overgaard J, Jakobsen S, Hansen KV, Theil J, Kallehauge JF, D'Andrea FP, Steiniche T, Horsman MR. PET hypoxia imaging with FAZA: reproducibility at baseline and during fractionated radiotherapy in tumour-bearing mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013; 40(2):186–197. doi: 10.1007/s00259-012-2258-x.

Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(24):14389–14394. doi: 10.1073/pnas.95.24.14389.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473(7347):298–307. doi: 10.1038/nature10144.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9(6):653–660. doi: 10.1038/nm0603-653.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6(4):389–395. doi: 10.1038/74651.

Chen EP, Smyth EM. COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011; 96(1-4):14–20. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2011.08.005.

Chen H, Niu G, Wu H, Chen X. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin $\alpha v \beta 3$. *Theranostics*. 2016; 6(1):78–92. doi: 10.7150/thno.13242.

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

Cherk MH, Foo SS, Poon AM, Knight SR, Murone C, Papenfuss AT, Sachinidis JI, Saunderson TH, O'Keefe GJ, Scott AM. Lack of correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in non-small cell lung cancer assessed by 18F-Fluoromisonidazole and 18F-FDG PET. *J Nucl Med*. 2006; 47(12):1921–1926.

Choen S, Kent MS, Chaudhari AJ, Cherry SR, Krtolica A, Zwingenberger AL. Kinetic Evaluation of the Hypoxia Radiotracers [^{18}F]FMISO and [^{18}F]FAZA in Dogs with Spontaneous Tumors Using Dynamic PET/CT Imaging. *Nucl Med Mol Imaging*. 2023; 57(1):16–25. doi: 10.1007/s13139-022-00780-4.

Chorostowska-Wynimko J, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E, Selman SH, Jankun J. Plasminogen activator inhibitor type-1 mutants regulate angiogenesis of human umbilical and lung vascular endothelial cells. *Oncol Rep.* 2004; 12(6):1155–1162.

Christian N, Deheneffe S, Bol A, De Bast M, Labar D, Lee JA, Grégoire V. Is (18)F-FDG a surrogate tracer to measure tumor hypoxia? Comparison with the hypoxic tracer (14)C-EF3 in animal tumor models. *Radiother Oncol.* 2010; 97(2):183–188. doi: 10.1016/j.radonc.2010.02.020.

Chun TH, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh KT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Weiss SJ. MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol.* 2004; 167(4):757–767. doi: 10.1083/jcb.200405001.

Clavo AC, Brown RS, Wahl RL. Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increased by hypoxia. *J Nucl Med.* 1995; 36(9):1625–1632.

Clavo AC, Wahl RL. Effects of hypoxia on the uptake of tritiated thymidine, L-leucine, L-methionine and FDG in cultured cancer cells. *J Nucl Med.* 1996; 37(3):502–506.

Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22(4):201–207. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01676-x.

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

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

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996; 87(7):1161–1169. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81812-7.

Dearling JL, Flynn AA, Sutcliffe-Goulden J, Petrie IA, Boden R, Green AJ, Boxer GM, Begent RH, Pedley RB. Analysis of the regional uptake of radiolabeled deoxyglucose analogs in human tumor xenografts. *J Nucl Med*. 2004; 45(1):101–107.

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

Dienes RA, Komor LA, Szabó JP, Berzi A, Emri M, Szikra D, Fekete A, Opposits G, Józai I, Kertész I, Fenyvesi F, Trencsényi G, Hajdu I, Képes Z. Preclinical evaluation of Manganese-52 labelled cyclodextrin: a prostaglandin E2 affine imaging probe. *Eur J Pharm Sci*. 2025; 215:107344. doi: 10.1016/j.ejps.2025.107344.

