

Doktori (PhD) értekezés

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

Dr. Farkasinszky Gergely

Témavezető: Dr. Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM

Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2025.

„Ha a tudomány problémára bukkan, azt csak a tudás oldhatja meg”

(Isaac Asimov)

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	6
2. Bevezetés	9
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1 Non-invazív képalkotás az <i>in vivo</i> preklinikai kutatásokban	10
3.1.1 Képalkotó modalitások.....	10
3.1.2 Pozitron emissziós tomográfia	12
3.1.3 PET radiofarmakonok	13
3.1.4 Az angiogenezis kimutatására alkalmas PET radiofarmakonok	15
3.2 Angiogenezis	18
3.2.1 Csírázó angiogenezis (sprouting angiogenesis)	21
3.2.2 Intusszuszeptív angiogenezis (intussusceptive angiogenesis).....	21
3.3 Aminopeptidáz N (APN/CD13)	22
3.3.1 Az aminopeptidáz N (APN, CD13) angiogenikus folyamatokban játszott szerepe	23
3.4 Vaszkuláris rendellenességek	24
3.4.1 Proliferatív diabéteszes retinopátia	24
3.4.2 Akut alsó végtagi iszkémia	29
3.5 <i>In vivo</i> kisállat modellek a preklinikai képalkotó kutatásokban.....	32
3.5.1 A 3 R érvényesülése az <i>in vivo</i> preklinikai képalkotó kutatásokban	34
3.6 Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell.....	35
3.7 Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell	37
4. Célkitűzés.....	38
5. Anyagok és módszerek	39
5.1 Radiokémia.....	39
5.1.1 [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-c(NGR) szintézise	40

5.1.2	[⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)] ₂ szintézise	42
5.1.3	2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz szintézise.....	44
5.2	MiniPET-II kisállat PET kamera	48
5.3	Kísérleti állatok.....	51
5.3.1	Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia kísérletsorozatban alkalmazott állatok sajátságai és elkülönített csoportok.....	51
5.3.2	Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia kísérletsorozatban alkalmazott állatok sajátságai és elkülönített csoportok.....	52
5.3.3	Fájdalomcsillapítási protokollok	54
5.4	Iszkémia-reperfúzió kiváltásának protokollja.....	54
5.4.1	Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell.....	54
5.4.2	Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell	56
5.5	Képkalkotási protokoll	57
5.5.1	Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia.....	57
5.5.2	Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia.....	58
5.6	Western blot.....	59
5.7	Immunhisztokémia	61
5.8	Szövettan	65
5.9	Statisztikai analízis	67
6.	Eredmények	68
6.1	Radiokémia.....	68
6.1.1	Projekt 1: [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-c(NGR) és [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)] ₂ előállításának eredményei	68
6.1.2	Projekt 2: 2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz előállításának eredményei	71
6.2	Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell	74
6.2.1	APN/CD13 receptor expresszió <i>in vivo</i> longitudinális vizsgálatának eredményei [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET segítségével.....	74

6.2.2	$\alpha V\beta 3$ integrin receptor expresszió <i>in vivo</i> vizsgálatának eredményei [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)] ₂ PET segítségével	76
6.2.3	PET vizsgálatok jel-háttér arány (SBR) elemzésének eredményei	77
6.2.4	Western blot és szövettan vizsgálatok eredményei	78
6.3	Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell	80
6.3.1	APN/CD13 receptor expresszió <i>in vivo</i> longitudinális vizsgálatának eredményei [⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET segítségével.....	80
6.3.2	Metabolizmus <i>in vivo</i> longitudinális vizsgálatának eredményei [¹⁸ F]FDG PET segítségével	83
6.3.3	Western blot vizsgálatok eredményei.....	86
6.3.4	Immunhisztokémia vizsgálatok eredményei	87
7.	Megbeszélés	89
8.	Összefoglalás	102
9.	Summary	103
10.	Irodalomjegyzék	104
10.1	A hivatkozott közlemények jegyzéke.....	104
10.2	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	113
11.	Tárgyszavak	114
12.	Köszönetnyilvánítás	115
13.	Függelék.....	116

1. Rövidítések jegyzéke

^{11}C	Szén-11 (radioaktív izotóp)
^{64}Cu]-DOTA-RGDyK	Réz-64-el jelölt DOTA-RGDyK molekula
^{64}Cu]-VEGF121	Réz-64-el jelölt vaszkuláris endoteliális növekedési faktor 121
^{18}F	Fluor-18 (radioaktív izotóp)
^{18}F]FDG	2- ^{18}F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz
^{18}F]PSMA-1007	^{18}F -el jelölt prosztataspecifikus membránantigén (PSMA) 1007
^{18}F]-Galakto-RGD	Fluor-18-al jelölt galakto-RGD peptid
^{18}F]-SAV 03M	Fluor-18-al jelölt SAV 03M molekula
^{68}Ga	Gallium-68 (radioaktív izotóp)
^{68}Ga]Ga-NODAGA- [c(RGD)] ₂	Gallium-68-al jelölt NODAGA-[c(RGD)] ₂ molekula
^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR)	Gallium-68-al jelölt NOTA-c(NGR) molekula
^{68}Ga]Ga-NOTA-PRGD ₂	Gallium-68-al jelölt NOTA-PRGD ₂ molekula
^{68}Ga]Ga-PSMA-11	^{68}Ga -val jelölt prosztataspecifikus membránantigén (PSMA) 11
^{68}Ge	Germánium-68 (radioaktív izotóp)
^{177}Lu]Lu-PSMA-617	Lutécium-177-el jelölt prosztataspecifikus membránantigén 617
^{13}N	Nitrogén-13 (radioaktív izotóp)
^{15}O	Oxigén-15 (radioaktív izotóp)
ALI	Akut végtag-iszkémia
Ang	Angiopoietin
APN/CD13	Aminopeptidáz N
$\alpha_v\beta_3$	Integrin receptor altípus
cGy	Centigray
CI	Claudicatio intermittens
CLI	Kritikus végtag- iszkémia
cm	Centiméter
CRAO	Központi retinális artéria elzárás
CT	Számítógépes tomográfia
D	Dioptria
DAB	3,3-diaminobenzidin

DEMÁB	Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság
DR	Diabéteszes retinopátia
DT	Dysbasias távolság
ECM	Extracelluláris mátrix
EMA	Európai Gyógyszerügynökség
eNOS	Nitrogén-monoxid szintáz
EtOH	Etanol
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal
FGF	Fibroblaszt növekedési faktorok
GBq/ μ Ah	Gigabecquerel per mikroampère-óra
GCL	Ganglion sejtréteg
GLP	Helyes laboratóriumi gyakorlat
GLUT	Glükóz transzporter
HE	Hematoxin-eosin
HIF	Hipoxia-indukált faktor
HIF-1 α	Hipoxia indukált faktor-1 α
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
HPRT	Hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz
IHC	Immunhisztokémia
IMP	Klinikai vizsgálati készítmény
INL	Belső nukleáris réteg
IPL	Inner plexiform réteg
I/R	Iszkémia-reperfúzió
i.v.	Intravenózus
IVC	Egyesével szellőztetett ketrecrendszer
K ₂ CO ₃	Kálium-karbonát
keV	Kilóelektronvolt
LYSO	Lutécium-ytrium-szilikátoxid
MBq	Megabecquerel (radioaktivitás mértékegysége)
MeV	Megaelectronvolt
mm	Milliméter
μ m	Mikrométer

MMP	Mátrix metalloproteinázok
MRI	Mágneses rezonancia képalkotás
NA	Nem alkalmazható
NGR	Aszparagin-Glicin-Arginin
OI	Optikai képalkotás
ONL	Külső nukleáris réteg
PAD	Perifériás artériás betegség
PDGF	Vérlemezke eredetű növekedési faktor
PDR	Proliferatív diabéteszes retinopátiának
PET	Pozitron emissziós tomográfia
pH	Hidrogénion-kitevő
PVDF	Polivinilidén-fluorid
RGD	Arginin-Glicin-Aszparaginsav
SBR	Jel/háttér arány
SD	Szórás (Standard Deviation)
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélen
SPECT	Egyfoton emissziós tomográfia
SUV	Standardizált felvételi érték
TATM	Mannóz-triflát (Mannose triflate)
TGF	Transzformáló növekedési faktor
TLC	Vékonyréteg kromatográfia (Thin-Layer Chromatography)
US	Ultrahang
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VOI	Érdeklődési térfogat (Volume of Interest)
Zn ⁽²⁺⁾ -	Cinkion (2+ töltésű)
3R	Helyettesítés, Csökkentés, Tökéletesítés

2. Bevezetés

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

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

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

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Non-invazív képalkotás az *in vivo* preklinikai kutatásokban

A kisállatmodellek alkalmazása az alap- és a preklinikai tudományok szerves részét képezi az új gyógyszerjelölt molekulák fejlesztésében a humán klinikai vizsgálatok előtt. Az állatkísérletes és humán fázisvizsgálatok közötti „átfordítás” az úgynevezett transláció, melynek kiemelt feladata, az állatkísérletekben összegyűjtött adatokat figyelembe véve, biztonságos és hatékony klinikai vizsgálati készítmény (IMP) és protokoll kidolgozása. Az egésztest kisállat képalkotás egy különösen effektív és gazdaságos kísérleti platform a gyógyszerjelölt szerek tesztelésében. A klinikai diagnosztikai módszerek főbb miniatürizált változatainak kifejlesztése, mint a számítógépes tomográfia (CT), a mágneses rezonancia képalkotás (MRI), az egyfoton emissziós tomográfia (SPECT), a pozitron emissziós tomográfia (PET), az optikai képalkotás (OI) és az ultrahang (US) mind nagymértékben hozzájárultak a különböző állatmodellek hatékony *in vivo* tanulmányozásához.

3.1.1 Képalkotó modalitások

A képalkotó modalitások több szempont szerint oszthatóak fel (1. táblázat). A legtöbb eljárás (MRI, SPECT, PET, CT, OI) nem valós idejű, vagyis a képalkotás és a rekonstrukció nem egy időben történik, míg az US az egyetlen valós idejű képalkotási metodika. A leggyakrabban azonban az ionizációs sugárzás alkalmazása alapján: azt alkalmazó (SPECT, PET, CT) és azt nem alkalmazó (MRI, US, OI) csoportokba sorolják be azokat. A további felosztás alapját képezheti, hogy az ionizáló sugárzás külső sugárforrásból (CT) vagy belső forrásokból (SPECT, PET) származik, azonban az ilyen jellegű csoportosításba nem sorolhatóak be az ionizáló sugárzást nem alkalmazó eljárások (MRI, US, OI) (2. táblázat).

A klinikai képalkotó modalitások térbeli felbontása a legtöbb esetben nem elégséges a kisállatokon végzett kutatásokban, így az ilyen irányú mérés technikai fejlesztések fő célkitűzési közé tartozik a mikrotechnikák létrehozása, fejlesztése.

1. táblázat: A klinikai és preklinikai képalkotó modalitások tulajdonságainak összehasonlítása (1)

Modalitás	Geometriai felbontás (mm)		Funkcionális felbontás (molekuláris koncentráció)	Ionizáló sugárzást alkalmaz	Alkalmazás információ
	Klinikai	Preklinikai			
MRI	~1mm	≤100μm	~10 ⁻³ - 10 ⁻⁴ mol/L	NEM	Szerkezeti és funkcionális
PET	~5mm	~1-2mm	~10 ⁻¹¹ - 10 ⁻¹³ mol/L	IGEN	Funkcionális
SPECT	~1cm	0,5-2mm	~10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻¹² mol/L	IGEN	Funkcionális
CT	1-2mm	≤200μm	Molekuláris adat nem következtethető, nem értelmezhető	IGEN	Szerkezeti
US	1-2mm	≤100μm	Molekuláris adat nem következtethető, nem értelmezhető	NEM	Szerkezeti
OI	~1mm	≤100μm	~10 ⁻⁹ - 10 ⁻¹² mol/L	NEM	Funkcionális

A kisállatokon végzett preklinikai képalkotás sugárdózisai a PET-, a SPECT- és a CT-vizsgálatokban lényegesen – egy-két nagyságrenddel – magasabbak, mint a klinikai alkalmazások esetén (2, 3). Az MRI-t, a CT-t és az US-t az anatómiai képletek nagy felbontású vizualizálása miatt gyakran „strukturális” képalkotó módszerként jellemzik. A PET-et, a SPECT-et és az OI-t ezzel szemben általában „funkcionális” képalkotó modalitásként írják le. Az ilyen megkülönböztetés azonban egyre önkényesebb és pontatlanabb, mivel dinamikus és/vagy statikus MRI-, CT- és US-képalkotás végezhető kontrasztanyag beadásával, így alkalmas lehet a funkcionális információ gyűjtésére.

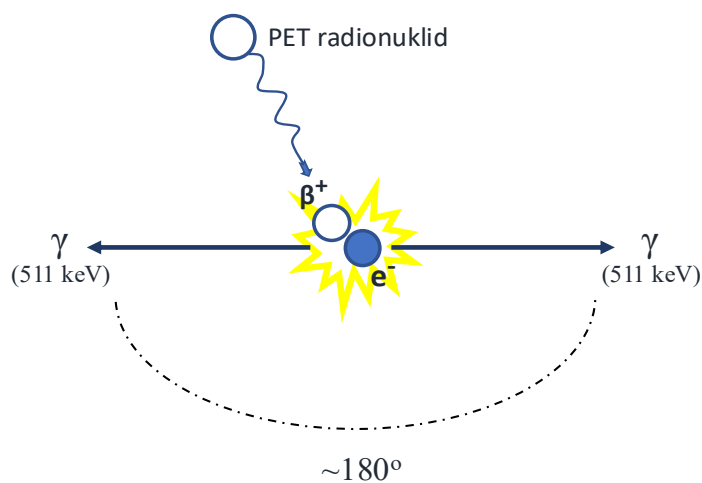
2. táblázat: A preklinikai képalkotó modalitások sugárterhelésének összehasonlítása (a feltüntetett dózisértékek egér modellre és egész testre vonatkoznak) (4)

Modalitás	Ionizáló sugárzás (alkalmaz)	Jellemző dózis (cGy)
MRI	NEM	NA
PET	IGEN	10-100
SPECT	IGEN	10-100
CT	IGEN	10-20
US	NEM	NA
OI	NEM	NA

3.1.2 Pozitron emissziós tomográfia

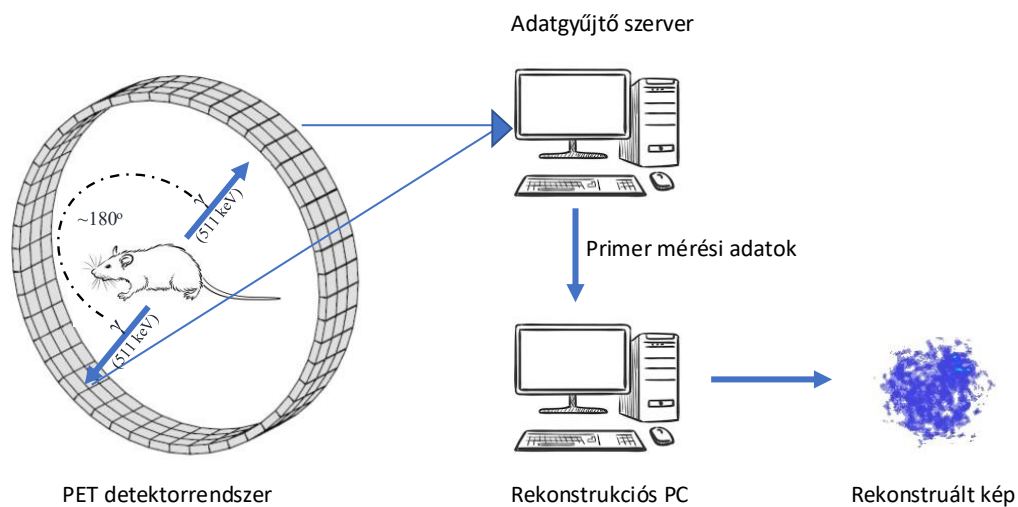
A pozitron emissziós tomográfia (PET) egy ionizáló sugárzást alkalmazó, funkcionális képalkotó eljárás. A módszer alkalmas háromdimenziós kép létrehozására, ami információt szolgáltat a radiofarmakon szervezetben belüli felhalmozódásáról vagy eloszlásáról. A technika belső nyitott sugárforrást igényel, amely pozitív béta-bomló radioaktív tulajdonságokkal rendelkezik.

A képalkotás fizikai alapját a pozitron annihilációja során keletkező két 511 keV-os gamma-foton szolgáltatja. Ezek megközelítőleg 180 fokos szögben hagyják el az annihilációs esemény helyszínét; így lehetséges a forrásuk lokalizálása (1. ábra).



1. ábra: A pozitron annihilációja – sematikus ábra

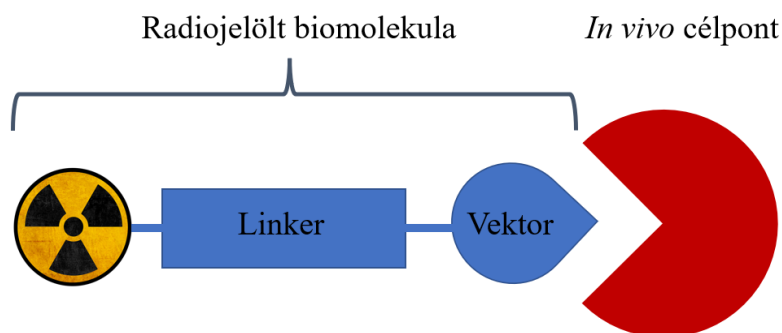
A γ fotonok detektálását úgynevezett szcintillátorokkal valósítják meg. Ez a vizsgálat tárgya körül gyűrű elrendezésben kialakított érzékelő rendszer része, amelyben fényjelenség következik be az elemi részecske és a kristály kölcsönhatása során. Az úgynevezett szcintillációs fényjelenség adja a gamma fotonok (single event) detektálásának alapját, ami az érzékelőrendszerben megvalósított koincidencia áramkörökön keresztül, egy adatgyűjtő egység segítségével, azonosítja az annihiláció hozzávetőleges helyét. A primer adatok feldolgozása (rekonstrukció) után a mérési adatok alkalmassá válnak az értékelésre (2. ábra).



2. ábra: A pozitronemissziós tomográfia – sematikus ábra

3.1.3 PET radiofarmakonok

A PET képalkotáshoz nélkülözhetetlenek a diagnosztikus radiogyógyszerek. Ezen molekulák alapvetően három funkcionális részegységből állhatnak; radioaktív atom, linker és vektor. Ugyanakkor ezen struktúrák nem minden esetben tartalmazzák mindhárom komponenst, mivel a radiofarmakonok szerkezeti struktúrája az alkalmazás céljától és a kapcsolódó biológiai mechanizmustól függően eltérő lehet. A radiofarmakonok alapvető egységeit a 3. ábra szemlélteti. Ezek a molekulák többek között lehetnek kis molekulák, aminosavak, peptidok, antitestek és nanorészecskék, amelyek alkalmasak különböző *in vivo* célpontokkal való kapcsolódásra a molekula biológiailag aktív részén keresztül (vektor) (5).



3. ábra: A radiofarmakonok alapvető egységei (5)

A jelölt biomolekulában a radioaktív atom ideális esetben egy főként pozitív béta (β^+) bomlási profillal rendelkező, optimális fizikai felezési idejű, az emberi szervezet alapvető alkotóelemeitől nem különböző, nem toxikus, és a felhasználás helyén előállítható. Továbbá a termelés módjából eredően (ciklotron vagy generátor termék) nem tartalmaz jelentékeny mennyiségű kémiai és radionuklidos szennyezőt. Általánoságban véve radiokémiai tisztasága meghaladja a 95%-os határértéket (6). Ezen felsorolt tulajdonságok nincsenek meg egyetlen radionuklidban sem, így a radiojelölt biomolekula tervezése során elsőrendű cél a megfelelő izotóp kiválasztása és helyes alkalmazása. A leggyakrabban használt PET izotópok főbb tulajdonságait a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat: A leggyakrabban használt PET izotópok főbb tulajdonságai

PET izotóp	Felezési idő (perc)	β^+ bomlás (%)	Radionuklid forrása	Pozitron maximális energiája (MeV)
^{18}F	110	96,9	Ciklotron	0,63
^{11}C	20,4	99,8	Ciklotron	0,96
^{13}N	10	99,8	Ciklotron	1,19
^{15}O	2,05	99,9	Ciklotron	1,72
^{68}Ga	67,7	89,1	Generátor Ciklotron	1,89

A táblázatból kitűnik, hogy a ciklotronban előállítható radionuklidok közül a ^{18}F rendelkezik a legjobb tulajdonságokkal, ebből kifolyólag a ^{11}C , a ^{13}N és az ^{15}O alkalmazása nem valósul meg nagy volumenben, továbbá a ^{68}Ga előállítása nehézségekbe ütközik, emiatt a generátor alapú előállítás terjedt el. Ezt támasztja alá az is, hogy a PET képalkotás „arany sztenderdje” a ^{18}F FDG.

A 2- ^{18}F fluoro-2-deoxi-D-glükóz (^{18}F FDG) használata a képalkotás során azoknál a betegeknél javasolt, akiknél a vizsgálóeljárás olyan folyamatokat, illetve betegségeket kell, hogy kimutasson, amelyek lényege bizonyos szervek, illetve szövetek fokozott glükózfelvetele. A gyógyszer az onkológiában alkalmas az elsődleges diagnózis felállítására, a stádiumbeosztásra, a terápiás válasz monitorozására és a recidívák kimutatására (indokolt gyanú esetén). Az onkológiai indikációkon kívül ^{18}F FDG ideális eszköz a gyulladással járó folyamatok, valamint egyes kardiológiai kórképek (pl. életképes szívműködés) és neurológiai betegségek közöttük neurodegeneratív kórképek (pl. Alzheimer-kór) nem receptor specifikus kimutatására. A ^{18}F FDG általános tulajdonságai előnyösek a széleskörű betegvizsgálati portfólió megvalósításához. Azonban, ha a magas glükózmétabolizmussal jellemezhető szervek (például agy) vagy a radiofarmakon kiürülésében résztvevő anatómiai struktúrák (például húgyhólyag) vizsgálatára kívánjuk alkalmazni, nem érjük el a kívánt eredményt. Amennyiben a diagnosztikai vizsgálat célja annak a megválaszolása, hogy az adott molekuláris célpont (receptor, enzim) jelen van-e a szervezetben, szükséges lehet specifikus hatásmechanizmusú radiojelölt molekulák (például peptidok) alkalmazása.

A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor-rendszerből nyerhető ^{68}Ga a legszélesebb körben alkalmazott radionuklid a kismolekulák és a peptid-származékok jelölésében. Ennek okai - az optimális fizikai felezési idő és a kedvező farmakokinetikai profil mellett -, az ideális kémiai tulajdonságaiban keresendő, továbbá, hogy teranosztikus pár képezhető a ^{68}Ga -mal (béta pozitív) és a ^{177}Lu -mal (béta negatív) jelölt biomolekulák között (például ilyen pár: ^{68}Ga PSMA-11 (diagnosztikus gyógyszer), ^{177}Lu PSMA-617 (terápiás készítmény)) (7). A fentebb felsorolt okok miatt, a vezető gyógyszeripari vállalatok jelentős forrásokat allokáltak a terület kiaknázására, az angiogenezis molekuláris szintű tanulmányozására alkalmas ^{68}Ga -mal jelölt peptid-származékok fejlesztésére (8).

3.1.4 Az angiogenezis kimutatására alkalmas PET radiofarmakonok

Az angiogenezis egy igen komplex élettani folyamat (lásd következő fejezet: *Angiogenezis*), amit pozitron emissziós tomográfia segítségével mélyrehatóan tanulmányoztak. A PET képalkotás során a következő célfolyamatok megértésére/értelmezésére alkalmas, széles körben használt, radiofarmakonok ismeretese (4. táblázat).

4.táblázat: Az angiogenezis kimutatására alkalmas PET radiofarmakonok (9)

Radiofarmakon	Biológiai analóg	Célfolyamat
[¹⁸ F]FDG	Glükóz	Glükóz metabolizmus, GLUT-1 expresszió
[⁶⁴ Cu]-VEGF121	VEGF izoformák	VEGF-útvonal, VEGFR2-höz kötődik
[¹⁸ F]-Galakto-RGD peptidek	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Az integrin RGD szekvenciájához kötődik
[⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-PRGD ₂	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Az integrin RGD szekvenciájához kötődik
[⁶⁴ Cu]-DOTA-RGDyK	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Az integrin RGD szekvenciájához kötődik
[¹⁸ F]-SAV 03M	Mátrix metalloproteinázok	Gelatináz útvonal, az MMP-2 inhibitorai
[⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-C6	Mátrix metalloproteinázok	Gelatináz útvonal, az MMP-2 inhibitorai
[⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-NGR	Metalloproteáz	APN/CD13 szekvenciájához kötődik

Ezeket a radiógyógyszereket a célfolyamat alapján a következő főbb csoportokra oszthatjuk:

Glükóz metabolizmus

A [¹⁸F]FDG-vel végzett képalkotás a különböző tumorok angiogenikus folyamataiban széleskörűen alkalmazott metodika. Ennek az oka, hogy a [¹⁸F]FDG mint „arany standard” jelenik meg a diagnosztikában. Általánosan jó tulajdonságai és széleskörű alkalmazása miatt a klinikai vizsgálatok ezen molekula és a klinikai vizsgálati készítmény hatékonyság és specificitás típusú összevetésén alapulnak. A tudományos szakirodalom a farmakon felhalmozódása és a tumorok érzépező képessége közötti korrelációról számol be (10). Sokrétű alkalmazását mi sem bizonyítja jobban, hogy Semenza és munkatársai bizonyították, hogy a hipoxia-indukált faktor (HIF) részt vesz a tumor angiogenezisben, amely ezáltal fokozza a glükóz metabolizmust (11). A glükóz transzporter (GLUT-1), a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) együttes szabályozása az angiogenezishez kapcsolódó gének modulálására utal (12).

VEGF-útvonal

A tumornövekedés során, az érintett területen jellemzően hipoxiás állapot alakul ki. Ennek ellensúlyozására molekuláris szinten VEGF/VEGFR által mediált érképződési folyamatok indulhatnak be (13). A humán radiojelölt VEGF izoforma, a [⁶⁴Cu]-VEGF121 alkalmas ennek a biológiai folyamatnak a hatékony, gyors és specifikus nyomon követésére az erősen vaszkularizált kis daganatokban, magas VEGFR-2 expresszió esetén (14).

Integrin $\alpha\beta_3$

Az integrin receptoron alapuló képalkotás alapja az Arg–Gly–Asp szekvenciát tartalmazó peptidok alkalmazása (RGD). Ezen vektorok nagy affinitással és kiváló specifitással kötődnek az $\alpha\beta_3$ receptorhoz. Az RGD szekvenciát tartalmazó gyógyszerjelölt vegyületek igen széles körben kutatott és fejlesztett területet képviselnek. A csoport első humán klinikai fázis I vizsgálatig eljutó molekulája a [¹⁸F]F-Galacto-RGD volt (15) de emellett más [¹⁸F]-ral jelzett molekulák (például a [¹⁸F]F-fluciclatide vagy [¹⁸F]F-RGD-K5) vizsgálata is megtörtént (13, 16). A [¹⁸F]-ral jelölt radiofarmakonok mellett további jelentős csoportot képviselnek a [⁶⁸Ga]-mal jelölt radiogyógyszerek, mint például a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-PRGD₂. Zheng és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a molekula, mint humán klinikai vizsgálati készítmény hatékony eszköz a tüdőrák képalkotásában, továbbá szignifikánsan hatékonyabb a [¹⁸F]FDG PET/CT-vel szemben a metasztatikus nyirokcsomók azonosítása terén (17).

Metalloproteázok

A metalloproteázok ismert résztvevői a neoangiogenikus folyamatoknak (18). Az APN/CD13 molekula a csoport egy cink-függő metalloproteáza. A célpont ideális lehet ⁶⁸Ga-mal jelölt radiogyógyszerek fejlesztésére. A képalkotás alapját az NGR szekvencia szolgáltatja (Asn-Gly-Arg), amely specifikusan kötődik az Aminopeptidáz N receptorhoz. Az NGR szekvencia beépítése és felhasználása különböző kémiai módosításokkal és más-más gyűrűzárási stratégiával készült peptid-származékokba lehetőséget ad különböző gyógyszerjelölt molekulák fejlesztésére és tesztelésére (például [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR), [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-c(NGR), [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1) vagy [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2)) (19). A tudományos szakirodalom által közölt vizsgálati eredmények alapján a hatásmechanizmus az APN/CD13 receptorhoz való specifikus kötődésen alapul.

3.2 Angiogenezis

Az emberi szervezetben két alapvető mechanizmus ismeretes a vérerek létrehozásának terén; a vaszkulogenezis és az angiogenezis. Ezek a fiziológiás folyamatok nélkülözhetetlenek az emberi test működéséhez.

A vaszkulogenezis során a vérerek képződése endoteliális őssejtekből (angioblasztokból) valósul meg. Ez egy dinamikus folyamatként írható le, mely során sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix (ECM) kölcsönhatások alakulnak ki. A folyamat regulációjában növekedési faktorok és morfogének vesznek részt. Carmeliet és munkatársai 2005-ös tanulmányukban a következő főbb lépéseket definiálták: a mezoderális őssejtek angioblasztokká differenciálódása, az angioblasztok endotél sejtekké történő differenciálódása (20). A vaszkulogenezis az embrió fejlődésben játszik szerepet és ez a folyamat indítja be - az egyedfejlődés során -, az első erek *de novo* kialakulását.

Az angiogenezis kifejezés a vérerek növekedését vagy az újak kialakulását foglalja magába a már meglévő erekből kiindulva (21). Fiziológiás körülmények között felnőtt egyedekben kétféle véredényképzés fordul elő; a csírázó angiogenezis (sprouting angiogenesis) és az intusszusceptív angiogenezis (intussusceptive angiogenesis). A felsorolt két fiziológiás folyamat az egyedfejlődéstől kezdve az egész életet végig kíséri. Jelentős szerepe van a reprodukciós folyamatokban, a gyógyulásban, a szövetek növekedésében és különböző betegségekben. A véredényképzés nagyon fontos folyamat, hiszen minden sejt/szövet oxigént igényel. Az oxigén forrása pedig a folyamat során képződő kapillárisokon keresztül maga a vér. Az angiogenezis mértékét/állapotát a szervezetben az adott sejt/szövet anyagcsere szükségletei határozzák meg.

A véredényképzés alul, illetve felülszabályozása különböző rendellenességeket okozhat. Az angiogenezis kiemelt jelentőséggel bír iszkémiás állapotokban, amikor a szöveti oxigén- és tápanyagellátás zavara következtében lokális hipoxiás mikrokörnyezet alakul ki. Ezen adaptív válasz során a szervezet kompenzációs mechanizmusokat aktivál, amelyek új kapillárisok képződését eredményezik a perfúzió helyreállítása érdekében. Az iszkémia indukálta hipoxia kulcsszerepet játszik az angiogén faktorok, így a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) és egyéb citokinek fokozott expressziójában, amelyek a neovaszkularizációt elősegítik. Alsó végtagi akut iszkémiában az angiogenezis kritikus a keringés javításában, a szöveti regenerációban és a funkcionális integritás fenntartásában. Ezzel szemben bizonyos kóros állapotokban, mint például a diabéteszes retinopátia, a fokozott angiogén aktivitás aberráns

éreképződéshez és szövődményekhez vezet, amelyek rontják a látásélességet és progresszív károsodást idéznek elő. Az angiogenezis pontos szabályozása ezért kulcsfontosságú terápiás célpont e betegségek kezelésében és megelőzésében.

A szabályzásban, ilyen kritikus kémiai tényezők például az angiogén szabályzó faktorok, a plazmin rendszer, a mátrix metalloproteinázok (MMP) vagy a metallopeptidázok. Ez egy igazán összetett, bonyolult folyamat, az ebben résztvevő főbb molekulákat, csoportosításukat és funkciójukat az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Angiogenezis szabályozásában résztvevő főbb molekulák és csoportosításuk (22) (23) (24)

Molekula	Csoport	Funkció
Fibroblaszt növekedési faktorok (FGF)	Szolubilis szabályozó faktor	Endoteliális sejtproliferáció Extracelluláris mátrix degradáció Endoteliális sejtek migrációja Junkcionális adhéziós molekulák modulálása
Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)	Szolubilis szabályozó faktor	Endoteliális sejtproliferáció Értágítás Metalloproteinázok stimulációja Plazminogén stimuláció
Angiopoietinek Ang-1, Ang-2, Ang-4	Szolubilis szabályozó faktor	1: Endotél sejtek migrációja, adhéziója 2: Ér destabilizáció 4: Glükóz transzporter expresszió
Vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF)	Szolubilis szabályozó faktor	Pericita toborzás
Transzformáló növekedési faktor (TGF)	Szolubilis szabályozó faktor	Alacsony koncentráció: Angiogenikus faktorok stimulációja Proteinázok stimulációja Magas koncentráció: Endotél sejt növekedés gátlás Bazálmembrán megújulásának serkentése Simaizomsejtek differenciációja
α V β 3 Integrinek α V β 5 Integrinek	Membrán kötött szabályozó faktor	Sejtmigráció Sejt proliferáció Túlélési faktor
VE cadherin	Membrán kötött szabályozó faktor	Sejtadhézió
Plazmin rendszer MMP-1, MMP-2, MMP-9	Plazmin rendszer Mátrix metalloproteináz	ECM komponenseinek degradálása Bazálmembrán Degradáció
APN/CD13	Metallopeptidáz	Enzimátikus fehérje hasítás Receptor funkció Jelátviteli funkció

Az angiogenezis stimulálása terápiás lehetőséget biztosít például a perifériás artériás betegség (PAD) (25) és az iszkémiás szívbetegség terén (26), azonban a proliferatív diabéteszes retinopátia (27), a különböző tumorkok (20) vagy a reumatoid arthritis esetén (28) a folyamat korlátozása lehet az ideális megközelítés.

