

# EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kísérletes daganatok angiogenezisének *in vivo*  
vizsgálata PET radiotraccerekkel

Csorbainé Kis Adrienn

Témavezető: Dr. Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM  
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI  
ISKOLA

Debrecen, 2021

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1 Erek felépítése.....	9
2.2 Angiogenezis típusai.....	9
2.2.1 Bimbózdó érképződés („sprouting angiogenesis”).....	10
2.2.2 Intussusceptiv („splitting”) angiogenezis.....	11
2.2.3 Vasculogén mimikri.....	12
2.2.4 Ér „felvétel” („Vessel co-option”).....	12
2.3 Angiogenezis szabályozásában résztvevő molekulák.....	12
2.3.1 Szolubilis szabályozó faktorok.....	13
2.3.2 Membrán kötött szabályozó faktorok.....	14
2.3.3 Plazmin rendszer.....	16
2.3.4 Matrix metalloproteinázok.....	16
2.4 Aminopeptidáz N (CD13) molekula.....	17
2.4.1 Enzimatiszikus fehérje hasító funkció.....	19
2.4.2 Receptorialis funkció.....	21
2.4.3 Jelátviteli funkció.....	22
2.5 Angiogenezis vizsgálati lehetőségei.....	24
2.5.1 <i>In vivo</i> vizsgálatok.....	24
2.5.2 <i>In vitro</i> vizsgálatok.....	25
2.5.3 <i>Ex vivo</i> vizsgálatok.....	26
2.5.4 Kvantitatív vizsgálatok.....	26
2.6 Aminopeptidáz N (APN/CD13) expresszió vizsgálata reaktív és nem reaktív ligandokkal.....	27
3. Anyagok és módszerek.....	31
3.1 Felhasznált vegyszerek és oldatok.....	31
3.2 Radiofarmakonok előállítása.....	34
3.2.1 A NODAGA-[c(RGD)] <sub>2</sub> , NOTA-c(NGR), NODAGA-c(NGR), NODAGA-c[CH <sub>2</sub> -CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH <sub>2</sub> és NODAGA-c[CH <sub>2</sub> -CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH <sub>2</sub> prekursorok előállítása.....	34
3.2.2 A DOTA-Nitroimidazol prekursor előállítása.....	35
3.2.3 A prekursorok tisztítása.....	36

3.2.4	A prekursorok radiojelölése <sup>68</sup> Ga-al.....	37
3.2.5	A radiojelölt vegyületek minőségellenőrzése.....	38
3.2.6	Megoszlási hányados (LogP) és szérumbiztonság meghatározása.....	38
3.3	Sejtenyészítés.....	40
3.3.1	Ne/De sejtek tenyésztése .....	40
3.3.2	He/De sejtek tenyésztése .....	40
3.3.3	HT1080 sejtek tenyésztése .....	41
3.3.4	B16F10 sejtek tenyésztése.....	41
3.4	Kísérleti állatok.....	42
3.5	Subcutan tumorok indukciója .....	42
3.6	Subcutan HT1080 és B16F10 tumoros egerek kezelése.....	43
3.7	Kísérleti állatok fájdalomának csillapítása .....	43
3.8	<i>In vivo</i> PET és PET/MRI vizsgálatok .....	44
3.9	PET vizsgálatokból származó adatok feldolgozása .....	47
3.10	Blokkolási vizsgálatok.....	48
3.11	<i>Ex vivo</i> szervi megoszlásos vizsgálatok.....	48
3.12	Western blot analízis.....	49
3.13	Immunhisztokémiai vizsgálatok .....	49
3.14	Statisztikai analízis .....	50
4.	Eredmények.....	51
4.1	Radiokémiai jelölések eredményei .....	51
4.2	Az alkalmazott radiotracer megoszlási hányadosai (LogP) és szérumbiztonsági eredményei.....	53
4.3	Subcutan He/De tumoros patkányok angiogenezisének és hypoxiájának <i>in vivo</i> és <i>ex vivo</i> vizsgálata.....	54
4.3.1	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-[c(RGD)] <sub>2</sub> -vel végzett <i>in vivo</i> vizsgálati eredmények.....	54
4.3.2	<sup>68</sup> Ga- NOTA-c(NGR)-rel végzett <i>in vivo</i> vizsgálati eredmények .....	55
4.3.3	<sup>68</sup> Ga-DOTA-Nitroimidazollal végzett <i>in vivo</i> vizsgálati eredmények .....	57
4.3.4	Subcutan He/De tumoros F-344 patkányok angiogenezisének és hypoxiájának <i>ex vivo</i> vizsgálata .....	58
4.4	Kontroll F-344 patkányok <i>in vivo</i> és <i>ex vivo</i> vizsgálata <sup>68</sup> Ga-NODAGA-[c(RGD)] <sub>2</sub> -vel, <sup>68</sup> Ga-NOTA-c(NGR)-rel és <sup>68</sup> Ga-DOTA-Nitroimidazollal .....	59
4.5	Hypoxia és angiogenezis összefüggésének <i>in vivo</i> vizsgálata a tumor növekedés függvényében subcutan He/De tumorokon.....	61
4.6	Kontroll F-344 patkányok <i>in vivo</i> PET/MRI és <i>ex vivo</i> szervi megoszlásos vizsgálata különböző NGR származékokkal .....	63

4.7	Subcutan He/De és Ne/De tumoros F-344 patkányok <i>in vivo</i> PET/MRI és <i>ex vivo</i> szervi megoszlásos vizsgálata különböző NGR származékokkal.....	66
4.8	APN/CD13 inhibitorok hatásának vizsgálata subcutan HT1080 és B16F10 tumoros egereken <sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) felhasználásával.....	71
4.8.1	Subcutan HT1080 tumoros állatok <i>in vivo</i> és <i>ex vivo</i> vizsgálata.....	71
4.8.2	Subcutan B16F10 tumoros állatok <i>in vivo</i> és <i>ex vivo</i> vizsgálata.....	74
4.8.3	Az actinonin és bestatin hatására bekövetkező térfogatbeli változások vizsgálata 77	
4.9	Western blot analízis.....	78
4.10	Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	79
5.	Megbeszélés.....	81
6.	Összefoglalás.....	89
7.	Summary.....	90
8.	Irodalomjegyzék.....	91
9.	Tárgyszavak.....	106
10.	Köszönetnyilvánítás.....	107
11.	Függelék.....	108

## Rövidítések jegyzéke

APN/CD13: aminopeptidáz N

$\alpha_v\beta_3$ : integrin receptor

B16F10: egér eredetű melanotikus melanoma sejtvonal

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium sejttenyésztő folyadék

DOTA: 1,4,7,10-Tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav

FBS: foetalis szarvasmarha szérum

He/De: kémiai indukált patkány eredetű máj carcinoma sejtvonal

HIF: hypoxia indukálta faktor

HT1080: humán eredetű fibrosarcoma sejtvonal

IHC: immunhisztokémia

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium sejttenyésztő folyadék

LogP: megoszlási hányados

MBq: MegaBecquerel

Ne/De: kémiai indukált patkány eredetű mesoblastos nephroma sejtvonal

NGR: aszparagin-glicin-arginin aminosavakat tartalmazó peptidszekvencia

NODAGA: 1,4,7-triazaciklonán,1-glutársav-4,7-ecetsav

NOTA: 1,4,7-triazaciklonán-N, N', N'' - triecetsav

PBS: foszfát pufferolt sóoldat

PET: pozitron emissziós tomográfia

PET/MRI: hibrid képalkotás PET és MRI modalitásokkal

RGD: arginin-glicin-aszparaginsav aminosavakat tartalmazó peptidszekvencia

SD: standard deviáció

T/M: tumor/ izom arány

VOI: vizsgálat tárgyát képező térfogat (volume of interest)

$^{18}\text{F}$ FDG:  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glükóz

## 1. Bevezetés

Az IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation) kimutatása szerint 2019-ben több, mint 18 millió ember halálát okozta kardiovasculáris megbetegedés, míg ez a szám daganatos betegségek esetén meghaladta a 10 milliót. Ezt a tényt támasztja alá a WHO (World Health Organization) 2019-es felmérése is, mely szerint az ischaemiás szívbetegség és a stroke világszerte az első és második helyen áll a 10 leggyakoribb halálokokat felsorozó listán, mely töretlen az elmúlt 19 év távlatában. A WHO becslése szerint 2019-ben Magyarországon 31700 beteg halálát okozta valamilyen rosszindulatú sejtburjánzás (neoplázia), melyet meghalad az ischaemiás szívbetegségben elhunytak (36800) száma. A teljes kardiovasculáris rendszert érintő elhalálozások száma 62100 volt, ami megközelítőleg kétszerese a daganatokban elhunytak számának. Az előzőekben említett vezető halálokok kialakulásában jelentős szerepet játszik a helytelen életmód, úgymint a mozgásszegény életmód, az elhízás, a dohányzás, az alkoholizmus, a helytelen táplálkozás és a stressz. Nem elhanyagolható a prevenció kérdése, amellyel a kardiovasculáris és daganatos megbetegedések késleltethetők vagy elkerülhetők. Megfelelő, rendszeres testmozgással, a káros szenvedélyek elhagyásával és egészséges, kiegyensúlyozott táplálkozással sokat tehetünk az egészségünk megőrzésében. Kiemelendő a szűrővizsgálatok fontossága is, hiszen ezek segítségével akár korai szakaszban is felismerhetőek a kóros elváltozások, így javítva a beteg túlélési esélyeit és hozzájárulva a teljes gyógyuláshoz. Magyarországon jelenleg minden 45 és 65 év közötti nő 2 évente beutalót kap emlőszűrésre, mely tapintásos vizsgálatból és az emlő összetételétől függően mammográfiás (röntgen berendezés) vagy ultrahangos vizsgálatból áll. Az évi egyszeri méhnyakrákszűrésen való részvétellel is sikeresen kiszűrhetőek a rákmegelőző állapotok. Az ovarium carcinomára nincs kifejezett szűrés, azonban az éves nőgyógyászati vizsgálat során hüvelyi ultrahanggal fény derülhet az esetleges elváltozásokra a petefészekben. A tüdőszűrés során röntgenkészülék segítségével világítják át a páciens mellkasát, melynek elsődleges célja a tüdő-tuberkulózis diagnosztizálása, de nem ritka a kezdeti vagy előrehaladott tüdődaganatok diagnózisa sem. A férfiak körében gyakori prosztata daganatok elsődleges szűrési módszerének a manuális vizsgálat minősül, ám kétes esetekben itt is szóba jön az ultrahangos képalkotó technika használata. A bőrdaganatok, vastagbél daganatok és szájüregi daganatok szűrésében nem a képalkotó eljárások az elsődleges szűrési módszerek, azonban malignus elváltozás gyanúja esetén a diagnózis felállításában fontos szerepe van a képalkotásnak. Jól látható, hogy a hagyományos klinikai vizsgálatok mellett a képalkotásnak milyen hatalmas és fontos szerep jut egy betegség

kiszűrésében, diagnózisában. A betegellátásban alkalmazott képalkotó berendezéseket két csoportba oszthatjuk. Egy részük anatómiai, más részük funkcionális, működésbeli információval szolgál. A hagyományos röntgen vizsgálatok, ultrahang, CT és MR vizsgálatok elsősorban anatómiai információt nyújtanak, míg a nukleáris medicinában alkalmazott SPECT és PET képalkotások működésbeli információt adnak. A hibrid képalkotással (SPECT/CT vagy PET/CT) a betegről egy időben kapunk anatómiai és működésbeli információt. Az ultrahang és MR képalkotás nem ionizáló képalkotások közé sorolhatóak, hiszen semmilyen káros, sugárzó anyaggal nem kerül kapcsolatba a beteg ezen vizsgálatok során. A CT, SPECT és PET vizsgálatok ezzel szemben ionizáló képalkotó eljárásnak minősülnek. CT vizsgálat során a beteget kívülről éri a röntgensugárzás, míg SPECT vagy PET vizsgálatok esetében a betegbe intravénásan injektált radioaktív (sugárzó) tracer megoszlását detektáljuk. Attól függően, hogy milyen fizikai vagy kémiai alapokon nyugszik a képalkotás, alkalmazási területeik és limitáló tényezőik eltérnek egymástól. Az ultrahang egy olcsó és széles körben elérhető képalkotó eljárás, azonban erősen vizsgálófüggő a látott képek értelmezése, így inkább kiegészítő modalitásként tartják számon a tumorok diagnosztikájában, követésében. Kiemelendő a szerepe ugyanakkor az ultrahang vezérelt biopsziák (például pajzsmirigy vagy emlő) során, mely segíti a daganatos betegségek diagnózisát. A CT és MR vizsgálatokkal keresztmetszeti (axiális, coronális és sagittális) képeket kaphatunk. Nem csak daganatok diagnózisának felállítására, hanem például traumák, fejlődési rendellenességek diagnosztikájára is alkalmasak. A CT képalkotás során elsősorban jó tartalmú, míg MR képalkotáskor gadólinium tartalmú kontrasztanyaggal kiegészített natív vizsgálatokkal még több információ nyerhető egy-egy kórképről. A modern CT képalkotással viszonylag gyorsan, alacsony dózisterheléssel, milliméter alatti felbontásban lehet a test nagy területéről információt nyerni. A mágneses rezonanciás képalkotás egy ionizáló sugárzással nem járó modalitás, amely nagy térbeli felbontással jellemezhető. A CT-hez képest jóval több időt vesz igénybe (ezzel növelve a beteg esetleges mozgását vizsgálat közben), korlátozza a képalkotást a testben előforduló nem mágnesezhető fémes implantátumok (protézisek, pacemakerek, szívbillentyűk, aneurysma klipek) jelenléte. A nukleáris medicina eszközei a SPECT és PET keresztmetszeti képalkotás. A SPECT képalkotás során a betegbe intravénásan bejutatott gamma fotont emittáló izotóppal jelölt tracer eloszlását, míg PET esetében pozitron emittáló izotóppal jelölt tracer megoszlását detektáljuk. Nyilvánvaló, hogy a nukleáris medicina modalitásai az ionizáló sugárzást alkalmazó képalkotó modalitások közé sorolhatók, így alkalmazásuk (akárcsak a CT vagy röntgen képalkotás) bizonyos esetekben (pl. terhesség) kontraindikált. A PET képalkotás során leggyakrabban alkalmazott izotópok a  $^{11}\text{C}$  ( $T_{1/2}=20$

perc) és a  $^{18}\text{F}$  ( $T_{1/2}=110$  perc). Az elmúlt évtizedekben az orvosbiológiai kutatások fókuszába kerültek más, szintén pozitronemittáló izotópok alkalmazásai, melyek ideálisabb felezési idővel vagy energiával rendelkeznek, esetleg előállításuk nem igényel ciklotron jelenlétét. Az  $^{18}\text{F}$ FDG a leggyakrabban alkalmazott PET radiofarmakon a tumorok diagnosztikájában, stádium meghatározásban, terápia hatékonyság követésében. Az  $^{18}\text{F}$ FDG egy glükóz analóg, melyet a fokozott glükóz-metabolizmussal rendelkező sejtek felvesznek, foszforilálódik, majd ott csapdába esik és nem jut ki a sejtől. Fontos azonban megemlíteni, hogy az  $^{18}\text{F}$ FDG nem tumorspecifikus, mivel a fokozott glükózanyagcserével és glükózigénnyel rendelkező szervek, szövetek (gyulladásos területek, agy, szív, izom), valamint a kiválasztásban résztvevő vesék  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele szintén magas. Továbbá, ismertek olyan daganatok (jól differenciált pajzsmirigy carcinomák és neuroendokrin tumorok), melyek nem halmozzák az  $^{18}\text{F}$ FDG-t. Ezekből kifolyólag indokoltá váltak más, tumorspecifikus célpontokat (pl. Aminopeptidáz N/CD13) célzó radiotracerok fejlesztése az orvosbiológiai kutatásokban.