Dietlmeier S, Ye Y, Kuhn C, Vattai A, Vilsmaier T, Schröder L, Kost BP, Gallwas J, Jeschke U, Mahner S, Heidegger HH. The prostaglandin receptor EP2 determines prognosis in EP3-negative and galectin-3-high cervical cancer cases. *Sci Rep*. 2020; 10(1):1154. doi: 10.1038/s41598-020-58095-3.

Dos Santos SN, Wuest M, Jans HS, Woodfield J, Nario AP, Krys D, Dufour J, Glubrecht D, Bergman C, Bernardes ES, Wuest F. Comparison of three ¹⁸F-labeled 2-nitroimidazoles for imaging hypoxia in breast cancer xenografts: [¹⁸F]FBNA, [¹⁸F]FAZA and [¹⁸F]FMISO. *Nucl Med Biol*. 2023; 124–125:108383. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2023.108383.

Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*. 1994; 8(16):1897–1909. doi: 10.1101/gad.8.16.1897.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002; 20(21):4368–4380. doi: 10.1200/JCO.2002.10.088.

Eble JA, Haier J. Integrins in cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6(2):89–105. doi: 10.2174/156800906776056518.

Edelberg JM, Aird WC, Wu W, Rayburn H, Mamuya WS, Mercola M, Rosenberg RD. PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J Clin Invest*. 1998; 102(4):837–843. doi: 10.1172/JCI3058.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6):669–676. doi: 10.1038/nm0603-669.

Foo SS, Abbott DF, Lawrentschuk N, Scott AM. Functional imaging of intratumoral hypoxia. *Mol Imaging Biol*. 2004; 6(5):291–305. doi: 10.1016/j.mibio.2004.06.007.

Gagel B, Reinartz P, Demirel C, Kaiser HJ, Zimny M, Piroth M, Pinkawa M, Stanzel S, Asadpour B, Hamacher K, Coenen HH, Buell U, Eble MJ. [18F] fluoromisonidazole and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography in response evaluation after chemo-/radiotherapy of non-small-cell lung cancer: a feasibility study. *BMC Cancer*. 2006; 6(1):51. doi: 10.1186/1471-2407-6-51.

Gálvez BG, Matías-Román S, Albar JP, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem*. 2001; 276(40):37491–37500. doi: 10.1074/jbc.M104094200.

Gao C, Liu C, Chen Q, Wang Y, Kwong CHT, Wang Q, Xie B, Lee SMY, Wang R. Cyclodextrin-mediated conjugation of macrophage and liposomes for treatment of atherosclerosis. *J Control Release*. 2022; 349:2–15. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.06.053.

Garai I, Varga J. Nukleáris Medicina Orvostanhallgatóknak. Debreceni Egyetemi Kiadó, 2018.

Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*. 2013; 26(5):441–454. doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.020.

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(19):7311–7315. doi: 10.1073/pnas.86.19.7311.

Guo M, Song LP, Jiang Y, Liu W, Yu Y, Chen GQ. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. *Apoptosis*. 2006; 11(1):67–77. doi: 10.1007/s10495-005-3085-3.

Guzman-Rojas L, Rangel R, Salameh A, Edwards JK, Dondossola E, Kim YG, Saghatelian A, Giordano RJ, Kolonin MG, Staquicini FI, Koivunen E, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(5):1637–1642. doi: 10.1073/pnas.1120790109.

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

Hammond EM, Asselin MC, Forster D, O'Connor JP, Senra JM, Williams KJ. The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2014; 26(5):277–288. doi: 10.1016/j.clon.2014.02.002.

Hara T, Bansal A, DeGrado TR. Effect of hypoxia on the uptake of [methyl-3H]choline, [1-14C] acetate and [18F]FDG in cultured prostate cancer cells. *Nucl Med Biol*. 2006; 33(8):977–984. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2006.08.002.

Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, Kimura A, Minekawa R, Tahara M, Tasaka K, Murata Y. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol.* 2004; 183(1):145–154. doi: 10.1677/joe.1.05599.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999; 79(4):1283–1316. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.