3.2.1 Csírázó angiogenezis (sprouting angiogenesis)

Hillen és munkatársai 2007-ben közölt publikációjában a csírázó angiogenezist lényegében a meglévő vérerek elágazásaként definiálták. A folyamat lépései a kapilláris alapmembrán enzimikus lebontása, az endotél sejtek proliferációja az ECM-on keresztül az angiogén inger (például VEGF felszabadulás) felé történő migráció, a lumennel ellátott cső kialakítása, az erek egyesülése, továbbá az érhálózat kialakítása és végül az erek stabilizálás periciták toborzásával (22).

A folyamat több lépésben megy végbe, amelyet egy hipoxiás állapotban lévő sejt indít el (angiogén központ). Az angiogén ingerek a meglévő erek endotél sejtjeit proliferációra és permeabilitás növekedésre készítik. A stimulus hatására pro-angiogén növekedési faktorok szabadulnak fel, melyek segítik az endotél csúcssejt kialakulását, továbbá az extracelluláris mátrixon keresztül való kihajtását, így megalapozva az új kapilláris keletkezését. A csúcssejteket a rajtuk lévő filopodiáknak nevezett képződmények segítik, amelyek proteolitikus enzimeket szabadítanak fel, ezek célja, hogy utat hoznak létre az ECM-on keresztül. A csúcssejtek filopodiáival való kihajtása ugyancsak nagymértékben függ az adott szabályozó faktor koncentrációjától, melynek oka a magas receptor denzitás. A folyamat kibontakozásában a csúcssejtek előrehaladását az endotél szárisejtek követik és ennek a következménye az érkezdemény folyamatos hosszanti növekedése. Ezek a szárisejtek alkotják a kapilláris lumenét. Az angiogenezis végső stádiumában az érkezdeményt érett vaszkuláris alapmembrán fedi és periciták veszik körül ezzel védve, támogatva és stabilizálva azt. A folyamat eredményeként az adott területen lévő sejtek normoxiás állapotba kerülnek, ami az angiogén inger megszüntetését vonja maga után.

3.2.2 Intussuszceptív angiogenezis (intussusceptive angiogenesis)

Az intussuszceptív angiogenezis egy újabb, kevésbé feltérképezett jelenség (29), amelyet először a tüdőben mutattak ki. Ez egy dinamikus intravaszkuláris folyamatnak tekinthető, amely részt vesz a mikrokeringés nagymértékű struktúrális átformálásában. Makanya és munkatársai a mechanizmust a redundáns vagy a nem/kevésbé funkcionáló erek metszéseként, az elágazó erek egymástól viszonyított szögének módosításaként vagy a meglévő erek megkettőzéseként írják le (30). Ebben a folyamatban nincs endoteliális sejtburjánzás, pusztán egy ér kettéhasadása valósul meg a meglévő endoteliális sejtek átszerveződésével. A rendszerre jellemző szerkezeti egység az intussuszceptív pillér, amely egy hengeres mikrostruktúráként írható le. Működése során átíveli a kis erek és kapillárisok lumenét.

3.3 Aminopeptidáz N (APN/CD13)

Az aminopeptidáz N (APN, CD13) egy $Zn^{(2+)}$ -függő membránhoz kötött ektopeptidáz, amely elsősorban fehérjéket és peptideket bont le (31). Biológiai funkciói közzé tartozik, a peptidek enzimatis hasításán kívül, az endocitózis és a jelátvitel. Az enzim biológiai funkcióit és ismert hatásmechanizmusait az 6. táblázat tartalmazza. Dixon és munkatársai 1994-es publikációja szerint, a molekula számos különböző emberi sejtben expresszálódik, mint például a makrofágok, a simaizomsejtek és a fibroblasztok, ezen kívül fellelhető a vese állományában és a bélrendszer egyes részeiben (32).

Az APN-t először 1963-ban azonosították, majd összefüggést fedeztek fel a molekula túlzott expressziója és a különböző humán betegségek, például a tumorokban (33) vagy a miokardiális infarktuszban lejátszódó angiogenikus folyamatok között (34). Az ektopeptidáz nem fejeződik ki a normál érrendszer felületén, de magas a jelenléte az angiogenezis során.

A tudományos szakirodalom úgynevezett „moonlighting” enzimeként hivatkozik rá, az az több biológiai funkciót tölt be, továbbá hatásmechanizmusa szerteágazó, ami kihívást jelent az APN hatásmechanizmusain alapuló specifikus terápiák kidolgozásában (35).

6. táblázat: Aminopeptidáz N (APN/CD13) biológiai funkció és ismert hatásmechanizmusai (23)

Biológiai funkció	Hatásmechanizmus
	Peptidek enzimatis szabályozása
	Tumorsejt invázió
	Differenciáció
Peptidek enzimatis hasítása	Proliferáció
	Motilitás
	Kemotaxis
	Antigén prezentáció
Endocitózis	Virális receptor
	Koleszterol felvétel
Jelátvitel	Fagocytózis
	Adhézió
	Angiogenezis

3.3.1 Az aminopeptidáz N (APN, CD13) angiogenikus folyamatokban játszott szerepe

Az aminopeptidáz N (APN, CD13) három alapvető mechanizmussal vesz részt az angiogenikus folyamatokban, ezek a következők: az ECM fehérjéinek lebontása (36), az angiogén tulajdonságokkal rendelkező peptidek előállítás (37) és a jelátviteli folyamatok modulálása növekedési (38) illetve, angiogén szabályzó faktorok által (31).

Fukasawa és munkatársai szerint az APN/CD13 szelektíven kifejeződik a vaszkuláris endotél sejtekben, beleértve a humán köldökvénát és az aortát. Ezt a jelenséget a IV-es és az I-es típusú kollagén fibronectinnel kialakított kölcsönhatásainak tulajdonítják (39). Ezt a megfigyelést az is alátámasztja, hogy több *in vivo* kutatásban megfigyelték, hogy az NGR szekvenciához kapcsolva, bizonyos tumorelleses gyógyszereknek jelentősen megnövekedett az affinitása az érintett terület angiogén ereinek megcélzására (40) (41) (42).

A CD13 receptor jelenléte az ECM-ban, ugyancsak a kutatók érdeklődési körébe került. Itt azt az összefüggést tárták fel, hogy a hipoxia és az angiogén faktorok indukáló hatással vannak az APN/CD13 expressziójára, továbbá az enzimaktivitás-gátlók anti-angiogenikus hatásáról számoltak be *in vitro* (31).

Rangel és munkatársai 2007-ben közölt tanulmánya döntő bizonyítékokat szolgáltatott a kérdés tisztázásában, mivel a CD13-null egereken végzett kísérletek egyértelműen bebizonyították ennek a molekulának az angiogenezisben betöltött jelentőségét (43). Ezeknél a kísérleti állatoknál szignifikánsan csökkent a retina neovaszkularizációja az oxigén-indukált retinopátia következtében, valamint csökkent a növekedési faktorokra adott angiogén válasz mértéke. A kutatás eredményével összhangban megállapítható, hogy az egyik érintett mechanizmus a CD13 galektin-3-mal való asszociációjához kapcsolódik ECM-ban (44).

Sejtfelszíni receptorként játszott szerepét Pasquallini és munkatársai által közölt 1995-ös tanulmány részletezi először (45). A kutatás központjában Tumor-homing molekulák azonosítása szerepelt fág-display technikával. A molekula szekvenciális természetét tekintve nagy hasonlóságot mutat az RGD-hez (egy aminosavban különböznek). Az ezirányú kutatások a szekvencia gyógyszerjelöltként történő felhasználását tüzték ki további célul, ahol a hatékonyság növelése mellett a toxicitás csökkentése volt a cél (23) (42).

3.4 Vaszkuláris rendellenességek

Fiziológiai szempontból az emberi szervezet érrendszere felosztható makro- illetve mikrokeringési elemekre (46). A megkülönböztetés alapja lehet az adott terület hemodinamikai tulajdonsága, az érfal szerkezetének és működésének aspektusai, illetve az arterioláris átmérő, ami a mikrocirkuláció esetén 150 µm vagy annál kisebb, míg a makrocirkulációnál az említett értéknél nagyobb (47)(48).

A makro- illetve mikrokeringés károsodása gyakori következménye a kardiovaszkuláris rendszer betegségeinek, a metabolikus szindrómának vagy a 2-es típusú cukorbetegségnek (49).

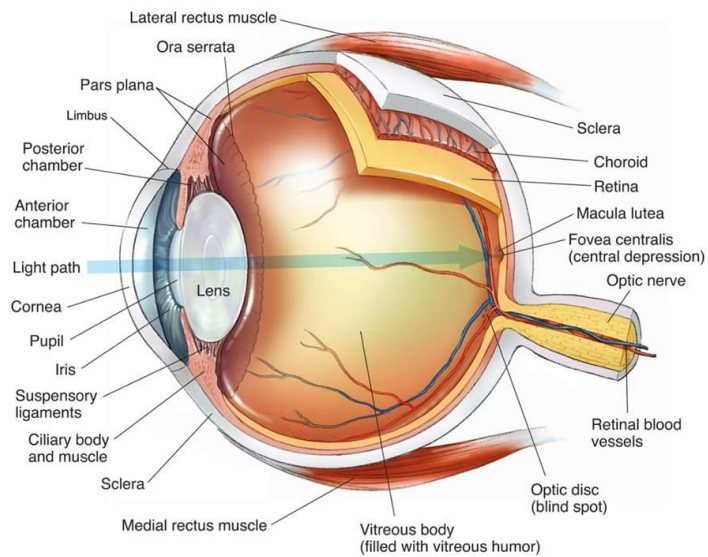
Chen és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a 2-es típusú cukorbetegség következtében fellépő PDR (proliferatív diabéteszes retinopátia) és PAD (perifériás artériás betegség) kialakulása között összefüggés van (50). Ennek oka lehet, hogy mindkét patofiziológiai állapot molekuláris hátterében a keringés iszkémia-reperfúziós károsodásai állnak (51) (52).

3.4.1 Proliferatív diabéteszes retinopátia

Az emberi szem (oculus humanus) a látás érzékszerve, alapvető makrokomponenseit a 4. ábra szemlélteti. Számos összetevőt tartalmaz, amelyek fiziológiai működése lehetővé teszi a vizuális érzékelést. Az ínhártya (sclera) a szemgolyó legkülső rétege. A bulbuszhoz a szemmozgató izmok is kapcsolódnak, ezek felelősek a szemmozgásokért. A szem elülső része a szaruhártya (cornea), amely egy átlátszó külső réteg, feladata az írisz és a pupilla védelme.

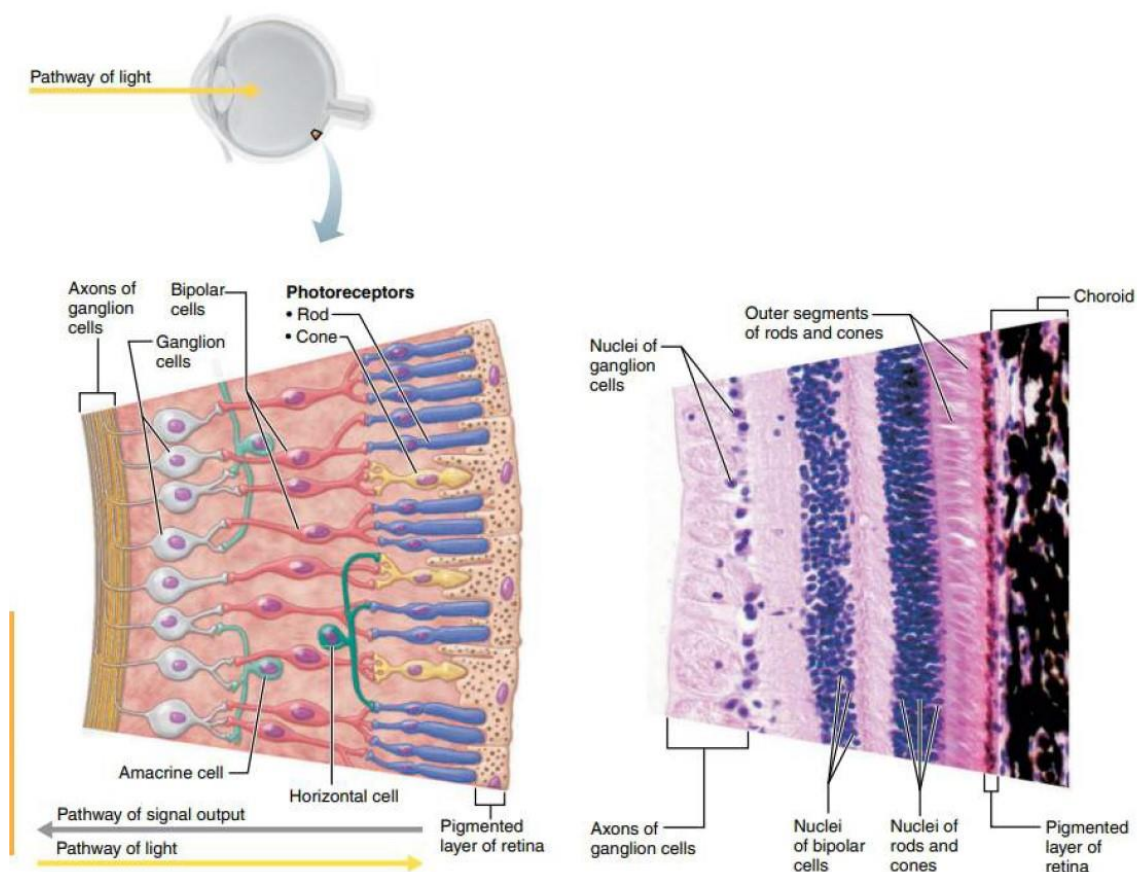
A szaruhártya, a csarnokvíz, a szemlencse és az üvegtest együttesen a szem törő közegei, amelyek biztosítják a fénysugarak fókuszálását a retinára. A szemlencse (lens crystallina) különösen fontos szerepet játszik a fénytörés finomhangolásában és az akkomodációban.

Az írisz a szem színes része, mely a pupilla méretének beállításával szabályozza a szembe jutó fény mennyiségét. Az írisz közepén helyezkedik el a pupilla, ami lehetővé teszi a fény bejutását a szembe. A retina a szem legbelső rétege, ez tartalmazza a fotoreceptor sejteket, az úgynevezett csapokat és pálcákat. Ezek a sejtek a fényt jelekké alakítják, amelyeket a látóidegen keresztül juttatnak el az agyba (53).



4. ábra: A szem anatómiai képletei (54)

A szembe bejutó fényt, mint ingert a fotoreceptorok transzformálják ingerületté. A jel az idegsejtek segítségével jut el az agyba, ahol a feldolgozás megtörténik. Az információ közvetítéséért a nervus opticus a felelős. A retina azon része, amelynél a látóideg kilép nem rendelkezik fotoreceptorokkal, ezt vakfoltnak nevezik. A retina a szem hátsó kétharmadát szegélyezi és felelős a vizuális képek fogadásáért. Mikroanatómiai struktúráit a 5. ábra szemlélteti.



5. ábra: A retina mikoratómiája (54)

A retina több sejtípusból és rétegből épül fel, ezek mindegyike egyedi funkcióval rendelkezik a látás folyamatában. Az ideghártya legkülső rétegét a fotoreceptorok alkotják. Ez a szegmens kétféle speciális sejtet tartalmaz, az úgynevezett csapokat és pálcákat. A retinális réteget a külső határoló membrán veszi körül, amelyet a külső nukleáris réteg követ, ez tartalmazza a fotoreceptorok sejttesteit. Ezután a külső plexiform réteg következik, ami a fotoreceptorok és a bipolaris sejtek közötti szinapszisokat tartalmazza. Ezt követi a belső nukleáris réteg, ami a bipolaris sejtek sejttesteit, valamint más típusú sejteket, beleértve a horizontális sejteket és amakrin sejteket foglalja magába. A következő, a belső plexiform réteg. Ez a bipolaris és a ganglionsejtek közötti szinapszisok helye. Ezután a ganglion sejtréteg következik. Végül az idegrostréteg zárja a sort, amelyben a ganglionsejtek axonjai találhatóak meg, ezek a szemből kilépve alakítják ki a látóideget (55).

A retina és az ínhártya között helyezkedik el az érhártya (choroidea), amely gazdag érhálózatával biztosítja a retina külső rétegeinek vérellátását és a megfelelő oxigén- valamint tápanyagellátást. Az érhártya szerepe kulcsfontosságú a fotoreceptorok metabolikus igényeinek kielégítésében.

A retina központi részén található a makula (macula lutea), amely a legnagyobb vizuális élességgel rendelkező területet képviseli. A makula sárgafolt elnevezése a lutein és zeaxantin pigmentek jelenlétére utal. A makula közepén helyezkedik el a fovea centralis, amely a legnagyobb fotoreceptor (csap) sűrűséggel rendelkezik, és a részletgazdag látásért felelős.

Ahogy a fenti leírás is szemlélteti a retina sejtszintű alkotói igen összetettek és sokfélék. A retinopátia ezen anatómiai régió betegségét jelenti, amelynek több típusa létezik, azonban mindegyik a látóhártya kis ereinek betegségével jár.

Diabéteszes retinopátia

A retinopátia leggyakoribb típusa a cukorbetegséggel kapcsolatos. Világviszonylatban 2020-ban a diabéteszes retinopátiában (DR) szenvedő betegek számát 103 millióra becsülték, azonban az előrejelzések szerint, 2045-re ez a szám 160 millióra fog emelkedni (56). A DR esetén a magas vércukorszint károsítja a retina ereit, aminek következtében folyadék vagy vér szivárog ki az intraokuláris térbe. Ez az ideghártya duzzanatához (makula ödéma) és/vagy kóros erek növekedéséhez vezethet. Ezt az állapotot proliferatív diabéteszes retinopátiának (PDR) nevezik.

A diabéteszes retinopátia patológiai folyamata több, egymást követő lépésben zajlik: először mikroaneurizmák alakulnak ki a retina kis ereiben, majd ezek az aneurizmák megrepedhetnek, aminek következtében pontszerű vérzések jönnek létre. Ezt követően a betegség progressziójával az érkárosodás és a retina oxigénhiánya fokozódik, ami az új, kóros erek (neovaszkularizáció) növekedését serkenti. Végző stádiumban ezek az új erek törékenyek és hajlamosak a vérzésre, hegszövetek képződésére és a retina szerkezetének deformálódására.

A diabéteszes retinopátia tünetei közé tartozik a homályos vagy elmosódott látáskép, az éjszakai látási nehézség és az úgynevezett lebegés (ez a látómezőben lebegni látszó foltok vagy húrok jelensége). Bizonyos esetekben tünetmentes, egészen addig amíg a betegség előrehaladott stádiumba nem lép.

Proliferatív retinopátia

A proliferatív retinopátia (PDR) a diabéteszes retinopátia egyik fajtája, amely akkor fordul elő, amikor rendellenes erek nőnek a retina felszínén, mely végül látásvesztéshez vezethet. A Yau és munkatársai által összeállított metaanalízis szerint, globális prevalenciája 7,5%-a cukorbetegség körében (57).

A diabéteszes retinopátia korai stádiumában a retinában lévő erek meggyengülhetnek és szivároghatnak, ami a folyadék felhalmozódását okozhatja a retinában, ez pedig a makulaödémának nevezett állapothoz vezethet. A betegség előrehaladtával a retina oxigén- és tápanyaghiánya új erek növekedését idézheti elő (angiogén inger), hogy kompenzálja a károsodást. Ezek az új erek azonban gyakran törékenyek, rendellenesek, és vért szivárogtathatnak az üvegtestbe. Ez látásromlást okozhat, ami végül hegesedéshez, továbbá a retina leválásához vezethet, ezáltal tartós vakságot idézhet elő.

A proliferatív retinopátia súlyos kór állapot. Általánosságban elmondható, hogy az elváltozás azonnali kezelést igényel. A betegség terápia magában foglalhatja a lézeres fotokoagulációt, melynek célja a rendellenes erek roncsolása és a további növekedés megakadályozása a látásvesztés megelőzésére érdekében. Egyes esetekben intravitreális anti-VEGF injekció is szükséges lehet. Súlyos esetekben vitrectomiás műtét lehet indokolt, ami során az üvegtest gél és a hegszövet eltávolítása történik meg, amelyet sóoldattal helyettesítenek (58).

3.4.2 Akut alsó végtagi iszkémia

A perifériás artériás betegség (PAD) a végtagok makro- illetve mikrokeringési betegsége. A kórállapot leginkább az alsó végtagok érzékületét jelenti. Négy alkategóriába osztható: tünetmentes, claudicatio, kritikus végtag- iszkémia (CLI) és akut végtag-iszkémia (ALI) (59).

Az akut alsó végtagi iszkémia (ALI) egy hirtelen fellépő érrendszeri krízis. A kórfolyamatban a láb véráramlásának akut elzáródása következik be. Klasszifikációját tekintve akut iszkémiának minősül az az eset, amelynek tünetei 14 napon belül jelentkeznek, míg a 14 napot meghaladó fennállás esetén már subakut állapotról beszélünk. Az ALI előfordulása körülbelül százötvenmillió fő évente. A kórállapot mind a végtag megmentése, mind a túlélés szempontjából rossz prognózisú. Megfelelő kezelés hiányában 10-15%-os amputációs-, továbbá 15-20%-os halálozási-arányról számoltak be (60).

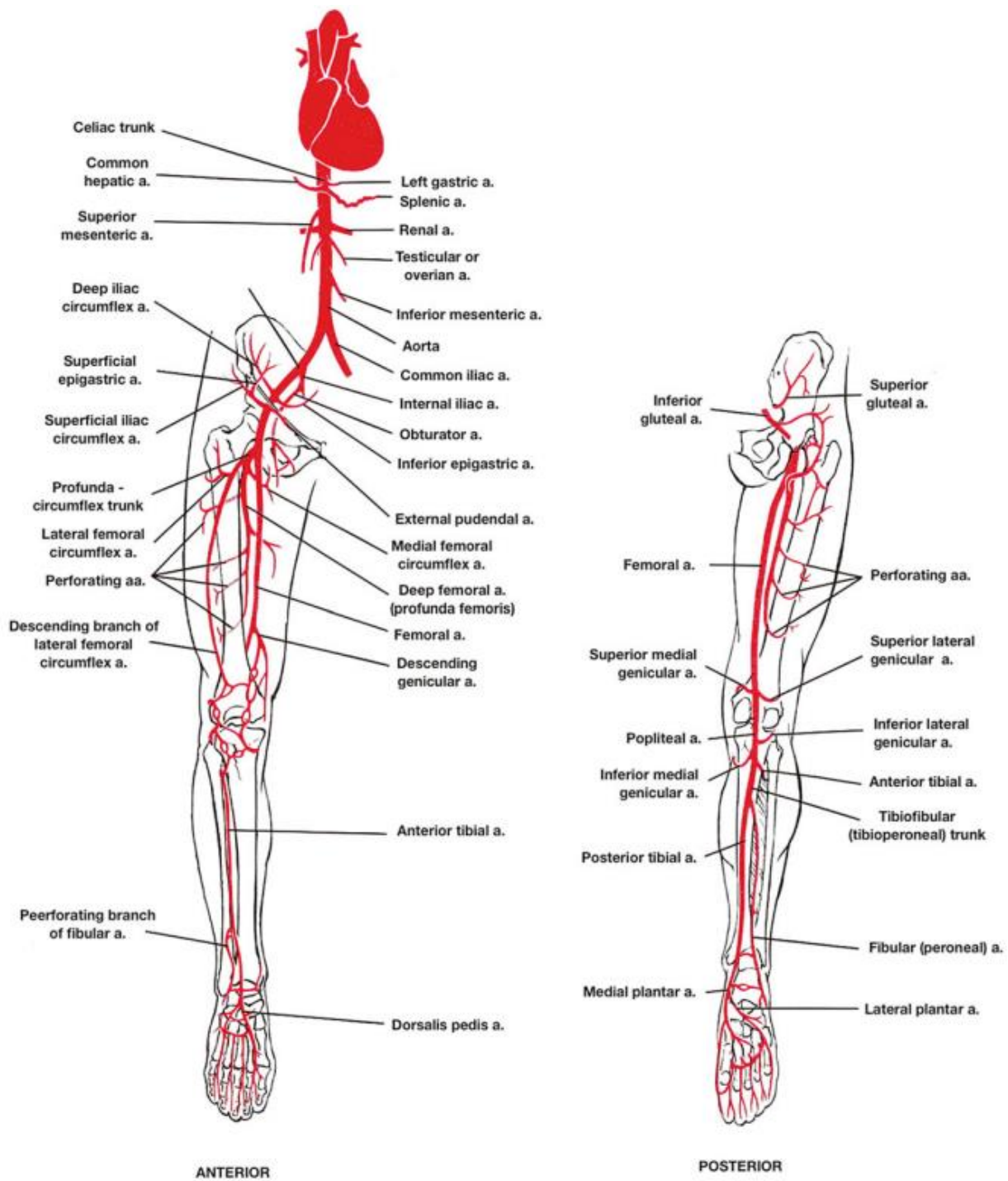
Az ALI jellemző okai az embóliára vagy a trombózisra vezethetőek vissza. A trombózis arteroszklerotikus jellegű, míg az embólia általában kardiovaszkuláris eredetű. Az ALI klasszikus tünetei 6P-ként ismertek: fájdalom, sápadtság, bénulás, paresztézia, pulzustalanság, poikilotermia (61). Az ALI súlyosságát a Fontaine és a Rutherford-osztályozás alapján becsülik meg (7. táblázat).

7. táblázat: A perifériás verőérbetegség klasszifikációja a klinikai jelek szerint (62)

Fontaine féle		Rutherford féle		
Stádium	Klinikai állapot	Fokozat	Kategória	Klinikai állapot
I.	Panaszmentes	0.	0.	Panaszmentes
II.a	Enyhe CI (DT:>200m)	I.	1.	Enyhe CI
II.b	kp. Súlyos (DT 50-200m)	I.	2.	kp. Súlyos
	Súlyos CI	I.	3.	Súlyos CI
III	Nyugalmi fájdalom	II.	4.	Nyugalmi fájdalom
		III.	5.	Kis szöveti károsodás
IV	Ulcus/gangrena	IV.	6.	Nagy szöveti károsodás

Rövidítések: CI= claudicatio intermittens, DT:dysbasias távolság

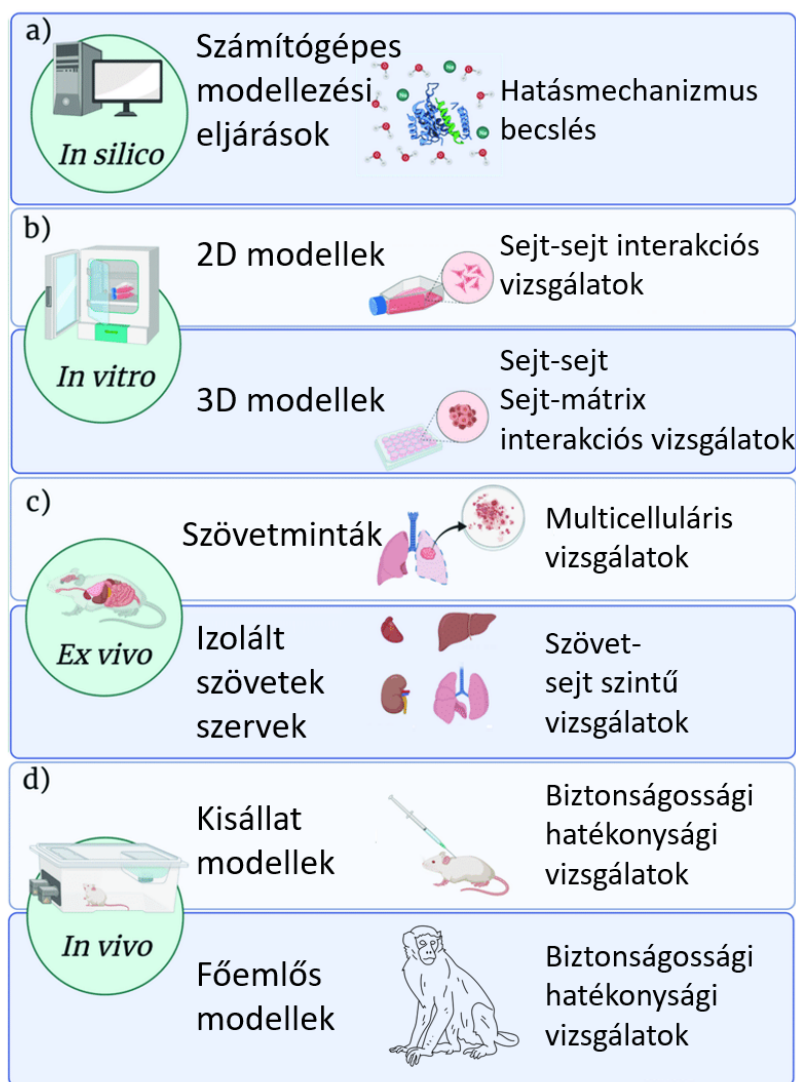
A felosztás anatómiai megközelítését az angioszóma koncepció reprezentálja a legpontosabban, miszerint az alsó végtagot különálló háromdimenziós szövetblokkokra osztja, amelyeket a forrásartériák táplálnak (63). A láb angioszómáit a három fő artéria különböző ágai határozzák meg (6. ábra) (64) (65). Az elülső tibiális artéria (anterior tibial a.) a lábszárat látja el és az elülső bokát, mely a dorsalis pedisbe a.-ba fordul, és ezt követően látja el a láb hátsó szegmensét. A hátsó tibiális artéria (posterior tibial a.) látja el a sarkot a calcaneális artérián, a lábfejet a mediális talpi artérián keresztül, míg az oldalsó artéria talpi a laterális lábközépet és az elülső lábfejet. A peroneális artéria két szegmensre szakad le, amelyek az elülső perforáló ág, ez a boka laterális elülső részét és a calcanealis ág, ami a sarok talpi részét látja el (66). Az angioszómák fontos hatással bírnak a plasztikai és helyreállító sebészet, a sebgyógyulás és a végtagmentés területén. Az egyes angioszómák anatómiájának és perfúziójának megértésével a sebészek jobban meg tudják tervezni a műtéteket ezáltal hatékonyabban biztosítják a rekonstruálandó szövetek megfelelő vérellátását. A koncepció ideális megközelítés a revaszkularizációs eljárásokkal kapcsolatos döntések meghozatalában a PAD-ban vagy más érrendszeri betegségben szenvedő betegeknél.



6. ábra: Az alsó végtag artériái forrás Basic Human Anatomy. O’Rahilly, Müller, Carpenter and Swenson (<http://www.dartmouth.edu/~humananatomy>) (67)

3.5 *In vivo* kísérlet modellek a preklinikai képalkotó kutatásokban

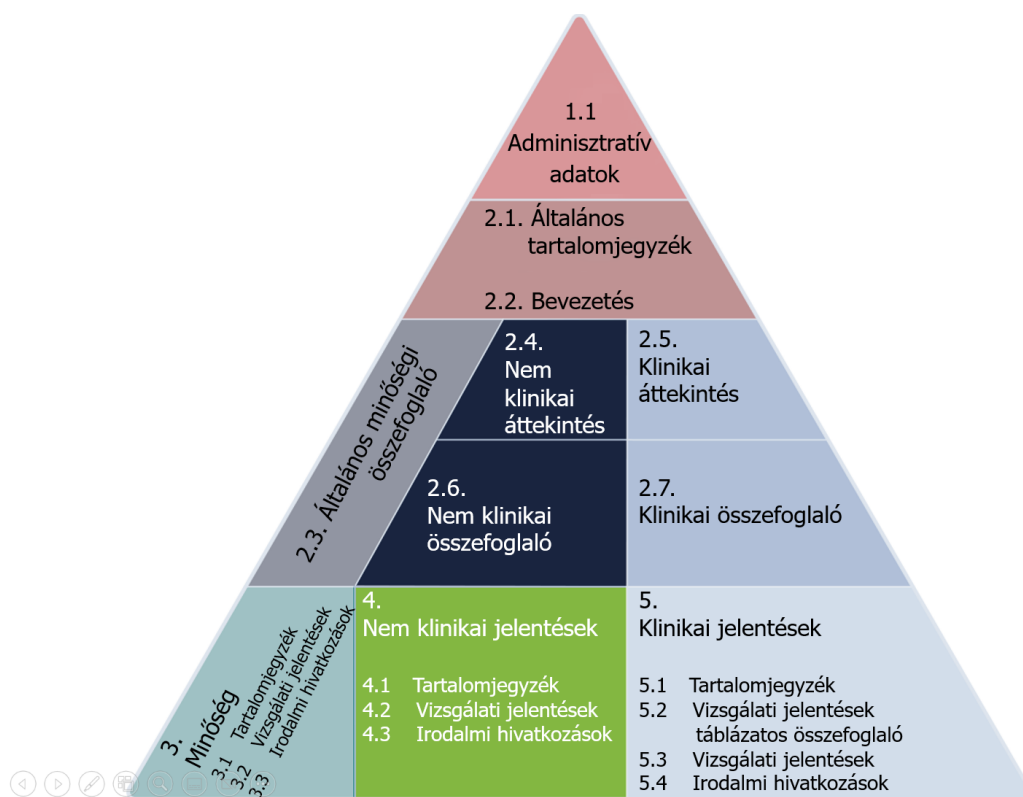
A preklinikai vizsgálatok megvalósulásának főbb platformjai az *in silico*, az *in vitro*, az *ex vivo* és az *in vivo* modellek (7. ábra).