Ennek megfelelően célkitűzéseink:

- A hypoxia és angiogenesis kapcsolatának *in vivo* PET és *ex vivo* vizsgálata subcutan He/De tumorokon különböző angiogenesis és hypoxia specifikus radiotracerok felhasználásával.
- A radiokémiai munkacsoport által előállított négy c(NGR) származék *in vivo* PET és *ex vivo* vizsgálata subcutan He/De és Ne/De tumoros állatokon.
- APN/CD13 specifikus c(NGR) származék daganatellenes terápia hatékonyság követésére való alkalmazásának vizsgálata subcutan HT1080 és B16F10 tumorokon.
- az alkalmazott tumorok APN/CD13 pozitivitásának igazolása western blot vagy immunhisztokémiai módszerrel

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 Erek felépítése

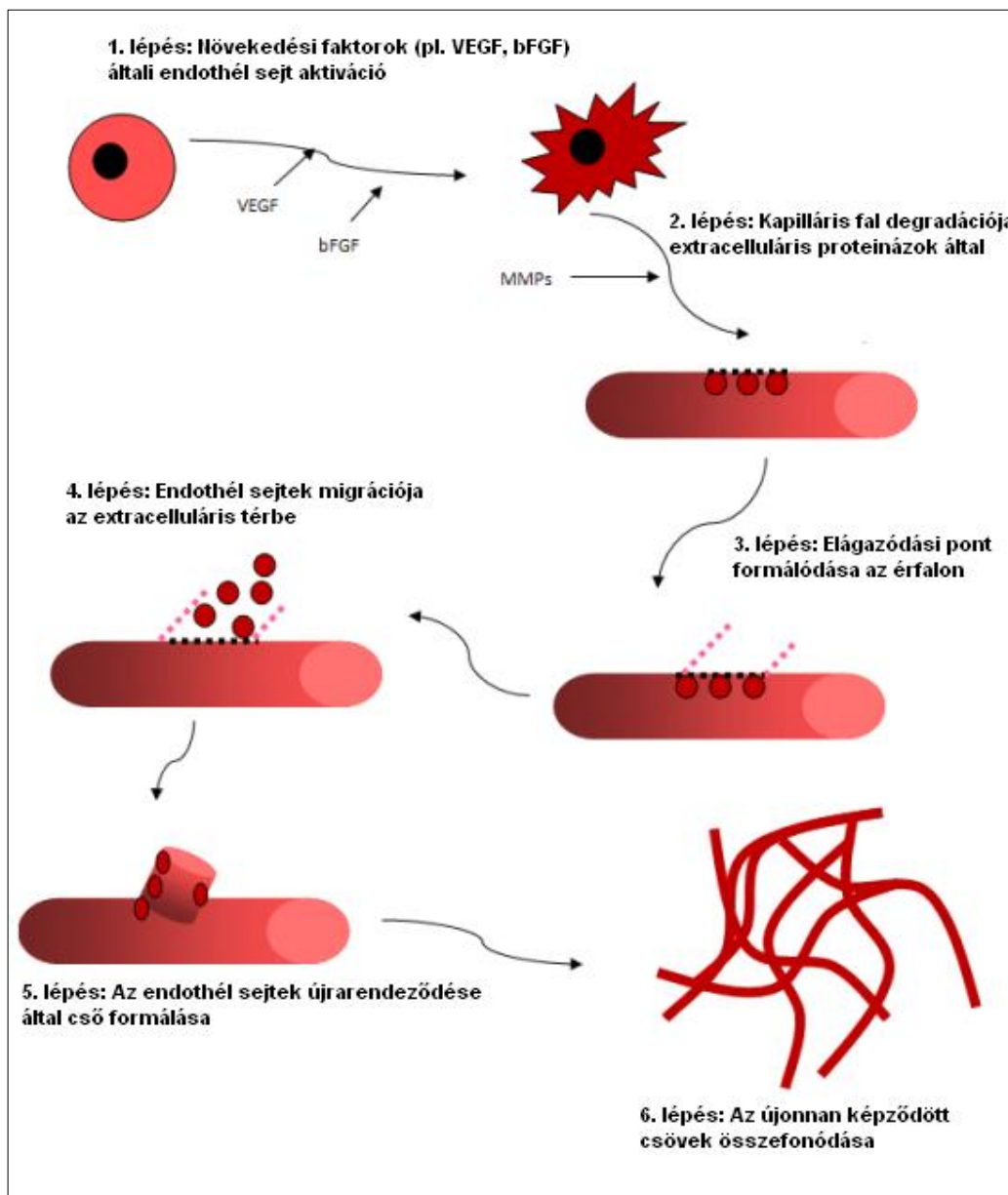
Az élő szervezetben a tápanyag és oxigén ellátás biztosítását, valamint az anyagcsere végtermékek elszállításának feladatát a testet beszövő érhálózat látja el. Az érrendszer artériákból, vénákból, arteriolákból, venulákból, valamint kapillárisokból épül fel, melyek eltérő morfológiával jellemezhetők, tükrözve funkciójukat. Az erek három fő rétegből épülnek fel, belső falukat (tunica intima) kapcsolómolekulák által (pl. VE-Cadherin) egybekötött endothél sejtek alkotják, melyek a bazalmembránon rögzülnek. Az erek középső rétegét (tunica media) rugalmas rostok és simaizom építi fel, külső rétegét (adventitia) laza kötőszövetes elemek (pl. kollagénrostok, pericyták) adják. Az artériák nagy nyomású érszakaszok, melyek jól fejlett tunica médiával jellemezhetők. Ezzel szemben a vénák kis nyomású érszakaszok, melyek az artériákhoz képest vékonyabb simaizomsejtréteggel, kisebb rugalmas rosttartalommal jellemezhetőek, azonban jóval fejlettebb adventitia réteggel bírnak. A kisebb átmérőjű erek (arteriolák, venulák és kapillárisok) funkciójuknak megfelelően eltérő felépítéssel rendelkeznek.

### 2.2 Angiogenesis típusai

A szervezetet körbefonó cardiovascularis hálózat a korai embriogenesis szakaszában alakul ki vasculogenikus (de novo érképződés) és angiogenikus (meglévő érből történő új ér képzés) folyamatok kombinációjával (Viallard és mtsai., 2017). Az angiogenesis, azaz egy már meglévő érből történő új ér képződése, egy többlépcsős folyamat, melynek szabályozásában számos pro- és anti- angiogenikus faktor vesz részt. Az angiogenesis egy meghatározó biológiai folyamat, amely nem csak fiziológiás, hanem malignus körülmények között is kiemelkedő fontossággal bír. Olyan fiziológiás folyamatban játszik szerepet, mint a sebgyógyulás, de elengedhetetlen a női reprodukciós rendszer működése során is. Angiogenesis következik be az ovuláció, folliculus fejlődés, sárgatest képzés, progeszteron felszabadulás, a menstruációs ciklus alatti endometrium- növekedés, -visszahúzódás és -regeneráció, valamint a terhesség alatt is. Azonban a fiziológiás angiogenikus folyamatok felborulása, zavara megannyi malignus folyamat, mint például tumorok, psoriasis, arthritis, retinopátiák, elhízás, asthma vagy atherosclerosis kialakulásához vezet (Tahergorabi és mtsai., 2012).

## 2.2.1 Bimbódzó érképződés („sprouting angiogenesis”)

A tumoros szöveten belül a bimbódzó („sprouting angiogenesis”) érképződés a leggyakoribb forma (Viallard és mtsai., 2017). A legtöbb tumor 1-2 mm-es mértet elérve képtelen tovább növekedni, a túlélés kulcsa az új erek képzése révén a megfelelő vérellátás biztosítása. A hiányos, gyenge oxigénnel való ellátottság és a metabolikus termékek felhalmozódása hypoxiát és/vagy acidózist von maga után (Viallard és mtsai., 2017).



1. ábra: Az angiogenezis folyamata (forrás: <https://www.cellworks.co.uk/angiogenesis.php>)

A bimbózdó érképződés első lépésében az endothél sejtek aktivációja következik be, melyet az endothél sejtek felszínén lévő növekedési faktor receptorokhoz (bFGFR, VEGFR) kötődő növekedési faktorok (bFGF, VEGF) váltanak ki. Második lépésben a már meglévő kapilláris falának degradációja következik, melyet a MMP-k (mátrix metalloproteinázok) mediálnak. Harmadik lépésben az elágazódási pont kialakítás következik az érfalban, mely folyamatot az integrinek szabályoznak. A következő - integrinek, MMP-k és urokinázok által szabályozott - lépésben megindul az endothél sejtek migrációja az extracelluláris térbe. Ötödik lépésént a környező stroma sejtek által termelt Angiopoietin 1 hatására a kiáramlott endothél sejtek újrendeződnek és lumennel rendelkező apró csövet formálnak. Utolsó lépésként pedig az új erekben lévő endothél sejtek által termelt PDGF, a pericyták toborzása révén az újonnan képződött apró csövek egybefonódását eredményezi (1. ábra).

### 2.2.2 Intussusceptiv („splitting”) angiogenezis

A bimbózdó angiogenezissel szemben szignifikánsan előnyösebbnek tekinthető ez az alternatív angiogenezis forma, hiszen gyorsabban és kevesebb energiabefektetéssel képződnek új erek ezzel a mechanizmussal. Továbbá, ez a folyamat nem függ az endothél sejtek proliferációjától, a membrán degradációtól és a migrációtól sem. A tumorok ezt az érképzési stratégiát alkalmazzák abban az esetben, ha gyorsan kell adaptálódniuk a mikrokörnyezet változásához. Az új ér képződése a már meglévő ér lumenén belül történik. A folyamat során az intersticiális szövet beekelődik a már létező ér lumenébe, így az eredeti eret kettéhasítva két új önálló ér keletkezik. A folyamat négy fő lépésből áll (Viallard és mtsai., 2017; Paku és mtsai., 2011). Első lépésben az ér belsejében lévő endothél sejtek hidat képezve egymáshoz kapaszkodnak kollagén nyálábok által. Második lépésként a proteolitikus aktivitásnak köszönhetően a bazalmembrán fellazul, a kollagén nyálábok a lumenen belül migrálnak az endothél sejtek által alkotott hídon keresztül. Harmadik lépésben a kollagényálábok eléri az ér túloldalát, hozzákapcsolódnak az intersticiális szövethez, így létrehozva egyfajta pillért. Az utolsó lépésben a pillér tovább fejlődik, növekszik a fibroblasztok, pericyták és myofibroblasztok toborzásának köszönhetően. A humán daganatok közül a melanómára (Viallard és mtsai., 2017; Ribatti és mtsai., 2005) és a colon carcinómára (Viallard és mtsai., 2017; Paku és mtsai., 2011) jellemző ez a fajta alternatív érképzési mechanizmus.

### 2.2.3 Vasculogén mimikri

A vasculogén mimikri kifejezés- mint alternatív angiogenezis- arra utal, hogy a tumorsejtek endothél sejt-ként viselkednek. A folyamat során a tumoros sejtek nemcsak tumor markereket, hanem endothél sejtekre jellemző markereket (pl.:VE-Cadherin) is expresszálnak, melyek segítségével apró ereket tudnak képezni. Ezt a jelenséget melanomában (Viallard és mtsai., 2017; Maniotis és mtsai., 1999), emlő, ovárium, prosztatata, húgyhólyag és tüdő carcinomákban, sarcomában és gliomákban is megfigyelték (Viallard és mtsai., 2017; Paulis és mtsai., 2010).

### 2.2.4 Ér „felvétel” („Vessel co-option”)

Ennek az alternatív angiogenezisnek a során a gazdagon erezett szövetekben a tumorok anélkül tudnak növekedni, hogy új ereket képeznének. A folyamat során gyakorlatilag „elrabolják” a környező szövetekben megtalálható ereket. Vesesejtes carcinomában megfigyelték, hogy a daganat határán jól fejlett eret látható, hiszen a daganat ezen erek mentén növekszik, majd ahogy növekszik a tumor, úgy foglalja magába az ereket (Viallard és mtsai., 2017; Qian, 2013).

## 2.3 Angiogenezis szabályozásában résztvevő molekulák

A hypoxia kialakulása a legfőbb hajtóereje az angiogenezis elindulásának. Normoxiában a PHD2 (prolyl hidroxiláz domain protein 2) oxigént használ fel a HIF (hypoxia indukálta faktor) transzkripció faktor hidrolizálására. A hidrolizált HIF transzkripció faktor a Von Hippel- Lindau (VHL) komplex által ubikvitinálásra, majd a proteaszómákban lebontásra kerül.

Hypoxiás körülmények között azonban a PHD2 inaktívvá válik, a HIF transzkripció faktor nem kerül lebontásra a proteaszómákban, hanem hozzákötődik a hypoxia válasz elemekhez (HRE), mely a target gének (VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF-B, plazminogén aktivátor-1, erythropoietin, GLUT-1) expresszióját vonja maga után.

Azonban a tumorokban nem csak a hypoxia okozhat magas HIF protein szinteket, hanem az onkogén útvonalak (pl.: ERK jelátviteli út) fokozott aktiválódása is (Viallard és mtsai., 2017; Masound és mtsai., 2015).

Továbbá, a VEGF képződése is fokozott lehet különböző mutációk által, melyek vagy onkogének aktivációját vagy tumor szupresszorok inaktivációját okozhatják (Viallard és mtsai., 2017).

### 2.3.1 Szolubilis szabályozó faktorok

#### 2.3.1.1 Vasculáris endotheliális növekedési faktor (VEGF)

A 8 exonból álló VEGF a 6-os kromoszóma rövid karján helyezkedik el. A VEGF-A sejt felszíni tirozin-kináz típusú transzmembrán receptorokhoz (VEGFR-1 VEGFR-2, NP-1, NP-2) kötődik. A VEGFR-1 és VEGFR-2 vasculáris endothél sejteken, míg a NP-1 és NP-2 (neurofilin receptor 1 és 2) a neuronokon és vasculáris endothél sejteken expresszálódik (Otrock és mtsai., 2007; Dvorak, 2002). A VEGF-A pro-angiogenikus hatását leginkább a VEGFR-2- höz való kötődése révén fejt ki (Otrock és mtsai., 2007; Ferrara és mtsai., 2003). A VEGF-A-nak szerepe van a sebgyógyulásban, az ovulációban, a vérnyomás fenntartásban, a menstruációban és a terhességben (Otrock és mtsai., 2007; Brown és mtsai., 1992), valamint a legtöbb szolid tumor nagy mennyiségben expresszálja (Otrock és mtsai., 2007; Ferrara és mtsai., 2003).

A VEGF-B VEGFR-1- hez igen, azonban a VEGFR-2-höz és VEGFR-3-hoz nem kötődik. *In vivo* körülmények között betöltött szerepe egyelőre nem ismert.

A VEGF-C és VEGF-D a VEGFR-2-höz és VEGFR-3-hoz is kötődik, mindkettő növekedési faktor *in vivo* és *in vitro* is stimulálja az angiogenezist.

#### 2.3.1.2 Angiopoietinek (Ang 1 és 2)

Az Angiopoietinek (Ang 1 és Ang 2) és a Tie receptorok fontos szerepet töltenek be az angiogenezisben (Otrock és mtsai., 2007; Carmeliet, 2003). A Tie 1 receptor mRNS-e nagy mértékben expresszálódik az embrionális vasculáris endothéliumban, angioblastokon és az endocardiumban (Otrock és mtsai., 2007; Korhonen és mtsai., 1994). Az Angiopoietinek Tie2 receptorhoz kötődnek, a Tie1 receptor ligandjai jelenleg még nem ismertek.

#### 2.3.1.3 Fibroblaszt növekedési faktorok (FGF)

Az aciditikus és bázikus fibroblaszt növekedési faktorok (aFGF és bFGF) olyan heparin kötő protein mitogének, amik szintén fontos szerepet játszanak az angiogenezisben. Az FGF-

ek FGFR1 vagy FGFR2-höz való kötődésükkel az endothél sejtek proliferációját (Otrock és mtsai., 2007; Gospodarowicz és mtsai., 1989) és migrációját (Otrock és mtsai., 2007; Terranova és mtsai., 1985) stimulálják.

#### 2.3.1.4 Vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF)

A vérlemezke eredetű növekedési faktort először vérlemezkékből izolálták, majd fibroblasztokban, astrocytáknak, keratinocytáknak és epitheliális sejtekben is azonosították őket (Otrock és mtsai., 2007; Heldin és mtsai., 1999). *In vivo* stimulálja az angiogenezist azáltal, hogy pericytákat toboroz az érképződés helyére, így segíti a kis erek fejlődését, majd egybefonódását (Otrock és mtsai., 2007; Risau és mtsai., 1992).