Hirayama F, Kurihara M, Uekama K. Improving the aqueous stability of prostaglandin E2 and prostaglandin A2 by inclusion complexation with methylated-beta-cyclodextrins. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1984; 32(10):4237–4240. doi: 10.1248/cpb.32.4237.

Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998; 274(3):H1054–H1058. doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.3.H1054.

Huang Y, Fan J, Li Y, Fu S, Chen Y, Wu J. Imaging of Tumor Hypoxia With Radionuclide-Labeled Tracers for PET. *Front Oncol.* 2021; 11:731503. doi: 10.3389/fonc.2021.731503.

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

Karthic A, Roy A, Lakkakula J, Alghamdi S, Shakoori A, Babalghith AO, Emran TB, Sharma R, Lima CMG, Kim B, Park MN, Safi SZ, de Almeida RS, Coutinho HDM. Cyclodextrin nanoparticles for diagnosis and potential cancer therapy: A systematic review. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10:984311. doi: 10.3389/fcell.2022.984311.

Képes Z, Dénes N, Kertész I, Hajdu I, Trencsényi G. Overview of Prostaglandin E2 (PGE2)-Targeting Radiolabelled Imaging Probes from Preclinical Perspective: Lessons Learned and Road Ahead. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(8):6942. doi: 10.3390/ijms24086942.

Kepes Z, Hegedus E, Sass T, Csikos C, Szabo JP, Szugyiczki V, Hajdu I, Kertesz I, Opposits G, Imrek J, Balkay L, Kalman FK, Trencsenyi G. Concomitant [^{18}F]F-FAZA and [^{18}F]F-FDG Imaging of Gynecological Cancer Xenografts: Insight into Tumor Hypoxia. *In Vivo*. 2024; 38(2):574–586. doi: 10.21873/invivo.13476.

Képes Z, Szabó JP, Kálmán-Szabó I, Sass T, Esze R, Opposits G, Józai I, Szikra D, Fenyvesi F, Hajdu I, Trencsényi G. ^{52}Mn -labelled Beta-cyclodextrin for Melanoma Imaging: A Proof-of-concept Preclinical Study. *In Vivo*. 2024; 38(6):2591-2600. doi: 10.21873/invivo.13735.

Kerner GS, Bollineni VR, Hiltermann TJ, Sijtsema NM, Fischer A, Bongaerts AH, Pruim J, Groen HJ. An exploratory study of volumetric analysis for assessing tumor response with (18)F-FAZA PET/CT in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *EJNMMI Res*. 2016; 6(1):33. doi: 10.1186/s13550-016-0187-6.

Khanna C, Prehn J, Yeung C, Caylor J, Tsokos M, Helman L. An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18(3):261–271. doi: 10.1023/a:1006767007547.

Korhonen J, Polvi A, Partanen J, Alitalo K. The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene*. 1994; 9(2):395–403.

Kroon ME, Koolwijk P, van der Vecht B, van Hinsbergh VW. Urokinase receptor expression on human microvascular endothelial cells is increased by hypoxia: implications for capillary-like tube formation in a fibrin matrix. *Blood*. 2000; 96(8):2775–2783.

Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T, Tamahashi N. Active and passive mechanisms of [fluorine-18] fluorodeoxyglucose uptake by proliferating and preneoplastic cancer cells in vivo: a microautoradiographic study. *J Nucl Med*. 1994; 35(6):1067–1075.

Kumar CC. Integrin $\alpha_v\beta_3$ as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets*. 2003; 4(2):123–131. doi: 10.2174/1389450033346830.

Kumar P, Stypinski D, Xia H, McEwan AJB, Machulla HJ, Wiebe LI. Fluoroazomycin arabinoside (FAZA): synthesis, 2H and 3H-labelling and preliminary biological evaluation of

a novel 2-nitroimidazole marker of tissue hypoxia. *J Label Compd Radiopharm.* 1999;42(1):3–16. doi: 10.1002/(SICI)1099-1344(199901)42:1<3::AID-JLCR160>3.0.CO;2-H.