7. ábra: Az *in silico*, az *in vitro*, az *ex vivo* és az *in vivo* modellek (68);

Az *in silico* modellek a kísérletet számítógépes szimulációval valósítják meg, például a gyógyszerjelölt molekulák hatásmechanizmus becslése esetén. Az *in vitro* kísérleti technikák jellemzően 2 vagy 3 dimenziós, nem az élő szervezetben, hanem azon kívül, ellenőrzött körülmények között lezajló, például Petri-csészében megvalósított kísérletek. Az *ex vivo* kifejezés olyan metodikákra utal, amelyeket egy a szervezetből eltávolított szövetmintán vagy izolált szöveten, szerven hajtanak végre, a homeosztázis mesterséges fenntartása mellett. Az *in*

vivo kollokáció egyed szinten, az élő szervezeteken megvalósuló, leggyakrabban állatokon végrehajtott vizsgálatok gyűjtőfogalma. Ezen vizsgálati csoportok pontosabb definiálása a gyógyszerfejlesztés különböző fázisainak speciális aspektusai szerint nyer értelmet (8. ábra).



8. ábra: A gyógyszerfejlesztés különböző fázisainak speciális aspektusai* (69)

*A fehér betűtípussal jelölt modulok kapcsolódnak a preklinikai kutatásokhoz. (CTD 2.4, 2.6, 4 részek)

A preklinikai (nem klinikai) kutatások célja alapvető információk megszerzése és áttekinthető formátumban történő közlése egy gyógyszerjelölt molekula biztonságosságáról és hatékonyságáról, mielőtt azt klinikai vizsgálatoknak vetnék alá. Ezen vizsgálatokat a helyes laboratóriumi gyakorlat (GLP) iránymutatásai alapján végzik. Ennek feladata egy olyan minőségügyi rendszer életre hívása, amely biztosítja az eredmények megbízhatóságát és reprodukálhatóságát. A gyógyszeripart szabályozó jelentős szervezetek, mint például az Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal (FDA, Amerikai Egyesült Államok) vagy az Európai Gyógyszerügynökség (EMA, Európai Unió) megköveteli a preklinikai adatok publikálását a klinikai vizsgálati készítmény engedélyeztetési eljárása során, különös tekintettel a toxikus hatásokra, a biztonsági profilra, a farmakokinetikára és a farmakodinámiára (70). Ezen vizsgálatokból származó adatoknak pontosnak és megbízhatónak kell lenniük továbbá a célpopuláció tekintetében a legalkalmasabb modellen kell alapulniuk az aktuális tudományos és regulációs irányelvek igényei szerint (71).

3.5.1 A 3 R érvényesülése az *in vivo* preklinikai képkötő kutatásokban

Az *in vivo* preklinikai képkötő kutatások legnagyobb mennyiségben kisállatokat, legfőképpen rágcsálókat (egereket és patkányokat) alkalmaznak a gyógyszerfejlesztés korai szakaszaiban. Ennek megfelelően az állatok felhasználásának hatékonyságát javító és az állatok számát csökkentő módszerek kidolgozása és megvalósítása kiemelten fontos terület (72). Ezen elvek összességének érvényesülése a képkötés viszonylatában lehetővé teszi a kísérlet leghelyesebb és leghumánusabb végpontjainak definiálását, ami az *in vivo* preklinikai modellek időbeli és térbeli nyomon követésén keresztül valósítható meg. A szükségtelen stressz minimalizálása a kísérlet során csökkenti az eredmények statisztikai szórását és a szükséges állatok számát. Ezen alapelv három elemi pillére: a Helyettesítés, a Csökkentés és a Tökéletesítés (73).

Helyettesítés

A helyettesítés gyakran egy élőlény (általában gerinces állat) helyett élettelen rendszer felhasználását jelenti. A helyettesítési stratégiák jellemzően a következő főbb alternatívái az *in silico* metódusok, például szimulációk lefuttatása, továbbá az *in vitro* módszerek, például az izolált szervek, a szövetminták és a sejtkultúrák felhasználása. A felsoroltakon kívül értelmezhető az érző lények (általában gerincesek) alacsonyabb rendű állatokkal (általában gerinctelenekkel) való helyettesítéseiként is.

Csökkentés

A csökkentés azon elv érvényesülését jelenti, amely a vizsgálatonként felhasznált állatok számát minimálisra redukálja. Ez a statisztikai elemszám meghatározáson alapuló megfelelő kísérlet tervezéssel, a szofisztikált adatelemzéssel, továbbá a változók számának csökkentésével, például standardizált műtéti módszerek, tápok, genetikailag homogén állatok alkalmazásával érhető el. A csökkentésre való törekedés egyik elegáns módszere a korábban már publikált tanulmányok felhasználása, amellyel elkerülhető a tudományos szakirodalomból már ismert adatok szükségtelen és ismételt megszerzése. A modern *in vivo* non-invazív képkötő technikák is értelmezhetőek a csökkentés eszközeként, hiszen az információ/állat hányados jelentősen nagyobb, mint a beavatkozással járó/invazív eljárások esetén (74).

Tökéletesítés

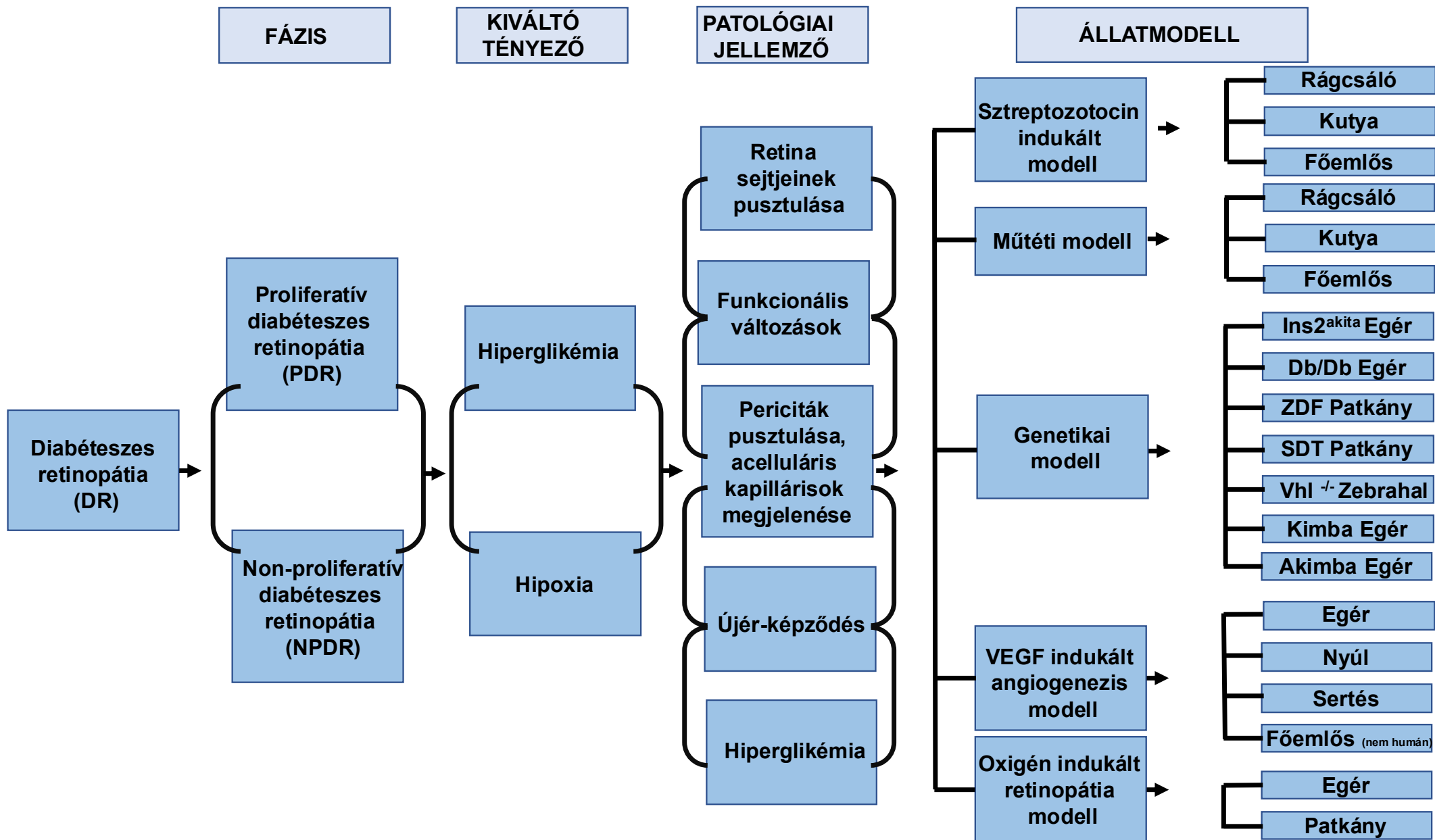
A tökéletesítés az adott kísérlet bizonyos paramétereinek megváltoztatását jelenti, az állatokat ért ártalmak minimalizálása érdekében. Az esetek legnagyobb részében az állatok számának további csökkenését tűzi ki célul, amit a humánus végpontok helyes megállapításával, a vizsgálatban nem invazív módszerek felhasználásával, továbbá a helyes preventív, peri- és posztoperatív fájdalomcsillapító protokollok alkalmazásával valósít meg. További eszközként szerepelhet az állatok megfelelő elhelyezése és a környezetgazdagítás (búvóhely, fészkelőhely, játékszer biztosítása) ezzel kielégítve az állatok igényeit, csökkentve azok szorongását.

3.6 Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell

A diabéteszes retinopátia (DR) kutatásában a rágcsálók a legnagyobb volumenben felhasznált modellek, bár magasabb rendű állatok - mint például a kutyák -, esetén hozhatóak létre az emberi kórállapothoz morfológiai szempontból leginkább hasonlatos retina elváltozások. A főemlősöknél is kialakulhat a spontán cukorbetegség, így ezen modellek a legalkalmasabbak a retina neovaszkuláris típusú (PDR) szövődményeinek szimulálására (75). Jelenleg nincs olyan modell, amely teljes mértékben alkalmas lenne az emberi DR egyes szakaszaiban fellépő neuronális és vaszkuláris elváltozások szimulálására, mindazonáltal a modellek sokfélesége és a kórállapot anatómiai/molekuláris szintű ismerete lehetőséget teremt az egyes aspektusok helyes tanulmányozására (9. ábra).

A központi retinális artéria elzárása (CRAO)

A központi retinális artéria elzárása módszer (CRAO) alkalmas a teljes belső retina iszkémia kiváltására (76). A modellt a retina iszkémia-reperfúziós indukálására használták különböző állatfajokban. Hayreh és munkatársai 1980-ban közölt tanulmányában átmeneti CRAO-t idézett elő rhesus majmokban a központi retina artéria különböző időtartamú megszorításával (77). A fentiekben részletezett metodika különböző állatmodellekben alkalmazható. Prasad és munkatársai műtéti módszerrel egy hurkot helyeztek el a szemgolyó mögé, majd a véráramlást akadályozzák a képlet meghúzásával (78). A rendszer alkalmas a DR neovaszkularizációs folyamatainak szimulálására (79) (80) (81) (82).



9. ábra: A diabéteszes retinopátia állatmodelljei a kórélettani fázisok és sajátosságok szerint (76) (83)

3.7 Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell

A rágszáló hátsó végtag-iszkémia a leggyakrabban használt preklinikai modell a perifériás artériás betegség (PAD) és az akut végtag-iszkémia (ALI) tanulmányozására. Ezek a módszerek alkalmasak a neovaszkularizáció mechanizmusainak vizsgálatára. A szakirodalom számos változatot alkalmaz, az elzáródás módjától, idejétől egészen a pozicionálásig a hátsó végtag iszkémiájának előidézése céljából.

Az iszkémia-reperfúzió előidézésének módja invazív illetve non-invazív módokon valósítható meg. Az invazív módszer jellemzően sebészeti úton vagy elektrokoagulációs technikával kiváltott iliális vagy femorális artéria elzárást takar (84), míg a nem invazív módszer a hátsó végtag köré helyezett gumiszalag segítségével váltja ki a kívánt hatást.

Aref és munkatársai 2019-ben közölt tanulmánya szerint, a tourniquet rágszáló hátsó végtag modell a cukorbetegség PAD-ra és ALI-ra gyakorolt hatásának, valamint az eNOS (nitrogén-monoxid szintáz), a VEGF és az angiogenezis ebben az összefüggésben betöltött lehetséges szerepének tanulmányozására használatos (85).

Abdel-Hamed és munkatársainak kutatásai során arra a következtetésre jutottak, hogy az érszorító patkány hátsó végtag modell segítségével az eNOS aktivitása diabetesben károsodott, ami hozzájárulhat a véráramlás csökkenéséhez és a végtagok szövetkárosodásához. Ez arra utal, hogy az eNOS aktiválása potenciális célpont lehet PAD-ban vagy ALI-ban szenvedő cukorbeteg kezelésében, ezáltal a modell ideális különböző antioxidáns terápia tesztelésére (86).

A VEGF-et és az angiogenezist a cukorbetegség és a PAD/ALI összefüggésében is vizsgálták érszorító patkány hátsó végtag modellben. Tanulmányok kimutatták, hogy a VEGF-terápia és más angiogenezist elősegítő szerek javíthatják a véráramlást, valamint csökkenthetik a szövetkárosodást PAD-ban vagy ALI-ban szenvedő, diabéteszes patkányokban (87).

Összességében az érszorító patkány hátsó végtag modell értékes eszköznél bizonyult a PAD és az ALI patofiziológiájának vizsgálatában a cukorbetegség összefüggésében, valamint az eNOS-t, VEGF-et és angiogenezist célzó lehetséges terápia értékelésében. Azonban, mint minden állatmodell esetében, itt is fontos, hogy ezt a modellt etikusan és az érintett állatok jólétének figyelembevételével használják.

4. Célkitűzés

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

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

A kitűzött célokat két projekt formájában valósítottuk meg:

Projekt 1:

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

Projekt 2:

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

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

5. Anyagok és módszerek

5.1 Radiokémia

A projektekhez a radiofarmakonok előállítása a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Nukleáris Medicina nem önálló Tanszék radiokémiai laboratóriumában valósult meg. A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ szintéziséhez a szükséges radioizotópot GalliaPharm[®] $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátorral állítottuk elő (Eckert & Ziegler Radiopharma Németország) (10. ábra).



10. ábra: GalliaPharm[®] $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátor (88)

Az elúciót 5 ml ultratiszta 0,1 M HCl oldattal (ABX, Németország) hajtottuk végre, maximum 4 m/perces áramlási sebességgel. A radionuklidot tartalmazó oldatot frakcionált módon gyűjtöttük, az 1,8-3,0 ml (összesen 1,2 ml) közötti részt használtuk fel a jelöléshez. A reakcióelegyek pH-ját ~4-re állítottuk be 0,16 ml (1 M) ultra tiszta nátrium-acetáttal felhasználásával.

A szintézisekhez 1 ml térfogategységnyi $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ -ot használtunk fel (≈ 300 MBq).

A radiogyógyszer előállítása előtt a generátort legfeljebb 30 órával korábban eluáltuk, hogy a Zn^{2+} ionok mennyiségét (ami a ^{68}Ga bomlásterméke) alacsony szinten tartsuk. A művelet után 14 órával valósult meg a ^{68}Ge és a ^{68}Ga nuklidok egyensúlya, ami a feltétele a maximális izotóp kihozatalnak.

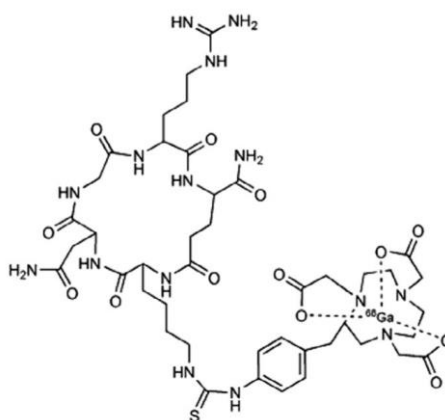
5.1.1 [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) szintézise

Reakcióedénynek egy 5ml térfogatú Eppendorf csövet használtunk, az előző pontban ismertetett 1000 µl térfogatú [⁶⁸Ga]GaCl₃-ot ebbe mértük be. A prekursor bemérése után (3 mM, 5 µl) (NOTA-c(NGR)) a reakcióelegyet az 8. táblázatban részletezett körülmények között inkubáltuk.

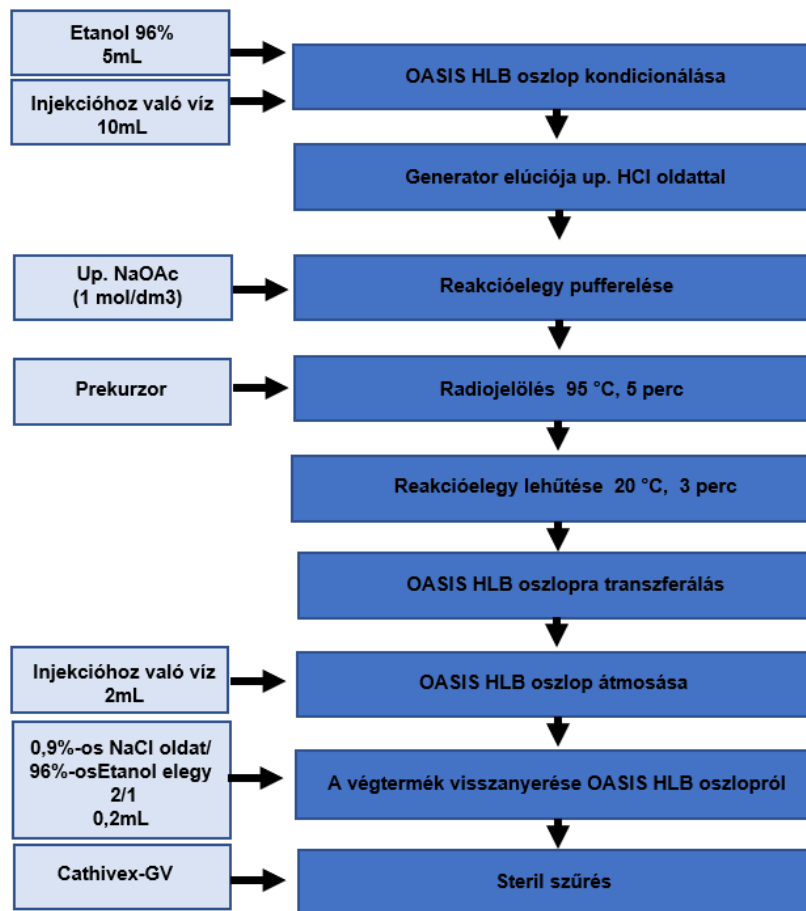
8. táblázat: [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) inkubálásának paraméterei

Inkubációs idő	Hőmérséklet
5 perc	95 °C

Az inkubációs idő letelte után a reakcióelegyet szobahőmérsékleten (20°C) 3 percig állni hagytuk, majd egy a szintézist megelőzően aktivált OASIS HLB 1 cc 30 mg töltettérfogatú oszlopon juttattuk keresztül (aktiválás: 5 ml 96%-os EtOH (etanol), majd 10 ml injekcióhoz való vízzel történő mosás). A cartridge-en megkötött radioaktív reakcióterméket 2 ml injekcióhoz való vízzel (B.BRAUN, Magyarország) tisztítottuk az esetlegesen jelenlévő fémzennyezők és a nem komplexált szabad ⁶⁸Ga eltávolítása érdekében. [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t 0,2 ml 0,9%-os nátrium klorid oldat (Fresenius Kabi, Németország)/96%-os etanol (Merck, Németország)/2:1 térfogategység arányú elegyével eluáltuk egy 1ml térfogatú Eppendorf csőbe. A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t ezután steril szűrtük (Cathivex®-GV, Merck, Németország) és elosztottuk, majd a további vizsgálatok érdekében hígítottuk, hogy az etanol koncentrációját 10% alá csökkentsük. A molekula szerkezetét az 11. ábra szemlélteti. A folyamat főbb lépéseit és kritikus paramétereit az 12. ábra foglalja össze.



11. ábra: [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) molekula szerkezete



12. ábra: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ előállításának főbb lépései és kritikus paraméterei

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ minőségellenőrzése

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ monográfiája nem szerepel az európai gyógyszerkönyvben így a Máté Gábor és munkatársai által közölt minőségi paramétereket és módszereket vettük alapul (89). A minőségellenőrzéshez tartozó specifikációkat az 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat: A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) specifikációi

Tulajdonság	Követelmény
Mechanikai szennyező, szálvizsgálat	tiszta, szálmentes, színtelen
pH	5 – 8
Specifikus aktivitás	≥5 GBq/μmol
Radiokémiai tisztaság (HPLC)	≥95%
Radiokémiai tisztaság (TLC)	≥95%
Etanol-tartalom	<10%

5.1.2 [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ szintézise

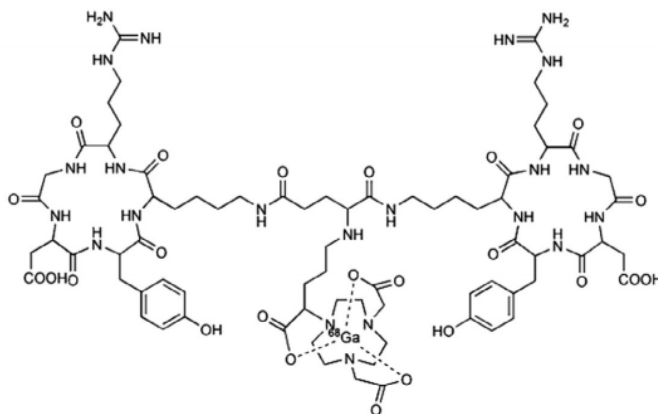
Reakcióedénynek egy 5ml térfogatú Eppendorf csövet használtunk. Az előző pontban leírt, 1000 μl térfogatú [⁶⁸Ga]GaCl₃-ot ebbe mértük be. A prekursor bemérése után (3 mM, 5 μl) (NODAGA-[c(RGD)]₂) a reakcióelegyet az 10. táblázatban részletezett körülmények között inkubáltuk.

10. táblázat: [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ inkubálásának paraméterei

Inkubációs idő	Hőmérséklet
5 perc	95 °C

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

Eppendorf csőbe. A radiojelzett molekulát ezután steril szűrtük (Cathivex®-GV, Merck, Németország) és elosztottuk. A folyamat főbb lépéseit és kritikus paramétereit az 12. ábra foglalja össze. A molekula szerkezetét az 13. ábra szemlélteti.



13. ábra: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)}_2$ molekula szerkezete

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)}_2$ minőségellenőrzése

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)}_2$ monográfiája nem szerepel az európai gyógyszerkönyvben így ugyancsak a Máté Gábor és munkatársai által közölt minőségi paramétereket és módszereket vettük alapul (89). A minőségellenőrzéshez tartozó specifikációkat az 11. táblázat foglalja össze.

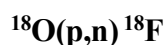
11. táblázat: A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)}_2$ specifikációi

Tulajdonság	Követelmény
Mechanikai szennyező, szálvizsgálat	tiszta, szálmentes, színtelen
pH	5 – 8
Specifikus aktivitás	$\geq 5 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$
Radiokémiai tisztaság (HPLC)	$\geq 95\%$
Radiokémiai tisztaság (TLC)	$\geq 95\%$
Etanol-tartalom	$< 10\%$

5.1.3 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz szintézise

¹⁸F radionuklid előállítása

A [¹⁸F]F⁻ radionuklid előállítása a következő magreakció felhasználásával történik:



A célszubsztancia legalább 95% vagy annál nagyobb dúsítási fokú [¹⁸O]víz. A besugárzást a Nukleáris Medicina PETTRACE 2132402 típusú részecskegyorsítóján végeztük. A besugárzás paramétereit az igényelt aktivitás nagysága, valamint a magreakció hozama szabja meg. A magreakció hozama ezen a gyorsítón 3,3±0,3 GBq/μAh.

A besugárzott [¹⁸F]F⁻ iont tartalmazó vizet – nagy tisztaságú hélium gáz segítségével – a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Nukleáris Medicina nem önálló Tanszéken elhelyezett SB2S típusú dupla szintézis fülkében lévő automata szintézismodulba juttattuk további szintetikus lépések megvalósításának céljából.

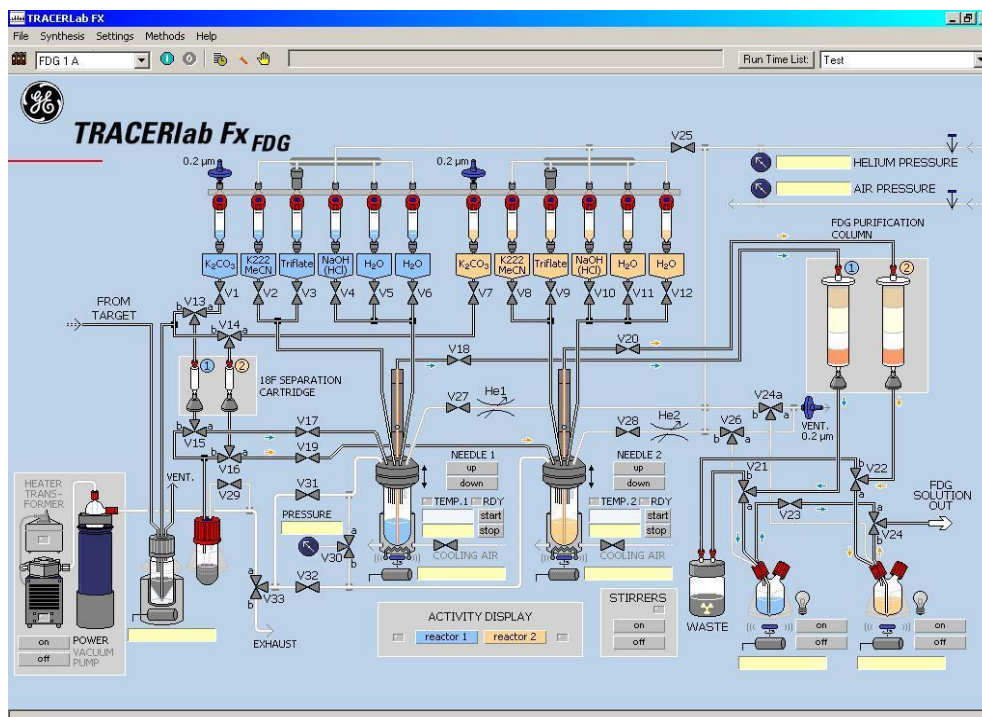
A [¹⁸F]F⁻ előállítása az 12. táblázatban szereplő paraméterek alkalmazásával történik:

12. táblázat: 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz előállításának ciklotron műveleti paraméterei

Tulajdonság	Követelmény
Ciklotron	PETTRACE 2132402
Nyaláb energia	16,4 MeV
Nyalábáram	60-70 μA
Besugárzási idő	30-120 perc
A besugárzandó dúsított víz térfogata	2-2,5 ml

2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz szintézise

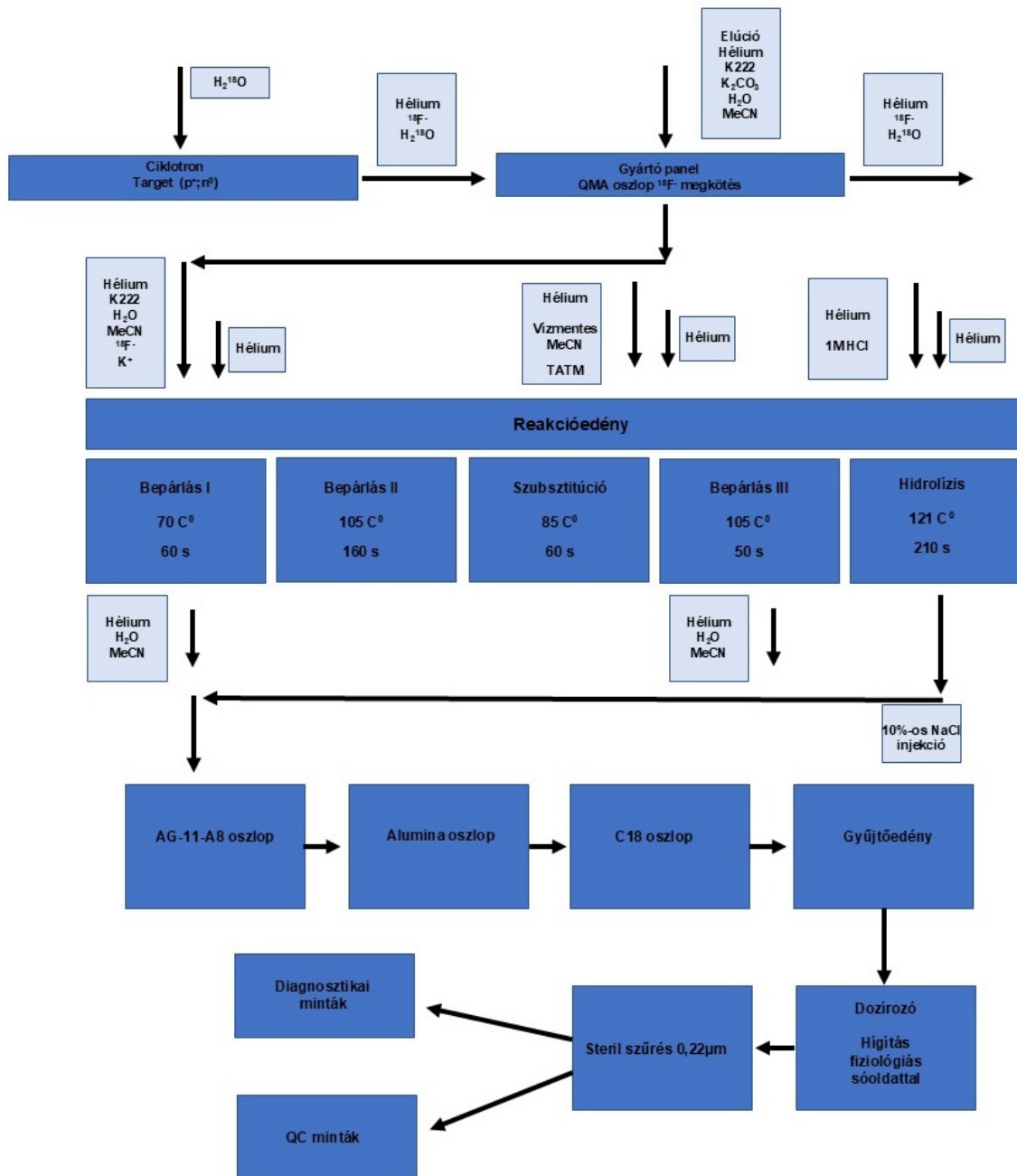
A 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz-t a GE Tracerlab FX FDG Synthesizer (GE, USA) szintézispanellel állítottuk elő, amely magában integrálja a jelzési reakció és a kémiai tisztítás folyamatait. A berendezést *Tracerlab FX* programmal (GE, USA) lehet vezérelni, amelynek a vezérlőfelületét és a szintézispanel sematikus felépítését az 14. ábra szemlélteti.



14. ábra: Tracerlab FX program vezérlőfelülete és a szintézispanel sematikus felépítése

A folyamat első lépéseként dúsított vízzel bevitt aktív $[^{18}\text{F}]$ fluor az erre a célra kialakított edénybe került. A szintézisprogram indításával a panelre helyezett QMA (WATERS, USA) ioncserélő oszlopon vákuum segítségével megkötődött a $[^{18}\text{F}]$ fluor. A QMA ioncserélő oszlopról a megkötött $[^{18}\text{F}]$ fluor-t ionos elúcióval K_2CO_3 -al (SigmaAldrich, USA) választottuk le és a reakcióedénybe juttattuk. Ahhoz, hogy a prekursor (ABX, Németország) molekulában a szubsztitúció végbe mehessen, a $[^{18}\text{F}]$ fluor-t szerves oldószerben oldhatóvá kellett tenni Kriptofix 2.2.2 (Merck, Németország) segítségével. Ezután a vízmentes acetonitrilben (SigmaAldrich, USA) feloldott prekursor molekulát bejuttattuk a reakcióedénybe, ahol kontrollált körülmények között (hőmérséklet, nyomás) és megfelelő idő alatt lejátszódott a szubsztitúció, melynek során a TATM molekula triflát csoportja aktív fluorra cserélődött. Ezután a végtermékben a nem kívánatos szerves oldószert eltávolítottuk a reaktorból. Oldószertmentesítés után az acetyl-csoportokat savas közegben hidrolizáltuk, majd a vizes elegyet egy oszlop- és töltetsoron tisztítottuk. A szintetizált $[^{18}\text{F}]$ FDG oldatot steril szűrőn keresztül (Millex-GV, SigmaAldrich, USA) ampullákba juttattuk, amelyeket vizsgálati célra elkülönítettünk.

A folyamat főbb lépései és ennek megfelelően az $[^{18}\text{F}]$ FDG gyártó program pontjait az 15. ábra szemlélteti.



15. ábra: A $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ gyártásának folyamatábrája

2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz minőségellenőrzése

2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz a Debreceni Egyetemen humán gyógyszergyártó tevékenység okán európai gyógyszerkönyvi minőségben elérhető. A minőségellenőrzéshez tartozó specifikációkat az 13. táblázat foglalja össze.