#### 2.3.1.5 Transzformáló növekedési faktor (TGF)

A TGF- $\beta$  család ligandjai II. típusú receptorokhoz kötődnek. Alacsony dózisban hozzájárul az angiogenikus faktorok, proteinázok fokozott termeléséhez, azonban magas koncentrációban gátolja az endothél sejtek növekedését, segíti a bazalmembrán megújulását és stimulálja a simaizom sejtek differenciációját és toborzását (Otrock és mtsai., 2007; Carmeliet, 2003)

### 2.3.2 Membrán kötött szabályozó faktorok

#### 2.3.2.1 $\alpha_v\beta_3$ Integrinek

Az integrinek kation-dependens heterodimer szerkezetű membrán kötött glikoproteinek, melyek jellemzően két ( $\alpha$  és  $\beta$ ), egymáshoz nem kovalens kötéssel kapcsolódó alegységből épülnek fel. 18  $\alpha$  és 8  $\beta$  alegység alkot 24 különböző integrin heterodimert. Mindegyik integrin receptor egy extracelluláris doménből, egy transzmembrán doménből és egy rövid (kb. 30-40 aminosavból álló) intracelluláris doménből épül fel. Néhány integrin csak egyféle ligandot képes kötni, míg mások (pl.  $\alpha_v\beta_3$ ) több ligand kötésére is képesek. Számos integrin, köztük az  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_6$  és  $\alpha_3\beta_1$  képes felismerni a 3 aminosavból (arginin-glicin-aszparaginsav) álló peptidszekvenciákat (RGD). Ligandkötést követően az alegységek csoportosulnak, majd integrin-mediált jelátvitel alakul ki. Az integrin receptorok nem rendelkeznek intrinsic enzimaktivitással, azonban komplex jelátviteli utakat tudnak megindítani a kinázokhoz és adaptor proteinekhez való hozzákapcsolódásuk által. Az

integrinek jelátvitelük által elősegítik a sejtek migrációját, proliferációját és túlélését. Ligandkötésük elmaradása ezeket a folyamatokat gátolja és apoptózist képes indukálni a sejtben. A sejthalál ezen stressz indukálta formáját integrin mediált sejthalálnak nevezzük. A folyamat kaszpáz 8-tól függő, ám halál-receptoroktól független. Míg az  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  és az  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorok expresszióját számos pro-angiogenikus növekedési faktorok vagy kemokinek szabályozzák, addig más integrinreket receptor mediált jelátvitel aktiválja (Avraamides és mtsai., 2008).

Az  $\alpha_v\beta_3$  integrin volt az első az integrinek családjából, melyről bebizonyosodott angiogenezisben betöltött szabályozó szerepe. Normál szövetek erein nem expresszálódik, azonban tumoros szövetben, sebgyógyulásakor és gyulladásakor nagy mennyiségben expresszálódik az endothél sejteken. Expressziójuk az endothél sejtek felszínén angiogenikus növekedési faktorok (VEGF, bFGF, TNF, IL8) által szorosán szabályozott folyamat. Számos kutatás bizonyítja az  $\alpha_v\beta_3$  integrinek endothél sejtek túlélését és migrációját befolyásoló hatását. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonisták hatására az endothél sejtek apoptózisa következik be, továbbá, emelkedik a p53 tumor szupresszor és p21 sejt ciklus inhibitor aktivitása, csökken az antiapoptotikus proteinek (pl. BAX) szintje. További tanulmányok bizonyítják, hogy az  $\alpha_v\beta_3$  antagonisták aktiválják a kaszpáz 8 függő programozott sejthalált (Avraamides és mtsai., 2008; Stupack és mtsai., 2001). Az endothél sejtek felszínén lévő  $\alpha_v\beta_3$  ligand (pl. Fibronectin) kötést követően aktiválja a MAPK, FAK, Src és más kinázokat, így szabályozva a sejt proliferációját, differenciációját és migrációját (Avraamides és mtsai., 2008).

#### 2.3.2.2 VE cadherin

A cadherineket a sejtadhéziós molekulák egyik legnagyobb csoportja. Jellegzetes extracelluláris cadherin doménnel rendelkeznek és homofil,  $\text{Ca}^{2+}$ -függő adhéziós folyamatokat mediálnak. Az optimális adhézió érdekében C terminálisával cytoplazmatikus proteinekhez, kateninekhez kötődik. Hasonlóan az integrinekhez, a cadherineket is kívülről befelé irányuló jelátvitelben játszanak szerepet. Részt vesz a sejt növekedésének kontaktgátlásában a VEGFR2-vel való gátló hatása révén. Ezzel ellentmondva, támogatja a VEGF2 stimulálta antiapoptotikus hatásokat (Vestweber, 2008).

### 2.3.3 Plazmin rendszer

A plazmin rendszer a zymogén plazminogénből, az aktív plazminból, szöveti és urokináz típusú plazminogén aktivátorból, plazminogén- és plazmin inhibitorból, valamint plazmin- és plazminogén receptorokból épül fel. Állatkísérletek bizonyították, hogy a plazminogén és a plazmin elengedhetetlen az *in vivo* angiogenikus folyamatokhoz, a plazminogén defficiens (Plg<sup>-/-</sup>) állatokban az érképződés mértéke csökkent. A plazmin egy olyan széles spektrummal rendelkező szerin proteáz, ami számos extracelluláris mátrix komponenst (fibronectin, laminin, von Willebrand faktor) képes enzimatikusan hasítani, aktiválja a mátrix metalloproteinázokat, továbbá, hatása van a növekedési faktorok (különösen a bFGF és VEGF) aktivitására is (Oh és mtsai., 2003).

### 2.3.4 Matrix metalloproteinázok

A bazalmembrán degradációja (lebontása) elengedhetetlen az angiogenesis folyamatában. A mátrix metalloproteinázok (MMP-k) olyan enzimek, melyek képesek az extracelluláris mátrix (ECM) átrendezésére. Szerkezetileg két csoportot különböztetünk meg, a szekretált MMP-eket és a membrán kötött MMP-eket. A szekretált MMP-k közé tartoznak a kollagenázok (MMP-1 és MMP-13), stromelizinek (MMP-3, MMP-10 és MMP-11), gelatinázok (gelatináz A= MMP-2 és gelatináz B=MMP-9), valamint egyéb MMP-k (MMP-7, MMP-12, MMP-19 és MMP-20) csoportja. A membrán kötött MMP-k közé pedig az MT1-MMP, MT2-MPP, MT3-MMP és az MT4-MMP sorolható. (Otrock és mtsai., 2007; Pepper, 2001). Az MMP-k normál szövetekben alapszinten expresszálódnak, azonban amikor a szövetek újrarendeződése (remodeling) indokoltá válik (tumor növekedés, sebgyógyulás), akkor az MMP-k rövid időn belül nagy mennyiségben expresszálódnak. Az MMP-k expresszióját számos jel beindíthatja, ilyenek például a citokinek vagy a hormonok. Citokinek és növekedési faktorok széles köre aktiválja az MMP-k transzkripcióját, többek között az epidermális növekedési faktor (EGF), hepatocita növekedési faktor (HGF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF), vascularis endotheliális növekedési faktor (VEGF), vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), tumor necrosis faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), keratinocita növekedési faktor (KGF), transzformáló növekedési faktor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), valamint interleukinek és interferonok. Ezzel együtt számos jelátviteli utat indíthatnak be, mint például NF-  $\kappa$ B, mitogén aktivált protein kináz (MAPK) vagy Smad dependens jelátviteli útvonalak. Szoros génexpressziós (endogén) és exogén szabályozás határozza meg az MMP-k aktivitását. Az

újonnan expresszált MMP-k enzimatikusan inaktívak (pro-MMP-k), az enzimek aktiválásához elengedhetetlen a  $Zn^{2+}$  bekötődése az enzim aktív régiójához. Exogén aktivátorok közé sorolható a plazmin, kallikrein és kaszkád mechanizmusok révén az MMP-k egymást is képesek aktiválni. Az aktiváció kontrollját a plazma proteináz inhibitorok ( $\alpha 1$ -proteináz,  $\alpha 2$  macroglobulin) és metalloproteináz szöveti inhibitorok (TIMP) adják (Caley és mtsai., 2015).

## 2.4 Aminopeptidáz N (CD13) molekula

Azokat a fehérjéket, melyek sokrétű funkcióval jellemezhetők „moonlighting” proteinek nevezzük. Ezek közé a proteinek közé tartozik az Aminopeptidáz N (APN), más néven CD13 molekula. Szerteágazó funkciójára akkor lettek figyelmesek, amikor monoklonális antitesttel kapcsolták össze őket (Mina-Osorio, 2008; Mina-Osorio és mtsai., 2008), csendesítették vagy éppen felerősítették a fehérje expresszáldását különböző sejtekben (Mina-Osorio, 2008; Fukasawa és mtsai., 2006), vagy kémiai inhibitorokkal enzimátikus aktivitását gátolták (Mina-Osorio, 2008; Mishima és mtsai., 2007). Angiogenesisben betöltött kitüntetett szerepét CD13-defficiens állatokkal való kísérletekben is leírták a közelmúltban (Rangel és mtsai., 2007).

A CD13 molekula egy erősen glikozilált, kb. 160 kDa méretű, 967 aminosavból álló II-es típusú membrán kötött metallopeptidáz. A humán genomban a 15-ös kromoszómán található az APN/CD13 molekulát kódoló 20 exonból álló ANPEP gén (Mina-Osorio, 2008; Watt és mtsai., 1990). N-terminális, intracelluláris doménje csupán 9 aminosavból áll, extracelluláris, C- terminális doménje, azonban ennél jóval nagyobb méretű, a kettő között pedig egy szimpla transzmembrán régió helyezkedik el (Wickström és mtsai., 2011). Cink kötő HEXXH pentapeptid motívumot tartalmaz, mely az M1 típusú metalloproteináz szuperfamilia jellemzője (Petrovic és mtsai., 2004). Normál expressziója megfigyelhető a vese és vékonybél epitélisejteken, az idegrendszerben (szinaptikus membránokon és pericytákon) és myeloid sejteken (monocytákon, macrofágokon és dendritikus sejteken). Aktivált, angiogenesisben résztvevő endothél sejteken is expresszáldódik, azonban csak *in vivo* körülmények között (Mina-Osorio és mtsai., 2008).

Az APN/CD13 molekula expresszióját leginkább a hypoxia és a növekedési faktorok expressziója indukálja transzkripciós szinten. A HIF-1 $\alpha$  transzkripciós faktor a hypoxia válasz elemekhez (HRE) hozzákötődve target gének, köztük az APN expresszióját indukálják

(Bhagwat és mtsai., 2001; Hanahan és mtsai., 1996; Hanahan, 1997; Folkman és mtsai., 1996; Varner és mtsai., 1996). Bhagwat és munkatársai (2001) kísérleteikben HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) sejteket tenyésztettek magas vagy alacsony szérumkoncentrációk mellett, vagy egy-egy angiogenikus faktor (bFGF, VEGF, TNF $\alpha$ , IGF-1) hozzáadásával. Tapasztalataik szerint az APN/CD13 expressziója négyszeresére nőtt szérum (mely az összes angiogenikus faktort tartalmazza a megfelelő koncentrációkban) hozzáadását követően. Az önálló angiogenikus faktorok másfél- kétszeres expresszióbeli növekedést tudtak generálni. A bFGF bizonyult a legerősebb indukálószernek, ezt követte a nagyjából azonos hatással bíró VEGF és TNF $\alpha$ , végül a leggyengébb indukáló hatással az IGF-1 rendelkezett. Petrovic és munkatársai (2003) a növekedési faktorok által beindított Ras/MAPK útvonal aktiválódása által indukált CD13 transzkripciót vizsgálták. Az aktivált Ras útvonal nélkülözhetetlen a CD13 indukációjához. Az Ets-2 Ras/MAPK általi foszforilációja elengedhetetlen a CD13 endotheliális indukációjához. Ezt a megfigyelést támasztja alá az a tény is, hogy a hiányosan foszforilált Ets-3 mutáns nem képes az APN/CD13 aktiválására (Petrovic és mtsai., 2003). Azonban a CD13 nem az egyetlen target a Ras általi aktivációban, APN/CD13 jelenlétében és Ras inhibitor (Manumycin A) hozzáadásával nem teljes a kapilláris formálódásának gátlása (Petrovic és mtsai., 2004; Bhagwat és mtsai., 2003). Ez az ismeret arra enged következtetni bennünket, hogy míg a Ras az angiogenezis korai szakaszában szükséges, addig a CD13 az angiogenezis későbbi szakaszában válik kulcsfontosságú molekulává (Petrovic és mtsai., 2004).

Pasqualini és munkatársai (2000) immunhisztokémiai vizsgálattal magas APN expressziót mutattak ki MDA-MB-435 emlő carcinomával transzplantált nude egerek tumoraiban. Immunhisztokémiai vizsgálatok igazolták különböző egér és humán tumorok, valamint a corpus luteum APN/CD13 pozitívitasát, illetve azt is, hogy a normál szövetek endothél sejtjeiről alapvetően hiányzik a molekula (Petrovic és mtsai., 2004; Pasqualini és mtsai., 2000; Curnis és mtsai., 2002). Számos humán eredetű klinikai mintán igazolódott az APN/CD13 pozitívitas (Wickström és mtsai., 2011). Martinez és munkatársai (1999) emlő daganatokon, Surowiak és munkatársai (2006) ovarium carcinomában, Hashida és munkatársai (2002) colon carcinomában, Kehlen és munkatársai (2003) pajzsmirigy carcinomában, Ikeda és munkatársai (2003) pancreas carcinomában, Zhang és munkatársai (2015) nem kissejtes tüdőcarcinomában, Guzman-Rojas és munkatársai (2012) melanomában, Ishii és munkatársai (2001a) prosztatata daganatokban igazolták az APN/CD13 emelkedett szintjét. Gyomor daganatokban az APN expresszió és a TGF- $\beta$ 1 expressziós szintek jól korreláltak a

tumormérettel, a nyirokcsomó áttétek számával és a tumor differenciáltságával (Schreiber és mtsai., 2018; Song és mtsai., 2017). Colorectalis carcinomában szenvedő betegek szöveti és plazma APN enzimatis aktivitást határoztak meg. Magas szöveti APN jó túlélési esélyt jelent, ezzel szemben a magas plazma APN rosszabb prognózissal kecsegtet (Schreiber és mtsai., 2018; Sanz és mtsai., 2015). Míg ismert az APN overexpressziója malignus daganatos kórképekben, addig akadnak olyan kivételek is, ahol az APN szintek csökkentek a környezethez képest. Ilyen kivételek közé tartoznak a vesedaganatok is, melyekben a környező veseszövethez képest alacsonyabb APN expressziót detektáltak (Schreiber és mtsai., 2018; Ishii és mtsai., 2001b).

Három fő funkcióval jellemezhető az APN/CD13 molekula: enzim, receptor és szignalizációs molekula. Enzimatis működése révén részt vesz peptidek hasításában, differenciációban, proliferációban, motilitásban, kemotaxis és antigén prezentációban is. Receptorként endocitotikus folyamatokban, így vírus fertőzéskor és a koleszterol felvétele során van szerepe. Szignalizációs molekulaként részt vesz adhéziós folyamatokban, az angiogenezisben és fagocitózisban is (Mina Osorio, 2008). Az APN/CD13 funkciója a lokalizációjától függ. Például a vékonybél epitélsejtjein nagy mennyiségben expresszálódik, melynek szerepe van a kis peptidek lebontásában enzimatis aktivitása révén. Az idegrendszerben, például szinaptikus membránokban inaktíválja a neuropeptid hormonokat (endorfin, enkefalin).

#### 2.4.1 Enzimatis fehérje hasító funkció

##### 2.4.1.1 Peptidek enzimatis szabályozása

Az aminopeptidáz N szubsztrátjainak hasítása révén azok aktivitását szabályozza. Szubsztrátja lehet például az enkefalin, melynek N-terminálisán való hasításával a fehérje féléletideje csökken, így segíti annak metabolizációját (Mina-Osorio, 2008). Az angiotenzin III N- terminálisán való hasítás révén angiotenzin IV-é alakul, így szabályozva a vérnyomást (Mina-Osorio, 2008; Danziger, 2008). Az ECM fehérjéinek - például a IV-es típusú kollagén vagy a nidogén- hasítása révén a tumoros sejt invázióját és metasztázis képzését segíti (Mina-Osorio, 2008; Menrad és mtsai., 1993).

##### 2.4.1.2 Differenciáció

Három fő megfigyelésen alapszik a differenciációban betöltött szerepe. Elsőként, megfigyelték, hogy normál és neopláziás myeloid sejteken jól meghatározott differenciációs

fázisban jelenik meg a CD13. A legtöbb leukémiás myeloblast expresszálja a CD13-at, azonban a lymphociták csak korai differenciációs fázisukban, érésük során a CD13 expressziója megszűnik. Ez lehetőséget teremt a leukémiák diagnózisának felállítására (Mina-Osorio, 2008; Nakase és mtsai., 1996). Másodikként, a CD13 expresszióját számos differenciációt befolyásoló ágens, például IL-4, IL-10 és TGF- $\beta$  szabályozza (Mina-Osorio, 2008; Kehlen és mtsai., 2004). Legutolsóként pedig *in vitro* vizsgálatok igazolták, hogy a CD13 gátlószerei (pl. bestatin, leuhistin) módosítja a sejtek differenciációját (Mina-Osorio, 2008; Löhn és mtsai., 1997).