Langlois S, Gingras D, Béliveau R. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation. *Blood.* 2004; 103(8):3020–3028. doi: 10.1182/blood-2003-08-2968.

Lee N, Nehmeh S, Schöder H, Fury M, Chan K, Ling CC, Humm J. Prospective trial incorporating pre-/mid-treatment [18F]-misonidazole positron emission tomography for head-and-neck cancer patients undergoing concurrent chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 75(1):101–108. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.10.049.

Lee ST, Scott AM. Hypoxia positron emission tomography imaging with 18f-fluoromisonidazole. *Semin Nucl Med.* 2007; 37(6):451–461. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2007.07.001.

Lewellen TK. Recent developments in PET detector technology. *Phys Med Biol.* 2008; 53(17):R287–317. doi: 10.1088/0031-9155/53/17/R01.

Li XF, Du Y, Ma Y, Postel GC, Civelek AC. (18)F-fluorodeoxyglucose uptake and tumor hypoxia: revisit (18)f-fluorodeoxyglucose in oncology application. *Transl Oncol.* 2014; 7(2):240–247. doi: 10.1016/j.tranon.2014.02.010.

Liu Z, Wang F, Chen X. Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev Res.* 2008;69(6):329–339. doi: 10.1002/ddr.20265.

Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci.* 1996; 85(10):1017–1025. doi: 10.1021/js950534b.

Loftsson T, Jarho P, Másson M, Järvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005; 2(2):335–351. doi: 10.1517/17425247.2.1.335.

Lopci E, Grassi I, Chiti A, Nanni C, Cicoria G, Toschi L, Fonti C, Lodi F, Mattioli S, Fanti S. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2014; 4(4):365–384.

Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem*. 2007; 14(6):639–647. doi: 10.2174/092986707780059571.

Ma X, Aoki T, Tsuruyama T, Narumiya S. Definition of Prostaglandin E₂-EP2 Signals in the Colon Tumor Microenvironment That Amplify Inflammation and Tumor Growth. *Cancer Res*. 2015; 75(14):2822–2832. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0125.

Madrigal-Martínez A, Fernández-Martínez AB, Lucio Cazaña FJ. Intracrine prostaglandin E₂ pro-tumoral actions in prostate epithelial cells originate from non-canonical pathways. *J Cell Physiol*. 2018; 233(4):3590–3602. doi: 10.1002/jcp.26220.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997; 277(5322):55–60. doi: 10.1126/science.277.5322.55.

Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, Cartocci E, Albini A, Ziche M, Bussolino F, Oliviero S. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(17):9671–9676. doi: 10.1073/pnas.96.17.9671.

Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990; 6:597–641. doi: 10.1146/annurev.cb.06.110190.003121.

Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem*. 2001; 276(46):43407–43412. doi: 10.1074/jbc.M108181200.

Mees G, Dierckx R, Vangestel C, Van de Wiele C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009; 36(10):1674–1686. doi: 10.1007/s00259-009-1195-9.

Mellanen P, Minn H, Grénman R, Härkönen P. Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int J Cancer*. 1994; 56(5):622–629. doi: 10.1002/ijc.2910560503.

Melsens E, De Vlieghere E, Descamps B, Vanhove C, Kersemans K, De Vos F, Goethals I, Brans B, De Wever O, Ceelen W, Pattyn P. Hypoxia imaging with ¹⁸F-FAZA PET/CT predicts radiotherapy response in esophageal adenocarcinoma xenografts. *Radiat Oncol*. 2018; 13(1):39. doi: 10.1186/s13014-018-0984-3.

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1999; 18(2):363–374. doi: 10.1093/emboj/18.2.363.

Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol*. 2004; 164(6):1875–1882. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63747-9.

Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res*. 2000; 78:103–157. doi: 10.1016/s0065-230x(08)61024-6.

Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Möller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993; 72(6):835–846. doi: 10.1016/0092-8674(93)90573-9.

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

Minn H, Clavo AC, Wahl RL. Influence of hypoxia on tracer accumulation in squamous-cell carcinoma: in vitro evaluation for PET imaging. *Nucl Med Biol.* 1996; 23(8):941–946. doi: 10.1016/s0969-8051(96)00134-5.

Mitsuhashi M, Liu J, Cao S, Shi X, Ma X. Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J Leukoc Biol.* 2004; 76(2):322-32. doi: 10.1189/jlb.1203641.

Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, Kay GF. Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(9):2660–2669. doi: 10.1002/art.11232.

Murakami T, Nishiyama T, Shirotani T, Shinohara Y, Kan M, Ishii K, Kanai F, Nakazuru S, Ebina Y. Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *J Biol Chem.* 1992; 267(13):9300–9306.

Nguyen AT, Kim HK. Recent Advances of ⁶⁸Ga-Labeled PET Radiotracers with Nitroimidazole in the Diagnosis of Hypoxia Tumors. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(13):10552. doi: 10.3390/ijms241310552.

Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* 2000; 299(3):551–572. doi: 10.1006/jmbi.2000.3777.

Nussenbaum F, Herman IM. Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol.* 2010; 2010:132641. doi: 10.1155/2010/132641.

OECD Country Cancer Profile 2025 HUNGARY. Available online:
https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2025/02/eu-country-cancer-profile-hungary-2025_d482f082/344b5f49-en.pdf

- Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 39(2):212–220. doi: 10.1016/j.bcmd.2007.04.001.
- Pan J, Yang Q, Shao J, Zhang L, Ma J, Wang Y, Jiang BH, Leng J, Bai X. Cyclooxygenase-2 induced β 1-integrin expression in NSCLC and promoted cell invasion via the EP1/MAPK/E2F-1/FoxC2 signal pathway. *Sci Rep*. 2016; 6:33823. doi: 10.1038/srep33823.
- Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*. 2000; 60(3):722–727.
- Pedersen MW, Holm S, Lund EL, Højgaard L, Kristjansen PE. Coregulation of glucose uptake and vascular endothelial growth factor (VEGF) in two small-cell lung cancer (SCLC) sublines in vivo and in vitro. *Neoplasia*. 2001; 3(1):80–87. doi: 10.1038/sj.neo.7900133.
- Peeters SG, Zegers CM, Lieuwes NG, van Elmpt W, Eriksson J, van Dongen GA, Dubois L, Lambin P. A comparative study of the hypoxia PET tracers [^{18}F]HX4, [^{18}F]FAZA, and [^{18}F]FMISO in a preclinical tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015; 91(2):351–359. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.09.045.
- Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2001; 86(1):346–355.
- Pettinato C, Nanni C, Farsad M, Castellucci P, Sarnelli A, Civollani S, Franchi R, Fanti S, Marengo M, Bergamini C. Artefacts of PET/CT images. *Biomed Imaging Interv J*. 2006; 2(4):e60. doi: 10.2349/bij.2.4.e60.
- Piert M, Machulla HJ, Picchio M, Reischl G, Ziegler S, Kumar P, Wester HJ, Beck R, McEwan AJ, Wiebe LI, Schwaiger M. Hypoxia-specific tumor imaging with 18F-fluoroazomycin arabinoside. *J Nucl Med*. 2005; 46(1):106–113.

Pijl JP, Nienhuis PH, Kwee TC, Glaudemans AWJM, Slart RHJA, Gormsen LC. Limitations and Pitfalls of FDG-PET/CT in Infection and Inflammation. *Semin Nucl Med*. 2021; 51(6):633–645. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2021.06.008.

Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci*. 1996; 85(11):1142–1169. doi: 10.1021/js960075u.