13. táblázat: A 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz specifikációi (6)

Tulajdonság	Követelmény
Mechanikai szennyező, szálvizsgálat	tiszta, szálmentes, színtelen vagy enyhén sárgás
pH	5 – 8
Radionuklidos azonosság [¹⁸ F]	energia csúcs: 511±0,5 keV
Felezési idő meghatározás	109,7 min ±5%
Radiokémiai azonosság ([¹⁸ F]FDG)	eltérés a referencia anyagtól ±5%
Radioaktív koncentráció	37 - 2590 MBq/ml
Radionuklidos tisztaság	Szennyező radionuklid: max 0,1%
Radiokémiai tisztaság (HPLC)	≥95% [¹⁸ F]FDG+[¹⁸ F]FDM ≤10% [¹⁸ F]FDM (a [¹⁸ F]FDG és a [¹⁸ F]FDM együttes radioaktivitásához viszonyítva)
Radiokémiai tisztaság (TLC)	≥ 95% [¹⁸ F]FDG+[¹⁸ F]FDM ≤5% [¹⁸ F]F+Ac-[¹⁸ F]FDG/Ac-[¹⁸ F]FDM
Kriptofix	<275 µg/ml
2-fluor-2-dezoxi-D-glükóz	≤62.5 µg/ml FDG
2-klór-2-dezoxi-D-glükóz	≤62.5 µg/ml CIDG
Oldószerma-radvány	Acetonitril:0,5125 mg/ml Aceton:6,25 mg/ml
Etanol-tartalom:	0,8-6,25 mg/ml
Sterilitás	steril
Bakteriális endotoxin	<20,6 EU/ml

5.2 MiniPET-II kisállat PET kamera

A PET vizsgálatokat a MiniPET-II kisállat PET kamera (Debreceni Egyetem, Magyarország) segítségével az 5.5 fejezetben (Képalkotási protokoll) ismertetett módon a Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia és a Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia vonatkozásaiban végeztük el a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képalkotó Intézet, Nukleáris Medicina nem önálló Tanszék Radiobiológiai Kutatócsoport laboratóriumaiban.

A képalkotó vizsgálatok során az 5.5.3 részben leírt fájdalomcsillapító protokollok alkalmazása mellett a megfelelő típusú, minőségű és mennyiségű radiofarmakon laterális farokvénán át i.v. bólusban történő bejuttatása után a megfelelő várakozási idő elteltével az 14. táblázat szerint végeztük el.

14. táblázat: A Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia és a Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia vonatkozásában alkalmazott PET vizsgálati protokoll

Projekt 1	Proliferatív diabéteszes retinopátia
Vizsgált régió	Feji
Radiofarmakon típusa	[⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-c(NGR) vagy [⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)] ₂
Radiofarmakon mennyisége	15 MBq
Várakozási idő	90 perc
Képalkotás ideje	20 perc
Framek száma	1x20 perc
Vizsgálat típusa	Statikus

Projekt 2**Akut alsó végtagi iszkémia**

Vizsgált régió	Alsó végtag
Radiofarmakon típusa	[⁶⁸ Ga]Ga-NOTA-c(NGR) és [¹⁸ F]FDG
Radiofarmakon mennyisége	15 MBq
Várakozási idő	60 perc
Képalkotás ideje	20 perc
Framek száma	1x20 perc
Vizsgálat típusa	Statikus

A MiniPET-II kisállat PET kamera egy úgynevezett LYSO kristályokkal szerelt detektor gyűrű rendszert foglal magába. A berendezés alapvető tulajdonságait az 15. táblázat szemlélteti.

15. táblázat: MiniPET-II kisállat PET alapvető tulajdonságai (90)

Detektorok száma	12
Kristályok száma/detektor	35 x 35 darab (1225 darab)
Kristályok anyaga	Lutécium-ytrium-szilikátoxid (LYSO)
tűkristályok méret	1,27 mm x 1,27 mm alapél, 12 mm magasság
axiális látótér méret	48 mm
belső körgyűrűjének átmérő	211 mm
Térbeli felbontás a centrumban	1,2 mm
Photomultiplier tube	Hamamatsu H9500
Jelfeldolgozó elektronika	ATOMKI
Operációs rendszer	Linux
Gyűjtő/feldolgozó szoftver	Multi-Modality Medical Imaging (M3I)

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

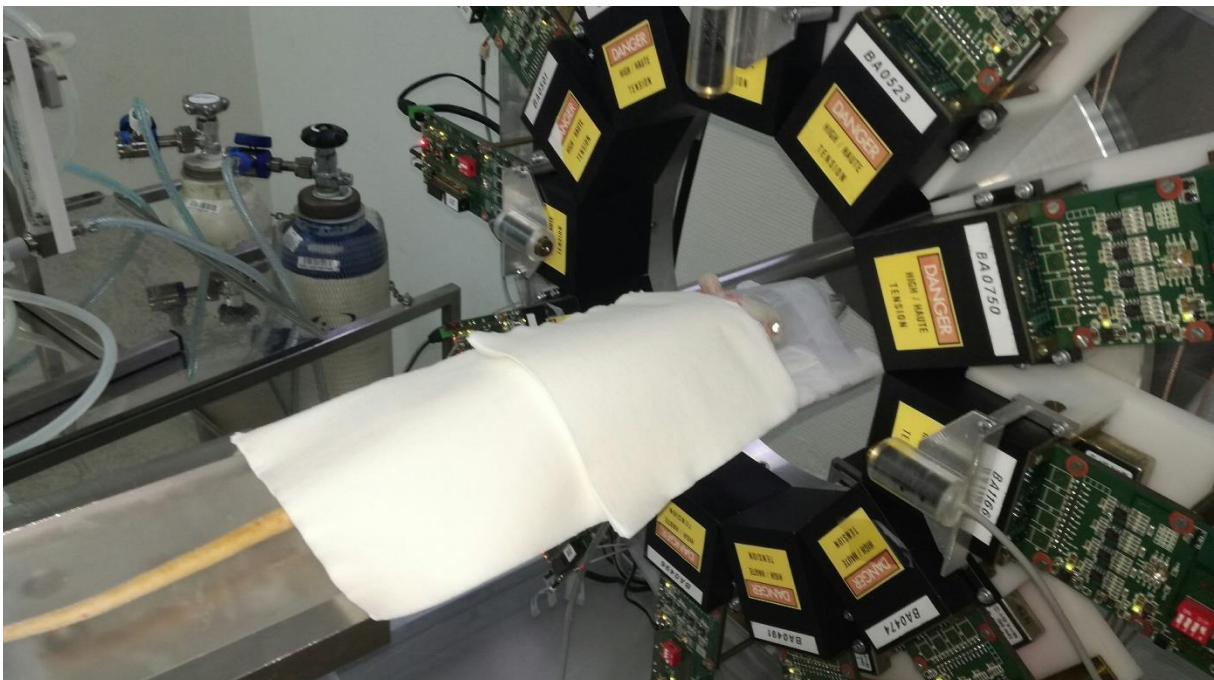
$$SUV = \frac{\text{VOI} - n \text{ belüli aktivitás koncentráció (MBq/ml)}}{\text{beadott dózis (MBq)} / \text{állat súlya (g)}}$$

1. képlet: A standardizált felvételi érték képlete

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

2. képlet: A jel-háttér arány képlete

Az állatok a képalkotás ideje alatt eszméletlen állapotban voltak, a testhőmérsékletüket fűthető vizsgálóasztal segítségével állandó $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten stabilizáltuk. A PET vizsgálatot a 16. ábra szemléltet.



16. ábra: A kísérleti állatok vizsgálata MiniPET-II kisállat PET kamerával

5.3 Kísérleti állatok

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

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

Az állatokat IVC (egyesével szellőztetett ketrecrendszer) állványokon tartottuk. A megvilágított órák száma 12 volt. Az etetés: VRF-1 (SDS Diets) rágcsálótáppal *ad libitum* történt. Az itatás csapvízzel *ad libitum* valósult meg. A hőmérséklet: 22 ± 2 °C, a páratartalom: $50 \pm 10\%$ volt. Környezetgazdagításként papír fészkelőanyaggal és búvóhellyel (papírcső) láttuk el a kísérleti állatokat.

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

A kísérletben Fischer-344 típusú, hím patkányokat (n=15) alkalmaztunk, amelyek testsúlya 250-300 gramm között volt. Az állatokat két csoportba osztottuk: iszkémiás csoportba és kontroll csoportba (16. táblázat).

Iszkémiás csoport (n=10)

A patkányok bal szemében (bal bulbus-**I/R**) (n=10) iszkémiát majd reperfúziót váltottunk ki, amelyet az 5.4.1 Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell részben részletezünk. A jobb szem (jobb bulbus) (n=10) nem esett át beavatkozáson (**non-I/R**), így az belső kontrollként szolgált. A beavatkozás után antibiotikus szemcseppet alkalmaztunk a gyulladásszerű folyamatok megelőzésére.

Kontroll csoport (n=5)

A kontroll csoport esetében az állatok semmilyen beavatkozáson nem estek át (**non-I/R**). Alcsoportként az iszkémiás csoporttal megegyező logika szerint; bal bulbus- non-I/R (n=5) és jobb bulbus-non-I/R (n=5), különítettük el. A kontroll csoport állatait ugyanazon az állattartási körülmények között tartottuk, mint az iszkémiás csoportéit továbbá ugyanolyan altatási és eutanázia protokollt alkalmaztunk. A kísérletsorozat főbb részletei az 16. táblázat: Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia kísérletsorozatban alkalmazott állatok sajátságai és elkülönített csoportok című részben kerültek összefoglalásra.

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

Állatok típusa:	Fischer-344	
Állatok neme:	Hím	
Állatok tömege:	250-300 gramm	
Csoportok megnevezése:	iszkémiás csoport	
	kontroll csoport	
Alcsoportok megnevezése	iszkémiás csoport	bal bulbus- I/R
		jobb bulbus- non-I/R
	kontroll csoport	bal bulbus- non-I/R
		jobb bulbus- non-I/R
Kísérleti állatok száma:	iszkémiás csoport	n=10
	kontroll csoport	n=5

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

A kísérletben Fischer-344 típusú, hím patkányokat (n=15) alkalmaztunk. Az állatok testsúlya 250-300 gramm között volt. Az állatokat két csoportba osztottuk: iszkémiás csoportba és kontroll csoportba (17. táblázat).

Iszkémiás csoport (n=10)

A patkányok bal hátsó végtagjában (bal hátsó végtag **-I/R**) (n=10) iszkémiát majd reperfúziót váltottunk ki, amely az 5.4.2 Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell című részben került részletesebb kifejtésre. A jobb hátsó végtag (n=10) nem esett át beavatkozáson (**non-I/R**), így az belső kontrollként szolgált.

Kontroll csoport (n=5)

A kontroll csoport esetében az állatok ugyan átestek a beavatkozáson (altatás, tourniquet felhelyezése), azonban az iszkémia majd az ezt követő reperfúzió nem valósult meg (**non-I/R**). Alcsoportként az iszkémiás csoporttal megegyező logika szerint; bal hátsó végtag - non-I/R (n=5) és jobb hátsó végtag -non-I/R (n=5), különítettük el. A kontroll csoport állatait ugyanazon állattartási körülmények között tartottuk, mint az iszkémiás csoportéit és ugyanolyan altatási és eutanázia protokollt alkalmaztunk. A kísérletsorozat főbb részletei az 17. táblázat: Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia kísérletsorozatban alkalmazott állatok sajátságai és elkülönített csoportok című részben kerültek összefoglalásra.

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

Állatok típusa:	Fischer-344	
Állatok neme:	Hím	
Állatok tömege:	250-300 gramm	
Csoportok megnevezése:	iszkémiás csoport	
	kontroll csoport	
Alcsoportok megnevezése	iszkémiás csoport	bal hátsó végtag -I/R
		jobb hátsó végtag -non-I/R
	kontroll csoport	bal hátsó végtag - non-I/R
		jobb hátsó végtag -non-I/R
Kísérleti állatok száma:	iszkémiás csoport	n=10
	kontroll csoport	n=5

5.3.3 Fájdalomcsillapítási protokollok

A beavatkozás alatti fájdalomcsillapítás

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

Posztoperatív fájdalomcsillapítás

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

A kísérletek befejezése

A képalkotó vizsgálatok elvégzése után (lásd: 5.5 Képalkotási protokoll) a kísérleti állatokon eutanáziát alkalmaztunk. Ezt izofluránnal történő túlaltatással valósítottuk meg, 5% izoflurán (Aerrane, Baxter, USA) + 0 liter/perc oxigén és 1,2 liter/perc dinitrogén-oxid (Linde, Magyarország) alkalmazásával.

5.4 Iszkémia-reperfúzió kiváltásának protokollja

5.4.1 Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell

Az általános érzéstelenítést követően, a patkányok bal szemét ellátó arteria centralis retinae lekötésre került az 16. ábra szerint. A szemhéjat varratokkal visszahúztuk, az állatok szemébe oxybuprokain tartalmú szemcseppet (Humacain 4 mg/ml, TEVA, Magyarország) cseppentünk helyi érzéstelenítés céljából, majd egy külön erre a célra készített elszorítót (egy polietilén kanülön keresztül vezetett sebészeti varrófonál-hurok) alkalmaztunk az arteria centralis retinae lekötéséhez. A hurkot a szemgolyó mögé helyeztük, lazán a nervus opticus, az arteria centralis retinae, a ciliáris artériák és a retrobulbáris kötőszövet köré. A hurok megfeszítésével és a kanül nervus opticus felszíne felé történő nyomásával az iszkémia kiváltható és a kívánt ideig fenntartható (90 perc). A hurok folyamatos feszesen tartását egy, a sebészeti varróanyagot húzó érfogó biztosította a lekötés ideje alatt.

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

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



16. ábra: A kísérleti állatok bal szemét ellátó arteria centralis retinae lekötése

5.4.2 Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell

Az általános érzéstelenítést követően, a bal hátsó végtagot fertőtlenítettük, ezután a comb proximalis részén azonos magasságban elasztikus gumiszalagot alkalmaztunk (tourniquet), standard módon körbetekerve és azonos szorítóerővel elszorítva, az iszkémia létrehozásához (17. ábra). Ezután 120 perc iszkémia következett, amit pulzoximéterrel és az operált végtag cianotikus elszíneződésének megfigyelésével igazoltunk. Az iszkémiát a gumiszalag eltávolításával szüntettük meg.

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

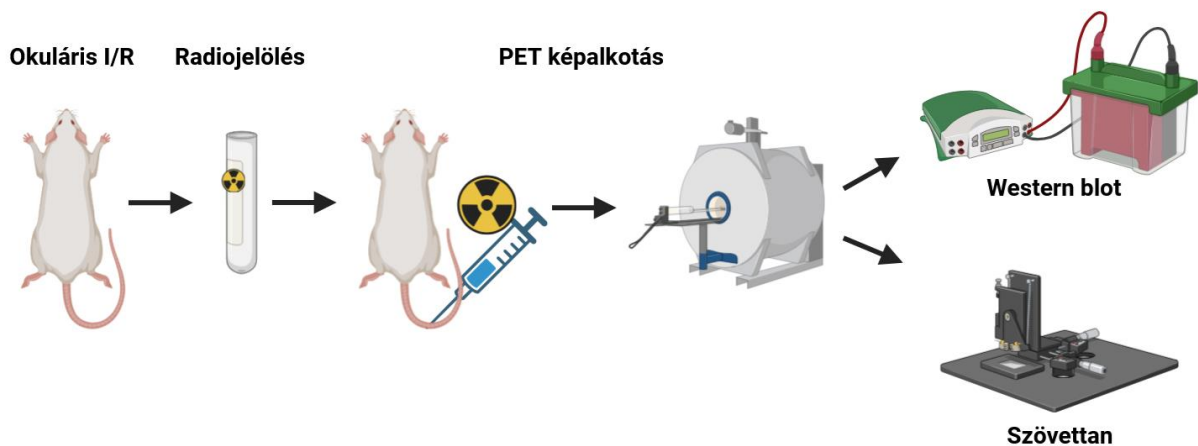


17. ábra: A kísérleti állatok bal lábának lekötése elasztikus gumiszalag alkalmazásával (tourniquet)

5.5 Képkalkotási protokoll

5.5.1 Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia

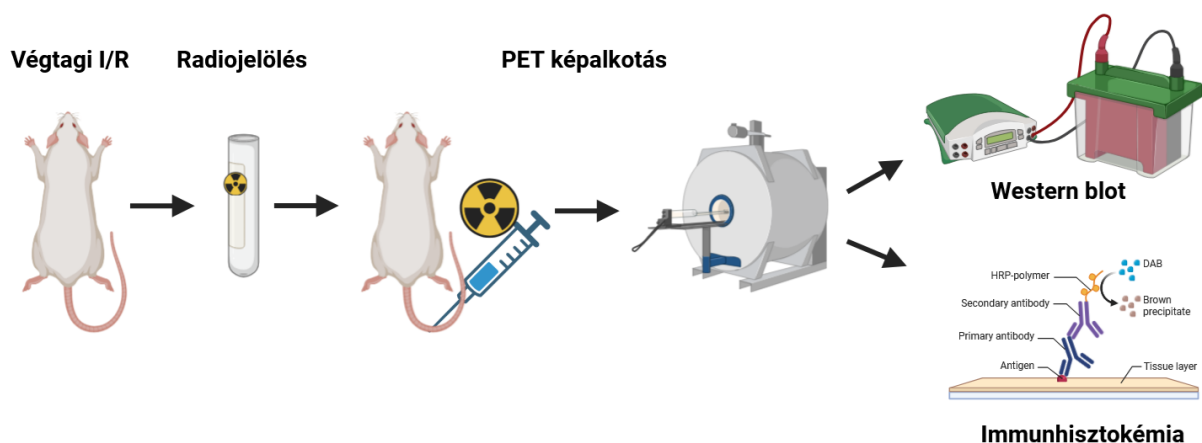
Az okuláris I/R kiváltása utáni 1., 3., 7. és 10. napokon a kísérleti és a kontroll állatokat elaltattuk és [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t (körülbelül 15 MBq 150 μl fiziológiás sóoldatban) injektáltuk a laterális farokvénán keresztül. Továbbá a 10. napon [^{68}Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂-t alkalmaztunk (körülbelül 15 MBq 150 μl fiziológiás sóoldatban). Ebben az esetben egymás után két PET vizsgálatot végeztünk a két radiogyógyszer külön-külön történő felhasználásával az injektálások közötti négy óra időkülönbséggel. Az érzéstelenített kísérleti állatok fiziológiás testhőmérsékletét fűtött kameraágy használatával tartottuk fenn. A radiofarmakon eloszlását az injekció beadása után 90 perccel *in vivo* PET képkalkotással (MiniPET-II kisállat PET szkennerek, Debreceni Egyetem, Magyarország) határoztuk meg (20 perces statikus PET felvételek). Az utolsó PET vizsgálatot követően az állatokat elaltattuk és a szemeket megfelelő előkészítés után további *ex vivo* vizsgálatoknak vetettük alá (western blot, hisztológia) (18. ábra).



18. ábra: Grafikus absztrakt - Projekt 1

5.5.2 Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia

A hátsó végtag I/R kiváltása utáni 1., 3., 5., 7. és 10. napokon egymás után két PET vizsgálatot végeztünk két radiogyógyszer külön-külön történő alkalmazásával. A kísérleti és a kontroll állatokat elaltattuk és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)-t}$ ($10,03 \pm 2,69$ MBq 150 μl fiziológiás sóoldatban) majd négy órával később $[^{18}\text{F}]\text{FDG-t}$ ($11,33 \pm 1,71$ MBq 150 μl fiziológiás sóoldatban) injektáltuk a laterális farokvénán keresztül. Az érzéstelenített kísérleti állatok fiziológiás testhőmérséklete fűtött kameraágy használatával volt fenntartva. A radiofarmakon eloszlását az injekciók beadása után 60 perccel *in vivo* PET képalkotással (MiniPET-II kisállat PET szkennerek, Debreceni Egyetem, Magyarország) határoztuk meg (20 perces statikus PET felvételek). Az utolsó PET vizsgálatot követően az állatokat elaltattuk és a hátsó végtagból nyert mintákat, megfelelő előkészítés után, további *ex vivo* vizsgálatoknak vetettük alá (western blot, immunhisztokémia) (19. ábra). Az 1., 3., 5., 7. és 10. napon történt mintavételek alkalmával naponta véletlenszerűen kiválasztott állatokat extermináltunk és különítettünk el mintát (immunhisztokémia, western blot). Ez a mintavételi stratégia lehetővé tette az időbeli változások pontos követését, mivel minden időpontban független állatokból származó mintákat vizsgáltunk. Az alkalmazott módszer megfelel az állatkutatási irányelveknek, biztosítva az állatszám minimalizálását, miközben megbízható és statisztikailag értékelhető adatokat szolgáltat.



19. ábra: Grafikus absztrakt - Projekt 2

5.6 Western blot

Western blot vizsgálatok a Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia és a Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia kapcsán kerültek elvégzésre. A kísérleti állatok (az iszkémiás és a kontroll csoport) exterminációja (az állatok életének kioltása, a vér eltávolítása és 0,9%-os fiziológiás sóoldattal végzett perfundálás) után az 18. táblázatban részletezett módon történtek a mintavételek.

18. táblázat: Western blot mintavételi protokoll

Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia		
Mintavétel ideje	Érintett csoport	Érintett szerv
10. nap	iszkémiás csoport	bal bulbus- I/R
		jobb bulbus- non-I/R
	kontroll csoport	bal bulbus- non-I/R
		jobb bulbus- non-I/R
Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia		
1. nap	iszkémiás csoport	bal hátsó végtag - I/R
3. nap		jobb hátsó végtag - non-I/R
5. nap	kontroll csoport	bal hátsó végtag - non-I/R
7. nap		jobb hátsó végtag - non-I/R
10. nap		
Minden időpont	minden projekt, minden csoport	vese (pozitív kontroll)

Pozitív kontrollként patkány vese szövetet használtunk, mivel fiziológiás körülmények között nagymértékű APN/CD13 fehérje expresszió jellemzi ezt a szervet.

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

Mintatárolás

A beérkezett szövetmintákat azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további feldolgozásig.

Minták előkészítése

A szöveti/szervi lizátum elkészítéséhez a mintákat jéghideg M-PER fehérje lízis pufferben (Thermo Fisher Scientific, USA) szuszpendáltuk és lizáltuk, proteáz és foszfatáz inhibitorokkal (SigmaAldrich, USA) kiegészítve.

A szövetminták roncsolása Tissue Ruptor (IKA®-WERKE GmbH, Németország) segítségével történt. A sejtlizátum fehérje mennyiségi meghatározását Bradford reagenssel (házi készítésű) végeztük. Az összes mintát $4\times$ Laemmli pufferrel hígítottuk. Minden $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 8 percig hőkezelt fehérjemintából egyenlő mennyiséget ($40\text{ }\mu\text{g}$) vittünk fel a futtatáshoz.

Fehérje elválasztás elektroforézissel

A lizátumokat a célfehérje molekulatömegének alapján gélelektroforézissel választottuk el 10%-os nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélen (SDS-PAGE). Molekulatömeg-markerként Precision Plus Protein Dual Color Standard-t (BioRad Laboratories, USA) használtunk.

Átvitel membránra

A fehérjéket polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra vittük át (Millipore, USA).

Blokkolás

Az antitestek nem specifikus kötődésének megakadályozása érdekében 5%-os tej-TBS-Tweennel való blokkolást hajtottunk végre.

Elsődleges és másodlagos antitest inkubáció és inkubáció

A membránokat ezután elsődleges antitesttel inkubáltuk (egér-anti-patkány APN/CD13, egy éjszakán át, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1:500 hígítás, sc-13536, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA).

Az elsődleges antitestekkel való inkubálást HRP-vel jelölt anti-egér IgG másodlagos antitest követte (1:2000 hígítás, Thermo Fisher Scientific, USA).

Detektálás

A jelet kemilumineszcenciával detektáltuk. Az egyes sávok intenzitását HPRT-re normalizáltuk (anti-HPRT, 1:1000 HPRT antitest (B-11) egér monoklonális, sc-393901; Cell Signaling Technology, USA). A ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, USA) rendszert használtuk a membránok megjelenítésére és a sávok intenzitásának mennyiségi értékeléséhez.

5.7 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia vizsgálatok a Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia kapcsán kerültek elvégzésre. A kísérleti állatok (az iszkémiás és a kontroll csoport) exterminációja (az állatok életének kioltása, a vér eltávolítása és 0,9%-os fiziológiás sóoldattal végzett perfundálás) után az 19. táblázatban részletezett módon történtek a mintavételek.

19. táblázat: Immunhisztokémia mintavételi protokoll

Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia		
Mintavétel ideje	Érintett csoport	Érintett szerv
1. nap	iszkémiás csoport	bal hátsó végtag -I/R
3. nap		jobb hátsó végtag -non-I/R
5. nap	kontroll csoport	bal hátsó végtag - non-I/R
7. nap		jobb hátsó végtag -non-I/R
10. nap		
Minden időpont	minden csoport	vese (pozitív kontroll)

Pozitív kontrollként patkány vese szövetet használtunk mivel fiziológiás körülmények között nagymértékű APN/CD13 fehérje expresszió jellemzi ezt a szervet.

A kísérleti állatok boncolásából származó mintákat Petri-csészében, fiziológiás sóoldattal átitatott steril mull-lapra helyezve, jégen tárolva hűtött körülmények között átszállítottuk a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Radiológiai Tanszékre.

Az immunhisztokémia vizsgálatot a következő protokoll szerint hajtottuk végre.

Szövet-előkészítés

A boncolásból nyert patkány alsó végtag szövetmintát (izom) szénsavhó és petroléter segítségével fagyasztottuk kriomátrixba ágyazva.

Metszetek

A szövetmintát kriosztát segítségével 6 mikrométer vastagságú metszeteket készítettünk. A fagyasztott metszeteket közvetlenül tárgylemezre helyeztük, ezt követően 10%-os pufferezett neutrális formalinban rögzítettük 5 percig. A fixálószeret csapvizes mosással távolítottuk el, majd elvégeztük az immunhisztokémiai reakciót a kit gyártói leírása alapján (91).

Blokkolás

Az antitestek nem specifikus kötődésének megakadályozása érdekében a szövetmetszeteket blokkoló oldattal kezeltük az 20. táblázat szerint.

20. táblázat: A blokkolás lépései

A blokkolás lépései	
Lépés	Idő
Tárgylemezek tisztítása	NA
Blokkoló puffer felvitele a tárgylemezre (2-4 csepp) és blokkolás (20°C)	30 perc
Blokkoló puffer eltávolítása a tárgylemezről és a szövetmetszet közeléből	5 perc

Primer antitest inkubáció

A szövetmetszeteket APN/CD13 specifikus primer antitesttel (IHCeasy, Proteintech Germany) inkubáltuk az 21. táblázatban jelölt lépések szerint.

21. táblázat: A primer antitest inkubáció lépései

A primer antitest inkubáció lépései	
Lépés	Idő
Primer antitest felvitele a tárgylemezre (2-4 csepp)	NA
Inkubáció (20°C)	60 perc
Mosó pufferrel történő maradék antitest eltávolítása	2 perc

Másodlagos antitest inkubáció

A szövetmetszeteket egy kimutatható, jelöléshez konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk az 22. táblázatban részletezett lépések szerint.

22. táblázat: A másodlagos antitest inkubáció lépései

A másodlagos antitest inkubáció lépései	
Lépés	Idő
Másodlagos antitest felvitele a tárgylemezre (2-4 csepp)	NA
Inkubáció (20°C)	30 perc
Mosó pufferrel történő maradék antitest eltávolítása	2 perc

Kimutatás

Az APN/CD13 jelenlétét a másodlagos antitesthez kapcsolt kromogénnel vizualizáltuk. Ennek lépéseit az 23. táblázat írja le.

23. táblázat: A másodlagos antitest inkubáció lépései

A másodlagos antitest inkubáció lépései	
Lépés	Idő
50 µl kromogén felvitele a tárgylemezre	NA
Színreakció (20°C) (barna)	5 perc
Reakció leállítása mosó pufferrel	NA
Minták dupla-desztillált vizes áztatása	2 perc
Szignál felerősítő felvitele a tárgylemezre (2-4 csepp) és inkubáció	5 perc
Mosó pufferrel történő mosás	NA

Víztelenítés és derítés

A tárgylemezeket a következő protokoll szerint víztelenítettük és derítettük, hogy lefedésre kerülhessenek (24. táblázat).

24. táblázat: A rögzítés lépései

A rögzítés lépései	
Lépés	Idő
Tárgylemezek merítéses mosása (60%,80%,95% és 100%-os etanol oldatban)	20 perc
Tárgylemezek merítéses mosása xilolban	10 perc
Rögzítő média felvitele a mintákra (1-2 csepp)	NA
Védőlemez felhelyezése	NA
Száradás horizontális pozícióban	40 perc

Mikroszkópos vizsgálat

Az elkészült szövetmetszeteket mikroszkóp alatt vizsgáltuk (Nikon Eclipse E800, Nikon Corporation, Japán), az APN/CD13 expressziójának hely és intenzitás meghatározásának érdekében.

5.8 Szövettan

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

A vizsgálati anyag előkészítése

A minták beérkezésének napján a bulbusokat beágyazó médiumba helyeztük (Shandon Cryomatrix®, Thermo Scientific, Egyesült Királyság) és kialakítottuk a blokkokat (25. táblázat).

25. táblázat: Blokk készítés lépései

Blokk készítés lépései	
1.	cryomatrix (1 csepp)
2.	parafa
3.	cryomatrix (1 csepp)
4.	szemmintá

Ezt követte az alumínium mintartó előkészítése, ami izopentánnal való feltöltéssel és szénsavhóba való elhelyezéssel valósult meg. A mintatartó megfelelő hőmérsékletének elérése után a beágyazó médiummal borított mintablokkok fagyasztásra kerültek a hűtőkeverékbe való mártással. A beágyazó médiummal körbevett bulbusok fagyasztása sagittalis élettani sík szerint történt.

A fentebb részletezett módon előkészített mintákból kriosztát segítségével 9 µm átmérőjű metszeteket készítettünk -21°C-on (Shandon Cryotome E, Thermo Scientific, Egyesült Királyság).

Fixálás

A fixálást az 26. táblázatban részletezett lépések szerint hajtottuk végre azzal a céllal, hogy a sejtek, szövetek fehérjeit denaturáljuk, és az enzimatikus bomlási folyamatokat leállítsuk, ezzel alkalmassá téve a mintát a további lépések kivitelezésére.

26. táblázat: A fixálás lépései

A fixálás lépései	
Lépés	Idő
Fixálás 10%-os pufferezett neutrális formalinban	5 perc
Áramló vizes mosás	5 perc
Desztillált vizes öblítés	5 perc

Hematoxin-eosin festés

A HE festést az 27. táblázatban részletezett módon hajtottuk végre.

27. táblázat: Hematoxilin-eosin festés lépései

Hematoxilin-eosin festés lépései	
Lépés	Idő
Mayer hematoxilin	8 perc
Vizes kékítés	8 perc
Desztillált vizes öblítés	NA
0,5%-os eosin	1 perc
Víztelenítés (öblítés Alkohol 3, 4, 5; Aceton 2; xylol 3, 4)	NA
Fedés	NA

Az elkészült metszeteket fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk (Nikon Eclipse E800, Nikon Corporation, Japán).

5.9 Statisztikai analízis

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

6. Eredmények

6.1 Radiokémia

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

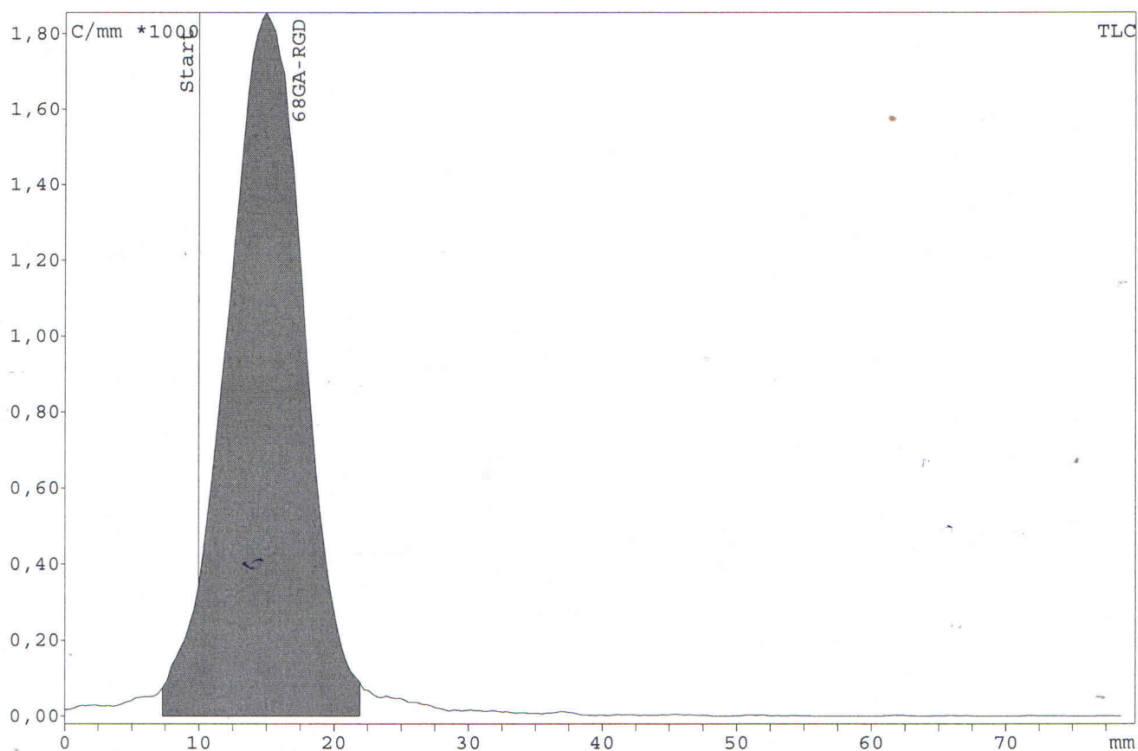
[⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) (projekt 1 és projekt 2 esetében) és [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ molekulák előállítása rendben, robusztusan, megfelelő specifikus aktivitással és kiváló radiokémiai tisztasággal valósult meg. A szintézisek minőségi paramétereit az 28. és az 29. táblázat a termék szempontjából kritikus minőségi paraméterek reprezentatív kromatogramjait az 21. és az 22. ábra hivatott szemléltetni.