#### 2.4.1.3 Proliferáció

Számos sejtvonalon leírásra került az APN/CD13 inhibitorok, monoklonális antitestek proliferációt gátló hatása. Például, két APN/CD13 gátlószerről, az aktinoninról és a bestatinról, valamint monoklonális antitestről jelent meg publikáció, hogy sikeresen gátolták egyes choriocarcinoma és leukémia sejtvonalak proliferációját (Mina-Osorio, 2008; Inoi és mtsai., 1995).

#### 2.4.1.4 Motilitás

Ismert, hogy a CD13-nak hatása van a sejtek, különösen a tumoros sejtek és a hímivarsejtek motilitására. Anti-CD13 monoklonális antitesttel való kezelés hatására szignifikánsan csökkent a tüdő tumorsejtek (Mina-Osorio, 2008; Chang és mtsai., 2005), a colon carcinoma sejtek és a fibrosarcoma sejtek (Mina-Osorio, 2008; Hashida és mtsai., 2002; Saitoh és mtsai., 2006) motilitása. Ráadásul, ismertek a CD13 aktivitása és a hímivarsejtek motilitása közötti összefüggéseket leíró publikációk is. Korrelációt találtak az APN/CD13 enzimikus aktivitása és a fertilitás között (Mina-Osorio, 2008; Gonzalez és mtsai., 1985).

#### 2.4.1.5 Kemotaxis

Az elmúlt években számos tanulmány jelent meg, melyben a T lymphocyták száma és az sarcoidosisos betegek bronchoalveoláris folyadékában mért APN/CD13 enzimikus aktivitása közötti összefüggéseket vizsgálták. A CD13 szintek jóval magasabbak ezekben a betegekben, mint kontroll, egészséges társaikéban, valamint leírták, hogy a tisztított CD13 a lymphocyták kemotaxisát váltja ki *in vitro* körülmények között (Mina-Osorio, 2008; Tani és

mtsai., 2000). Továbbá, a CD13 lebontja a CXCL11 kemokint, csökkenti a CXCR4 szintjét és modulálja az SDF-1 (Stroma sejt eredetű faktor) indukálta sejt migrációt (Mina-Osorio, 2008; Proost és mtsai., 2007; Wulfaenger és mtsai., 2008).

#### 2.4.1.6 Antigén prezentáció

Az APN/CD13 molekulát gyakran említik, mint antigén feldolgozó enzim. Ismert, hogy az APN/CD13 enzimatis aktivitása révén képes bizonyos extracelluláris peptidok hasítására, nyírására, ezzel pedig segítve az antigén prezentációt. Ezt támasztja alá az a felismerés is, hogy az APN inhibitorok, valamint a monoklonális antitestek gátolják az APN enzimatis aktivitását, akadályozva ezzel az antigén prezentációt (Mina-Osoria, 2008).

#### 2.4.2 Receptorális funkció

##### 2.4.2.1 Virális receptor

Számottevő fajban ismert a CD13 virális receptorként való működése. Például humán coronavírus 229E (HCoV-229E), sertés CoV (légzőszervi megbetegedést okozó), sertés gastroenteritis CoV (TGEV), macska CoV (FECoV) és kutya CoV (CCoV) receptora. A receptor aktív, kötő részének mutációja vagy gátlószer kötődés hatására a vírusok receptorális kötése elmarad (Mina-Osorio, 2008; Kolb és mtsai., 1998). Összefüggésbe hozták a humán cytomegalovírus (HCMV) infekcióval is, minden HCMV-ra fogékony mononukleáris sejt *in vitro* körülmények között CD13-at expresszált (Mina-Osorio, 2008; Söderberg és mtsai., 1993).

##### 2.4.2.2 Koleszterol felvétel

Korábbi publikáció bizonyítja, hogy a CD13 célpontja az Ezetimib nevű koleszterol felvételt gátló szernek (Mina-Osorio, 2008; Kramer és mtsai., 2005). Azt feltételezik, hogy a koleszterol felvétel gátlására irányuló Ezetimib adása, nem a CD13 enzimatis aktivitását gátolja, sokkal inkább az enterocyták endocytotikus koleszterol felvételhez van- eddig még pontosan nem ismert- köze (Mina-Osorio, 2008; Orsó és mtsai., 2006).

### 2.4.3 Jelátviteli funkció

#### 2.4.3.1 Fagocytózis

A mononukleáris sejtek több, mint kétszer annyi CD13-at expresszálnak, mint azok a sejtek, melyek nem vesznek részt a fagocytózisban (Mina-Osorio, 2008; Tokuda és mtsai., 2006). Abban az esetben, ha ezeknek a fagocytotikus sejteknek 1,25- dihidroxi-D3 vitaminnal indukáljuk a differenciációját, akkor fagocytotikus kapacitásuk nő, a kisebb fagocytotikus kapacitású sejtek CD13 szintje azonban csökken, következményesen még alacsonyabb lesz a fagocytotikus kapacitásuk (Mina-Osorio, 2008). Korábban leírták, hogy a CD13 aktívan részt vesz a fagocytózisban. Azok a partikulák, melyek egyszerre alakítanak ki kereszt kötést az Fc $\gamma$  receptorral és az APN/CD13-mal, sokkal eredményesebb a fagocytózisuk, mint azoké, melyek csak az Fc $\gamma$  receptorhoz kötődnek. Érdekes módon, a CD13 önmagában is hatékony fagocytózist képes indukálni (Mina-Osorio és mtsai., 2005).

#### 2.4.3.2 Angiogenezis

Az APN/ CD13 három mechanizmus révén is részt vesz az angiogenezisben: (a) enzimatis aktivitása révén degradálja a mátrix proteineket, (b) olyan peptideket generál, melyek angiogenikus és/vagy anti-angiogenikus hatásúak, (c) végül pedig jelátvitelt módosít növekedési és/vagy angiogenikus faktorokkal (Bauvois, 2004). További tanulmányok is alátámasztják, hogy az APN/CD13 molekula az angiogenezis egyik kulcsfontosságú molekulája (Wickström és mtsai., 2011): (i) APN inhibitorokkal való kezelés hatására kísérleti állatok retinális neovascularizációja, a chorioallantoic membrán angiogenezise és a tumor növekedése csökkent, károsodott. (ii) Primer sejtek és sejtvonalak APN szintjei jelentősen növekedtek hypoxia, angiogenikus növekedési faktorok és a kapillárisok formálódását befolyásoló jelátviteli útvonalak által. (iii) A CD13 proximális promóterét tartalmazó plazmid transzkripciója jelentősen megemelkedett azoknak az angiogenikus jeleknek a hatására, melyek az endogén APN gén expresszióját kiváltják *in vitro* és tumor xenograftokban, az APN/CD13 esszenciális a kapilláris formálódásában (Bhagwat és mtsai., 2001). Az APN/CD13 enzimatis aktivitásától függetlenül, sejtfelszíni receptorként is funkcionálhat, azonban a pontos receptoriális mechanizmusuk egyelőre nem ismert. Endothél sejtek felszínén elhelyezkedő receptorként működhet a galectin-3 számára, a galectin-3 indukálta angiogenezis folyamatában. Azonban az APN csak 9 aminosavból álló cytoplazmatikus doménnel rendelkezik, amely által nem képes direkt jelátvitelre. Arra, hogy az APN és

galectin 3 együttes jelenléte az endothél sejteken miként szabályozhatja az angiogenezist, magyarázat lehet az, hogy az APN egyfajta adaptor fehérjeként vesz részt a folyamatban. Egy másik magyarázat lehet, hogy a galectin 3-at az APN receptorként megköti, később proteolitikus aktivitása révén feldolgozza, majd az így feldolgozott galectin 3 stimulálja az angiogenezist (Yang és mtsai., 2007).

Igazolták, hogy bestatin, mint APN/CD13 gátlószer vagy anti-CD13 antitest hatására az angiogenezis gátlásra kerül *in vivo* körülmények között (Mina-Osorio, 2008; Hashida és mtsai., 2002). Ezenfelül, a CD13 null egerekkel egyértelműen bizonyították a molekula jelentőségét az angiogenezisben (Rangel és mtsai., 2007). Ezekben az egerekben hypoxiás körülmények között drámaian alacsony a neovascularizáció folyamata, ahogyan a növekedési faktorokra adott angiogénikus válaszuk is igen csekély.

Tumor-homing molekulák azonosítására irányuló fág-display technika segítségével felfedeztek (Pasqualini és mtsai., 1995) egy aszparagin-glicin-arginin aminosavakat tartalmazó peptidszekvenciát (NGR), mely specifikusan kötődik az angiogenezisben résztvevő endothél sejtek felszínén lévő APN/CD13 receptorhoz (Pasqualini és mtsai., 2000). Az NGR peptidszekvencia roppant hasonló az  $\alpha v \beta_3$  integrin receptorokhoz kötődő arginin-glicin-aszpartámsav tartalmú RGD-vel. Mind az RGD, mind pedig az NGR peptidek antitumor hatású gyógyszerekkel konjugálva hatékonyabb kezelést biztosítanak, amellet, hogy a toxikus hatásuk csökken (Mina-Osorio, 2008; Curnis és mtsai., 2000; Pastorino és mtsai., 2006; Corti és mtsai., 2004).

#### 2.4.3.3 Adhézió

Egy anti-CD13 antitest karakterizálása során azt figyelték meg, hogy a CD13 diffúz módon expresszálódik a szabadon álló sejtek felszínén, azonban, ha a sejtek egymáshoz kapcsolódnak, a CD13 expresszió átrendeződik és a sejt-sejt kontaktus helyére összpontosul (Mina-Osorio, 2008; Menrad és mtsai., 1993). Később azt találták lymphocytákban, hogy a sejt-sejt kapcsolat indukálja a CD13 expressziót (Mina-Osorio, 2008; Riemann és mtsai., 1999). Legutóbbi megfigyelések szerint a monocyták felszínén lévő CD13-al való keresztkötés egy erős homotipikus aggregációt (HA) vált ki, ami jelátviteltől függő, azonban az enzimikus aktivitástól független (Mina-Osorio, 2008; Mina-Osorio és mtsai., 2006).

## 2.5 Angiogenezis vizsgálati lehetőségei

### 2.5.1 *In vivo* vizsgálatok

#### 2.5.1.1 Matrigel plug assay

A Matrigel egy extracelluláris mátrix komponenseket (pl.: laminin, IV-es típusú kollagén, nidogén, proteoglikánok, egyéb ECM proteinek) tartalmazó gél halmazállapotú anyag, melyet  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva tárolunk és  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra felolvasztott állapotában használunk fel. Az ECM összetételének „modellezésére” alkalmas. A módszer lényege, hogy a Matrigelhez különböző pro- és anti-angiogenikus anyagokat hozzákeverve és kísérleti állatba subcutan injektálást követően vizsgálni tudjuk ezen faktorok angiogenezisre gyakorolt hatását. Bizonyos idő eltelte után a Matrigel plugot eltávolítva szövettani vizsgálatnak vetik alá a metszeteket, melyből az erek száma és hemoglobin tartalma alapján következtetni lehet a vizsgált anyag angiogenezist serkentő vagy gátló hatásra. (Passaniti és mtsai., 2004; Tahergorabi és mtsai., 2012).

#### 2.5.1.2 Szaruhártya angiogenezis vizsgálat

Ezt a módszert elsőként nyulakban fejlesztették ki, azonban pár évvel később kisebb testű rágcsálókra, így egérre és patkányra is adaptálták a módszert (Staton és mtsai., 2004; Tahergorabi és mtsai., 2012). Az eljárás során egy apró zsebet képeznek a szaruhártyában, melybe a vizsgálni kívánt anyagot fecskendezik. A módszer egyetlen előnye, hogy az alapvetően érmentes szaruhártyában az újonnan képződő ereket könnyen detektálni tudjuk. Azonban a befecskendezett anyag gyulladásos reakciókat is kiválthat, valamint igen limitált a szaruhártya hozzáférhetősége.

#### 2.5.1.3 Csirke chorioallantoic membrán vizsgálat

A módszer során a tojáson egy apró ablakot nyitnak, a chorioallantoic membránra fecskendezik a vizsgálni kívánt anyagot majd zárják a tojást. Megfelelő inkubálási idő után átvilágítással ellenőrzik az új erek képződését. A módszer előnye olcsóságában és egyszerűségében rejlik, azonban az idegen anyagok bevitele gyakran vált ki gyulladásos választ, ami megakadályozhatja az újonnan képződött erek felismerését.

#### 2.5.1.4 Hátsóláb ischaemia vizsgálat

Az egereken és patkányokon végrehajtott hátsóláb ischaemiás eljárás a perifériás artériás betegségek modellezésére szolgál (Niiyama és mtsai., 2009). Számos módszer rendelkezésünkre áll az ischaemia előidézésére, melyekben az elkötések helye és módja eltér egymástól. Attól függően pedig, hogy melyik módszert alkalmazzuk, más- más ischemiás mintázatot kapunk. Az elkötés után bekövetkező neovascularizációt endothél sejtek proliferációjából és a kapillárisok denzitásából lehet meghatározni. A mm<sup>2</sup>-ként lévő kapilláriszám meghatározással szemben pontosabb adatot szolgáltat az izomrostonként lefutó kapillárisok számának meghatározása.

#### 2.5.2 *In vitro* vizsgálatok

##### 2.5.2.1 Endothél sejt proliferációs vizsgálat

Két különböző módszer ismert az endothél sejtek proliferációjának meghatározására. Az első a nettó sejtszám meghatározáson alapszik, melyet hemocytométerrel (Bürker kamra) végeznek, azonban a folyamat időigényes és csak magas sejt denzitásnál alkalmas a proliferáció meghatározására. A másik módszer egy kolorimetriás eljárás, az MTT assay, mely során az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) a mitokondriális dehidrogenáz enzimek (mitokondriális aktivitás = élő sejt) általi lebontás révén kékes-lilás formazán kristállyá alakulnak. A formazán kristályokat DMSO segítségével oldják és a keletkező oldott formazán abszorbanciáját 570 nm-en spektrofotométerrel mérik (Riss és mtsai., 2013; Tahergorabi és mtsai., 2012).

##### 2.5.2.2 Endothél sejt migrációs vizsgálat

A Boyden kamra vizsgálat a leggyakrabban alkalmazott migrációs vizsgálati módszer. A vizsgálat során a sejteket egy 8 µm pórus átmérőjű fibronectinnel, kollagénnel, vagy Matrigellel fedett szűrőre visszük fel, a vizsgálni kívánt angiogenikus faktort pedig az alatta lévő kamrába juttatjuk be, a sejtek pedig a koncentrációgradiens irányába kezdenek el mozogni. A módszer rendkívül érzékeny a kis koncentrációkülönbségekre is, könnyen reprodukálható, hátránya viszont, hogy a vizsgálat során maga a migrációs folyamat nem látható, csak a végén ennek az eredménye (Tahergorabi és mtsai., 2012).

### 2.5.2.3 Endothél sejt differenciációs vizsgálat

A vizsgálat választ ad arra a kérdésre, hogy képesek-e az endothél sejtek 3D-s struktúrát, azaz cső (ér) formát felvenni. A differenciáció sebessége az alkalmazott mátrix összetételétől függ. I-es vagy II-es típusú kollagén mátrixon jóval lassabb és esetibb a csőképzés, mint IV-es vagy V-ös típusú kollagén mátrixon. A legkifejezettebb és leggyorsabb differenciáció természetesen a komplex összetételű Matrigelen valósul meg (Tahergorabi és mtsai., 2012).

### 2.5.3 *Ex vivo* vizsgálatok

#### 2.5.3.1 Patkány aortagyűrű vizsgálat

A módszer során a patkányok thoracalis aortáját, valamint az aorta melletti zsírszövetet eltávolítják. Az aortát megközelítőleg 1 mm vastag gyűrűkre vágják fel, Matrigellel ellátott plate-ekbe ágyazzák őket, az angiogénikus faktorok hozzáadása opcionális. 6-12 napos inkubálás után a plate-eket szteromikroszkóp alatt vizsgálják (Bellacen és mtsai., 2009).

#### 2.5.3.2 Csirke aortaív vizsgálat

A módszer hasonlít az előzőekben leírt patkány aortagyűrű vizsgálatához, azonban a csirkéből aortaívet izolálnak, melyet 1 mm-es darabokra vágnak és Matrigellel fedett plate-ekben tenyésztik a mintákat. A módszer előnye a gyorsaság, csupán 1-3 napot vesz igénybe (Tahergorabi és mtsai., 2012).