Reischl G, Dorow DS, Cullinane C, Katsifis A, Roselt P, Binns D, Hicks RJ. Imaging of tumor hypoxia with [124I]IAZA in comparison with [18F]FMISO and [18F]FAZA--first small animal PET results. *J Pharm Pharm Sci*. 2007; 10(2):203–211.

Rezvani HR, Ali N, Nissen LJ, Harfouche G, de Verneuil H, Taïeb A, Mazurier F. HIF-1 α in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders. *J Invest Dermatol*. 2011; 131(9):1793–1805. doi: 10.1038/jid.2011.141.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*. 2007; 21(1):44–52. doi: 10.1038/sj.leu.2404402.

Rini BI, Small EJ. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(5):1028–1043. doi: 10.1200/JCO.2005.01.186.

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

Sandler AB, Dubinett SM. COX-2 inhibition and lung cancer. *Semin Oncol*. 2004; 31(2 Suppl 7):45–52. doi: 10.1053/j.seminoncol.2004.03.045.

Sauer RS, Rittner HL, Roewer N, Sohajda T, Shityakov S, Brack A, Broscheit JA. A Novel Approach for the Control of Inflammatory Pain: Prostaglandin E2 Complexation by Randomly Methylated β -Cyclodextrins. *Anesth Analg*. 2017; 124(2):675–685. doi: 10.1213/ANE.0000000000001674.

Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000; 35(2):71–103. doi: 10.1080/10409230091169186.

Semmlinger A, von Schoenfeldt V, Wolf V, Meuter A, Kolben TM, Kolben T, Zeder-Goess C, Weis F, Gallwas J, Wuerstlein R, Hermelink K, Schmoeckel E, Harbeck N, Mayr D, Mahner S, Jeschke U, Ditsch N. EP3 (prostaglandin E2 receptor 3) expression is a prognostic factor for progression-free and overall survival in sporadic breast cancer. *BMC Cancer.* 2018; 18(1):431. doi: 10.1186/s12885-018-4286-9.

Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, Lévy BI. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res.* 2003; 93(2):114–123. doi: 10.1161/01.RES.0000081594.21764.44.

Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation.* 2005;111(12):1556–1566. doi: 10.1161/01.CIR.0000159345.00591.8F.

Singh M, Sharma R, Banerjee UC. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv.* 2002; 20(5-6):341–359. doi: 10.1016/s0734-9750(02)00020-4.

Sorger D, Patt M, Kumar P, Wiebe LI, Barthel H, Seese A, Dannenberg C, Tannapfel A, Kluge R, Sabri O. [18F]Fluoroazomycinarabinofuranoside (18FAZA) and [18F]Fluoromisonidazole (18FMISO): a comparative study of their selective uptake in hypoxic cells and PET imaging in experimental rat tumors. *Nucl Med Biol.* 2003; 30(3):317–326. doi: 10.1016/s0969-8051(02)00442-0.

Souvatoglou M, Grosu AL, Röper B, Krause BJ, Beck R, Reischl G, Picchio M, Machulla HJ, Wester HJ, Piert M. Tumour hypoxia imaging with [18F]FAZA PET in head and neck cancer patients: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007; 34(10):1566–1575. doi: 10.1007/s00259-007-0424-3.

Szabó JP, Csige K, Kálmán-Szabó I, Arató V, Opposits G, Józai I, Kertész I, Képes Z, Méhes G, Fenyvesi F, Hajdu I, Trencsényi G. In vivo assessment of tumor targeting potential of ⁶⁸Ga-labelled randomly methylated beta-cyclodextrin (RAMEB) and 2-hydroxypropyl-β-

cyclodextrin (HP β CD) using positron emission tomography. *Int J Pharm.* 2023; 630:122462. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122462.

Szejtli J. Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes. Academic Publisher; Budapest, Hungary: 1982. p. 395.

Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev.* 1998; 98(5):1743–1754. doi: 10.1021/cr970022c.

Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000; 157(2):411–421. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64554-3.

Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol.* 1985; 101(6):2330–2334. doi: 10.1083/jcb.101.6.2330.

Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J.* 1987; 1(6):434–440.

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

Trencsényi G, Kis A, Szabó JP, 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.* 2020; 576:118954. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118954.

Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Utsugi T, Akuzawa N, Sato M, Tomono S, Kawazu S, Nagai R. Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(4):1155–1161. doi: 10.1161/01.atv.20.4.1155.

van den Driesche S, Mummery CL, Westermann CJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2003; 58(1):20–31. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00852-0.

Vengellur A, LaPres JJ. The role of hypoxia inducible factor 1alpha in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts. *Toxicol Sci.* 2004; 82(2):638–646. doi: 10.1093/toxsci/kfh278.

Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis.* 2017; 20(4):409–426. doi: 10.1007/s10456-017-9562-9.

Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(3):181–193. doi: 10.1038/nrc2809.

Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut.* 2006; 55(1):115–122. doi: 10.1136/gut.2004.047100.

Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell.* 1998; 93(5):741–753. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81436-1.

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

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE.* 2005; 2005(306):re12. doi: 10.1126/stke.3062005re12.

Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 2011; 102(3):501–508. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01826.x.

Wilder RL. Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61 Suppl 2(Suppl 2):ii96–99. doi: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii96.

Wojtyla C, Bertuccio P, Wojtyla A, La Vecchia C. European trends in breast cancer mortality, 1980-2017 and predictions to 2025. *Eur J Cancer*. 2021; 152:4–17. doi: 10.1016/j.ejca.2021.04.026.

Wu WK, Sung JJ, Lee CW, Yu J, Cho CH. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer Lett*. 2010; 295(1):7–16. doi: 10.1016/j.canlet.2010.03.015.

Wyss MT, Honer M, Schubiger PA, Ametamey SM. NanoPET imaging of [(18)F]fluoromisonidazole uptake in experimental mouse tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006; 33(3):311–318. doi: 10.1007/s00259-005-1951-4.

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

Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*. 1998; 93(5):661–664. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81426-9.

Zanzonico P, Campa J, Polycarpe-Holman D, Forster G, Finn R, Larson S, Humm J, Ling C. Animal-specific positioning molds for registration of repeat imaging studies: comparative microPET imaging of F18-labeled fluoro-deoxyglucose and fluoro-misonidazole in rodent tumors. *Nucl Med Biol*. 2006; 33(1):65–70. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2005.07.011.

10.2 Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb in extenso közlemények hitelesített listája



**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

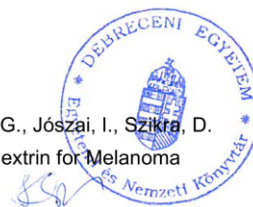
Jelölt: Sass Tamás
Doktori Iskola: Orvostudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10074153

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 alapján 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.



11 Tárgyszavak

angiogenezis – angiogenesis

ciklodextrin – cyclodextrin

emlő/petefészek/cervix karcinóma xenograftok – breast/ovarian/cervix xenotransplants

experimentális tumormodell – experimental tumor model

fluoroazomicin-arabinozid (FAZA) – fluoroazomycin arabinoside

fluorodezoxiglükóz (FDG) – fluorodeoxyglucose

hidroxipropil-béta-ciklodextrin (HP β CD) – hydroxypropyl-beta-cyclodextrin

hipoxia – hypoxia

izotóp – isotope

pozitronemissziós tomográfia (PET) – positron emission tomography

preklinikai – preclinical

prostaglandin E2 (PGE2) – prostaglandin E2

radiofarmakon – radiopharmaceutical

random metilezett beta ciklodextrin (RAMEB) – randomly methylated beta cyclodextrin

12 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.

13 FÜGGELÉK

Az értekezés alapját képező in extenso közlemények másolatai