28. táblázat: A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) szintézisek eredményei

Tulajdonság	Követelmény	Eredmény
Mechanikai szennyező, szálvizsgálat	tiszta, szálmentes, szintelen	tiszta, szálmentes, szintelen
pH	5 – 8	6,5-6,8
Specifikus aktivitás	≥5 GBq/μmol	5,17-5,93 GBq/μmol
Radiokémiai tisztaság (HPLC)	≥95%	≥97
Radiokémiai tisztaság (TLC)	≥95%	≥99%
Etanol-tartalom	<10%	<8%
Szintézis szám	NA	9
Sikertelen szintézis szám	NA	0

29. táblázat: A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ szintézisek eredményei

Tulajdonság	Követelmény	Eredmény
Mechanikai szennyező, szálvizsgálat	tiszta, szálmentes, szintelen	tiszta, szálmentes, szintelen
pH	5 – 8	6,2-6,8
Specifikus aktivitás	≥5 GBq/μmol	5,45-6,72 GBq/μmol
Radiokémiai tisztaság (HPLC)	≥95%	≥98
Radiokémiai tisztaság (TLC)	≥95%	≥99%
Etanol-tartalom	<10%	<9%
Szintézisszám	NA	1
Sikertelen szintézisszám	NA	0

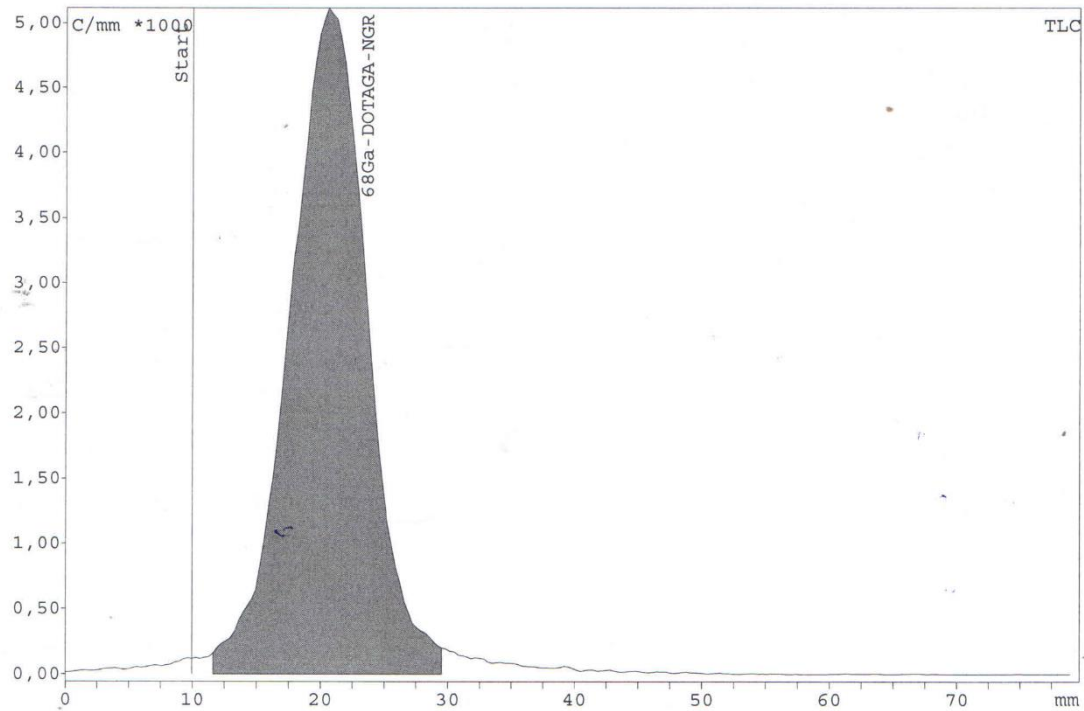


Measurement: RGD_20220926.rta, started: 2022.10.05. 15:27
 Method: ga
 Origin: 10 mm Front: 190 mm
 Meas. time: 0:00:30 Resolution: 0,33 mm Energy: 25-1500 keV
 High voltage: 500,0 V
 Radio detector: raytest MiniGITA Serial Nr.: 1201027

TLC

Substance	R/F	%Total %	Type	Area Counts	%Area %
68GA-RGD	0,028	94,49	DD	12394,00	100,00
Sum in ROI				12394,00	
Total area				13117,00	
Area RF				12774,00	
Ext. BKG				0,00 C/mm	

21. ábra: A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ radiokémiai tisztaság vizsgálata (TLC) kromatogramja (körülmények: Silica gél 60 típusú kromatográfias vékonyréteg, kifejlesztőszer: citrát 0,5M pH=4,5)



Measurement: 68GA_DOTAGA-NGR_20220817.rta, started: 2022.08.26. 10
 Method: ga
 Origin: 10 mm Front: 190 mm
 Meas. time: 0:00:30 Resolution: 0,33 mm Energy: 25-1500 keV
 High voltage: 500,0 V
 Radio detector: raytest MiniGITA Serial Nr.: 1201027

TLC

Substance	R/F	%Total %	Type	Area Counts	%Area %
68Ga-DOTAGA-NGR	0,061	94,71	DD	36275,00	100,00
Sum in ROI				36275,00	
Total area				38300,00	
Area RF				38114,00	
Ext. BKG				0,00 C/mm	

22. ábra: A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ radiokémiai tisztaság vizsgálata (TLC) kromatogrammjára (körülmények: Silica gél 60 típusú kromatográfiás vékonyréteg, kifejlesztőszer: citrát 0,5M pH=4,5)

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

A 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz molekula előállítása rendben, robusztusan, megfelelő radiokémiai tisztasággal valósult meg. A szintézisek minőségi paramétereit az 30. táblázat a termék szempontjából kritikus minőségi paraméterek reprezentatív kromatogramjait az 23. és 24. ábra szemlélteti.

30. táblázat: 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz szintézisek eredményei

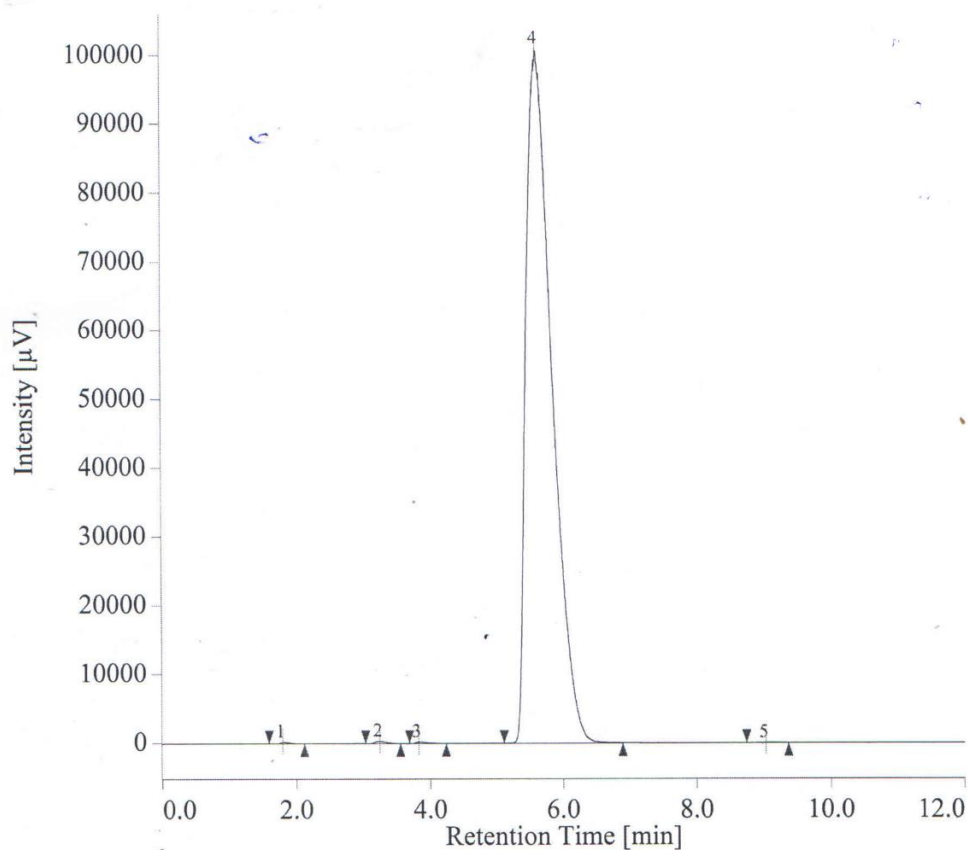
Tulajdonság	Követelmény	Eredmény
Mechanikai szennyező, szálvizsgálat	tiszta, szálmentes, színtelen vagy enyhén sárgás	tiszta, szálmentes, színtelen vagy enyhén sárgás
pH	5 – 8	6,5-6,8
Radionuklidos azonosság [¹⁸ F]	energia csúcs: 511±0,5 keV	511±0,3 keV
Felezési idő meghatározás	109,7 min ±5%	109,7 min ±1%
Radiokémiai azonosság ([¹⁸ F]FDG)	eltérés a referencia anyagtól ±5%	eltérés a referencia anyagtól ±0,20%
Radioaktív koncentráció	37 - 2590 MBq/ml	1490-1500 MBq/ml
Radionuklidos tisztaság	Szennyező radionuklid: max 0,1%	0%
Radiokémiai tisztaság (HPLC)	≥95% [¹⁸ F]FDG+[¹⁸ F]FDM ≤10% [¹⁸ F]FDM (a [¹⁸ F]FDG és a [¹⁸ F]FDM együttes radioaktivitásához viszonyítva)	≥99% [¹⁸ F]FDG+[¹⁸ F]FDM ≤10% [¹⁸ F]FDM (a [¹⁸ F]FDG és a [¹⁸ F]FDM együttes radioaktivitásához viszonyítva)
Radiokémiai tisztaság (TLC)	≥95% [¹⁸ F]FDG+[¹⁸ F]FDM ≤5% [¹⁸ F]F+Ac-[¹⁸ F]FDG/Ac-[¹⁸ F]FDM	≥99% [¹⁸ F]FDG+[¹⁸ F]FDM ≤5% [¹⁸ F]F+Ac-[¹⁸ F]FDG/Ac-[¹⁸ F]FDM
Kriptofix	<275 µg/ml	<275 µg/ml
2-fluor-2-dezoxi-D-glükóz	≤62.5 µg/ml FDG	≤62.5 µg/ml FDG
2-klór-2-dezoxi-D-glükóz	≤62.5 µg/ml CIDG	≤62.5 µg/ml CIDG
Oldószermaradvány	Acetonitril:0,5125 mg/ml Aceton:6,25 mg/ml	Acetonitril: ≤0,006 mg/ml Aceton: ≤0,007 mg/ml
Etanol-tartalom:	0,8-6,25 mg/ml	1,6-2,0
Sterilitás	steril	steril
Bakteriális endotoxin	<20,6 EU/ml	<0,10 EU/ml
Szintézis szám	NA	5
Sikertelen szintézis szám	NA	0

HPLC VIZSGALATI JELENTES

Felhasználó: joszai istvan
 Kiertekelés ideje: 17/08/2022 07:18:41
 Rendszer: System-2
 Vizsgálat ideje: 17/08/2022 07:06:41

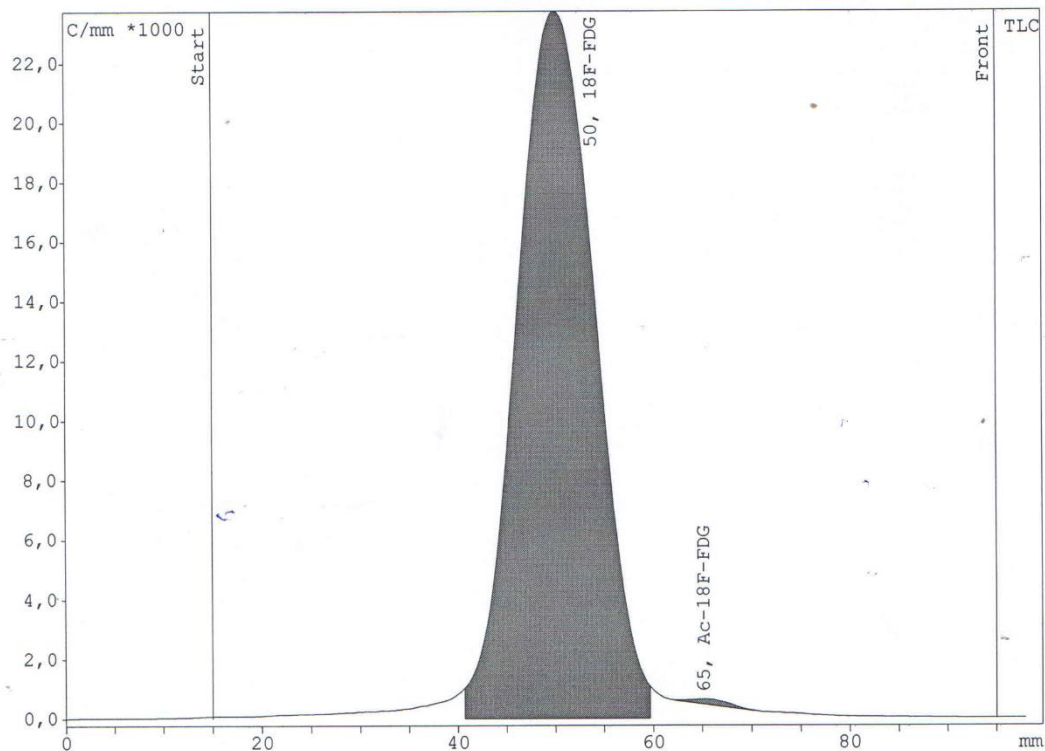
Vizsgálati módszer: MBE-118

Project Name: FDG-2022
 Fajlnev:
 Merési Módszer: FDG



#	Peak Name	CH	tR [min]	Area [µV·sec]	Height [µV]	Area%	Resolution
1	Unknown	1	1.795	2180	279	0.08	5.582
2	Unknown	1	3.243	3987	386	0.15	2.090
3	¹⁸ F	1	3.827	2790	283	0.10	3.576
4	¹⁸ F-FDG	1	5.603	2708335	100960	99.62	6.215
5	Unknown	1	9.025	1503	125	0.06	N/A

23. ábra: A 2-^[18F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz radiokémiai tisztaság vizsgálata (HPLC) kromatogramja (Eluens: 100 mM NaOH oldat, Kolonna: DIONEX CarboPac PA10 4x250 mm)



Measurement: FDGM9059.rta, started: 2022.08.17. 7:27
 Method: FID-F
 Origin: 15 mm Front: 95 mm
 Meas. time: 0:03:02 Resolution: 0,33 mm Energy: 25-1500 keV
 High voltage: 501,0 V
 Radio detector: raytest MiniGITA Serial Nr.: 2006152

TLC

Trc	Substance	R/F	Area Counts	%Area %
TLC	18F-FDG	0,438	222076,0	99,59
TLC	Ac-18F-FDG	0,621	917,9	0,41
	Sum in ROI		222993,9	
	Area RF		237019,0	
	Ext. BKG		0,00 C/mm	

24. ábra: A 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxi-D-glükóz radiokémiai tisztaság vizsgálat (TLC) kromatogramja (körmények: Silica gél 60 típusú kromatográfiás vékonyréteg, kifejlesztőszer: acetonitril víz (95+5 V/V%))

6.2 Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia – patkány modell

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

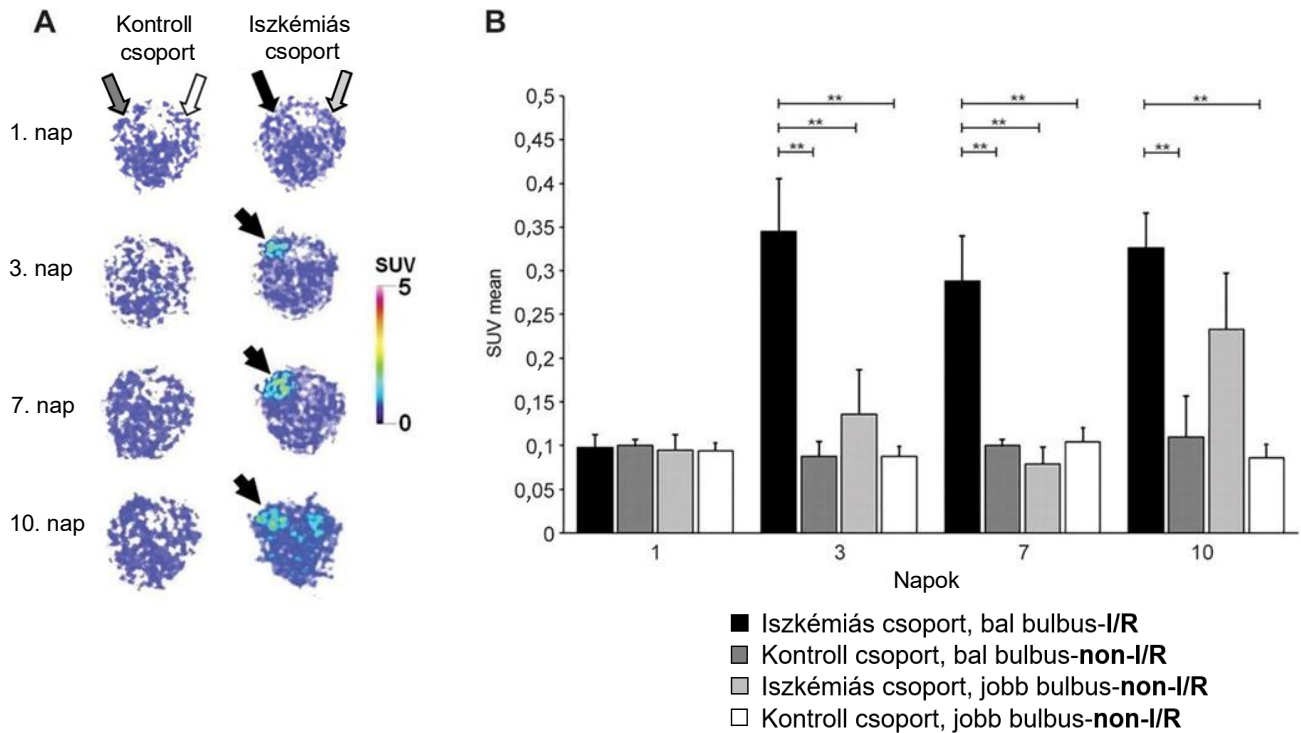
A proliferatív diabéteszes retinopátia patkány modelljének segítségével az APN/CD13 receptor expressziójának *in vivo* longitudinális vizsgálatát valósítottuk meg. A kísérletek során [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakkal PET képalkotást végeztünk, hogy a kapott eredmények alapján elemezzük a receptorok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

A PET-képek kvalitatív analízise egyik vizsgálati napon sem mutatott [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódást a kontroll csoport kísérleti állatainak egyik látószervében sem (bal bulbus- non-I/R, jobb bulbus-non-I/R). Ezzel szemben az iszkémiás csoport sebészileg lekötött látószervei esetén a beavatkozás után 3 nappal jelentős radiofarmakon felhalmozódás volt detektálható (bal bulbus-I/R). Továbbá markáns radiogyógyszer felvétel volt megfigyelhető az iszkémiás csoport nem lekötött szemgolyóiban is a beavatkozás után tíz nappal (jobb bulbus-non-I/R) (25. A. ábra).

A bomláskorrigált PET felvételek kvantitatív analízise során, szignifikánsan ($p \leq 0,01$) megnövekedett [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvétel volt detektálható az iszkémiás csoport lekötött szemeiben (bal bulbus-I/R), ahol a SUV_{mean} értékek $0,35 \pm 0,06$, $0,29 \pm 0,05$ és $0,33 \pm 0,04$ -nak adódtak 3, 7 és 10 nappal a beavatkozás után (25. B. ábra).

Az első vizsgált időpontban (1 nappal a beavatkozás után) nem volt szignifikáns különbség az I/R indukált és a nem I/R indukált szemek SUV_{mean} értékei között (iszkémiás csoport bal bulbus-I/R vs iszkémiás csoport jobb bulbus-non-I/R vs kontroll csoport bal bulbus- non-I/R és kontroll csoport jobb bulbus-non-I/R) ($p \leq 0,05$). A 25. B. ábra tanúsága szerint, a beavatkozás után 3 és 7 nappal az I/R indukált bulbusok (iszkémiás csoport bal bulbus-I/R) [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvétele körülbelül kétszerese volt a kontroll csoport estén detektált értékekhez viszonyítva, továbbá nem volt megállapítható szignifikáns különbség a radiofarmakon akkumulációban a kontroll és az iszkémiás csoport nem I/R indukált szemei között ($p \leq 0,05$).

Ezzel szemben a beavatkozás után 10 nappal megnövekedett [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvétel (SUV_{mean}=0,23±0,06) volt detektálható az iszkémiás csoport nem ligált szemében (jobb bulbus-non-I/R) (25. B. ábra). A kontroll csoport bal (SUV_{mean}=0,11±0,05) és jobb (SUV_{mean}=0,09±0,02) bulbusainak SUV_{mean} értékei megközelítőleg kétszer alacsonyabbnak adódtak az iszkémiás csoporthoz képest.



25. ábra: A PET képalkotás eredményei a [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) beadását követően. A: Reprezentatív transzaxiális bomláskorrigált PET-képek a kontroll csoportról (A panel, bal oldalon) és az iszkémiás csoportról (A panel, jobb oldalon) 1, 3, 7 és 10 nappal a beavatkozás után.

A fekete nyíl az iszkémiás csoport lekötött szemére (bal bulbus-I/R), a sötétszürke nyíl az iszkémiás csoport nem lekötött szemére (jobb bulbus-non-I/R), a szürke nyíl a kontroll csoport nem lekötött szemére (bal bulbus-non-I/R), a fehér nyíl a kontroll csoport nem lekötött szemére (jobb bulbus-non-I/R) mutat.

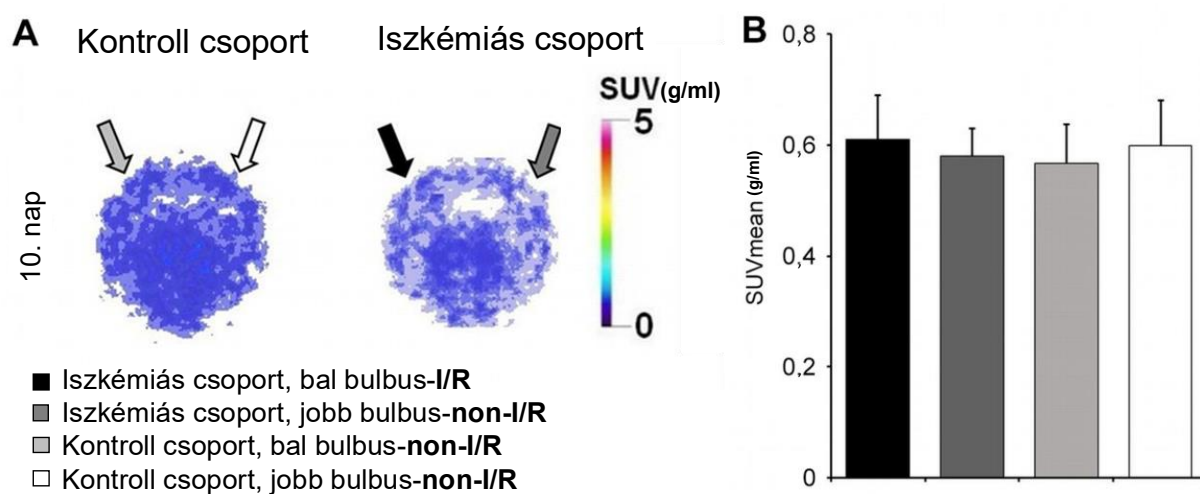
B: A PET-képek kvantitatív elemzése 1, 3, 7 és 10 nappal a szem I/R kiváltása után és 90 perccel a [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) intravénás injekciója után.

Szignifikancia szintek: $p \leq 0,05$ (*) és $p \leq 0,01$ (**)

Állatok száma: 1. nap $n=10+5$, 3. nap $n=8+4$, 7. nap $n=6+3$, 10. nap $n=4+2$ (csoportok: iszkémiás+kontroll)

6.2.2 $\alpha V\beta 3$ integrin receptor expresszió *in vivo* vizsgálatának eredményei [^{68}Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ PET segítségével

Az $\alpha V\beta 3$ integrin receptor expressziójának meghatározására *in vivo* [^{68}Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ PET képalkotást alkalmaztunk. A SUV korrigált PET-képek elemzése során nem volt kimutatható emelkedett érték a felhalmozódást tekintve az iszkémiás csoport lekötött szemeiben 10 nappal a kiváltott I/R után a többi csoporthoz viszonyítva (iszkémiás csoport bal bulbus-I/R vs jobb bulbus-non-I/R, kontroll csoport bal bulbus-non-I/R, jobb bulbus-non-I/R) (26. A. ábra). Ezt a megfigyelést megerősítette a kvantitatív SUV analízis, ahol nem volt szignifikáns különbség a SUV_{mean} értékekben sem az iszkémiás csoport ligált (SUV_{mean}=0,61±0,08) és nem ligált (SUV_{mean}=0,57±0,07) alcsoportjai (iszkémiás csoport bal bulbus-I/R vs iszkémiás csoport jobb bulbus-non-I/R), sem az iszkémiás és a kontroll csoportok között (SUV_{mean}=0,60±0,08) (iszkémiás csoport bal bulbus-I/R vs kontroll csoport) (26. B. ábra) ($p \leq 0,05$).



26. ábra: PET képalkotás [^{68}Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ radiofarmakon alkalmazásával.

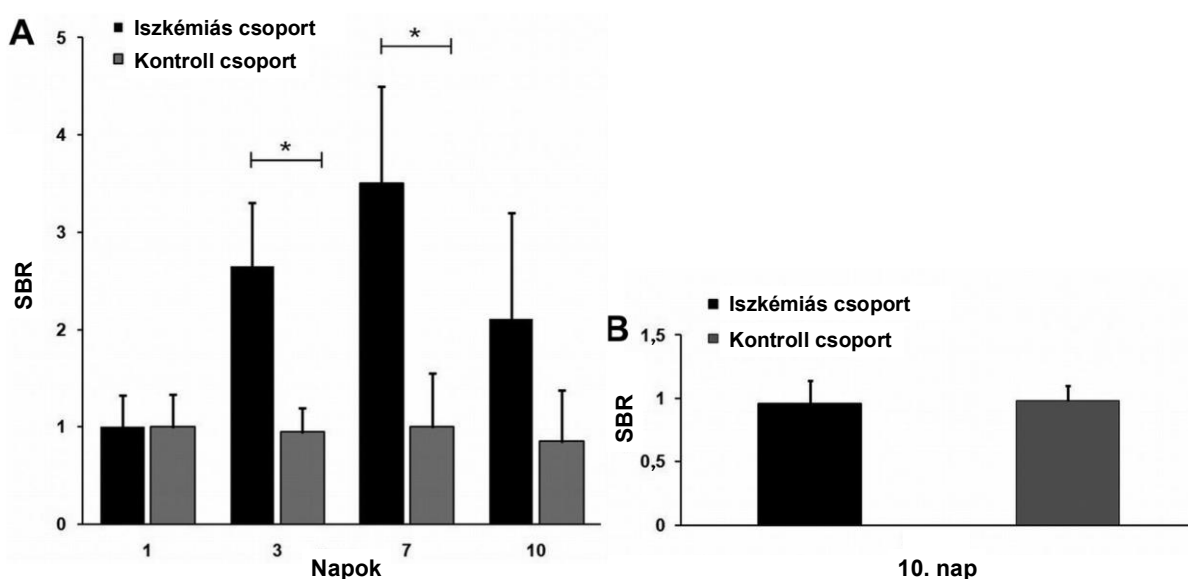
A: Reprezentatív transzaxiális bomláskorrigált PET-képek a kontroll (A panel, bal oldalon) és az iszkémiás csoportról (A panel, jobb oldalon) 10 nappal a szem I/R kiváltása után (inkubációs idő:90 perc, radiofarmakon: [^{68}Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ beviteli forma: intravénás injekció)

B: A PET-képek kvantitatív elemzése 10 nappal a szem I/R kiváltása után (inkubációs idő:90 perc, radiofarmakon: [^{68}Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ beviteli forma: intravénás injekció).

Állatok száma: 10. nap n=4+2 (csoportok: iszkémiás+kontroll)

6.2.3 PET vizsgálatok jel-háttér arány (SBR) elemzésének eredményei

A bomlás-korrigált PET képek kiértékelése alapján jel-háttér arány (SBR) elemzést végeztünk el. Az APN/CD13 specifikus [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) molekulát tekintve megállapítást nyert, hogy az iszkémiás csoportban az SBR arány szignifikánsan magasabb volt a beavatkozás utáni 3. (SBR=2,65±0,65) és 7. (SBR=3,51±0,99) napokon, összehasonlítva a kontroll csoport SBR értékeivel ugyanazon vizsgált időpontokban ($p \leq 0,05$). Tíz nappal a beavatkozás után is magas SBR érték (SBR=2,11±0,95) volt megfigyelhető az iszkémiás csoportban, de ez a különbség nem volt szignifikáns a kontroll csoporttal összehasonlítva ($p \leq 0,05$). A kontroll csoport SBR értékei változatlanok maradtak a vizsgálat alatt, ami arra utal, hogy nem volt specifikus [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódás a vizsgált állapotokban (27. A. ábra). Az $\alpha V\beta 3$ integrin receptor specifikus radiogyógyszer, a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ alkalmazásával tíz nappal az okuláris I/R kiváltása után nem volt tapasztalható szignifikáns különbség az SBR értékek tekintetében az iszkémiás és a kontroll csoportok között (27. B. ábra) ($p \leq 0,05$).



27. ábra: Jel-háttér arány (SBR) elemzés eredményei.

A) SBR eredmények 1., 3., 7. és 10. nappal az okuláris I/R után [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakon alkalmazásával.

(B) SBR eredmények 10 nappal az okuláris I/R után [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ radiofarmakon alkalmazásával.

Szignifikancia szint: $p \leq 0,05$ (*).

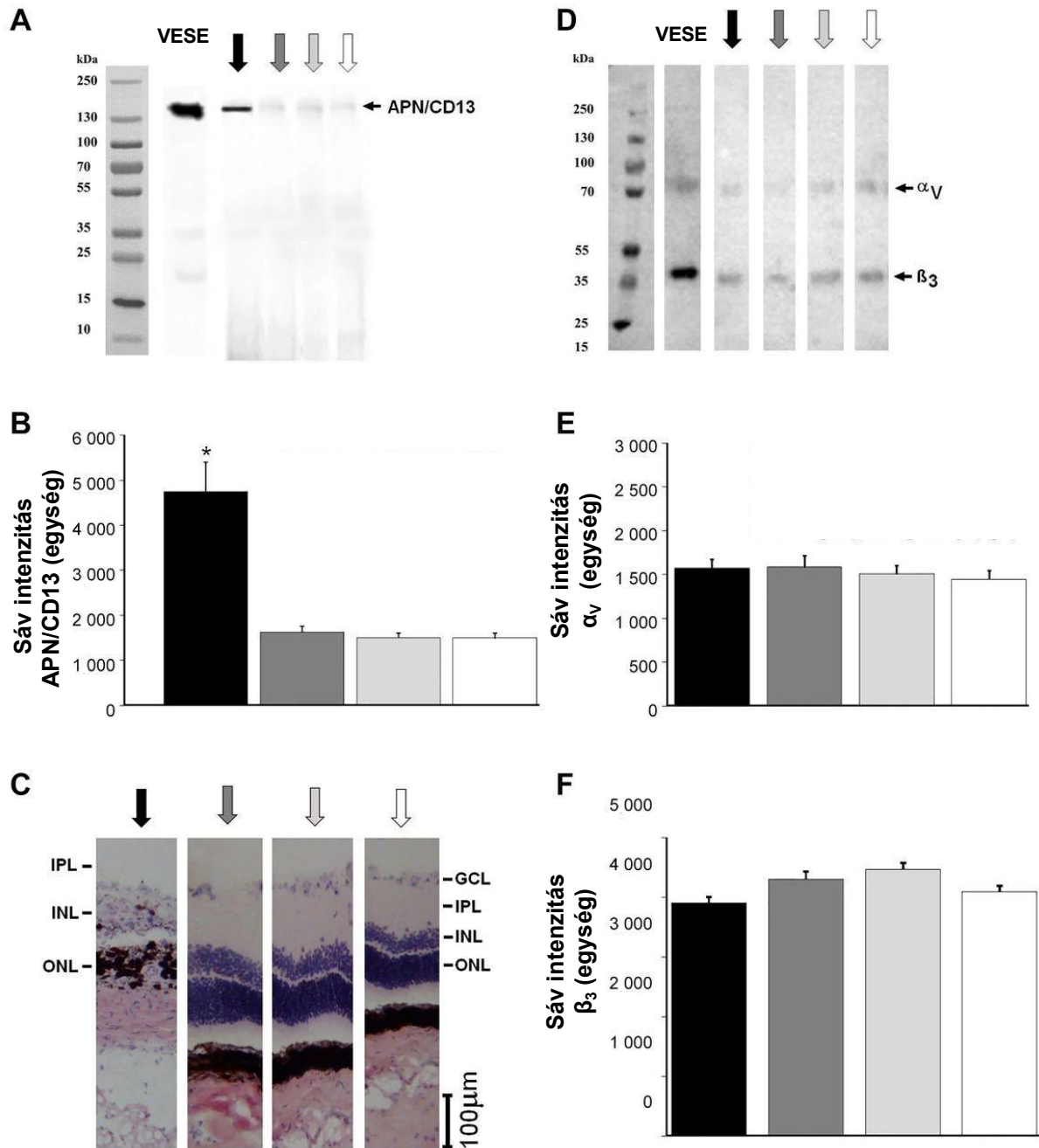
6.2.4 Western blot és szövettan vizsgálatok eredményei

Az APN/CD13 és $\alpha\beta 3$ molekulák expresszióját tíz nappal a beavatkozást követően vizsgáltuk Western blot technikával. Az APN/CD13 kifejeződésének kimutatásához patkány veseszövetet használtunk pozitív kontrollként, mivel ezen szövetről ismert, hogy magas szintű expressziót mutat. Ez lehetővé tette a Western blot eljárás hatékonyságának és specifitásának megerősítését, valamint alapvető referenciapontként szolgált a többi vizsgált mintához képest.