### 2.5.4 Kvantitatív vizsgálatok

A kvantitatív vizsgálatoknak két csoportját, az invazív és noninvazív technikákat különböztetjük meg. Invazív technikának minősül az élő szervezetből nyert szövetdarabon (biopszia) végzett hisztológiai vizsgálat fény- vagy elektronmikroszkóppal. Noninvazív technikák közé a képalkotó eljárásokat (MRI, CT és PET) sorolhatjuk, hiszen ezeknél a módszereknél egy intravénás szúrásán kívül semmilyen más invazív eljárás nem történik. A CT és MR modalitások elsősorban anatómiai információval szolgáló képalkotó eljárások. A CT vizsgálatokhoz jellemzően jódtartalmú, míg MR vizsgálatokhoz gadolínium tartalmú kontrasztanyagot juttatnak a beteg szervezetébe intravénásan, majd ezt követi a képalkotás. Fontos azonban azt leszögezni, hogy ezek a képalkotó eljárások molekuláris szintű

információt nem biztosítanak. A képalkotó módszerek közül kiemelendő a PET képalkotás, mely az élő szervezet működésbeli, funkcionális állapotáról nyújt információt. A PET képalkotás során pozitronemittáló izotóppal jelölt radiotraceret injektálunk intravénásan, melyet radiotracerből függő inkubációs idő követ. Ennek leteltét követően történik a képalkotás. A PET technika angiogenezis specifikus radiotracer alkalmazásával magas szenzitivitással és pontossággal képes a tumorok érképződésének vizsgálatára. A korábban említett CT vagy MR modalitásokkal kombinált PET technika, úgynevezett hibrid képalkotást tesz lehetővé, mellyel egy ülésben kapunk anatómiai és működésbeli információt.

#### 2.5.4.1 Kapilláris denzitás becslés

Gold standardnak minősülő vizsgálat a szövettani mintákon végzett vascularis denzitás immunhisztokémiai vizsgálata. Az eljárás során a mintákat formalinban fixálják, majd fokozatosan emelkedő alkoholsorban dehidratálják, ezt követően a paraffinba ágyazott mintát 5 µm vastagságú szeletekre vágják. A metszetek deparaffinálását követően anti-CD31 antitesttel inkubálják a mintákat. Majd a másodlagos antitesttel konjugált HRP-DAB előhívó rendszerrel mikroszkóp alatt vizsgálják a minták erezettségét (Tahergorabi és mtsai., 2012).

### 2.6 Aminopeptidáz N (APN/CD13) expresszió vizsgálata reaktív és nem reaktív ligandokkal

Az APN-t célzó kémiai ágenseket két csoportra oszthatjuk: reaktív (melyeket az APN/CD13 enzimatikusan hasít) ligandok csoportjára és a nem reaktív ligandok csoportjára. Ismert, hogy az APN/CD13 előnyben részesíti az N terminálison lévő semleges aminosavak hasítását (Schreiber és mtsai., 2018; Mina-Osorio, 2008). Ezek közül is kiemelkedő optikailag aktív szubsztrátja az enzimnek a karboxil módosított L-leucin és az L-alanin. A legegyszerűbb példa erre az L-leucin-p-nitroanilid, melyből a hasítással képződő p-nitroanilin 405 nm-en abszorbeál. Ez a kereskedelmi forgalomban is kapható molekula enzim inhibitor vizsgálatok során gyakran alkalmazott ágens, azonban a detektálási érzékenysége igen gyenge (Schreiber és mtsai., 2018; Rich és mtsai., 1984; Gao és mtsai., 2011). Sokkal érzékenyebb detektálást biztosítanak azok az L-leucin és L-alanin származékok, melyek az enzimátikus hasítás eredményeként fluoreszcens 7-amino-4-metil-kumarinra (AMC) hasadnak. Az AMC-vel való vizsgálatok során ovarium daganatos betegek intratumorális folyadékának vagy rheumathoid arthritises betegek szinoviális folyadékának szolubilis APN szintjét határozzák meg

(Schreiber és mtsai., 2008; van Hensbergen és mtsai., 2002; Morgan és mtsai., 2015). Az elmúlt években nagy figyelem fordítódott az olyan szubsztrátok irányába, melyek hasítás révén mélyvörös vagy közel infravörös (NIR) fluoreszcens jel szabadul fel. Ezeknek a festékeknek a fluoreszcencia vezérelt sebészetben van szerepük, ahol segítik a negatív sebészi széllel való tumoros szövet kimetszését, így hozzájárulva a beteg mihamarabbi gyógyulásához (Schreiber és mtsai., 2018; Vahrmeijer és mtsai., 2013). A közelmúltban amino-hemicianin-alanin nevű NIR szubsztrátot fedeztek fel, mely lehetővé teszi az APN *in vitro* és *in vivo* enzimatisz aktivitásának mérését (Schreiber és mtsai., 2018; He és mtsai., 2017). Hasonlóan az előzőkhöz, az alanin-krezil-ibolya vagy az alanin-naphtalinamid APN-nel való hasításának terméke vörös színtartományban emittál (Schreiber és mtsai., 2018; He és mtsai., 2017; Chen és mtsai., 2013). Egy egészen más megközelítéssel NMR (mágneses magrezonancia) spektroszkópiával is mérhető az APN enzimatisz aktivitása. Az [1-<sup>13</sup>C] Ala-NH<sub>2</sub> enzimatisz hasításával [1-<sup>13</sup>C] Ala-OH termék keletkezik, melyet a <sup>13</sup>C NMR kémiai eltolódása jelez vese homogenátumokon (Schreiber és mtsai., 2018; Hata és mtsai., 2016).

A másik nagy csoportot a nem reaktív APN-t célzó molekulák alkotják. Ide tartoznak az antitestek, peptid és nem peptid típusú molekulák is.

Az antitesteket gyakran immunhisztokémiai vizsgálatoknál használjuk, melynél a cél az APN expresszió kimutatása a tumoros szövetben. A klinikai gyakorlatban az APN expresszió mértéke biomarkerként szolgál, mely segíti a beteg státuszát meghatározni és prognosztikai jelentőséggel is bír (Schreier és mtsai., 2018; Wickström és mtsai., 2011). Az APN eltérően glikolizált isoformáihoz különböző antitestek különböző specificitással kötődnek. Ezek a glikolizációk nem befolyásolják az APN enzimatisz aktivitását, azonban az antitestek általi felismerést erősen befolyásolják (Schreiber és mtsai., 2018; O'connel és mtsai., 1991; Norén és mtsai., 1997). A WM15, BF10 és 3D8 monoklonális antitestek szinte majdnem minden tumortípus felismerésére alkalmasak (Schreiber és mtsai., 2018; Di Matteo és mtsai., 2011).

A nem peptid alapú APN ligandok csoportjába az APN inhibitorok tartoznak. Az egyik legjobban ismert molekula a bestatin, mely a *Streptomyces Olivoreticuli*-ből izolált, reverzibilis kompetitív inhibitor (Schreiber és mtsai., 2018; Umezawa és mtsai., 1976). A Japánban kereskedelmi forgalomban kapható bestatin hatóanyagú Ubenimex® APN inhibitort akut leukémiák kezelésére alkalmazzák (Schreiber és mtsai., 2018; Ota és mtsai., 1992; Guo és mtsai., 2017). A közelmúltban Chen és munkatársai (2015) zöld fluoreszcensen jelölt bestatint állítottak elő és alkalmaztak ovarium carcinomák fluoreszcens képalkotására.

Sajnálatos módon a bestatin alacsony specificitással bír, hiszen az APN/CD13-on kívül még 12 különböző aminopeptidázhoz is képes kötődni (Schreiber és mtsai., 2018; Scornik és mtsai., 2001). Az elmúlt években számos APN inhibitor szintéziséről születtek publikációk (Schreiber és mtsai., 2018; Bauvois és mtsai., 2006; Xu és mtsai., 2005; Zhang és mtsai., 2008). Jelenleg ezek mindegyike potenciális ligandjai a fluoreszcens molekuláris képalkotásnak (Schreiber és mtsai., 2018).

A peptid alapú APN ligandok legismertebb tagja az NGR (aszparagin-glicin-arginin) peptid. Pasqualini és munkatársai 1995-ben ismerték fel fág-display technikával, mint lehetséges APN ligand. 1998-ban humán emlő carcinomával transzplantált nude egérbe injektáltak fág könyvtárat (Schreiber és mtsai., 2018; Arap és mtsai., 1998). A lineáris és ciklikus NGR (cCNGRC) peptidek képalkotási tulajdonságait összehasonlítva arra a következtetésre jutottak, hogy a ciklikus változat jóval stabilabb és specifikusabb tumorkötési képességgel rendelkezik, mint a lineáris változat. Ugyanakkor vannak kivételes esetek (például tüdő carcinoma), amikor a lineáris változat bizonyult jobbnak (Schreiber és mtsai., 2018; Zhang és mtsai., 2014). Ductalis pancreas adenocarcinomával és hepatocelluláris carcinomával transzplantált xenograft állatmodelleken a ciklikus NGR-t (cCNGRC) fluoreszcens és PET képalkotásra is felhasználták (Schreiber és mtsai., 2018; Tang és mtsai., 2017; Gao és mtsai., 2017). PET képalkotás céljából a  $^{68}\text{Ga}$ -al való jelöléshez a ciklikus NGR-t három különböző (NODAGA, DOTAGA és HBED) kelátorral is konjugálták már, ahol a DOTAGA és HBED kelátorokkal való konjugálás magasabb target specificitást mutatott a háttérhez viszonyítva (Schreiber és mtsai., 2018; Satpati és mtsai., 2018). A ciklikus NGR azonban nem csak a diagnosztikus felhasználási lehetőségeket rejti. A cCNGRC-t kemoterápiás szerrel (pl.: Chlorambucil) konjugálva és HYNIC kelátorral funkcionálizálva  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -al jelölték, mely olyan radiofarmakont eredményezett, mely nem csak diagnosztikára, hanem terápiára is alkalmas volt. Az így létrejövő  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-CLB-cCNGRC radiotracer mindamelllett, hogy sikeresen gátolta a tumor növekedését, magas hidrofil tulajdonságának köszönhetően a nem target szövetekből gyorsan eliminálódott (Schreiber és mtsai., 2018; Vats és mtsai., 2018). A ciklikus NGR felhasználása nem csak az onkológia, hanem a kardiológia területén is megjelent. A radiojelzett cCNGRC a patkányok fibroblasztjait és gyulladásosejtjeit célozta, melyek a myocardialis ischaemia és ezt követő reperfüziós folyamatban vesznek részt (Schreiber és mtsai., 2018; Tillmans és mtsai., 2015; Shao és mtsai., 2014a). Az infarktusos myocardiumot dual-izotóp SPECT képalkotással is láthatóvá tették,  $^{111}\text{In}$ -DTPA-cCNGRC és  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi felhasználásával. A cCNGRC-rel való *in vivo* képalkotás két akadályba is

ütközik: az egyik, hogy a ciklikus szerkezeten belül a diszulfid hidak biodegradáción mennek keresztül, a második pedig az arginin spontán deamidációja. A diszulfid hidak biodegradációjának megoldására két, diszulfid hidakkal nem rendelkező molekula is született, az első az cKNGRE, a második pedig a coNGR volt (Schreiber és mtsai., 2018; Hendrikx és mtsai., 2017). A cCNGRC molekulához képest mindkét NGR származék stabilabb a vérben és specifikus kötődést mutattak az APN/CD13 overexpresszált területeken. A coNGR magas tracer felvételt mutatott a myocardialis infarktusos területen (Hendrikx és mtsai., 2017). A második problémát az arginin spontán deamidációja okozza. A cKNGRE-hez aminos (NH<sub>2</sub>) csoport konjugálásával stabilabbá válik a molekula a deamidációval szemben. Microarray technikával még egy ígéretes APN/CD13-at célzó lineáris peptidszekvenciát (YEVGHRC) sikerült azonosítani, melyet liposzómákba csomagolva hepatocelluláris carcinomával transzplantált egereken fluoreszcens képalkotásra és terápiára használtak (Schreiber és mtsai., 2018; Jia és mtsai., 2017).

Korábbi munkánkban <sup>68</sup>Ga-al jelzett, NOTA kelátorral konjugált cKNGRE-NH<sub>2</sub> származék (<sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR)) *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatát végeztük egészséges és vese tumoros patkányokon (Máté és mtsai., 2015). Az újonnan előállított APN specifikus radiotracer az α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> integrin receptorra specifikus <sup>68</sup>Ga-NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel hasonlítottuk össze. Egészséges, kontroll állatokon való vizsgálat során nyilvánvalóvá vált az új tracer urogenitális rendszeren keresztüli ürülése, melyet hidofil tulajdonságának köszönhetünk. Szignifikánsan alacsony tracer felvételt tapasztaltunk a nem tumoros szervekben, különösen a hasi régióban, a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-hez képest, ami alacsony háttér és magas tumor-izom arányt eredményezett, ezzel javítva a képalkotás minőségét. Vizsgáltuk a tracerek eloszlását tumoros, Ne/De (patkány eredetű vese carcinoma) sejtekkel subcutan (bőr alá) vagy vesetok alá transzplantált (mely metasztázist is képezett) kísérleti állatokban. Magasabb tracer felvételt tapasztaltunk a primer tumoros (mind a subcutan, mind pedig a vesetok alá ültetett) és a metasztatikus területeken a <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) esetében, mint a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel. Az alkalmazott <sup>68</sup>Ga izotóp közel ideális fizikai tulajdonságokkal rendelkezik, hiszen 89%-a β<sup>+</sup>sugárzó, felezési ideje megközelítőleg 68 perc, β<sup>+</sup> energiája pedig 740 keV. <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generátorból való kinyerése sokkal költséghatékonyabb, mint a ciklotronnal való előállítása.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 Felhasznált vegyszerek és oldatok

##### Radiotracerek előállításához használt vegyszerek:

- NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> (ABX GmbH, Radeberg, Németország)
- p-SCN-Bn-NOTA (Macrocyclics, An Orano Med Company, Texas, Amerikai Egyesült Államok)
- NODAGA-NHS-észter (CheMatech, Dijon, Franciaország)
- p-SCN-Bn-NODAGA (CheMatech, Dijon, Franciaország)
- ultra tiszta HCl, 30%-os (Merck KGaA, Darmstadt, Németország)
- ultra tiszta víz (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
- ultra tiszta NaOAc (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
- OASIS® HLB (30mg) Light oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok)
- Dimetil-formamid (DMF) (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország)
- Dimetil-szulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)
- Acetonitril (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország)
- ESI-MS MS (Shimadzu LCMS IT-TOF Mass Spectrometer, Shimadzu Corp., Tokyo, Japán)
- KNAUER HPLC (KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Németország)
- <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-generátor Obninsk (Cyclotron Co., Obninsk, Oroszország)
- Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlop (Merck KGaA, Darmstadt, Németország)
- 1,4,7,10-Tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav [DOTA] (ChemaTech, Dijon, Franciaország)
- <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-generátor ITG (ITM Isotopen Technologien München AG, München, Németország)
- Luna C18 10 µm (250 x 10 mm) oszlop (Phenomenex Inc., Torrance, California, Amerikai Egyesült Államok)
- SepPak® C18 plus oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok)

- Minden más felhasznált reagens a Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok) termékei

Sejttenyésztéshez használt vegyszerek:

Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) termékei:

- DMEM (Gibco™ DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate),
- IMDM (Gibco™ IMDM, GlutaMAX™ Supplement)
- FBS (Gibco™ Fetal Bovine Serum, qualified, Brazília)
- Antibiotikum-antimikotikum oldat (Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X))
- MEM nem esszenciális aminosav oldat (Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X))
- MEM vitamin oldat (Gibco™ MEM Vitamin Solution (100X))

Állatok kezelésére használt vegyszerek:

- Actinonin (Item No. 16605, Cayman Chemical Company, VWR Kft., Debrecen, Magyarország)
- Bestatin (Item No. 70520, Cayman Chemical Company, VWR Kft., Debrecen, Magyarország)

Állatok altatásához használt altatószer: Forane® oldat inhalációs gőz képzéséhez; AbbVie Inc., Chicago, Amerikai Egyesült Államok

Western blot vizsgálatnál használt vegyszerek:

- TissueLyser II (QIAGEN) lízis puffer összetétele
- RIPA puffer összetétele: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium deoxikolát, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, proteáz inhibitor koktél
- egér anti patkány CD13 antitest (sc-136484, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Amerikai Egyesült Államok)
- egér-anti humán Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antitest (sc-7312, Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Amerikai Egyesült Államok)
- IgG-HRP-vel konjugált másodlagos antitest (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok)

Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz használt vegyszerek:

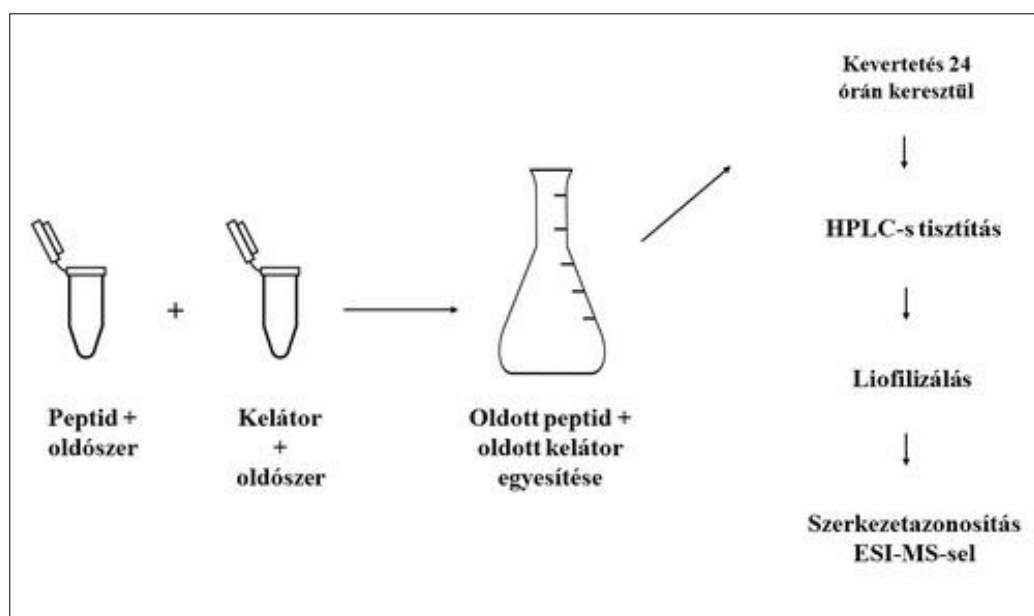
- egér-anti patkány CD13 primer antitest (sc-136484, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Amerikai Egyesült Államok)
- detektáló rendszer: Super Sensitive™ One Step Polymer HRP-IHC Detection System; BioGenex Fremont, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok

## 3.2 Radiofarmakonok előállítása

### 3.2.1 A NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>, NOTA-c(NGR), NODAGA-c(NGR), NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> prekursorok előállítása

A kereskedelmi forgalomban kapható NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> kelátorral konjugált peptid-származékot az ABX GmbH-től (Radeberg, Németország) szereztünk be, további tisztítás nélkül alkalmaztuk a <sup>68</sup>Ga-al történő jelölések során.