Az okuláris szövetmintákon végzett APN/CD13 expressziójának elemzése során szignifikánsan magasabb mennyiség volt detektálható az iszkémiás csoport ligált bulbusaiban (bal bulbus-I/R), mint ugyanezen állatok nem lekötött szemeiben (jobb bulbus-non-I/R), valamint a kontroll csoportban (28. A és B ábra) ($p \leq 0,05$). Az iszkémiás csoport nem ligált (jobb bulbus-non-I/R) és a kontroll csoport látószervei között nem mutatkozott szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$).

A hisztológiai vizsgálatok a retina súlyos szerkezeti károsodását igazolták a ganglion sejtrétegben (GCL), az inner plexiform rétegben (IPL), valamint a belső és külső nukleáris rétegekben (INL és ONL) az iszkémiás csoport ligált bulbusai esetén (bal bulbus-I/R). A hematoxilín-eozin (HE) festésű szövettani mintákban a ganglion sejtréteg alkotóinak számában jelentős csökkenés volt tapasztalható, amely a celluláris szétesésre és elhalásra utal. Az inner plexiform rétegben a terület elmosódottsága és a fiziológiás szerkezet elvesztése volt megfigyelhető. A belső nukleáris réteg (INL) sejtjei körében karyolízis (a sejtmagok feloldódása) és karyopiknózis (a sejtmagok zsugorodása) volt észlelhető, amely a súlyos sejtkárosodás jele. Ezen felül a külső nukleáris réteg (ONL) sejtjei között a sejtmagok rendezettsége felborult. A mintákban felfedezhető volt az extracelluláris tér relatív növekedése, ami az intercelluláris összeköttetések gyengülésének a következménye lehet. A kontroll csoport mintáiban a sejtrétegek szerkezete és denzitása normális volt és nem mutatott eltéréseket (28. C. ábra).

Az $\alpha\beta 3$ integrin receptor expressziót szintén elemeztük a kísérleti csoportokban. Az $\alpha\beta 3$ integrin receptor kimutatásához ugyancsak patkány veseszövetet alkalmazva pozitív kontrollként. Az eredmények alapján az $\alpha\beta 3$ receptor kifejeződésében nem volt tapasztalható szignifikáns különbség sem az iszkémiás, sem a kontroll csoport mintái között (28. D., E. és F. ábra) ($p \leq 0,05$). Az $\alpha\beta 3$ receptor expressziójának szintje mind a ligált, mind a nem ligált szemek esetében hasonló volt és nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll csoport értékeihez képest ($p \leq 0,05$).



- Iszkémiás csoport, bal bulbus-I/R
- Iszkémiás csoport, jobb bulbus-non-I/R
- Kontroll csoport, bal bulbus-non-I/R
- Kontroll csoport, jobb bulbus-non-I/R

28. ábra: A vizsgálati csoportok neoangiogén marker expressziójának Western blot és hisztopatológiai analízise 10 nappal a beavatkozás után.
A: APN/CD13 expresszió vizsgálata western blott analízissel.
B: Az APN/CD13 expresszió sematikus diagramja (kvantitatív Western blot analízis).
C: Reprezentatív H-E festés a kísérleti csoportok lekötött és nem lekötött szemeiben.
D: αVβ3 integrin receptor expresszió vizsgálata western blott analízissel.
E és F: Az αV és β3 integrin receptor expresszió tetszőleges egységértékeinek sematikus diagramja (kvantitatív Western blot analízis).
Szignifikancia szint: $p \leq 0,05$ (*).

6.3 Projekt 2: Akut alsó végtagi iszkémia – patkány modell

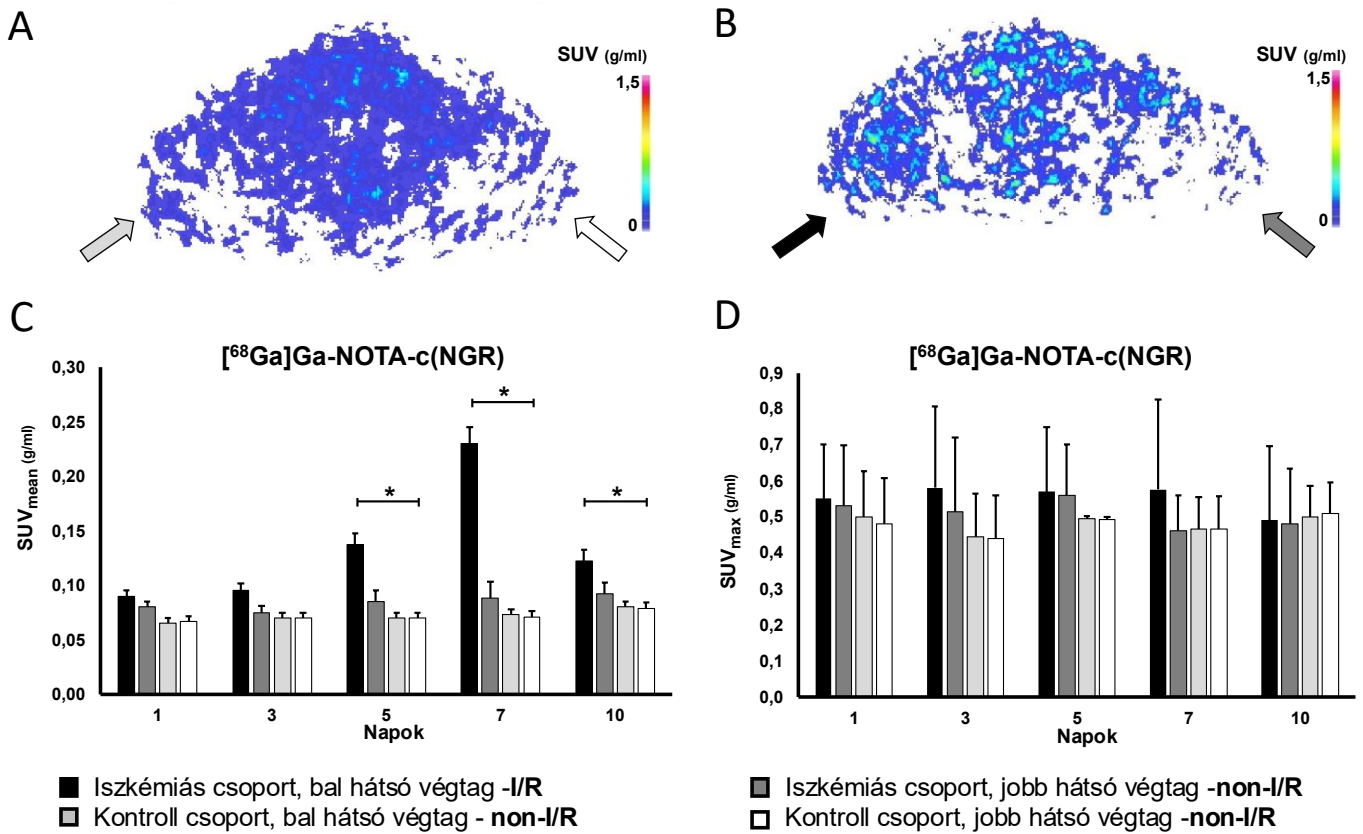
6.3.1 APN/CD13 receptor expresszió *in vivo* longitudinális vizsgálatának eredményei [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET segítségével

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

A kísérletben [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakonnal végzett PET vizsgálati eredményeket hasonlítottunk össze a I/R (iszkémia-reperfúzió) sérülésen átesett hátsó végtagokat vizsgálva, a nem I/R indukált hátsó testrészekkel összevetve az iszkémiás csoportban, valamint a non-IR hátsó végtagokat a kontroll csoportban, hogy feltárjuk az iszkémia-reperfúzió által okozott hatásokat az APN/CD13 receptor mintázatának vonatkozásában. A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET radiofarmakonnal megvalósított PET képalkotás a hátsó végtagok esetében a 29. A, B és 29. A ábrákon látható.

A vizuális értékelés során megállapítást nyert hogy az iszkémiás csoportban az I/R hátsó végtagok (bal hátsó végtag -I/R) felvétele fokozatos növekedést mutatott az iszkémia indukcióját követően az első naptól a hetedik napig, majd a 10. napon éles csökkenés volt megfigyelhető a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételében. Ezzel szemben, alacsonyabb radioaktivitás volt detektálható a non-I/R hátsó testrészekben (iszkémiás és kontroll csoport) (29. és 31. ábra).

A 29. C. és D. ábrák a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódásának mennyiségi értékelését hivatottak bemutatni (SUV_{mean} és SUV_{max}). A vizuális elemzéssel összhangban megfigyelhető volt, hogy folyamatosan nőtt a SUV_{mean} értéke az I/R hátsó lábokban az iszkémiás csoport esetén (bal hátsó végtag -I/R) az első naptól (SUV_{mean}: 0,090±0,005) a hetedik napig (SUV_{mean}: 0,230±0,015). A SUV_{mean} értékek a hetedik napon (0,230±0,015) bizonyultak a legmagasabbnak, amit éles csökkenés követett a 10. napon (0,123±0,010).



29. ábra: Az APN/CD13 expresszió *in vivo* longitudinális értékelése [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET képalkotás segítségével.

A: Reprezentatív transzaxiális bomláskorrigált PET-kép a kontroll csoportról a tourniquet által kiváltott hátsó végtagi iszkémiát követően 7 nappal.

B: Reprezentatív transzaxiális bomláskorrigált PET-kép az iszkémiás csoportról a tourniquet által kiváltott hátsó végtagi iszkémiát követően 7 nappal.

C: A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET vizsgálatok kvantitatív SUV_{mean} elemzése 1, 3, 5, 7 és 10 nappal az iszkémia indukciója után.

D: A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET vizsgálatok kvantitatív SUV_{max} elemzése 1, 3, 5, 7 és 10 nappal az iszkémia indukciója után.

A fekete nyíl és oszlop az iszkémiás csoport lekötött végtagjára (bal hátsó végtag -I/R), a sötétszürke nyíl és oszlop az iszkémiás csoport nem lekötött végtagjára (jobb hátsó végtag -non-I/R), a szürke nyíl és oszlop a kontroll csoport nem lekötött végtagjára (bal hátsó végtag -non-I/R), a fehér nyíl és oszlop a kontroll csoport nem lekötött végtagjára utal (jobb hátsó végtag -non-I/R).

Szignifikancia szint: * $p \leq 0,05$.

Állatok száma: 1. nap $n=10+5$, 3. nap $n=8+4$, 5. nap $n=6+3$, 7. nap $n=4+2$, 10. nap $n=2+1$ (csoportok: iszkémiás+kontroll)

Az iszkémiás csoportban az I/R hátsó végtagokban (bal hátsó végtag -I/R) az iszkémia kiváltását követő ötödik, hetedik és tizedik napokon szignifikánsan emelkedett [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódás volt detektálható a normálisan perfundált hátsó lábához képest ugyanazon kohort esetén (jobb hátsó végtag -non-I/R), a SUV_{mean} értékek pedig 0,138±0,010, 0,230±0,015 és 0,123±0,010 voltak az I/R hátsó testrész esetében az ötödik, hetedik és tizedik napokon, illetve 0,085±0,012, 0,088±0,015 és 0,093±0,011 a non-I/R hátsó lábakon ugyanazokon a mérési időpontokban (29 C. és D. ábra) ($p \leq 0,05$). A longitudinális vizsgálat maximuma [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételi értéke esetén a hetedik napon volt megfigyelhető.

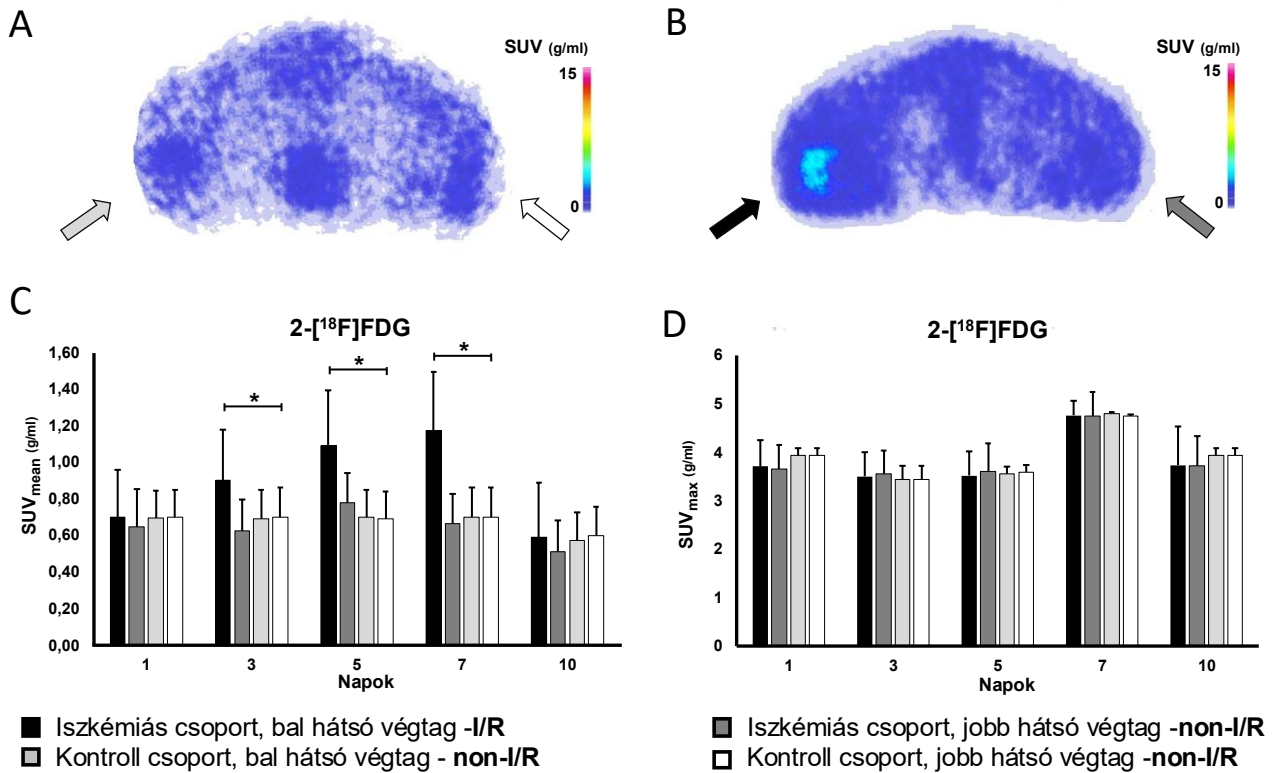
Az elvégzett vizsgálatok értékelése során nem volt kimutatható szignifikáns különbség az I/R és a non-I/R hátsó végtagok között a beavatkozásra átesett állatokban a SUV_{max} értékek tekintetében (iszkémiás és kontroll csoport) ($p \leq 0,05$). Azonban az első és a harmadik napokon a leköttést követően nem volt megállapítható szignifikáns különbség az I/R és a non-I/R hátsó lábak SUV_{mean} értékei között az iszkémiás csoportban (SUV_{mean} értékek: 0,090±0,005 és 0,100±0,007 az első és harmadik napon, illetve 0,080±0,005 és 0,075±0,006 az első és harmadik napon; $p \leq 0,05$). Ezenkívül az ötödik és a hetedik napi vizsgálati időpontokban az I/R hátsó testrészek (bal hátsó végtag -I/R) közel 2-3-szorosan magasabb [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételt mutattak, mint a normálisan perfundált végtagok (jobb hátsó végtag -non-I/R) az iszkémiás csoportban (29. C. és D. ábra). Továbbá az I/R hátsó végtagok radiofarmakon felhalmozódása (SUV_{mean}: 0,138±0,010 (ötödik nap) és 0,230±0,015 (hetedik nap)) körülbelül kétszer, háromszor magasabbnak adódott, mint a kontroll csoport egészséges állatainak bármelyik lába esetén ugyanabban a mérési időpontban (bal hátsó végtag - non-I/R SUV_{mean}: 0,070±0,004 (ötödik nap) és 0,073±0,008 (hetedik nap); jobb hátsó végtag -non-I/R SUV_{mean}: 0,070±0,005 (ötödik nap) és 0,071±0,009 (hetedik nap)). Emellett nem volt kimutatható jelentős különbség az iszkémiás csoport non-I/R hátsó végtagjainak és a kontroll csoport non-I/R hátsó testrészeinek [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételében, sem a kontroll csoport bal és jobb non-I/R hátsó végtagjai között ($p \leq 0,05$).

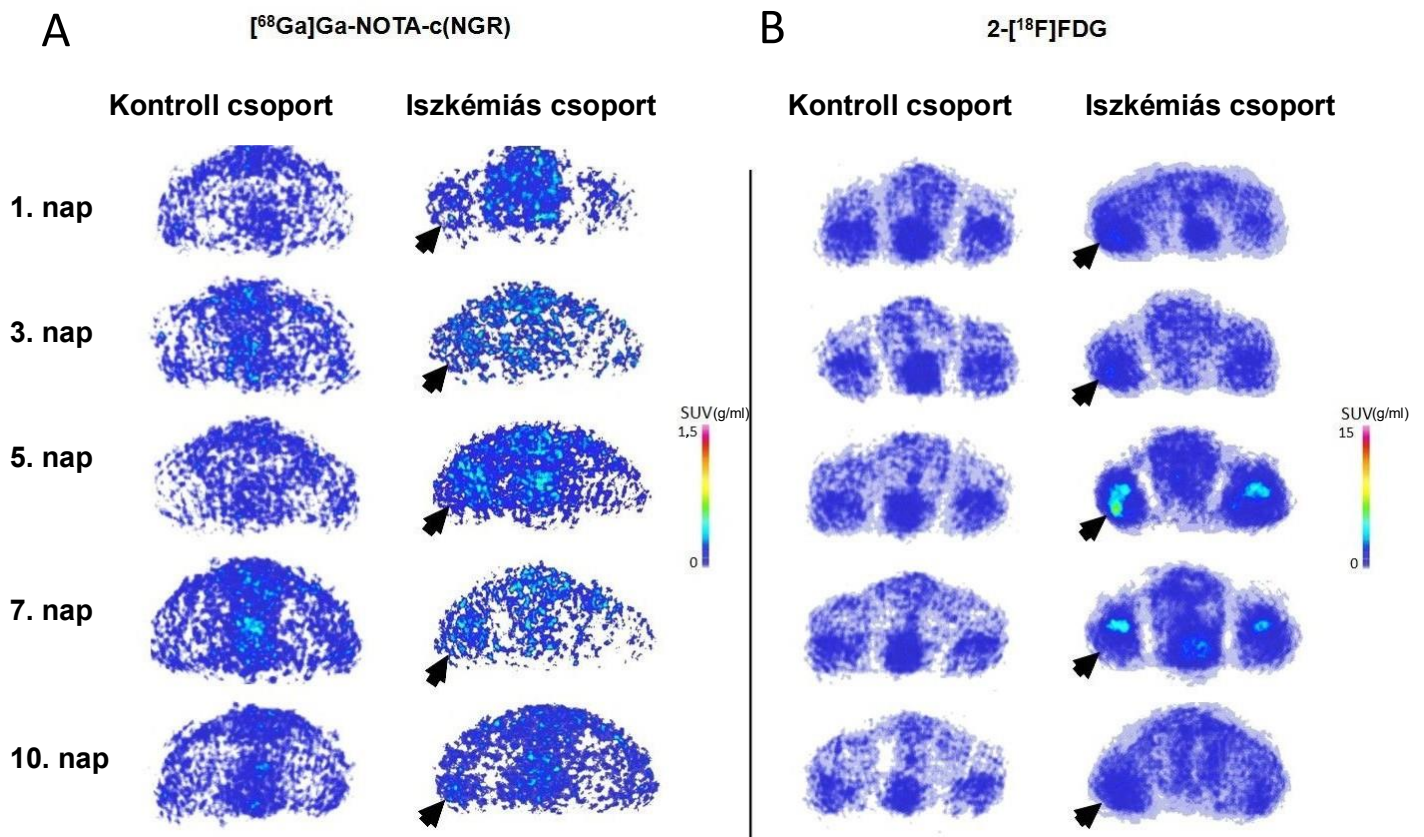
6.3.2 Metabolizmus *in vivo* longitudinális vizsgálatának eredményei [¹⁸F]FDG PET segítségével

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

A transzaxiális bomláskorrigált PET-képek és a kvantitatív értékelésének eredményei a 30. A.–D. és a 31. B. ábrán figyelhetők meg. A vizsgálatok során kvantitatív PET adatelemzést végeztünk amely alapján megfigyelhető volt a [¹⁸F]FDG felhalmozódásának folyamatos növekedése az iszkémiás csoport bal hátsó végtag -I/R végtagjaiban az 1. (SUVmean: 0,70±0,26) és a 7. (SUVmean: 1,18±0,32) vizsgálati időpontok között, amelyet a 10. napon csökkenés követett (SUVmean: 0,59±0,30) (30. ábra). Ez a tendencia hasonlóságot mutat a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) vizsgálatok eredményeivel. Emellett a 3. (SUVmean: 0,90±0,28), 5. (SUVmean: 1,09±0,30) és 7. (SUVmean: 1,18±0,32) napokon az I/R hátsó végtagok (iszkémiás csoport, bal hátsó végtag -I/R) [¹⁸F]FDG koncentrációja szignifikánsan magasabb volt ugyanezen csoport non-I/R hátsó lábainak (jobb hátsó végtag -non-I/R), valamint a kontroll csoport ugyanezen a kísérleti napokon mért non-I/R testrészeinek (bal hátsó végtag - non-I/R és jobb hátsó végtag -non-I/R) értékeihez képest (30. ábra) ($p \leq 0,05$); ezen túlmenően az I/R hátsó végtagokban körülbelül 2-3-szoros mennyiségű radioaktivitás volt detektálható, mint ugyanazon állatok non-I/R hátsó lábainak.

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





31. ábra: Az $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ és $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ felhalmozódásának longitudinális értékelése alsó végtagi patkánymodell esetén PET technikával.

A: Reprezentatív transzaxiális bomláskorrigált $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ PET-képek a kontroll és az iszkémiás csoportról 1, 3, 5, 7 és 10 nappal az iszkémia indukcióját követően.

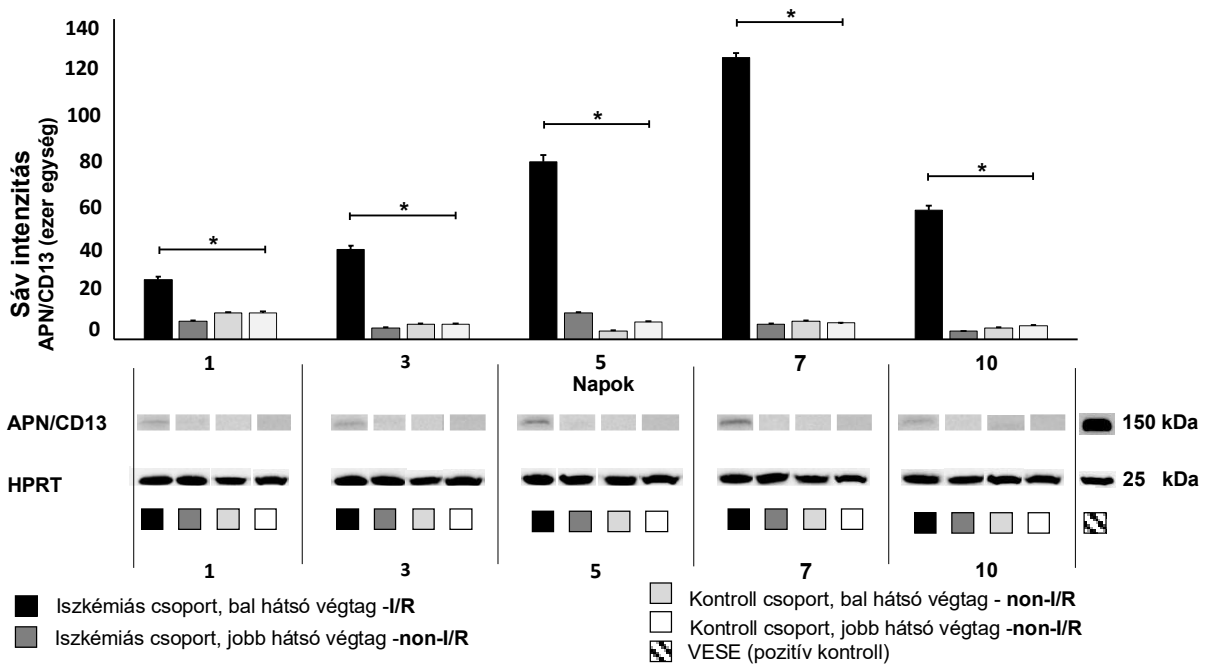
B: Reprezentatív transzaxiális bomláskorrigált $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ PET-képek a kontroll és az iszkémiás csoportról 1, 3, 5, 7 és 10 nappal az iszkémia indukcióját követően.

A fekete nyíl az iszkémiás csoport lekötött végtagjára (bal hátsó végtag -I/R) mutat

Állatok száma: 1. nap $n=10+5$, 3. nap $n=8+4$, 5. nap $n=6+3$, 7. nap $n=4+2$, 10. nap $n=2+1$
(csoportok: iszkémiás+kontroll)

6.3.3 Western blot vizsgálatok eredményei

Az APN/CD13 molekulák kifejeződését Western blot technikával elemeztük mindkét állatcsoportban. Az APN/CD13 fehérje expresszió szignifikánsan magasabb szintje volt detektálható az iszkémiás csoport I/R hátsó végtagjaiban (bal hátsó végtag -I/R) az iszkémiás csoport és a kontroll csoport non-I/R hátsó lábaihoz képest az iszkémia indukcióját követő 1., 3., 5., 7. és 10. napokon (32. ábra) ($p \leq 0,05$). Továbbá nem volt tapasztalható jelentős különbség az iszkémiás csoport nem-iszkémiás hátsó testrészeinek (jobb hátsó végtag -non-I/R) és a kontroll csoport (non-I/R) alcsoportjainak fehérje expressziója között. A fehérje kifejeződés az 1., 3., 5., 7. napokon folyamatos növekedést mutatott majd a 10. napon jelentős csökkenés volt megfigyelhető. A vizsgálati eredmények tanúsága szerint, az expresszió maximuma a hetedik napon volt megállapítható.



32. ábra: Western blot analízis az iszkémiás (I/R) és normálisan perfundált (non-I/R) hátsó végtagi izomszöveti lizátumokban az APN/CD13 expresszió (150 kDa) meghatározására az iszkémia indukcióját követő 1., 3., 5., 7. és 10. napokon.

Belső kontrollként HPRT-t (25 kDa) használtuk a minták mennyiségének kiegyenlítésére. Pozitív kontrollként patkány veseszövetet alkalmaztunk.

A fekete szín az iszkémiás csoport lekötött végtagjára (bal hátsó végtag -I/R), a sötétszürke szín az iszkémiás csoport nem lekötött végtagjára (jobb hátsó végtag -non-I/R), a szürke szín a kontroll csoport nem lekötött végtagjára (bal hátsó végtag - non-I/R), a fehér szín a kontroll csoport nem lekötött végtagjára utal (jobb hátsó végtag -non-I/R). A csíkos minta a vese mint pozitív kontrollra utal.

Szignifikancia szint: * $p \leq 0,05$.

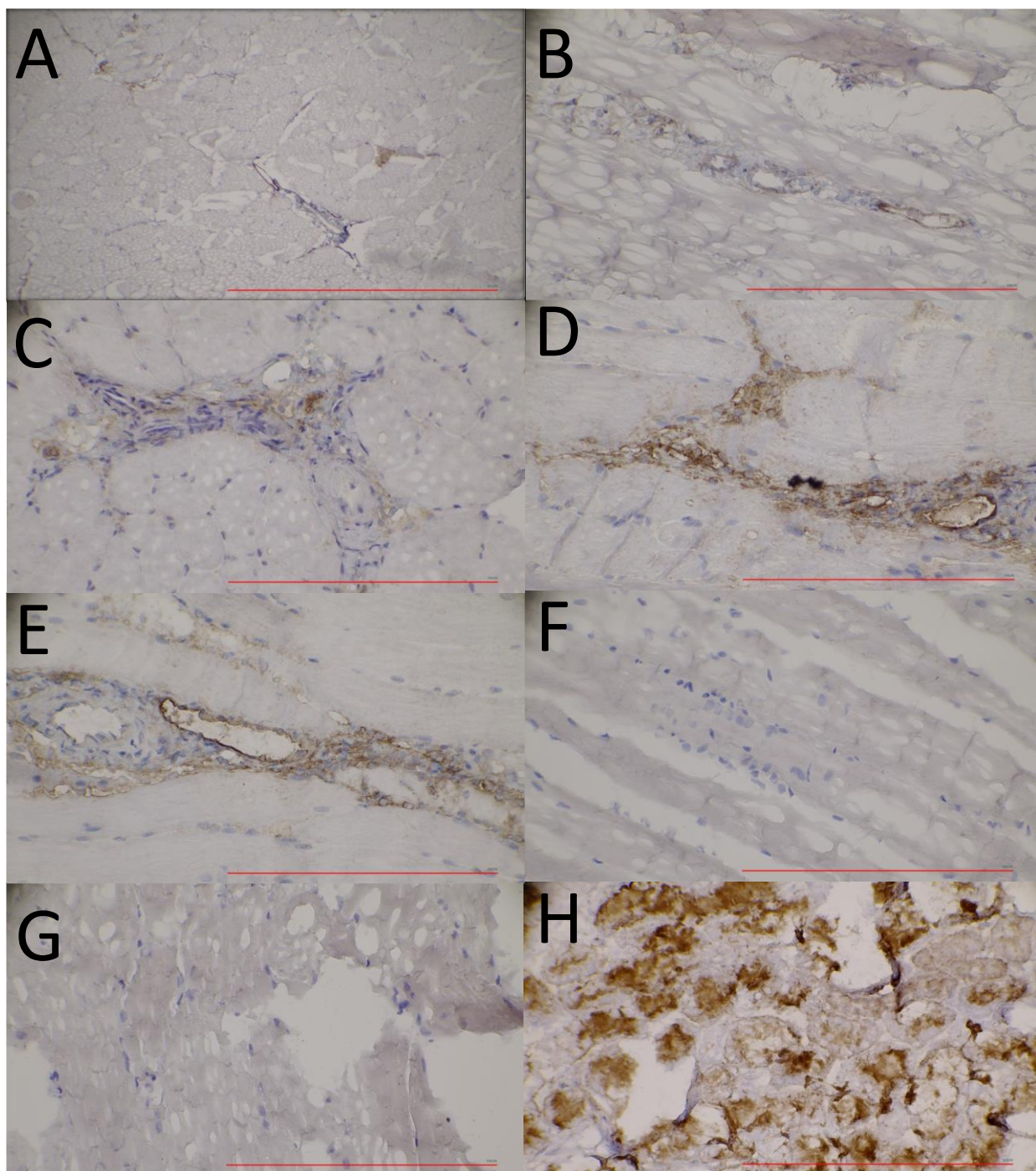
6.3.4 Immunhisztokémia vizsgálatok eredményei

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

A 33. ábra az IHC vizsgálatok eredményeit hivatott összefoglalni, amely szemlélteti az expresszió időbeli dinamikáját a kísérleti és a kontroll csoportokban. Az első napon (33. A. ábra) az iszkémiás csoport iszkémián átesett végtagjainál (bal hátsó végtag -I/R) gyenge, elszórtan megjelenő barna festődés volt megfigyelhető az iszkémiás végtag izomszövetében, amely a fehérje alacsony szintű jelenlétére utalt. A harmadik napra (33. B. ábra) a festődés intenzitása egyértelműen fokozódott, és a festett területek mérete is jelentősen megnövekedett, jelezve az expresszió emelkedését és az érintett sejtek nagyobb számát és a hetedik napra (33. D. ábra) a barna festődés elérte a maximális intenzitást, amely az APN/CD13 kifejeződés csúcspontját tükrözte az iszkémián átesett szövetekben. Ezt követően az APN/CD13 expresszió intenzitása enyhén csökkent a beavatkozás utáni 10. napon (33. E. ábra), jelezve a molekuláris folyamatok változását.