Az MTA-ELTE peptidkémiai munkacsoport tagjai, Prof. Dr. Mező Gábor és Dr. Enyedi Kata Nóra végezték a c[KNGRE]-NH<sub>2</sub>, c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> peptidok előállítását. A peptidok kelátorral való konjugálási sémáját a 2. ábra mutatja.



2. ábra: Peptidek kelátorral való konjugálási sémája

A c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> peptidet p-SCN-Bn-NOTA (Macrocyclics, An Orano Med Company, Texas, Amerikai Egyesült Államok) kelátorral konjugáltuk. 6,2 mg (12 μmol) c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> peptidet 0,9 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,1 mol/dm<sup>3</sup>) pufferben (pH=8,42) oldottunk. A NOTA kelátorból 5,4 mg-ot (9,6 μmol) 0,1 ml DMSO-ban oldottunk, majd a két oldott anyagot egy reakcióedényben egyesítettük. A reakciót 24 óráig szobahőmérsékleten kevertettük, ezután feldolgoztuk.

A c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> peptidet egy NODAGA-NHS-észter-rel (CheMatech, Dijon, Franciaország) is konjugáltuk. Ennek során 5 mg (8,6 μmol) c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> peptidet oldottunk 0,9 ml 0,1 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pufferben (pH=8,42), majd hozzáadtuk a 0,1 ml DMSO-ban oldott 7,5 mg (10,2 μmol) NODAGA-NHS-észtert. A reakciót szobahőmérsékleten 24 órán keresztül kevertettük, majd feldolgoztuk.

A NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> vegyület előállításánál 5 mg (8 μmol) c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> peptidet 0,9 ml 0,1 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pufferben (pH=8,42) oldottunk. Majd hozzáadtuk a peptidhez a 0,1 ml DMSO-ban feloldott 4,6 mg (8,8 μmol) p-SCN-Bn-NODAGA (CheMatech, Dijon, Franciaország) kelátort. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 24 órán keresztül.

A NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> vegyület esetében, 6 mg (9,3 μmol) c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> peptidet 0,9 ml 0,1 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pufferben (pH=8,42) feloldottunk majd hozzáadtuk a 0,1 ml DMSO-ban oldott 5,3 mg (10,2 μmol) kelátort (p-SCN-Bn-NODAGA) és 24 órán át szobahőmérsékleten kevertettük.

A négy különböző reakcióelegyet (1. táblázat) 24 órán át szobahőmérsékleten kevertettük. A reakciók végbemenetele után kapott NOTA-c(NGR), NODAGA-c(NGR), NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> prekursorokat szemi-preparatív HPLC segítségével tisztítottuk, majd az összegyűjtött frakciókat liofilizáltuk. Ezt követte a szerkezetazonosítás, melyhez ESI-MS-t (Shimadzu LCMS IT-TOF Mass Spectrometer, Shimadzu Corp., Tokyo, Japán) alkalmaztunk.

### 3.2.2 A DOTA-Nitroimidazol prekursor előállítása

A 2-nitro-imidazol (1,55 g, 13,7 mmol) és a dimetil-formamidban (20 ml) oldott terc-butil-2-bromoetilkarbamát (4,2 g, 18,8 mmol) keverékéhez nátrium jodidot (0,2 g, 1,36 mmol) és kalium karbonátot (3,79 g, 27,4 mmol) adtunk szobahőmérsékleten. 4 napig kevertettük, majd etil- acetáttal hígítottuk és vízzel mostuk. A szerves fázist (terc-N-butil 2-(2-nitroimidazolil) etilkarbamát) szeparáltuk és szárítva tároltuk.

Az 1 ml diklórmetánban oldott terc-N-butil 2-(2-nitroimidazolil) etilkarbamát-hoz (8,2 mg, 0,032 mmol) 1ml trifluor-ecetsavat adtunk szobahőmérsékleten. Egy éjszakán át történő kevertetés után az elegyet koncentráltuk. A kapott vegyület (0,032 mmol) és a dimetil-formamidban (0,5 ml) és vízben (0,5 ml) oldott DOTA kelátor (13 mg, 0,032 mmol) elegyéhez 100 μl-ben oldott DCC-t (6,6 mg, 0,032 mmol) adtunk szobahőmérsékleten. Egy éjszakán át

kevertettük, majd szűrtük és bepároltuk. A nyers terméket preparatív RP-HPLC-vel tisztítva megkaptuk a DOTA-Nitroimidazol prekuzort.

1.táblázat: Alkalmazott peptidok és kelátorok megnevezései és mennyiségei

Prekuzor neve	Peptid-származék neve és mennyisége	Peptid-származék oldására használt oldószer és mennyisége	Kelátor típusa és mennyisége	Kelátor oldására használt oldószer és mennyisége
<b>NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub></b> A prekuzor kereskedelmi forgalomban kapható				
<b>NOTA-c(NGR)</b>	c[KNGRE]-NH <sub>2</sub> (6,2 mg; 12 μmol)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,9 ml; 0,1 mol/dm <sup>3</sup> ; pH=8,42)	p-SCN-Bn-NOTA (5,4 mg; 9,6 μmol)	DMSO (0,1 ml)
<b>NODAGA-c(NGR)</b>	c[KNGRE]-NH <sub>2</sub> (5 mg; 8,6 μmol)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,9 ml; 0,1 mol/dm <sup>3</sup> ; pH:8,42)	NODAGA-NHS-észter (7,5 mg; 10,2 μmol)	DMSO (0,1 ml)
<b>NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub></b>	c[CH <sub>2</sub> -CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH <sub>2</sub> (5 mg; 8 μmol)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,9 ml; 0,1 mol/dm <sup>3</sup> ; pH:8,42)	p-SCN-Bn-NODAGA (4,6 mg; 8,8 μmol)	DMSO (0,1 ml)
<b>NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub></b>	[CH <sub>2</sub> -CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH <sub>2</sub> (6 mg; 9,3 μmol)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,9 ml; 0,1 mol/dm <sup>3</sup> ; pH:8,42)	p-SCN-Bn-NODAGA (5,3 mg; 10,2 μmol)	DMSO (0,1 ml)

### 3.2.3 A prekuzorok tisztítása

A kelátorral konjugált peptid-származékok tisztítását KNAUER HPLC rendszeren szemi-preparatív körülmények között végeztük Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlop (150 x 10 mm; szemcseméret: 10 μm) felhasználásával, 4 ml/perc áramlási sebességgel. Egy rövid izokratikus szakasz után (4 perc) grádiens elúciót alkalmaztunk (4 perc 5% „B”; 25 perc 65% „B”). Az „A” eluens összetétele: víz, 0,1% trifluor-ecetsav (TFA), a „B” eluens 0,1% TFA MeCN-víz 95:5 (v/v) arányú elegye, a detektálás UV detektorral 220 nm-en történt.

A DOTA-Nitroimidazol tisztítását szemipreparatív RP-HPLC-n végeztük Luna C18 10 μm (250 x 10 mm) oszlopon, 5 ml/perc áramlási sebességgel. Az „A” eluens 1% HCOOH,

„B” eluens: acetonitril volt. Grádiens profil: 0 perc 100% „A”, 2 perc 100% „A”, 32 perc 100% „B”, 40 perc 100% „B” 40,1 perc: 100% „A”.

### 3.2.4 A prekursorok radiojelölése $^{68}\text{Ga}$ -al

A NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>, NOTA-c(NGR), NODAGA-c(NGR), NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és a NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> vegyületek radiojelölése  $^{68}\text{Ga}$ -al Máté és munkatársai (2015) módszere alapján történt. A radiojelölések során Obninsk típusú  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátorokat használtunk. A generátor eluálása 5 ml HCl-al (0,1 mol/dm<sup>3</sup>) történt, frakcionált elúciót alkalmaztunk, amely során az aktivitás koncentrációra legtöményebb részét gyűjtöttük az eluátumnak. A 0,8-2,0 ml közötti frakciót használtuk fel a továbbiakban. Az Eppendorf tesztesőbe gyűjtött 1,2 ml  $^{68}\text{GaCl}_3$  oldatból 1 ml-t mértünk át egy tiszta Eppendorf csőbe pufferelés (NaOAc-tal [1 mol/dm<sup>3</sup>, 160 µl]) céljából. A jelölések 4,0-4,1 pH-án zajlottak. Ezután a peptid-prekursorokat (NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>, NOTA-c(NGR), NODAGA-c(NGR), NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>, NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>) tartalmazó törzsoldatból (3 mmol/dm<sup>3</sup>) 5 µl-t adtunk a reakcióedénybe, majd 95°C-on, 5 percre, keverés nélkül inkubáltuk őket. Az 5 perces, optimalizált reakcióidő letelte után a tisztítási-formulázási lépés következett. A reakcióelegyet egy OASIS® HLB (30 mg) Light oszlopra vittük fel (az oszlopot a mérések előtt aktiváltuk 5 ml 96%-os EtOH-al, majd 10 ml vízzel mostuk), majd 2 ml vízzel mostuk az oszlopot. A  $^{68}\text{Ga}$ -al radiojelölt vegyületeket ( $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>) 0,2 ml izotóniás sóoldat/96% EtOH 2:1 arányú oldatának segítségével nyertük vissza az oszlopról. Utolsó lépésként az elkészült oldatokat sterilre szűrtük.

A DOTA-Nitroimidazol radiojelölése során az ITG  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátort 0,1 M HCl-al eluáltuk, majd Eppard és munkatársai (2014) által leírt protokoll szerint jártunk el. Röviden, a  $^{68}\text{Ga}$ -ot egy kation cserélő gyantán (Strata SCX) megkötöttük és mostuk 1ml etanol és víz 8:2 arányú elegyében oldott 0,15 M HCl-al. A tisztított  $^{68}\text{Ga}$ -ot 9:1 arányú etanol és víz elegyében (3x100 µl) oldott 0,9 M HCl-al eluáltuk. 100 µl-t átpipettáztunk egy Eppendorf csőbe, majd 60 µl NaOAc puffert (3M, 4 pH), 40 µl 5%-os NaOH-t és 40 µl DOTA-NI vizes oldatát (1 mg/ml) adtunk hozzá. A jelölési reakció 95°C-on 15 perc alatt ment végbe. A reakcióidő eltelté után a reakcióelegyet 1 ml vízzel hígítottuk és 5 ml etanollal és 10 ml vízzel prekondicionált SPE oszlopra (SepPak® C18 plus) vittük fel. Az oszlopot 1 ml vízzel

tisztítottuk, majd a jelölt vegyületet 1:1 arányú etanol és víz elegyével eluáltuk. Az eluátumot koncentráltuk és 100 µl fiziológias sóoldatban oldottuk.

### 3.2.5 A radiojelölt vegyületek minőségellenőrzése

A radiojelölt vegyületek ( $^{68}\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$ ,  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ ,  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c[CH}_2\text{-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH}_2$  és  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c[CH}_2\text{-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH}_2$ ) minőségellenőrzését a fentiekben említett HPLC rendszerrel és eluensekkel végeztük. Az alkalmazott oszlop azonban eltért a konjugátum tisztításnál felhasznált oszloptól: Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopot (250 x 4,6 mm; szemcseméret 10 µm) használtunk fel, 1,2 ml/perc áramlási sebesség mellett, melynek gradiens profilja: 0 perc 0%, 3 perc 0% „B”; 14 perc 40% „B” volt. A radiojelölések minőségellenőrzése során radiodetektort és UV detektort (254 nm) is alkalmaztunk.

A  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazol}$  minőségellenőrzését radio-HPLC-vel határoztuk meg Luna C18 10 µm (250 x 10 mm) oszlopon. „A” eluens: oxálsav (0,01 M, pH 3), „B” eluens: acetonitril, áramlási sebesség: 1 ml/perc. A gradiens profil: 0 perc 100% „A”, 1 perc 100% „A”, 10 perc 100% „B”, 10,1 perc 100% „A”.

### 3.2.6 Megoszlási hányados (LogP) és szérumstabilitás meghatározása

A megoszlási hányadost (LogP) oktanol- PBS 1:1 arányú elegyében határoztuk meg kirázásos módszerrel. Ehhez 10 µl vizes fázisban lévő radioaktív vegyületet adtunk 0,5 ml oktanol-t tartalmazó kémcsőbe, majd hozzáadtuk a 0,5 ml PBS-t. Az egyensúlyi állapot eléréséhez erősen összeráztuk az elegyet, majd 5 percig 20.000 rpm-en centrifugáltuk a mintát. Mindkét fázisból (vizes és oktanolos) három párhuzamos mérést végeztünk. A centrifugacsövek egyenként 100 µl mintát tartalmaztak, melyek radioaktivitását kalibrált gamma számlálón (HEWLETT PACKARD Cobra II Autogama Gamma Counter) mértük meg. A logP érték az alábbi képlet alapján került meghatározásra:

$$\text{LogP} = \text{Log}_{10} * \left[ \frac{\text{beütésszám az oktanolos fázisban}}{\text{beütésszám a PBS fázisban}} \right].$$

*1. képlet: LogP meghatározási képlete*

A  $^{68}\text{Ga}$ - radiojelölt vegyületek kémiai stabilitás vizsgálatát PBS-ben végeztük  $95^\circ\text{C}$ -on. Ehhez  $50\ \mu\text{l}$  radioaktív oldatot hígítottunk  $0,5\ \text{ml}$  PBS-sel, majd  $95^\circ\text{C}$ -ra hevítettük. Különböző időpontokban (0, 30, 60, 90 és 120 perc)  $25\ \mu\text{l}$  mintát szűrtünk fel reverz fázisú HPLC-re. A radiokémiai tisztaság meghatározásához az analitikai programmal megegyezően, gradiens elúciót használtunk.

Az enzimikus stabilitás meghatározásához egy törzsoldatot készítettünk  $100\ \mu\text{l}$  radioaktív oldatból  $1\ \text{ml}$  PBS hozzáadásával.  $450\ \mu\text{l}$  patkány szérumhoz  $50\ \mu\text{l}$ -t pipettáztunk a törzsoldatból, majd  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk az elegyet. Eltérő időpontokban (0, 30, 60, 90 és 120 perc) a törzsoldatból  $50\ \mu\text{l}$  mintát pipettáztunk Eppendorf csőbe, amihez ugyanilyen mennyiségű hideg abszolút EtOH-t adtunk. Az üledékek eltávolítása céljából 5 percre  $20.000\ \text{rpm}$ -en centrifugáltuk a mintánkat, majd ezt követően távolítottuk el a felülúszót. A felülúszót az analitikai HPLC eluensével kihígítottuk majd a standard protokolnak megfelelően végeztük el az analitikai vizsgálatot. A metabolikus stabilitást a radiokémiai tisztaság felhasználásával határoztuk meg.