Az iszkémiás csoport nem lekötött hátsó lábai (jobb hátsó végtag -non-I/R) esetén alig észlelhető APN/CD13 pozitívitas volt megfigyelhető (33. F. ábra), továbbá hasonló eredményre jutottunk a kontroll csoport normálisan perfundált (non-IR) hisztológiai metszetei esetén is (33. G. ábra). A kontroll csoport ezen non-I/R mintái negatív kontrollként szolgáltak az APN/CD13 expresszió vizsgálatához, biztosítva az eredmények hitelességét és specifikusságát.

A patkány veseszövet (33. H. ábra) pozitív kontrollként volt alkalmazva az APN/CD13 kifejeződés kimutatására, mivel ezen szövetről ismert, hogy magas szintű expressziót mutat. A fentebb ismertetett alkalmazás oka az immunhisztokémiai eljárás hatékonyságának és specifikitásának megerősítése. A veseszöveten detektált intenzív barna festődés nagy bizonyossággal jelezte az APN/CD13 jelenlétét, amely alapvető referenciapontként szolgált a többi vizsgált mintához képest.



33. ábra: Az APN/CD13 expresszió immunhisztokémiai vizsgálata az iszkémiás csoport bal hátsó végtag -I/R izomszövetében az iszkémiát kiváltó tourniquet-alkalmazása utáni 1. (A), 3. (B), 5. (C), 7. (D) és 10. (E) napokon. Az iszkémiás csoport jobb hátsó végtag -non-I/R (F) és a kontroll csoport (G) jobb hátsó végtag -non-I/R hátsó végtagi izomszöveti mintáit negatív kontrollként használtuk. A patkány veseszövet (H) pozitív kontrollként szolgált az APN/CD13 expresszió kimutatására. Az anti-CD13 primer antitestet 3,3-diaminobenzidinnel (DAB) vizualizáltuk (barna festődés). Nagyítás: 40×. Méretarány: 200 µm.

7. Megbeszélés

A makro- illetve mikrokeringés károsodása gyakori következménye a kardiovaszkuláris rendszer betegségeinek, a metabolikus szindrómának és a 2-es típusú cukorbetegségnek (49). Chen és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a 2-es típusú diabétesz következtében fellépő PDR (proliferatív diabéteszes retinopátia) és PAD (perifériás artériás betegség) kialakulása között összefüggés van (50). Ennek molekuláris hátterében a keringés iszkémia-reperfúzió (I/R) által előidéztet károsodásai állnak (51) (52). Továbbá Buehler és munkatársai azt a megállapítást tették, miokardiális infarktus rágsáló modell vizsgálata során, hogy reláció állapítható meg az I/R által kiváltott mechanizmusok és az APN/CD13 kifejeződésének változása között (92).

Az APN/CD13 expressziója fokozódik hipoxiás környezetben, így potenciális biomarkerként alkalmazható az iszkémia-reperfúzióval és neovaszkularizációval járó állapotok pozitron emissziós tomográfiával végzett vizsgálatában. Semenza és munkatársai [¹⁸F]FDG-vel végzett kísérletei bizonyították, hogy a hipoxia-indukált faktor (HIF) részt vesz a tumor angiogenezisben, amely molekuláris hátterében a glükóz metabolizmus fokozódása áll (11). Ezen kutatás jól reprezentálja a [¹⁸F]FDG jelentőségét, mint a PET képalkotás „arany standardja”, ami nagyszámú kutatásban jelenik meg mint referencia molekula. Továbbá Zheng és munkatársainak vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-PRGD₂ molekula, mint humán klinikai vizsgálati készítmény effektív eszköz lehet a tüdőrák képalkotásában, ezenkívül szignifikánsan hatékonyabb a [¹⁸F]FDG PET/CT-vel szemben a metasztatikus nyirokcsomók azonosítása terén (17). Az RGD szekvencia alkalmazhatósága jelentős kutatói érdeklődést váltott ki az onkológia területén, továbbá újabb ígéretes tripeptid szekvenciákat tartalmazó molekulák fejlesztését irányozta elő. Az NGR szekvencia beépítése és felhasználása különböző kémiai módosításokkal és más-más gyűrűzárási stratégiával készült peptid-származékokba lehetőséget ad különféle gyógyszerjelölt molekulák fejlesztésére és tesztelésére, mint például [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR). A közölt vizsgálati eredmények alapján a hatásmechanizmus az APN/CD13 receptorhoz való specifikus kötődésen alapul (19).

Dolgozatomban kettő vizsgálatosorozat került kifejtésre. Az elsőben a proliferatív diabéteszes retinopátia patofiziológiai folyamatait vizsgáltuk patkány állatmodellen, ahol az iszkémia-reperfúzió által inicializált angiogenezis folyamatok és az APN/CD13 molekula expressziója közötti összefüggések feltárására tettünk kísérletet. A kutatásban az állatok bal szeme lekötésre került majd az így kiváltott iszkiémiát 90 perc után megszüntettük. Az okuláris I/R kiváltása

utáni 1., 3., 7. és 10. napokon [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR)-t injektáltuk a laterális farokvénán keresztül. Továbbá a 10. napon [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂-t is alkalmaztunk. A radiofarmakon eloszlását az injekció beadása után 90 perccel *in vivo* PET képalkotással határoztuk meg. A PET vizsgálat sorozatot követően *ex vivo* Western blot és szövettani vizsgálatokat végeztünk.

A második vizsgálatsorozatban az akut alsó végtagi iszkémia patofiziológiai folyamatait vizsgáltuk patkány állatmodellen, ahol az iszkémia-reperfúzió által inicializált angiogenikus folyamatok és az APN/CD13 molekula expressziója közötti összefüggések feltárására tettünk kísérletet. A kutatásban az állatok bal lába lekötésre került majd az így kiváltott iszkémiát 120 perc után megszüntettük. A hátsó végtag I/R kiváltása utáni 1., 3., 5., 7. és 10. napokon egymás után két PET vizsgálatot végeztünk, először [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) majd négy órával később [¹⁸F]FDG alkalmazásával. A radiofarmakon eloszlását az injekciók beadása után 60 perccel *in vivo* PET képalkotással határoztuk meg. A PET vizsgálatok mellett *ex vivo* Western blot és immunhisztokémia vizsgálatokat is végeztünk.

Kutatómunkánk elvégzése során a következő új eredmények születtek:

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

- Longitudinális vizsgálatot végeztünk az 1., 3., 5., 7. és 10. napokon az I/R után, ahol megvizsgáltuk a radiojelölt molekulák felhalmozódásának időbeli változásait.
- Arra a következtetésre jutottunk hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) alkalmas radiotrészter az iszkémia-reperfúzió által kiváltott APN/CD13 expressziójának, továbbá a [¹⁸F]FDG a glükóz metabolizmus mértékének mennyiségi és időbeli változásainak kimutatására az akut alsó végtagi iszkémia állatmodellben.

A kutatómunka első szakaszában a diabéteszes retinopátia mikrovaszkuláris szövődményeit tanulmányoztuk patkány állatmodellen. A tudományos szakirodalomból ismert, hogy a kóros vaszkuláris burjánzás, az angiogenezis és a retinális hipoxia jelenléte erősen összefügg a DR kialakulásával (93, 94). Korábban már beszámoltak arról, hogy a cukorbetegségben a magas vércukorszint elősegíti a hipoxia kialakulását, ami a pro-angiogén faktorok, például a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), az angiopoietin-2 (Ang-2), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) és más mediátorok fokozott expresszióját eredményezi a retina rétegeiben és az üvegtestben (94, 95). Ezen túlmenően korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az NGR peptid APN/CD13-hoz és az RGD peptid α V β 3 integrin receptorhoz való specifikus kötődése miatt ezen molekulák radioaktívan jelölt formái alkalmasak lehetnek az angiogénikus folyamatok *in vivo* tanulmányozására iszkémia-reperfúziós modellekben. Ezen összefüggések elemzése alapján, a munka célja az volt, hogy az élő szervezetben meghatározzuk az APN/CD13 hipoxia által kiváltott angiogén faktor expressziós szintjét iszkémia-reperfúziós patkánymodellben [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET segítségével (89, 96).

Az APN/CD13 expresszió időbeli változásának értékelésére az iszkémia-reperfúzió indukált patkánymodellben *in vivo* PET képalkotást alkalmaztunk. Az élő szervezetben iszkémia-reperfúzióval összefüggő angiogénikus folyamatokat vizsgáló kutatások területén széleskörben ismertek a rágcsáló retina modellek, amelyek alkalmasak az újérképződés fiziológiás és kóréletti folyamatainak tanulmányozására. Az egyik leggyakrabban használt modell a látóideget kísérő artériák és erek lekötése (97), ezért vizsgálatunk során ligált szem patkány állatmodellt alkalmaztunk. A vizsgált időpontokat (1., 3., 7. és 10. napok az I/R után) az első héten várható APN/CD13 expressziós csúcs miatt választottuk ki, mivel más szervek iszkémia-reperfúziós modelljeiben, mint például a hátsó végtag (98) vagy a szívizom (96) esetén ezen értékek a hetedik napig emelkedő, majd ezután csökkenő tendenciát mutattak. A PET vizuális értékelés megerősítette, azt hogy az iszkémiás csoport szemi régiójában magasabb SUVmean értékek voltak detektálhatók, mint a kontroll csoport látószervei esetén (25. A. ábra). A vizuális értékelés során a bal bulbus (iszkémiás csoport, bal bulbus-I/R) egyértelműen vizualizálható

volt [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) segítségével, ami arra enged következtetni, hogy a radiotrészert kötődik a sérült retina alkotóihoz. Az iszkémiás csoport ugyanazon kísérleti állataiban a nem ligált szemek (iszkémiás csoport, jobb bulbus-non-I/R) esetén a háttérértékekhez hasonló SUVmean mennyiségeket és vizuális mintázatot detektáltuk. A kontroll csoportban a nem lekötött szegolyókban (non-I/R) hasonló eredményeket regisztráltunk, mint az iszkémiás csoport nem ligált látószervei (jobb bulbus-non-I/R) esetén.

A longitudinális vizsgálatban mind az iszkémiás, mind a kontroll csoportot SUVmean analízisnek vetettük alá. Az első napon nem volt szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a vizsgálati csoportok között. A kapott adatok alapján sikeresen kialakításra kerültek a longitudinális vizsgálat alapértékei. A vizsgálat sorozat többi időpontjában kapott eredmények megfeleltek a hipotézisnek; statisztikailag szignifikáns különbséget ($p \leq 0,05$) találtunk az iszkémiás csoport ligált (bal bulbus-I/R) és nem lekötött (jobb bulbus-non-I/R) bulbusai között, továbbá nem volt szignifikáns különbség az iszkémiás csoport nem ligált (jobb bulbus-non-I/R) és a kontroll csoport nem lekötött (non-I/R) látószervei között. Érdekes módon a beavatkozás utáni tizedik napon megnövekedett [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételt detektáltunk az iszkémiás csoport nem ligált szeméi esetén (jobb bulbus-non-I/R) (25. B. ábra). Ez az időbeli mintázat jól illeszkedik a korábbi megfigyelésekhez, melyek szerint az iszkémia-reperfúziós károsodást követően az angiogenezishez, gyulladásához és szöveti regenerációhoz kapcsolódó markerek – köztük integrinek vagy peptidázok – expressziója fokozatosan növekszik az első napokban, majd körülbelül egy hét elteltével tetőzik, és ezt követően mérséklődik. Grönman és munkatársai (96) például a myocardialis I/R modellt alkalmazva kimutatták, hogy az $\alpha\beta 3$ integrin expressziója [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RGD PET segítségével a 13 ± 4 napon. Vizsgálati eredményekkel megegyező időbeli lefolyást (7. napi maximum) írt le Orbay és kollégái (98) is a hátsó végtagi iszkémiás modellben, ahol az angiogénikus folyamatok, valamint a perfúzió dinamikája is ezt a mintázatot követte. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az APN/CD13 expressziójának változása is hasonló kinetikát mutat, így az általunk választott időpontok megalapozottan reprezentálják a kulcsfontosságú fázisokat. Feltételezésünk szerint az esetleges sejtes (például a látóidegfej és a preganglionális neuronok véráramlásának változása) és a fiziológiás autoregulációs mechanizmusok (például a vaszkuláris simaizomsejtek miogén összehúzódása által elindított depolarizáció, érhártya válasz) állhatnak ezen eredmények hátterében (99-101). Ezen mechanizmusok hátterében olyan komplex sejtes és érrendszeri válaszok állnak, amelyek kulcsszerepet játszanak a retinális és chorioideális véráramlás fenntartásában iszkémiás stressz esetén. Kur és munkatársai (99) részletesen ismertették a retina

és érhártya véráramlásának szabályozásában részt vevő miogén, neurogén és metabolikus mechanizmusokat, amelyek zavarai patológiás körülmények között jelentős funkcionális eltérésekhez vezethetnek. Továbbá, Lovasik és munkatársai vizsgálatai (100) rávilágítottak arra, hogy az egyoldali perfúziócsökkenés a kontralaterális szem retinális működését is hátrányosan befolyásolhatja, ami a centrális szabályozás közvetett hatására utal. Kergoat (101) pedig kimutatta, hogy a vaszkuláris stressz elektrofiziológiai következményei, például az elektoretinográfiás eltérések, jól korrelálnak az autoregulációs válaszokkal, függetlenül a diabeteses háttértől. Ezek az adatok alátámasztják azt a feltételezést, miszerint a sejtes és érfa reakciók integrált módon járulhatnak hozzá a megfigyelt expressziós mintázatokhoz. Továbbá a tudományos szakirodalomból ismert, hogy az APN/CD13 részt vesz az extracelluláris mátrix lebontásában, ami befolyásolhatja a vér-retina gát permeabilitását (102, 103). Az SBR elemzés elvégzése során a kísérleti csoportokban a vizsgált szerv ellenoldali párját alkalmaztuk belső standardként. Az eredmények alakulása a szakirodalomból ismert trendet mutatta és az előzetes várakozásoknak megfelelő volt. Az első napon nem volt szignifikáns különbség detektálható az iszkémiás és a kontroll csoport értékei között. A harmadiktól a hetedik napi csúcserőig szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbség volt kimutatható a csoportok között, majd a tizedik napon visszaesést tapasztaltunk az SBR értékek tekintetében. A tizedik napon végzett vizsgálatok alapján megállapítható, bár továbbra is szemmel látható különbség adódott az iszkémiás csoport és a kontroll csoport értékei között, bár ezek a különbségek már nem voltak statisztikailag szignifikánsak (27. A. ábra).

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ specifikus kötődése az $\alpha\text{V}\beta 3$ integrin receptorhoz ismert jelenség (104), ezért ezt a molekulát használtuk fel a specificitás vizsgálatára, annak érdekében, hogy kizárjuk a nem szelektív kötődés lehetőségét *in vivo*. A SUVmean és az SBR analízisekben nem találtunk szignifikáns különbséget sem az iszkémiás csoport (bal bulbus-I/R/jobb bulbus-non-I/R), sem a kontroll csoport eredményeiben (bal bulbus-non-I/R/jobb bulbus-non-I/R) (26. B. és 27. B. ábra). Tekintettel arra, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ molekulák alkalmazásakor nem volt szignifikáns különbség az SBR értékekben a nem ligált szemek (non-IR) értékei között (iszkémiás, kontroll csoport), arra a következtetésre jutottunk, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ molekula nem specifikus kötődése kizárható a kísérleti modellünk esetén (27. B. ábra). Bár az I/R által kiváltott angiogenezis nem minden aspektusára derült eddig fény, az viszont ismert, hogy a vese- és a szív iszkémia modellekben az angiogén faktorok, mint például a VEGF, aktiválódnak az I/R

után a korai és késői stádiumokban, hogy stabilizáló hatást fejtsenek ki a mikrokeringésben és a vérellátásban az érintett területeken (105, 106).

Az $\alpha V\beta 3$ integrinhez nagy affinitással kötődő $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ radiofarmakon alkalmazása lehetőséget adott a nem specifikus kötődés kizárására. A kvantitatív analízis során a radiofarmakon felhalmozódása nem mutatott szignifikáns különbséget sem az iszkémiás, sem a kontroll csoport szemeiben, ami közvetett módon megerősíti, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ tracer esetében a mérési eredményeket nem torzítja nem specifikus kötődésből származó radiofarmakon felhalmozódás. Továbbá, az integrin-specifikus $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ alacsony koncentrációja arra utal, hogy ebben a kísérleti modellben és az alkalmazott időablakban nem jellemző a fokozott $\alpha V\beta 3$ integrin expresszió, így az I/R által kiváltott angiogenikus válasz e szakaszban még nem jelentkezik markánsan az intraokuláris szövetekben.

A fentebb ismertetett megfigyelés részben összhangban van Velikyan és munkatársainak adataival, akik főemlős modellben vizsgálták a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-RGD}$ molekula biodisztribúcióját (104). Eredményeik szerint az integrin-pozitív szövetekben (pl. daganatokban és aktívan neovaskularizálódó területeken) magasabb felhalmozódás figyelhető meg, míg fiziológiai körülmények között, vagy alacsony angiogenikus aktivitás esetén a tracer-retenció minimális. Ez jól illeszkedik ahhoz a tapasztalatunkhoz, hogy az I/R utáni szemszövetekben, a vizsgált napokon (1., 3., 7., 10. nap), nem volt megfigyelhető szignifikáns mértékű $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ felvétel. Ugyanakkor Pallet és munkatársai (105) egyértelmű angiogenikus választ írtak le vesében, különösen a VEGF és más pro-angiogén tényezők expressziója révén, már az I/R-t követő korai fázisban. Ezt ők humán biopsziás mintákon igazolták, ahol az endothelialis proliferáció, valamint a mikrovaszkuláris hálózat újraképződése már röviddel a reperfüzió után megindult. Hasonlóan, Kobayashi és kollégái (106) infarktusos szívmódelletben fluoreszcens immunjelöléssel és funkcionális képalkotással követték az angiogenezist: a VEGF expresszió és a kapilláris sűrűség fokozódása már a 3. naptól megfigyelhető volt, és a 7–14. nap között tetőzött. A fenti adatokkal való részleges eltérés egyik lehetséges oka, hogy a retina és az intraokuláris szövetek angiogenikus válasza konzervatívabb lehet más szervekhez képest, részben a szoros vér-retina gát, valamint az immunológiai és sejtvédelmi mechanizmusok miatt. Továbbá, az általunk alkalmazott modell (akut, 90 perces iszkémia, majd reperfüzió) kevésbé súlyos, mint a szív vagy vese esetében vizsgált teljes artériás elzáródás vagy infarctus modell, ami szintén hozzájárulhat az alacsonyabb integrin expresszióhoz. Elképzelhető továbbá, hogy a retinális vagy chorioideális

angiogenikus válasz más molekulák (pl. CD13, VEGFR2) közvetítésével zajlik, és az $\alpha V\beta 3$ integrin expressziója csak későbbi időpontban aktiválódik, így az általunk vizsgált 1–10 napos ablak nem feltétlenül fedi le a válasz csúcspontját.

Az APN/CD13 expressziójának Western blot analízise az okuláris szövetben nagyobb mennyiségű APN/CD13 fehérjét mutatott ki a ligált, mint a nem lekötött szemekben, ami korrelációt mutat a SUVmean értékekkel (28. A. és B. ábra). Nem volt megfigyelhető különbség az APN/CD13 expressziójában az iszkémiás és a kontroll csoport nem ligált szemei között (non-I/R). A specificitás igazolása végett Western blot vizsgálatot végeztünk az $\alpha V\beta 3$ integrin receptor expresszió jelenlétének meghatározására. Minden kísérleti csoportban egyformán alacsony fehérjekoncentrációt mértünk, ami szignifikánsan alacsonyabb volt a pozitív kontrollként alkalmazott veseminta mennyiségi értékéhez képest (28. D., E. és F. ábra). Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ molekula negatív kontrollként alkalmazható, mivel a PET felvételeken akkumuláció nem volt megfigyelhető, továbbá a Western blot analízis nem mutatott ki $\alpha V\beta 3$ integrin receptor expressziót, amely a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ radiofarmakon célpontja. A szövettani minták értékelése megerősítette a lekötött szem iszkémia-reperfúzió okozta sérülését az iszkémiás csoportban (iszkémiás csoport, bal bulbus-I/R) (28. C. ábra). A kapott eredményeket támasztja alá az a tény, hogy hasonló szövettani eredményeket írtak le a szakirodalomban, ahol iszkémia-reperfúzió után a retina vastagsága és a sejtek sűrűsége a recehártya különböző rétegeiben már 60 perces ligálás után is szignifikánsan csökkent (107). Általánosságban megállapítható, hogy az angiogén folyamatok *in vivo* képalkotással történő azonosítása és tanulmányozása nagy jelentőséggel bír a retina vaszkuláris betegségeinek, így például a diabéteszes retinopátiának a korai diagnosztikájában és a terápiás válasz objektív értékelésében (108). Vizsgálatunk eredményei arra a következtetésre vezettek, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -mal jelölt NGR-motívumot magába foglaló $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ radiotrészter az iszkémia-reperfúzió által kiváltott APN/CD13 expressziójának mennyiségi és időbeli változásainak kimutatására alkalmas ágens lehet az iszkémia/reperfúzió által kiváltott diabéteszes retinopátia patkánymodellben. Ezek az adatok megalapozhatják egy olyan, célzott molekuláris képalkotási módszer kifejlesztését, amely képes korai stádiumban azonosítani a retina mikrokeringésének zavarait és az ezzel párhuzamosan aktiválódó patomechanizmusokat. A megnövekedett SUVmean értékek jelenléte a sérült retinában nemcsak az APN/CD13 lokális expressziójának feltérképezését teszi lehetővé, hanem a jövőben diagnosztikai biomarkerként is szolgálhat a betegség progressziójának vagy a terápiás beavatkozások hatékonyságának monitorozására.

Hosszabb távon ez a megközelítés hozzájárulhat olyan személyre szabott kezelési stratégiák kidolgozásához, amelyek az APN/CD13 útvonal célzásán alapulnak, különösen olyan páciensek esetében, akiknél az angiogén aktivitás kulcsszerepet játszik a retina szerkezetének és funkciójának károsodásában.

A kutatómunka második szakaszában akut alsó végtagi iszkémia állatmodellen végeztünk vizsgálatokat. Az iszkémiás csoport bal hátsó végtagjainak (bal hátsó végtag -I/R) [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET felvételeit hasonlítottuk össze ugyanezen csoport jobb hátsó lábával (jobb hátsó végtag -non-I/R) és a kontroll csoport egészséges hátsó testrészeivel (bal hátsó végtag -non-I/R, jobb hátsó végtag -non-I/R), hogy feltárjuk az iszkémiával összefüggő változásokat az APN/CD13 receptor mintázatában. A hátsó végtagok [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakon felvételei (29. A., B. ábra és 31. A. ábra) és a bomlás-korrigált PET képek vizuális értékelése során nyert adatok az iszkémiás csoport hátsó testrészeinek (bal hátsó végtag -I/R) [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakon akkumulációja esetén az iszkémia-reperfúzió indukcióját követően az első naptól a hetedik napig fokozatos növekedés mutatkozott, majd a tizedik napon éles csökkenés volt megfigyelhető. Ezzel szemben, alacsony radioaktivitás érték volt kimutatható az iszkémiás csoport nem I/R hátsó végtagjában (jobb hátsó végtag -non-I/R) és a kontroll csoport mindkét hátsó testrészében (bal hátsó végtag - non-I/R, jobb hátsó végtag -non-I/R) (29. ábra és 31. ábra). A vizuális analízis során tapasztaltakkal összhangban az I/R hátsó végtagok SUVmean értékeinek folyamatos emelkedése volt mérhető az iszkémiás csoportban az első naptól a hetedik napig. Mivel az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a celluláris hipoxiához/anoxiához való alkalmazkodást a hipoxia indukált faktorok szabályozzák, beleértve a Hipoxia indukált faktor-1 α -t (HIF-1 α), amely kiváltja a különböző pro-angiogén gének transzkripcióját és a kapcsolódó fehérjék expresszióját (109, 110), feltételezhető, hogy a radiofarmakon koncentráció emelkedése a pro-angiogén faktorok, például az APN/CD13, iszkémia által kiváltott emelkedésének a következménye. Az I/R-indukált hátsó végtagokban megfigyelt progresszív [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR felhalmozódás az első, harmadik, ötödik és hetedik napon, majd az ezt követő, tizedik napi visszaesés szoros összefüggést mutat az irodalomban ismertett angiogén válasz időbeli lefutásával, különösen az APN/CD13 expresszió mintázatát tekintve. Kobayashi és munkatársai (106) iszkémiás szívmodellben írták le, hogy az angiogenezisre jellemző markerek, köztük a VEGF, 1–5 napos időablakban maximálisan expresszálódnak az infarktus zónában, majd a későbbiekben jelentős csökkenést mutattak. A mögöttes biológiai mechanizmusokra vonatkozóan Krock et al. (109) és Michiels (110) kiemelik, hogy a hipoxia-indukált sejtválasz során a HIF-1 α aktiválja számos pro-

angiogén gén transzkripcióját, beleértve azokat is, amelyek az extracelluláris mátrix átalakításáért és új erek képződéséért felelnek. Michiels (110) külön kiemeli, hogy hipoxiás környezetben az olyan proteázok, mint az APN/CD13, kulcsszerepet játszanak a szöveti regeneráció szabályozásában és az angiogenezis fenntartásában.

Vizsgálatunkban az I/R hátsó végtagokban mért SUV_{mean} értékek szignifikáns emelkedést mutattak a 7. napig, majd a 10. napra jelentős visszaesést, ami in vivo is visszatükrözi az APN/CD13 expresszió időbeli lefutását. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakon megbízható képalkotó eszköz lehet az APN/CD13-mediált angiogén aktivitás nyomon követésére akut iszkémia-reperfúziós modellekben, és potenciálisan hozzájárulhat terápiás célpontok és időablakok azonosításához is. Willmann és munkatársai egyik tanulmányukban [⁶⁴Cu]Cu-jelzett vaszkuláris endotél növekedési faktor-121 ([⁶⁴Cu]Cu-VEGF-121) segítségével hátsó végtagi iszkémia-reperfúziós modellben az angiogénikus folyamatok leképezése végett a beavatkozás utáni első héten (a 8. napon, majd a csökkenés után) a kapott eredményeinkhez viszonyítva még fokozottabb perfúziós helyreállást tapasztaltak (111). Hasonló eredményekről számoltak be Kobayashi és munkatársai egy korábbi tanulmányukban, ahol C57BL/6J egerek szívinfarktus (MI) modelljét alkalmazva a pro-angiogén A (VEGF-A) emelkedett expressziójáról közöltek eredményeket a hipoxiás szívizom egyes régióiban 24 órával az infarktus kiváltása után (106).

A vizsgálat sorozat ötödik, hetedik és tizedik napján szignifikánsan emelkedett [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) radiofarmakon dúsulás volt regisztrálható az iszkémiás csoport I/R hátsó végtagjaiban (bal hátsó végtag -I/R), összehasonlítva ugyanezen csoport fiziológiásan perfundált hátsó testrészeivel (jobb hátsó végtag -non-I/R) ($p \leq 0,05$) (29. C., D. ábra). A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET felvételi értékek maximumai a hetedik napon kerültek rögzítésre, ami egybe esik Almutairi és munkatársai által közölt eredményekkel, akik egy [⁷⁶Br]Br-jelzett RDG-alapú dendritikus nanomolekulát vizsgáltak, a vegyület az angiogenezisben ismert $\alpha\beta 3$ specificitását véve alapul (112). Hasonló módon, a [⁶⁸Ga]Ga-mal jelölt ciklikus RGD-peptid [c(RGDyK)] és az NC100692-t tartalmazó [^{99m}Tc]Tc-jelzett RGD szekvenciát magában foglaló vegyület ([^{99m}Tc]Tc-NC100692) is jelentős felhalmozódást mutatott az iszkémiás egérben, hét nappal a femorális artéria okklúzió kiváltása után (113, 114). A kutatás során megvizsgáltuk a SUV_{max} értékek alakulását, azonban nem volt számottevő különbség a kísérleti csoportok tekintetében. Mindazonáltal az I/R kiváltását követő első és harmadik napokon a SUV_{mean} analízis esetén sem volt kimutatható szignifikáns különbség az iszkémiás csoport I/R és non-I/R hátsó végtagjainak értékeiben. Ezenkívül az ötödik és a

hetedik napi vizsgálati időpontokban az I/R hátsó testrészek (bal hátsó végtag -I/R) körülbelül kétszer-háromszor magasabb [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felvételt mutattak, mint az iszkémiás csoport fiziológiásan perfundált (jobb hátsó végtag -non-I/R) extermításai (29. C. ábra). Továbbá az I/R hátsó végtagok SUVmean értékei megközelítőleg kétszeres-háromszoros mértékűnek adódtak a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezen trendeket figyelembe véve, kutatócsoportunk hasonló megfigyelésekről számolt be a Projekt 1: Proliferatív diabéteszes retinopátia kísérletsorozatban. Ezenkívül nem találtunk figyelemre méltó különbséget az iszkémiás csoport nem I/R hátsó végtagjai (jobb hátsó végtag -non-I/R) és a kontroll csoport hátsó lábai (bal hátsó végtag - non-I/R, jobb hátsó végtag -non-I/R) között ($p \leq 0,05$). Összességében a vizsgált állatok iszkémiás hátsó végtagjaiban regisztrált megnövekedett [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódás rávilágít az APN/CD13 döntő szerepére a PAD-hoz kapcsolódó iszkémia-reperfúzió által kiváltott neoangiogenikus folyamatokban. Az APN/CD13 expressziós mintázatának [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET longitudinális vizsgálata iszkémia-reperfúzió során tovább bővítheti ismereteinket a PAD patológiájáról, nemcsak új terápiás célpontok felfedezéséhez járulhat hozzá, hanem lehetőséget adhat ezek terápiás hatékonyságának értékelésére a humán klinikai vizsgálatokat megelőzően.

Mivel a [¹⁸F]FDG PET képalkotás hatékonyságát szív- és agyi iszkémia modellekben korábbi preklinikai vizsgálatokban már sikeresen bizonyították (115-117), így jelen kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy akut alsó végtagi iszkémia patkánymodellben ezen radiojelölt glükóz analóg alkalmas-e az I/R-rel összefüggő dinamikus változások tanulmányozására.

A bomláskorrigált transzaxiális [¹⁸F]FDG PET-képek (30. A.–D. ábra és 31. B. ábra) és a kvantitatív SUV értékek analízise megerősítette a [¹⁸F]FDG felhalmozódásának folyamatos növekedését (30. ábra) az iszkémiás csoport I/R hátsó végtagjaiban (bal hátsó végtag -I/R) az első vizsgálati naptól a hetedik napig amelyet a tizedik napon csökkenés követett. Általánosságban megállapítható, hogy ez a felvételi tendencia összhangban volt a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET vizsgálatok esetében feltártakkal. Ezen túlmenően az I/R hátsó testrészek [¹⁸F]FDG felvétele a harmadik napon, az ötödik napon és a hetedik napon jelentősen magasabb volt az iszkémiás csoport nem I/R hátsó végtagjaihoz (jobb hátsó végtag -non-I/R) és a kontroll csoport értékeihez viszonyítva, továbbá az I/R hátsó testrészek körülbelül kétszer-háromszor magasabb radioaktivitás értéket mutattak, mint ugyanezen csoport non-I/R hátsó lábai (30. ábra). Az eddigi szakirodalmi eredményeket figyelembe véve megállapítható, hogy az I/R hátsó végtagokban tapasztalt fokozódó metabolikus aktivitás az iszkémiával összefüggő szöveti

hipoperfúzióra adott fiziológias inflammatorikus válaszreakció lehet. Az iszkémiával összefüggő gyulladós mechanizmus részeként egyre több makrofág gyűlik össze az iszkémia által érintett szövetben (118, 119), amelyek magas glükózigényük miatt felelősek lehetnek a megnövekedett anyagcseréért és az ebből következő magas [¹⁸F]FDG felhalmozódásért (120). A fentebb felsorolt szakirodalmi eredmények figyelembevételével az I/R-indukált hátsó végtagokban tapasztalt, [¹⁸F]FDG-vel detektált fokozódó metabolikus aktivitás háttérében valószínűsíthetően az iszkémiát követő hipoperfúzió által kiváltott fiziológias gyulladós válasz áll. Arras és munkatársai (118) már egy korai munkájukban kimutatták, hogy az alsó végtagi iszkémiát követően megnövekedett monocita- és makrofág-akkumuláció figyelhető meg a károsodott szövetekben, amely szorosan összefügg az angiogenezissel és kollaterális érnövekedéssel. Ezt egészíti ki Krishnasamy és munkatársainak (119) eredménye, akik rámutattak, hogy az érkárosodás környezetében jelen lévő endothelium szabályozza a makrofágok érési folyamatát, így befolyásolva az arteriogenezis hatékonyságát. Mindazonáltal, az tourniquet által kiváltott mechanikai elzáródásból következő beavatkozás utáni gyulladás megnövekedett nem specifikus [¹⁸F]FDG-felvételhez vezethet, amelyet figyelembe kell venni a [¹⁸F]FDG eloszlásának átfogó értékelése során.

Sem az iszkémia indukcióját követő első, sem a tizedik napon nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket ($p \leq 0,05$) az I/R és a non-I/R hátsó végtagok metabolikus aktivitása között az iszkémiás csoportban, a SUVmean analízis során. Hasonlóképpen, az I/R hátsó testrészek [¹⁸F]FDG felvétele sem különbözött a kontroll csoport non-I/R hátsó lábainak radioaktivitás értékétől a beavatkozás utáni első és tizedik napokon ($p \leq 0,05$)(30. C.,D. ábra).

A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET vizsgálathoz hasonlóan, sem az iszkémiás csoport non-I/R hátsó végtagjai, sem a kontroll csoport non-I/R hátsó testrészei nem mutattak jelentős anyagcsere aktivitást, továbbá metabolikus profiljuk nem mutatott eltérést egymáshoz képest ($p \leq 0,05$), ami szintén összhangban volt az [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR felvételre vonatkozó eredményekkel.

Figyelembe véve a vizsgálat során feltárt összefüggéseket, a [¹⁸F]FDG PET képalkotás kiegészítő információt nyújthat az iszkémiával összefüggő molekuláris változásokról, ezért hatékony komplementere lehet az [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR PET-nek a PAD patogenikus folyamatainak molekuláris képalkotásában. A nem specifikus nyomjelző felhalmozódásából származó [¹⁸F]FDG PET korlátjainak leküzdése azonban a jövőbeni munka részét kell hogy képezze.

Western blot segítségével APN/CD13 fehérjeanalízist végeztünk mindkét állatcsoportban, hogy megvizsgáljuk az esetleges összefüggést a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR PET *in vivo* felvételi trendjével (32. ábra). A kapott [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR PET adatoknak megfelelően, szignifikánsan nagyobb mennyiségű ($p \leq 0,05$) APN/CD13 fehérje volt kimutatható az iszkémiás csoport I/R hátsó végtagjaiban (bal hátsó végtag -I/R), mint ugyanezen csoport vagy a kontroll csoport non-I/R hátsó testrészeiben az ötödik, hetedik és tizedik vizsgálati napokon. Ahogy a [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-cNGR PET felvételi adatok alapján várható volt, az iszkémiás csoport (non-I/R) és a kontroll csoport (non-I/R) nem iszkémiás hátsó végtagjainak fehérje expressziója között nem volt jelentős különbség. Összességében elmondható, hogy a Western blot vizsgálati eredmények hasonló tendenciát mutattak a proliferatív diabéteszes retinopátia kísérletsorozatban kapott eredményekkel. A fehérje expresszió tizedik napon megfigyelt csökkenése, az első napról a hetedik napra történő kezdeti növekedését követően, különböző tényezőkből fakadhat, amelyek az iszkémiás sérülést követő neoangiogenezis és szövetjavítás dinamikus természetében rejlenek. Az egyik elfogadható magyarázat a tipikusan szövetsérüléssel és iszkémiával összefüggő akut gyulladásos válasz megszűnésére vonatkozik. Amint a kezdeti sérülés enyhül, a pro-inflammatorikus mediátorok expressziója csökkenhet, ami a gyulladásos sejtek, nevezetesen az APN/CD13-at expresszáló makrofágok toborzásának és aktiválásának csökkenéséhez vezethet (121). Bár a radiotrészter felvétel nem különbözött szignifikánsan a vizsgálati csoportok tekintetében az első és a harmadik napon, szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) volt megfigyelhető az APN/CD13 fehérje expressziójának tekintetében ugyanazokon a kísérleti napokon. Feltételezzük, hogy bár az iszkémia által kiváltott változások bár molekuláris szinten megnyilvánultak, mégis az iszkémiás és a kontroll csoport receptor expressziójának mértéke közötti különbség még nem volt olyan markáns, hogy a radiofarmakon felvételi értékekben jelentős eltérést okozzon.

Az iszkémiás csoport I/R hátsó végtagjaiból (bal hátsó végtag -I/R) vett izomszövet mintáit immunhisztokémia segítségével vizsgáltuk az APN/CD13 expresszió iszkémiával összefüggő időbeli változásainak molekuláris szinten történő követése érdekében. Az iszkémiás és a fiziológiásan perfundált vázizomszövetek receptorális mintázatának összehasonlításához az iszkémiás csoport non-I/R hátsó végtagjaiból és a kontroll csoportból vett hasonló mintákat is elemzésnek vetettük alá. Ahogy a 33. ábrán is látható, az iszkémiás izomszövet minták (I/R) APN/CD13 expressziójában (barna festődés) az első naptól (33. A. ábra) a hetedik napig (33. E. ábra) folyamatos növekedés volt regisztrálható, amit a beavatkozást követő tizedik napon enyhe csökkenés követett. Ezen eredmények dinamikája hasonlóságot mutat a [⁶⁸Ga]Ga-

NOTA-c(NGR) PET, valamint a Western blot analízis adataival az azonos vizsgálati időpontokban. Ezzel szemben alig volt található APN/CD13 pozitivitás az iszkémiás csoport (non-I/R; 33. F. ábra) és a kontroll csoport (non-I/R) (33. G. ábra) fiziológiásan perfundált izomszöveteinek metszetein, ami szintén korrelált az [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) PET eredményekkel. Az APN/CD13 expresszió longitudinális vizsgálati tendenciája alapján úgy tűnik, hogy az angiogén felépülés az iszkémia kezdetét követő első napokban a legkifejezettebb.

Az elvégzett kísérletek alapján megállapítható, hogy a PET képalkotás jelentős tudományos potenciállal rendelkezik az iszkémiás kórállapotok kutatásában az angiogenezissel összefüggő APN/CD13 expresszió változásainak nyomon követése terén. A kutatómunkánk során nyert eredmények értékes új információval szolgálhatnak a perifériás artériás betegség (PAD) patofiziológiájának molekuláris szintű megértéséhez. A [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-c(NGR) molekula alkalmas eszköz lehet az iszkémia-reperfúzió által közvetített APN/CD13 kifejeződés időbeli dinamikájának feltérképezésére, míg a preklinikai modelleken végzett PET vizsgálatok lehetőséget biztosíthatnak az angiogenezis értékelésére. Ez kulcsfontosságú az iszkémiás szövetek kórélettani folyamatainak megértésében. Továbbá az iszkémia/reperfúzió által indukált diabéteszes retinopátia patkánymodell hatékony preklinikai rendszert kínál az iszkémiás károsodások molekuláris változásainak nyomon követésére. Az APN/CD13 expresszió vizsgálata különös jelentőséggel bírhat a diabéteszhez társuló mikrovaszkuláris eltérések jobb megértésében. A képalkotó eljárások és az ehhez kapcsolódó radiofarmakonok fejlesztése jelentősen hozzájárulhat az iszkémia-reperfúzió által kiváltott szöveti károsodások célzott terápiás beavatkozásainak optimalizálásához.

8. Összefoglalás

Az iszkémia-reperfúziós események fontos szerepet játszanak az angiogenikus folyamatok inicializálásában a különböző kardiovaszkuláris betegségekből, mint például a proliferatív diabéteszes retinopátia vagy az akut alsó végtagi iszkémia. Ezen rendellenességek kutatásában a rágcsálókban végzett pozitron emissziós tomográfia különös jelentőséggel bír az élettani és a patofiziológiai folyamatok *in vivo* tanulmányozása terén. A képalkotó eljárás megvalósíthatatlan radiojelzett molekulák nélkül. Kiemelt jelentőségűek a ^{68}Ga -mal jelölt peptid származékok, amelyek célzottan kötődnek az angiogenezisben részt vevő receptorokhoz. Vizsgálatsorozatunk első szakaszában a proliferatív diabéteszes retinopátia patofiziológiai folyamatait vizsgáltuk patkány állatmodellen, ahol az iszkémia-reperfúzió által indukált angiogenikus folyamatok és az APN/CD13 molekula expressziója közötti összefüggések feltárására tettünk kísérletet. A kutatómunka során összefüggést mutattunk ki az iszkémia-reperfúzió által inicializált angiogenikus folyamatokban részt vevő APN/CD13 kifejeződésének mértéke és a ^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) felhalmozódásának SUVmean értékei között PET képalkotás segítségével. Ezen felül sikeres longitudinális vizsgálatot folytattunk le az 1., 3., 7. és 10. napokon az iszkémia után, ahol megvizsgáltuk a radiojelölt molekula felhalmozódásának időbeli változásait. A kapott eredményeket a Western blot és hisztológiai vizsgálatok egyaránt alátámasztották.

A második vizsgálatsorozatunkban az akut alsó végtagi iszkémia patofiziológiai folyamatait vizsgáltuk. Összefüggést mutattunk ki PET képalkotás segítségével az iszkémia-reperfúzió által indukált angiogenikus folyamatokban részt vevő APN/CD13 receptor expressziójának mértéke és a ^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR), valamint a glükóz metabolizmus változása és a ^{18}F]FDG, felhalmozódásaihoz köthető SUVmean értékek között. Továbbá longitudinális vizsgálatot végeztünk az 1., 3., 5., 7. és 10. napokon az iszkémiát követően, ahol elemeztük a radiojelölt molekulák felhalmozódásának mennyiségi változásait az idő függvényében. Ezen megfigyeléseket a Western blot és az immunhisztokémiai analízis eredményei is alátámasztották.

Az elvégzett tudományos munka alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a ^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) alkalmas radiotrészter az iszkémia-reperfúzió által kiváltott APN/CD13 expressziójának mennyiségi és időbeli változásainak kimutatására a proliferatív diabéteszes retinopátia és az akut alsó végtagi iszkémia állatmodellekben. Továbbá diagnosztikai biomarkerként is szolgálhat a betegségek progressziójának vagy a terápiás beavatkozások hatékonyságának monitorozására.

9. Summary

Ischemia-reperfusion events play an important role in the initiation of angiogenic processes in various cardiovascular diseases, such as proliferative diabetic retinopathy or acute lower limb ischemia. Investigating these disorders with positron emission tomography imaging in rodent models is highly significant. It enables the study *in vivo* of physiological and pathophysiological processes. The imaging procedure is impossible without radiolabeled molecules. Particularly important are ^{68}Ga -labeled peptide derivatives, which are specifically bound to receptors involved in angiogenesis.

In the first stage of our study, the pathophysiological processes of proliferative diabetic retinopathy were investigated in a rat model with a specific focus on the relationships between ischemia-reperfusion induced angiogenic processes and the expression of the APN/CD13 molecule. A correlation was identified between the expression of APN/CD13, which is involved in the angiogenic processes initiated by ischemia-reperfusion, and the SUV_{mean} values of [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) accumulation using PET imaging. In addition, a longitudinal study was successfully conducted on days 1, 3, 7 and 10 post-ischemia to assess the temporal changes in the accumulation of the radiolabeled molecule. The obtained results were supported by both Western blot and histological analyses.

In our second study, the pathophysiological processes of acute lower limb ischemia were studied. A correlation was identified between the expression of the APN/CD13 receptor, which is involved in ischemia-reperfusion-induced angiogenic processes and SUV_{mean} values associated with [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR), as well as changes in glucose metabolism and [^{18}F]FDG accumulation using PET imaging. Furthermore, a longitudinal study was successfully performed on days 1, 3, 5, 7 and 10 post-ischemia, to quantify the changes in the accumulation of radiolabeled molecules as a function of time. These observations were also supported by the results of Western blot and immunohistochemical analyses.

Based on the findings of the scientific work performed, [^{68}Ga]Ga-NOTA-c(NGR) is a suitable radiotracer for detecting quantitative and temporal changes in APN/CD13 expression induced by ischemia-reperfusion in rat models of proliferative diabetic retinopathy and acute lower limb ischemia. Furthermore, it can serve as a diagnostic biomarker to monitor disease progression or the effectiveness of therapeutic interventions.

10. Irodalomjegyzék

10.1 A hivatkozott közlemények jegyzéke

References

1. Tichauer KM, Wang Y, Pogue BW, Liu JTC. Quantitative in vivo cell-surface receptor imaging in oncology: kinetic modeling and paired-agent principles from nuclear medicine and optical imaging. *Phys Med Biol*. 2015 Jul 21;60(14):239.
2. Li Y, Jiang L, Wang H, Cai H, Xiang Y, Li L. Effective Radiation Dose of 18f-Fdg Pet/ct: how Much does Diagnostic Ct Contribute? *Radiat Prot Dosimetry*. 2019 Dec 31;187(2):183–90.
3. Rausch I, Füchsel FG, Kuderer C, Hentschel M, Beyer T. Radiation exposure levels of routine SPECT/CT imaging protocols. *Eur J Radiol*. 2016 Sep;85(9):1627–36.
4. R. Cherry S. Chapter 14 - In-Vivo Whole-Body Imaging of the Laboratory Mouse. In: *The Mouse in Biomedical Research*. Second Edition ed. Elsevier Inc; 2007. p. 489,XIX,511,XXIII.
5. Lau J, Rousseau E, Kwon D, Lin K, Bénard F, Chen X. Insight into the Development of PET Radiopharmaceuticals for Oncology. *Cancers (Basel)*. 2020 May 21;12(5):1312. doi: 10.3390/cancers12051312.
6. EDQM, editor. *The European pharmacopeia*. 11.0th ed. EDQM; 2023.
7. Maffey-Steffan J, Scarpa L, Svirydenka A, Nilica B, Mair C, Buxbaum S, et al. The (68)Ga/(177)Lu-theragnostic concept in PSMA-targeting of metastatic castration-resistant prostate cancer: impact of post-therapeutic whole-body scintigraphy in the follow-up. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2020 Mar;47(3):695–712.
8. Pipeline Advanced Accelerator Applications [Internet].; 2023 []. Available from: <https://www.adacap.com/pipeline/>.
9. Niccoli Asabella A, Di Palo A, Altini C, Ferrari C, Rubini G. Multimodality Imaging in Tumor Angiogenesis: Present Status and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 28;18(9):1864. doi: 10.3390/ijms18091864.
10. Mirus M, Tokalov SV, Abramyuk A, Heinold J, Prochnow V, Zöphel K, et al. Noninvasive assessment and quantification of tumor vascularization using [18F]FDG-PET/CT and CE-CT in a tumor model with modifiable angiogenesis-an animal experimental prospective cohort study. *EJNMMI Res*. 2019 Jun 21;9(1):55–0.
11. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8(4 Suppl):62.

12. 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):80–7.
13. Provost C, Prignon A, Rozenblum-Beddok L, Bruyer Q, Dumont S, Merabtene F, et al. Comparison and evaluation of two RGD peptides labelled with (68)Ga or (18)F for PET imaging of angiogenesis in animal models of human glioblastoma or lung carcinoma. *Oncotarget*. 2018 Apr 10;9(27):19307–16.
14. Cai W, Chen K, Mohamedali KA, Cao Q, Gambhir SS, Rosenblum MG, et al. PET of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Nucl Med*. 2006 Dec;47(12):2048–56.
15. Haubner R, Wester HJ, Reuning U, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, et al. Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med*. 1999 Jun;40(6):1061–71.
16. Sharma R, Valls PO, Inglese M, Dubash S, Chen M, Gabra H, et al. (18)F]Fluciclatide PET as a biomarker of response to combination therapy of pazopanib and paclitaxel in platinum-resistant/refractory ovarian cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2020 May;47(5):1239–51.
17. Zheng K, Liang N, Zhang J, Lang L, Zhang W, Li S, et al. 68Ga-NOTA-PRGD2 PET/CT for Integrin Imaging in Patients with Lung Cancer. *J Nucl Med*. 2015 Dec;56(12):1823–7.
18. Piedfer M, Dauzonne D, Tang R, N'Guyen J, Billard C, Bauvois B. Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells. *FASEB J*. 2011 Aug;25(8):2831–42.
19. Gyuricza B, Szabó JP, Arató V, Dénes N, Szűcs Á, Berta K, et al. Synthesis of (68)Ga-Labeled cNGR-Based Glycopeptides and In Vivo Evaluation by PET Imaging. *Pharmaceutics*. 2021 Dec 7;13(12):2103. doi: 10.3390/pharmaceutics13122103.
20. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932–6.
21. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992 Jun 5;267(16):10931–4.
22. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec;26(3-4):489–502.
23. Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med*. 2008 Aug;14(8):361–71.
24. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455–67.
25. Han J, Luo L, Marcelina O, Kasim V, Wu S. Therapeutic angiogenesis-based strategy for peripheral artery disease. *Theranostics*. 2022 Jun 27;12(11):5015–33.

26. Cao Y, Hong A, Schulten H, Post MJ. Update on therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Res*. 2005 Feb 15;65(3):639–48.
27. Hammes H. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia*. 2018 Jan;61(1):29–38.
28. Koch AE. Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003 Nov;62 Suppl 2(Suppl 2):ii60–7.
29. Mentzer SJ, Konerding MA. Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*. 2014 Jul;17(3):499–509.
30. Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis*. 2009;12(2):113–23.
31. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):652–9.
32. Dixon J, Kaklamanis L, Turley H, Hickson ID, Leek RD, Harris AL, et al. Expression of aminopeptidase-n (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin. *J Clin Pathol*. 1994 Jan;47(1):43–7.
33. Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci*. 2011 Mar;102(3):501–8.
34. Mandic L, Traxler D, Gugerell A, Zlabinger K, Lukovic D, Pavo N, et al. Molecular Imaging of Angiogenesis in Cardiac Regeneration. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*. 2016;9(10):27,6. Epub 2016 Sep 10.
35. Barnieh FM, Loadman PM, Falconer RA. Is tumour-expressed aminopeptidase N (APN/CD13) structurally and functionally unique? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Dec;1876(2):188641.
36. Menrad A, Speicher D, Wacker J, Herlyn M. Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res*. 1993 Mar 15;53(6):1450–5.
37. Guzman-Rojas L, Rangel R, Salameh A, Edwards JK, Dondossola E, Kim Y, et al. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 31;109(5):1637–42.
38. Li X, Li J, Li C, Guo Q, Wu M, Su L, et al. Aminopeptidase N-targeting nanomolecule-assisted delivery of VEGF siRNA to potentiate antitumour therapy by suppressing tumour revascularization and enhancing radiation response. *J Mater Chem B*. 2021 Sep 22;9(36):7530–43.
39. Fukasawa K, Fujii H, Saitoh Y, Koizumi K, Aozuka Y, Sekine K, et al. Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett*. 2006 Nov 8;243(1):135–43.

40. Curnis F, Sacchi A, Borgna L, Magni F, Gasparri A, Corti A. Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat Biotechnol.* 2000 Nov;18(11):1185–90.
41. Pastorino F, Brignole C, Di Paolo D, Nico B, Pezzolo A, Marimpietri D, et al. Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):10073–82.
42. Corti A, Ponzoni M. Tumor vascular targeting with tumor necrosis factor alpha and chemotherapeutic drugs. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1028:104–12.
43. Rangel R, Sun Y, Guzman-Rojas L, Ozawa MG, Sun J, Giordano RJ, et al. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13;104(11):4588–93.
44. Yang E, Shim JS, Woo H, Kim K, Kwon HJ. Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Nov 16;363(2):336–41.
45. Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol.* 1995 Sep;130(5):1189–96.
46. Safar ME, Struijker-Boudier HA. Cross-talk between macro- and microcirculation. *Acta Physiol (Oxf).* 2010 Apr;198(4):417–30.
47. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990 Oct;70(4):921–61.
48. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation.* 2001 Aug 7;104(6):735–40.
49. Walther G, Obert P, Dutheil F, Chapier R, Lesourd B, Naughton G, et al. Metabolic syndrome individuals with and without type 2 diabetes mellitus present generalized vascular dysfunction: cross-sectional study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Apr;35(4):1022–9.
50. Chen Y, Wang Y, Zhao D, Yu C, Xin Z, Cao X, et al. High prevalence of lower extremity peripheral artery disease in type 2 diabetes patients with proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2015 Mar 30;10(3):e0122022.
51. Lois N, McCarter RV, O'Neill C, Medina RJ, Stitt AW. Endothelial progenitor cells in diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014 Apr 9;5:44.
52. Narula N, Dannenberg AJ, Olin JW, Bhatt DL, Johnson KW, Nadkarni G, et al. Pathology of Peripheral Artery Disease in Patients With Critical Limb Ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Oct 30;72(18):2152–63.
53. Skalicky SE. *Ocular and Visual Physiology.* Singapore: Springer Singapore Pte. Limited; 2015.

54. The human eye: structure and function. *Nat Med.* 1999 Nov;5(11):1229.
55. Gupta MP, Herzlich AA, Sauer T, Chan C. Retinal Anatomy and Pathology. *Dev Ophthalmol.* 2016;55:7–17.
56. Teo ZL, Tham Y, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology.* 2021 Nov;128(11):1580–91.
57. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2012 Mar;35(3):556–64.
58. Villegas VM, Schwartz SG. Current and Future Pharmacologic Therapies for Diabetic Retinopathy. *Curr Pharm Des.* 2018;24(41):4903–10.
59. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, et al. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Mar 21;69(11):e71–e126.
60. Creager MA, Kaufman JA, Conte MS. Clinical practice. Acute limb ischemia. *N Engl J Med.* 2012 Jun 7;366(23):2198–206.
61. Callum K, Bradbury A. ABC of arterial and venous disease: Acute limb ischaemia. *BMJ.* 2000 Mar 18;320(7237):764–7.
62. Hardman RL, Jazaeri O, Yi J, Smith M, Gupta R. Overview of classification systems in peripheral artery disease. *Semin Intervent Radiol.* 2014 Dec;31(4):378–88.
63. STAMLER J. Cardiovascular diseases in the United States. *Am J Cardiol.* 1962 Sep;10:319–40.
64. Taylor GI, Pan WR. Angiosomes of the leg: anatomic study and clinical implications. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Sep;102(3):599–8.
65. Shishehbor MH. Acute and critical limb ischemia: when time is limb. *Cleve Clin J Med.* 2014 Apr;81(4):209–16.
66. Nanjundappa A, Dieter I, Raymond A, Dieter J, Raymond A, Dieter RS. Critical Limb Ischemia Acute and Chronic. Cham: Springer International Publishing; 2017.
67. O'Rahilly R, Muller F. Basic Human Anatomy: A Regional Study of Human Structure. USA: W B Saunders Co; 1983.
68. Tinajero-Díaz E, Salado-Leza D, Gonzalez C, Martínez Velázquez M, López Z, Bravo-Madrigal J, et al. Green Metallic Nanoparticles for Cancer Therapy: Evaluation Models and Cancer Applications. *Pharmaceutics.* 2021 Oct 18;13(10):1719. doi: 10.3390/pharmaceutics13101719.

69. Food and Drug Administration H. International Conference on Harmonisation; guidance on M4 common technical document; availability. Notice. Fed Regist. 2001 Oct 16;66(200):52634–7.
70. Steinmetz KL, Spack EG. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. BMC Neurol. 2009 Jun 12;9 Suppl 1(Suppl 1):S2–.
71. ICH Guidelines [Internet].; 2023 [cited 2023]. Available from: <https://www.ich.org/page/ich-guidelines>.
72. Aske KC, Waugh CA. Expanding the 3R principles: More rigour and transparency in research using animals. EMBO Rep. 2017 Sep;18(9):1490–2.
73. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2015 Mar;54(2):120–32.
74. Cunha L, Horvath I, Ferreira S, Lemos J, Costa P, Vieira D, et al. Preclinical imaging: an essential ally in modern biosciences. Mol Diagn Ther. 2014 Apr;18(2):153–73.
75. Olivares AM, Althoff K, Chen GF, Wu S, Morrisson MA, DeAngelis MM, et al. Animal Models of Diabetic Retinopathy. Curr Diab Rep. 2017 Aug 24;17(10):93–0.
76. Minhas G, Morishita R, Anand A. Preclinical models to investigate retinal ischemia: advances and drawbacks. Front Neurol. 2012 May 11;3:75.
77. Hayreh SS, Kolder HE, Weingeist TA. Central retinal artery occlusion and retinal tolerance time. Ophthalmology. 1980 Jan;87(1):75–8.
78. Prasad SS, Kojic L, Wen YH, Chen Z, Xiong W, Jia W, et al. Retinal gene expression after central retinal artery ligation: effects of ischemia and reperfusion. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Dec;51(12):6207–19.
79. Ortak H, Demir S, Ateş O, Söğüt E, Alim S, Benli I. Association of MMP2-1306C/T and TIMP2G-418C polymorphisms in retinal vein occlusion. Exp Eye Res. 2013 Aug;113:151–5.
80. Long P, Yan W, He M, Zhang Q, Wang Z, Li M, et al. Protective effects of hydrogen gas in a rat model of branch retinal vein occlusion via decreasing VEGF- α expression. BMC Ophthalmol. 2019 May 16;19(1):112–2.
81. Kohen MC, Tatlipinar S, Cumbul A, Uslu Ü. The effects of bevacizumab treatment in a rat model of retinal ischemia and perfusion injury. Mol Vis. 2018 Mar 23;24:239–50.
82. Lin L, Chen J, Tai M, Chen Y, Chen C, Pao S, et al. Protective effects of hypercapnic acidosis on Ischemia-reperfusion-induced retinal injury. PLoS One. 2019 Jan 25;14(1):e0211185.
83. Pitale PM, Gorbatyuk MS. Diabetic Retinopathy: From Animal Models to Cellular Signaling. Int J Mol Sci. 2022 Jan 27;23(3):1487. doi: 10.3390/ijms23031487.

84. Chen T, Ye B, Tan J, Yang H, He F, Khalil RA. (CD146+) Mesenchymal stem cells treatment improves vascularization, muscle contraction and VEGF expression, and reduces apoptosis in rat ischemic hind limb. *Biochem Pharmacol.* 2021 Aug;190:114530.
85. Aref Z, de Vries MR, Quax PHA. Variations in Surgical Procedures for Inducing Hind Limb Ischemia in Mice and the Impact of These Variations on Neovascularization Assessment. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 29;20(15):3704. doi: 10.3390/ijms20153704.
86. Abdel-Hamed AR, Mehanna ET, Hazem RM, Badr JM, Abo-Elmatty DM, Abdel-Kader MS, et al. Plicosepalus acacia Extract and Its Major Constituents, Methyl Gallate and Quercetin, Potentiate Therapeutic Angiogenesis in Diabetic Hind Limb Ischemia: HPTLC Quantification and LC-MS/MS Metabolic Profiling. *Antioxidants (Basel).* 2021 Oct 27;10(11):1701. doi: 10.3390/antiox10111701.
87. Liu Z, Benard O, Syeda MM, Schuster VL, Chi Y. Inhibition of Prostaglandin Transporter (PGT) Promotes Perfusion and Vascularization and Accelerates Wound Healing in Non-Diabetic and Diabetic Rats. *PLoS One.* 2015 Jul 31;10(7):e0133615.
88. Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH [Internet].; 2023 []. Available from: <https://medical.ezag.com/en/products/galliapharm/>.
89. Máté G, Kertész I, Enyedi KN, Mező G, Angyal J, Vasas N, et al. In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer (68)Ga-NOTA-c(NGR). *Eur J Pharm Sci.* 2015 Mar 10;69:61–71.
90. A Krizsan LB. A debreceni kisállat PET program eredményei: a MiniPET-1, MiniPET-2 és a MiniPET-3 kamerák leképezési tulajdonságai. *IME KÉPALKOTÓ DIAGNOSZTIKAI KÜLÖNSZÁM.* 2018;12.
91. Proteintech. ICHCeasy Ready-To-Use IHC Kit. In: .
92. Buehler A, van Zandvoort MAMJ, Stelt BJ, Hackeng TM, Schrans-Stassen BHGJ, Bennaghmouch A, et al. cNGR: a novel homing sequence for CD13/APN targeted molecular imaging of murine cardiac angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Dec;26(12):2681–7.
93. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet.* 2010 Jul 10;376(9735):124–36.
94. Abcouwer SF. Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy. *J Clin Cell Immunol.* 2013;Suppl 1(11):1–12.
95. Crawford TN, Alfaro DV3, Kerrison JB, Jablon EP. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev.* 2009 Feb;5(1):8–13.
96. Grönman M, Tarkia M, Kiviniemi T, Halonen P, Kuivanen A, Savunen T, et al. Imaging of $\alpha(v)\beta(3)$ integrin expression in experimental myocardial ischemia with [(68)Ga]NODAGA-RGD positron emission tomography. *J Transl Med.* 2017 Jun 19;15(1):144–1.

97. Masuzawa K, Jesmin S, Maeda S, Kaji Y, Oshika T, Zaedi S, et al. A model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats by subconjunctival injection of endothelin-1. *Exp Biol Med* (Maywood). 2006 Jun;231(6):1085–9.
98. Orbay H, Hong H, Zhang Y, Cai W. PET/SPECT imaging of hindlimb ischemia: focusing on angiogenesis and blood flow. *Angiogenesis*. 2013 Apr;16(2):279–87.
99. Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2012 Sep;31(5):377–406.
100. Lovasik JV, Kergoat H, Gagnon M. Experimentally reduced perfusion of one eye impairs retinal function in both eyes. *Optom Vis Sci*. 2005 Sep;82(9):850–7.
101. Kergoat H. Electroretinogram in unilateral vascular stress in nondiabetic and diabetic subjects. *Optom Vis Sci*. 1993 Sep;70(9):743–9.
102. Trindade F, Ferreira R, Amado F, Vitorino R. Biofluid proteases profiling in diabetes mellitus. *Adv Clin Chem*. 2015;69:161–207.
103. Hossain A, Heron D, Davenport I, Huckaba T, Graves R, Mandal T, et al. Protective effects of bestatin in the retina of streptozotocin-induced diabetic mice. *Exp Eye Res*. 2016 Aug;149:100–6.
104. Velikyan I, Lindhe Ö. Preparation and evaluation of a (68)Ga-labeled RGD-containing octapeptide for noninvasive imaging of angiogenesis: biodistribution in non-human primate. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2018 Feb 5;8(1):15–31.
105. Pallet N, Thervet E, Timsit M. Angiogenic response following renal ischemia reperfusion injury: new players. *Prog Urol*. 2014 Jun;24 Suppl 1:20.
106. Kobayashi K, Maeda K, Takefuji M, Kikuchi R, Morishita Y, Hirashima M, et al. Dynamics of angiogenesis in ischemic areas of the infarcted heart. *Sci Rep*. 2017 Aug 2;7(1):7156–x.
107. Hughes WF. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res*. 1991 Nov;53(5):573–82.
108. Hu T, Vanhove M, Porcu M, Van Hove I, Van Bergen T, Jonckx B, et al. The potent small molecule integrin antagonist THR-687 is a promising next-generation therapy for retinal vascular disorders. *Exp Eye Res*. 2019 Mar;180:43–52.
109. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer*. 2011 Dec;2(12):1117–33.
110. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol*. 2004 Jun;164(6):1875–82.

111. Willmann JK, Chen K, Wang H, Paulmurugan R, Rollins M, Cai W, et al. Monitoring of the biological response to murine hindlimb ischemia with ^{64}Cu -labeled vascular endothelial growth factor-121 positron emission tomography. *Circulation*. 2008 Feb 19;117(7):915–22.
112. Almutairi A, Rossin R, Shokeen M, Hagooley A, Ananth A, Capoccia B, et al. Biodegradable dendritic positron-emitting nanoprobe for the noninvasive imaging of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 20;106(3):685–90.
113. Jeong JM, Hong MK, Chang YS, Lee Y, Kim YJ, Cheon GJ, et al. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent: ^{68}Ga -labeled c(RGDyK)-isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid and feasibility studies in mice. *J Nucl Med*. 2008 May;49(5):830–6.
114. Hua J, Dobrucki LW, Sadeghi MM, Zhang J, Bourke BN, Cavaliere P, et al. Noninvasive imaging of angiogenesis with a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled peptide targeted at $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin after murine hindlimb ischemia. *Circulation*. 2005 Jun 21;111(24):3255–60.
115. Su H, Lu D, Shen M, Feng L, Xu C. Evaluating the cardioprotective effect of metformin on myocardial ischemia-reperfusion injury using dynamic $(^{18}\text{F})\text{-FDG}$ micro-PET/CT imaging. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022 Jul 10;22(1):310–2.
116. Lou M, Zhang H, Wang J, Wen S, Tang Z, Chen Y, et al. Hyperbaric oxygen treatment attenuated the decrease in regional glucose metabolism of rats subjected to focal cerebral ischemia: a high resolution positron emission tomography study. *Neuroscience*. 2007 May 11;146(2):555–61.
117. Varasteh Z, Mohanta S, Robu S, Braeuer M, Li Y, Omidvari N, et al. Molecular Imaging of Fibroblast Activity After Myocardial Infarction Using a (^{68}Ga) -Labeled Fibroblast Activation Protein Inhibitor, FAPI-04. *J Nucl Med*. 2019 Dec;60(12):1743–9.
118. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):40–50.
119. Krishnasamy K, Limbourg A, Kapanadze T, Gamrekelashvili J, Beger C, Häger C, et al. Blood vessel control of macrophage maturation promotes arteriogenesis in ischemia. *Nat Commun*. 2017 Oct 16;8(1):952–2.
120. Kapanadze T, Bankstahl JP, Wittneben A, Koestner W, Ballmaier M, Gamrekelashvili J, et al. Multimodal and Multiscale Analysis Reveals Distinct Vascular, Metabolic and Inflammatory Components of the Tissue Response to Limb Ischemia. *Theranostics*. 2019 Jan 1;9(1):152–66.
121. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010 Jun 8;121(22):2437–45.

10.2 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

Jelölt: Farkasinszky Gergely

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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



11. Tárgyszavak

Iszkémia, *in vivo* , Pozitron emissziós tomográfia, Aminopeptidáz N (APN/CD13), angiogenezis, ^{68}Ga

12. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

13. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomatait tartalmazza.