### 3.3 Sejtenyésztés

#### 3.3.1 Ne/De sejtek tenyésztése

A fagyasztásból felvett Ne/De sejteket (patkány eredetű, kémiai indukált mesoblastos nephroma) 12 ml DMEM (Gibco™ DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) sejtenyésztő folyadékban és T75-ös sejtenyésztő flaskában (TC Flask T75; SARSTEDT AG & Co. KG., Németország) tenyésztettük. A sejtenyésztő médiumot 10% FBS (Gibco™ Fetal Bovine Serum, qualified, Brazil; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal (Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X); Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) egészítettük ki. A sejteket 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában és 95% páratartalom mellett tenyésztettük sejtenyésztő inkubátorban (ESCO CCL-170B-8) és 2 naponta passzáltuk. Tumor indukcióra a sejtek 5. passzálása után került sor, ekkor a sejteket a sejtenyésztő flaskából eltávolítottuk, megszámláltuk, centrifugáltuk és a kívánt térfogatban vettük fel. A sejtek életképességét tripánkék festéssel vizsgáltuk mikroszkóp (Olympus CH-2) alatt.

#### 3.3.2 He/De sejtek tenyésztése

A fagyasztásból felvett He/De sejteket (patkány eredetű, kémiai indukált hepatocellularis carcinoma) 12 ml IMDM (Gibco™ IMDM, GlutaMAX™ Supplement; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) sejtenyésztő folyadékban és T75-ös sejtenyésztő flaskában tenyésztettük. A sejtenyésztő médiumot 10% FBS és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal egészítettük ki. A sejteket 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában és 95% páratartalom mellett tenyésztettük sejtenyésztő inkubátorban és 2 naponta passzáltuk. Tumor indukcióra a sejtek 5. passzálása után került sor, ekkor a sejteket a sejtenyésztő flaskából eltávolítottuk, megszámláltuk, centrifugáltuk és a kívánt térfogatban vettük fel. A sejtek életképességét tripánkék festéssel vizsgáltuk mikroszkóp alatt.

### 3.3.3 HT1080 sejtek tenyésztése

A HT1080 sejteket (humán eredetű fibrosarcoma) az ATCC-től szereztük be (Virginia, Amerikai Egyesült Államok), majd a fagyasztásból felvéve 12 ml GlutaMAX™ DMEM (Gibco™ DMEM, GlutaMAX™ Supplement; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) sejttenyésztő folyadékban és T75-ös sejttenyésztő flaskában tenyésztettük. A sejttenyésztő médiumot 10% FBS és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal egészítettük ki. A sejteket 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában és 95% páratartalom mellett tenyésztettük sejttenyésztő inkubátorban és 2-3 naponta passzáltuk. Tumor indukcióra a sejtek 5. passzálása után került sor, ekkor a sejteket a sejttenyésztő flaskából eltávolítottuk, megszámloltuk, centrifugáltuk és a kívánt térfogatban vettük fel. A sejtek életképességét tripánkéék festéssel vizsgáltuk mikroszkóp alatt.

### 3.3.4 B16F10 sejtek tenyésztése

A B16F10 sejteket (egér eredetű melanotikus melanoma) az ATCC-től szereztük be (Virginia, Amerikai Egyesült Államok), majd a fagyasztásból felvéve 12 ml GlutaMAX™ DMEM (Gibco™ DMEM, GlutaMAX™ Supplement; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) sejttenyésztő folyadékban és T75-ös sejttenyésztő flaskában tenyésztettük. A sejttenyésztő médiumot 10% FBS és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal, valamint 1% MEM nem esszenciális aminosav oldattal (Gibco™) és 1% MEM vitamin oldattal (Gibco™) egészítettük ki. A sejteket 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában és 95% páratartalom mellett tenyésztettük sejttenyésztő inkubátorban és 2-3 naponta passzáltuk. Tumor indukcióra a sejtek 5. passzálása után került sor, ekkor a sejteket a sejttenyésztő flaskából eltávolítottuk, megszámloltuk, centrifugáltuk és a kívánt térfogatban vettük fel. A sejtek életképességét tripánkéék festéssel vizsgáltuk mikroszkóp alatt.

### 3.4 Kísérleti állatok

A kísérleteink első (tumoros n=36; kontroll n=9) és második (tumoros n=64; kontroll n=12) részében felhasznált 16 hetes hím F-344 patkányokat (Charles River; Animalab Hungary Kft., Budapest, Magyarország) és kísérleteink harmadik részében felhasznált hím 10-12 hetes CB17 SCID (kezelt tumoros n=20; kezeletlen- kontroll n=10) és C57BL/6 (kezelt tumoros n=20; kezeletlen-kontroll n=10) egereket légkondicionált szobában  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten,  $50\pm 10\%$  páratartalom mellett és mesterséges 12 órás cirkadián megvilágítási körülmények között konvencionális állatházban tartottuk (Állatházi engedély száma: III/6-KÁT- 2015). Az F-344 patkányokat IVC-ZJ3 IVC rendszerben (Avidin Biotech Kft., Szeged, Magyarország), LTE E-004 nyárfa alommal (Abedd; Akronom Kft., Budapest, Magyarország) ellátott IVC ketrecekben, a C57BL/6 és CB17 SCID egereket Sealsafe® Blue line IVC rendszerben (Techniplast®, Akronom Kft., Budapest, Magyarország), sterilizált kukoricacsutka granulátum alommal (REHOFIX®, Akronom Kft, Budapest, Magyarország) tartottuk, sterilizált csapvízzel ad libitum itattuk és sterilizált szemi- szintetikus rágcsálótáppal (SDS-VRF1; Akronom Kft., Budapest, Magyarország) ad libitum etettük. A kísérleteket az Európai Unió és a Magyarországi törvényeknek megfelelően a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága regisztrálta (8/2016/DEMÁB).

### 3.5 Subcutan tumorok indukciója

A hím F-344 patkányokat, illetve a hím CB17 SCID vagy C57BL/6 egereket dedikált kisállat inhalációs altatógéppel (Tec3 Isoflurane Vaporizer; Akronom Kft., Budapest, Magyarország) elaltattuk (indukció: 3% Isoflurán (Forane®; AbbVie Inc., Chicago, Illinois, Amerikai Egyesült Államok), fenntartás: 1,5% Isoflurán + 0,4 l/perc  $\text{O}_2$  + 1,2 l/perc  $\text{N}_2\text{O}$ ). A kísérleti állatok bal válláról a szőrt leborotváltuk, majd fertőtlenítés után a patkányok bőre alá  $5 \times 10^6$  He/De vagy Ne/De sejtet (150  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatban), a CB17 SCID egerek bőre alá  $1,5 \times 10^6$  HT1080 sejtet (150  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatban), a C57BL/6 egerek bőre alá pedig  $3 \times 10^6$  B16F10 sejtet (150  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatban) injektáltunk (3. ábra).



3. ábra: Tumoros sejtszuszpenzió subcutan (bőr alá) injektálása.

### 3.6 Subcutan HT1080 és B16F10 tumoros egerek kezelése

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

### 3.7 Kísérleti állatok fájdalmának csillapítása

Amennyiben az állatokon rövid ideig tartó mérsékelt fájdalom jelentkezett, úgy a kísérlet ideje alatt orális fájdalomcsillapítást alkalmaztunk:

DROG	FAJ	DÓZIS	GYAKORISÁG
Ibuprofen	Patkány	15 mg/kg/nap- 2,5 ml Motrin 500 ml vízben oldva	ad libitum

A fájdalomcsillapítás hatékonyságát az állatok diszstresszének monitorozása mellett módosítottuk, amennyiben

- mozgásszegény viselkedés
- étvágytalanság, tömegvesztés
- szőrzet borzoltsága

- hát púpos tartása

jeleit tapasztaltuk, a lentebbi protokoll szerint megnöveltük a fájdalomcsillapító szer dózisát:

DROG	FAJ	DÓZIS	GYAKORISÁG
Ibuprofen	Patkány	30 mg/kg/nap- 5 ml Motrin 500 ml vízben oldva	ad libitum

### 3.8 *In vivo* PET és PET/MRI vizsgálatok

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

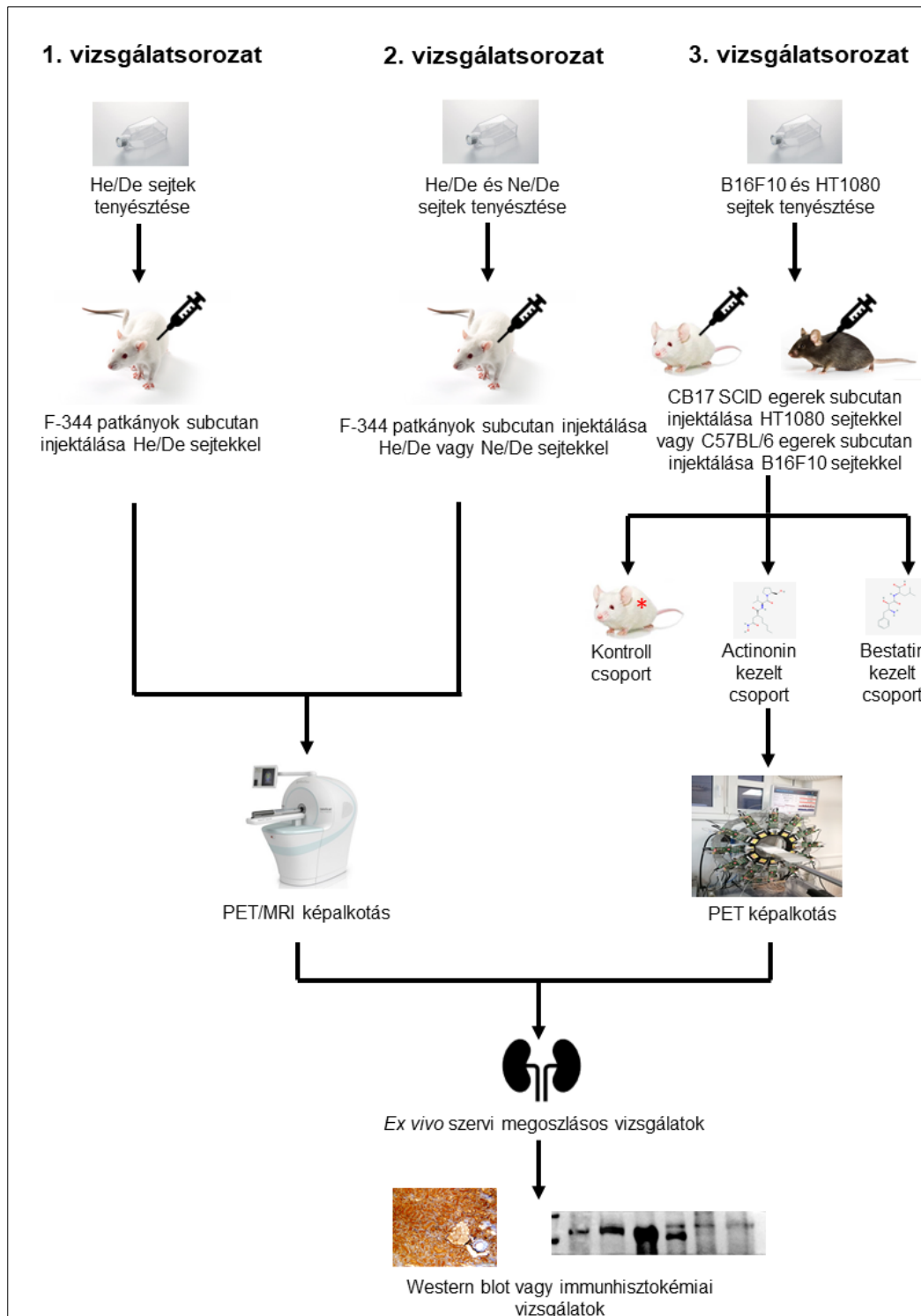
A radiokémiai munkacsoport által előállított két radiotracer elnevezése az *in vivo* vizsgálatokban c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>-ről c(NGR) (MG1)-re, a c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>-ről pedig c(NGR) (MG2)-re módosul, melyekben az MG rövidítés Prof. Dr. Mező Gábor iránti megbecsülésünkre utal. A kísérletek második részében hím F-344 kontroll (egészséges) (n=12) és subcutan He/De és Ne/De tumoros patkányokat (n=40) 11±1 nappal a tumoros sejtek injektálása után 150 µl fiziológiás sóoldatban  $12,3 \pm 1,2$  MBq  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) radiotracerrel injektáltuk 26 G-s tüvel (Chirana, Szlovákia) a farokvénájukon keresztül. Az állatokat a radiotracer injektálása és a vizsgálat alatt inhalációs módszerrel (indukció: 3% Isoflurán, fenntartás: 1,5% Isoflurán + 0,4 l/perc O<sub>2</sub> + 1,2 l/perc N<sub>2</sub>O), dedikált kisállat altatógéppel altattuk. A teljes test PET vizsgálatokat (10 perces statikus vizsgálatok) preklinikai nanoScan PET/MRI 1T (Mediso Kft.; Budapest, Magyarország) készüléssel végeztük 90 perccel a radiotracer injektálását követően. Az

állatok mozgásának megelőzése céljából és az állandó testhőmérséklet fenntartása miatt a patkányokat speciális patkányágyban vizsgáltuk (MultiCell Imaging Chamber; Mediso Kft., Budapest, Magyarország) és a FOV (Field Of View) középpontjába pozicionáltuk. A szövetek és szervek anatómiai lokalizációjának meghatározására T1 súlyozott MRI felvételeket készítettünk (GRE EXT multi-FOV; TR/TE 15/2 ms; FOV 40 mm; excitációk száma: 2).

A kisállat miniPET vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Képző Intézet Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszéken működő miniPET berendezésen végeztük el. A miniPET kamera 12 detektorában LYSO (Lutécium-yttrium-szilikátoxid) kristályok vannak. Minden egyes detektorban 35 x 35 darab LYSO kristály található, a tűkristályok mérete egyenként 1,27 x 1,27 x 12 mm<sup>3</sup>. A PET kamera axiális látótere 48 mm nagyságú, belső körgyűrűjének átmérője 211 mm, a központi felbontása pedig 1,4 mm. A kamera ágya szoftverek segítségével mozgatható (Lajtos és mtsai., 2013).

Kísérleteink harmadik részében a tumoros (subcutan HT1080 és B16F10) állatokat a tumor indukcióját követő 6. és 11. napon, Isoflurán inhalációs módszerrel, dedikált kisállat inhalációs altatógéppel elaltattuk. Ezt követően az állatok farokvénáján keresztül 26 G-s tűvel 150 µl térfogatban, Salsol-Etanol 2:1 arányú oldatban 5,5±0,2 MBq <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) radiotraceret injektáltunk. A 90 perc inkubálási idő letelte után 20 perces statikus PET felvételeket készítettünk a tumoros területről.

A vizsgálatsorozatok egyszerűsített folyamatait a 4. számú ábra tartalmazza.



4. ábra: A vizsgálatsorozatok folyamatábrája.

### 3.9 PET vizsgálatokból származó adatok feldolgozása

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

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

A képek elemzése során a tumorok radiotracer felvételének meghatározásához a SUV és T/M SUVmean értékek meghatározása alapvető fontosságú.

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

*2. képlet: Standardizált felvételi érték (SUV) képlete*

A SUV egy szemikvantitatív érték, melynek értéke 1 lenne, ha egyenletesen oszlana meg a szervezetben az adott radiofarmakon. A T/M (SUVmean) érték meghatározásánál a tumor SUVmean (VOI-n belüli átlagos SUV érték) értékét elosztjuk a háttérként használt izom SUVmean értékével. Így megtudjuk, hogy a tumor hányszor annyi radiofarmakont vesz fel, mint a háttérként használt izom. A T/M (SUVmean) érték kiszámítását Excel táblázat segítségével végeztük. A SUV érték kiszámításához szükséges VOI-k felrajzolása a miniPET vizsgálatoknál BrainCAD képelemző programmal, a PET/MRI vizsgálatoknál az InterView™ FUSION multi-modal visualization and evaluation software (Mediso Kft., Budapest, Magyarország) alkalmazásával történt. A tumor határok és a háttérként használt izom körberajolásával minden egyes szeleten megkaptuk a háromdimenziós VOI-kat. A VOI-k alapján a képelemző programok kiszámolták a minimum, maximum és átlagos SUV értékeket, a standard deviációt és a szeleteken berajzolt területekből származó térfogatot. Az adatok összerendezéséhez Microsoft Excel táblázatkezelő programot használtunk.

### 3.10 Blokkolási vizsgálatok

A blokkolási vizsgálatok során 200 µg jelöletlen, kelátorral konjugált peptidet (NOTA-c(NGR) (kísérletek első része) vagy c(NGR) molekulát (kísérletek második része) injektáltunk 100 µl fiziológiás sóoldatban a subcutan He/De (kísérletek első részében n=9, második részében n=12) és/vagy Ne/De (kísérletek második részében n=12) tumoros állatok laterális farokvénáján keresztül 5 perccel a radiojelölt molekula injektálása előtt. 90 perc inkubálási időt követően az állatokat elaltattuk és PET/MRI vizsgálatokat végeztünk a korábbiakban (3.7-es bekezdés) leírtaknak megfelelően.

### 3.11 *Ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatok

A kísérletek első részében a kontroll (egészséges) és subcutan He/De tumoros kísérleti állatokat a daganatok beültetése után 9±1 nappal (kis méretű tumor, n=3), 12±1 nappal (közepes méretű tumor, n=3) és 15±1 nappal (nagy méretű tumor, n=3), a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>, <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) és <sup>68</sup>Ga- DOTA-Nitroimidazol radiotraccerekkal végzett PET/MRI vizsgálatok után túlaltattuk. A kísérletek második szakaszában a <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) vagy <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) vagy <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1) vagy <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2)-vel végzett PET/MRI képalkotás után, a tumor indukálása után 11±1 nappal a He/De és Ne/De tumoros (n=64) és kontroll (n=12) állatokat túlaltattuk. A kísérletek harmadik etapjában a kontroll és kezelt HT1080 (n=30) és B16F10 (n=30) tumoros állatokat a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR)-rel végzett PET vizsgálatok után és a tumorindukciót követő 12±1 napon túlaltattuk. Ezt követően az állatok hasüregét, valamint a mellüregét megnyitottuk és a szívből vérmintát vettünk. Apró darabokat távolítottunk el a májból, lépéből, vesékből, gyomorból, vékony- és vastagbélből, izomból, tüdőből, szívből, zsírból és tumorból. A minták tömegét analitikai mérlegen (Ohaus Explorer; Spektrum 3D Kft., Debrecen, Magyarország) és radioaktivitását kalibrált gamma-számlálóval (HEWLETT PACKARD Cobra II Autogama Gamma Counter) – lemértük, és az értékeket ID%/g-ban fejeztük ki Microsoft Excel szoftver segítségével.

$$ID\%/g = \left( \frac{\text{radioaktivitás[MBq]}}{\text{szövet[g]}} * \left( \frac{1}{\text{teljes injektált dózis[MBq]}} \right) \right) * 100$$

3. képlet: ID%/g képlete

### 3.12 Western blot analízis

A fagyasztott szövetmintákat folyékony nitrogén alatt porlasztottuk dörzsmozsárban, a kapott port TissueLyser II (QIAGEN) lízis pufferben feloldottuk. Ezt követően a sejteket RIPA pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium deoxikolat, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, proteáz inhibitor koktél) lizáltuk. A szövet homogenizációját követően a mintáinkban fehérjét izoláltunk. A fehérje mintákat (10-40 µg) 10% SDS poliakrilamid gélen szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra elektrotranszferáltuk. Az 1 órán át TBST tartalmú 5% BSA-val való blokkolás után a membránokat primer antitesttel (hígítás: 1:1000; egér- anti patkány CD13 (sc-136484) és egér-anti humán Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (sc-7312) antitestek [Santa-Cruz Biotechnology Inc. Amerikai Egyesült Államok]) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Egyszeri TBST oldattal való mosás után, a membránokhoz IgG-HRP-vel konjugált másodlagos antitestet (Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok, hígítás: 1:2000) adtuk. A kötéseket felerősített kemolumineszcens reakcióval (SuperSignal West Pico Solutions, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Amerikai Egyesült Államok) tettük láthatóvá. Loading kontrollként  $\beta$ -actint használtunk.

### 3.13 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A tumoros állatok boncolását követően a tumor minták kiszáradását megelőzendő, fiziológiás sóoldattal átitatott gézlapokba csomagoltuk a mintákat. Ezt követően a tumor mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd 6 µm vastag metszeteket készítettünk kriosztáttal (SHANDON CRYOTOME®; Thermo Scientific, Egyesült Királyság). Az elkészült metszeteket 10%-os pufferezett neutrális formalinban fixáltuk. A fixáló kimosását követték az immunhisztokémiai reakciók, melynek első lépése során a metszeteket pH6-os citrát pufferben tártuk fel. Ezt követte az egér-anti patkány CD13 primer antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Amerikai Egyesült Államok) történő inkubálás 1:50 hígításban 35 percig. A detektáló rendszer (Super Sensitive™ One Step Polymer HRP-IHC Detection System; BioGenex Fremont, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) HRP polimer (másodlagos antitesthez konjugált tormaperoxidáz) és kromogénjeként használt DAB (3,3 Diaminobenzidin) alapú volt. Ennek során a tormaperoxidáz polimerrel 15 percig inkubáltuk a mintákat, majd PBS (Phosphate Buffered Saline) pufferrel mostuk. Az előhívás mikroszkópos (mikroszkóp: Olympus B72) kontroll mellett történt DAB kromogén

felhasználásával. Csapvizes mosással állítottuk le a reakciót, melyet a magfestés, víztelenítés és fedés követett. Pozitív kontrollként az állatokból kipreparált vese mintát használtuk fel, negatív kontrollként a primer antitest nélküli reakció eredménye szolgált. A metszetek kiértékelését 20-szoros nagyításban, Olympus DP72 kamerával ellátott Olympus B72 mikroszkóp alatt Twain Driver Ver 03.01 Image Analyzer szoftver segítségével végeztük.

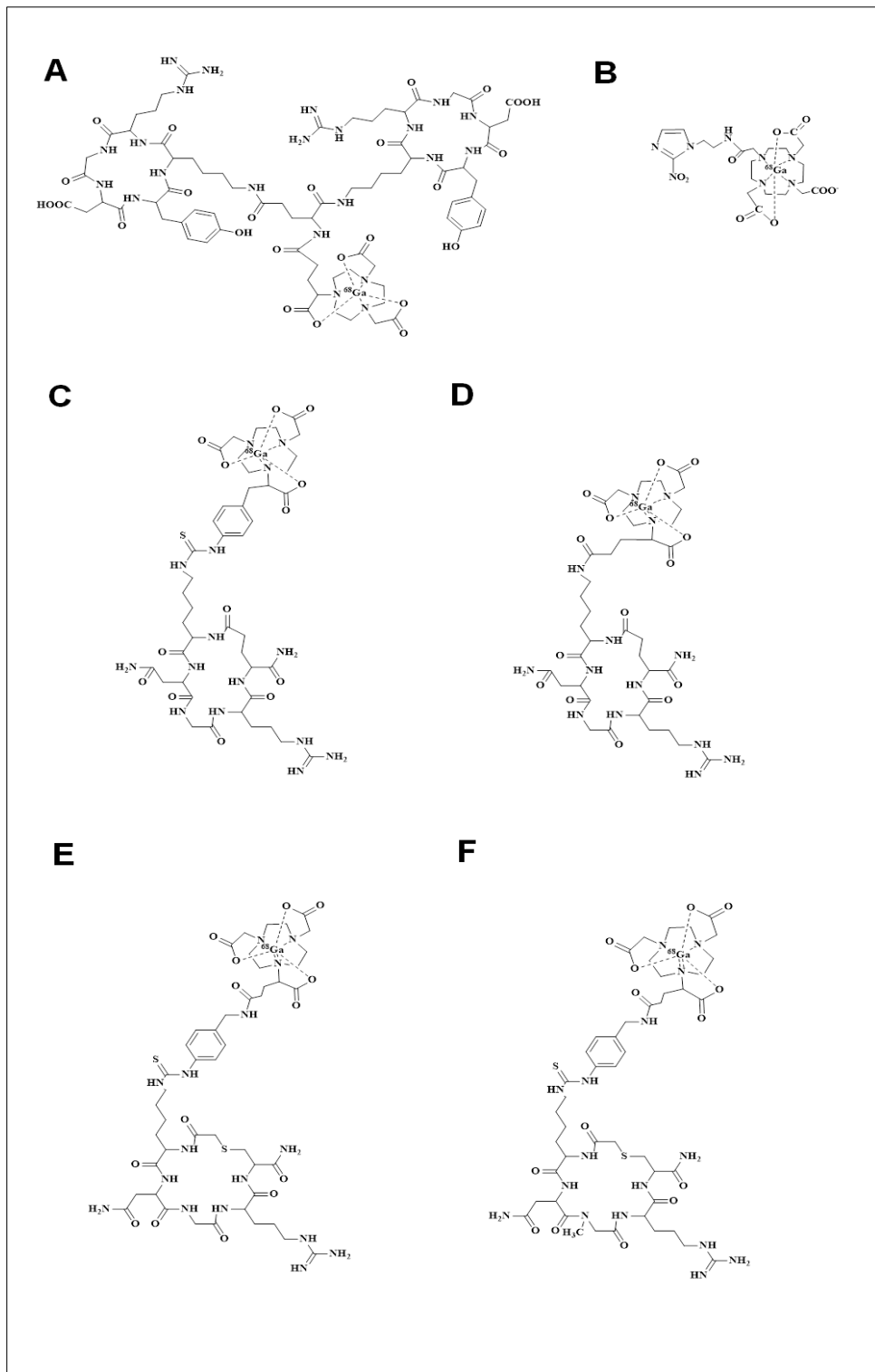
### 3.14 Statisztikai analízis

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

## 4. Eredmények

### 4.1 Radiokémiai jelölések eredményei

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



5. ábra: Az előállított radiofarmakonok szerkezeti képletei.  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> (A),  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol (B),  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) (C),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (D),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> (E),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> (F)

#### 4.2 Az alkalmazott radiotracerek megoszlási hányadosai (LogP) és szérumbizonyítási eredményei

A  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> LogP értéke  $-4,05\pm 0,12$  (Pohle és mtsai., 2012), a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) LogP értéke  $-2,77\pm 0,12$  (Máté és mtsai., 2015), a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) megoszlási hányadosa  $-4,07\pm 0,13$  volt. A  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> radiotracer megoszlási hányadosa (LogP érték)  $-2,33\pm 0,14$ , míg a N-metil-glicin tartalmú analógjának ( $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>) megoszlási hányadosa  $-2,29\pm 0,13$  volt. A  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-nitroimidazol LogP értéke  $-3,50\pm 0,18$  volt. A kapott LogP értékek a tracerek hidrophil jellegére utalnak. A vizsgált radiotracerek megoszlási hányadosait a 2. számú táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Radiotracerek LogP értékei

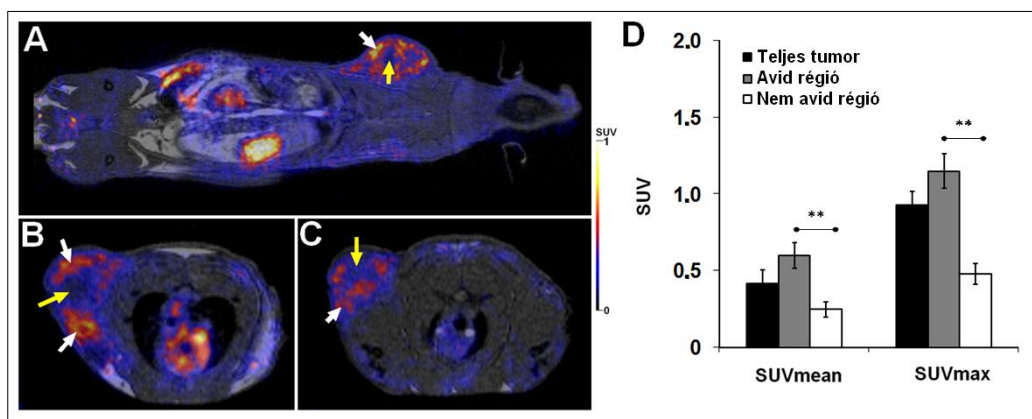
Radiotracer megnevezése	LogP érték
$^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)] <sub>2</sub>	$-4,05\pm 0,12$
$^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)	$-2,77\pm 0,12$
$^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR)	$-4,07\pm 0,13$
$^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH <sub>2</sub> -CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH <sub>2</sub>	$-2,33\pm 0,14$
$^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH <sub>2</sub> -CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH <sub>2</sub>	$-2,29\pm 0,13$
$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol	$-3,50\pm 0,18$

Mindegyik analóg emelt hőmérsékleten (95°C), 7,4-es pH-n PBS-ben stabilnak (<90%) bizonyult 120 perc letelte után is. Az eredeti szerkezet felbomlása patkány szérumban volt a legkifejezettebb a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> esetében, ahol a különböző időpontokban mért radiokémiai tisztaság 100%, 86,75%, 73,4%, 61,11%, 55,42% és 100%, 92,45%, 84,47%, 78,32%, és 75,42% volt. Ezek az eredmények az említett két radiotracer mérsékelt vérbeli stabilitását mutatják, de egyértelműen jelzi az Asn deamidációtól védő N-metilálás pozitív hatását.

### 4.3 Subcutan He/De tumoros patkányok angiogenezisének és hypoxiájának *in vivo* és *ex vivo* vizsgálata

#### 4.3.1 $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel végzett *in vivo* vizsgálati eredmények

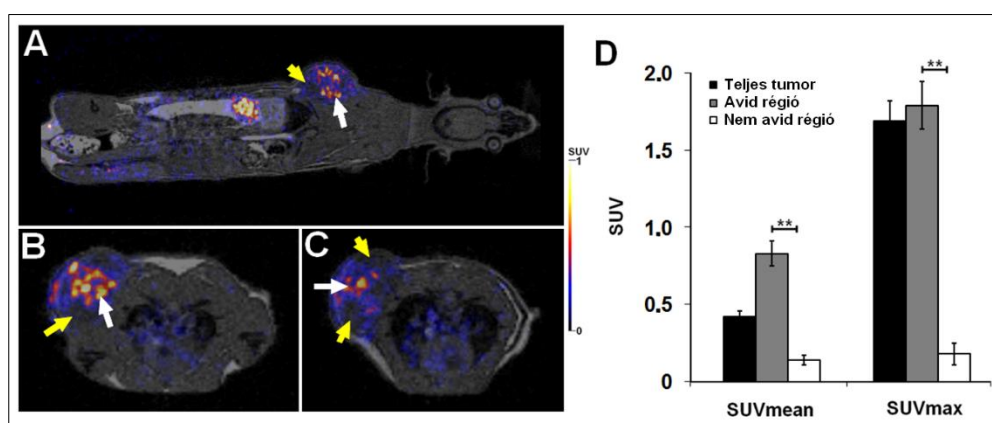
A He/De tumorral subcutan transzplantált F-344 patkányokban a He/De tumor  $\alpha_v\beta_3$  receptor expresszió vizsgálatához  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-t injektáltunk az állatok farokvénájába, majd 90 perc inkubálási idő után PET/MRI képalkotást végeztünk. A subcutan He/De tumorok azonosíthatóak voltak a bomlás korigált PET képeken, ahol a SUVmean és SUVmax értékek  $0,42\pm 0,09$ , valamint  $0,93\pm 0,09$  voltak (6. ábra). Továbbá, a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel heterogén tumorszerkezetet detektálhattunk. A kvantitatív SUV analízis során meghatároztuk az avid területek SUVmean és SUVmax értékeit, melyek  $0,60\pm 0,08$  és  $1,15\pm 0,11$  voltak. A SUV értékek megközelítőleg kétszer magasabbak voltak az avid régiókban, mint a nem avid régiókban, ahol a SUVmean érték  $0,25\pm 0,05$ , a SUVmax érték pedig  $0,48\pm 0,07$  volt. Az avid és nem avid területek közötti különbséget szignifikánsnak ( $p\leq 0,01$ ) találtuk (6. ábra/D).



6. ábra:  $\alpha_v\beta_3$  expresszió vizsgálata subcutan transzplantált He/De tumoros F-344 patkányokban  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> felhasználásával. Subcutan He/De tumorokról készült reprezentatív coronális (A) és axiális (B, C) PET/MRI felvételek 13 nappal a tumor indukciót és 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> injektálását követően. Fehér nyilak:  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor pozitív (avid) régiók, sárga nyilak: nem avid régiók. D: heterogén He/De tumorok (n=10) kvantitatív PET/MRI vizsgálata. Szignifikancia szint:  $p\leq 0,01$ (\*\*).

#### 4.3.2 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel végzett *in vivo* vizsgálati eredmények

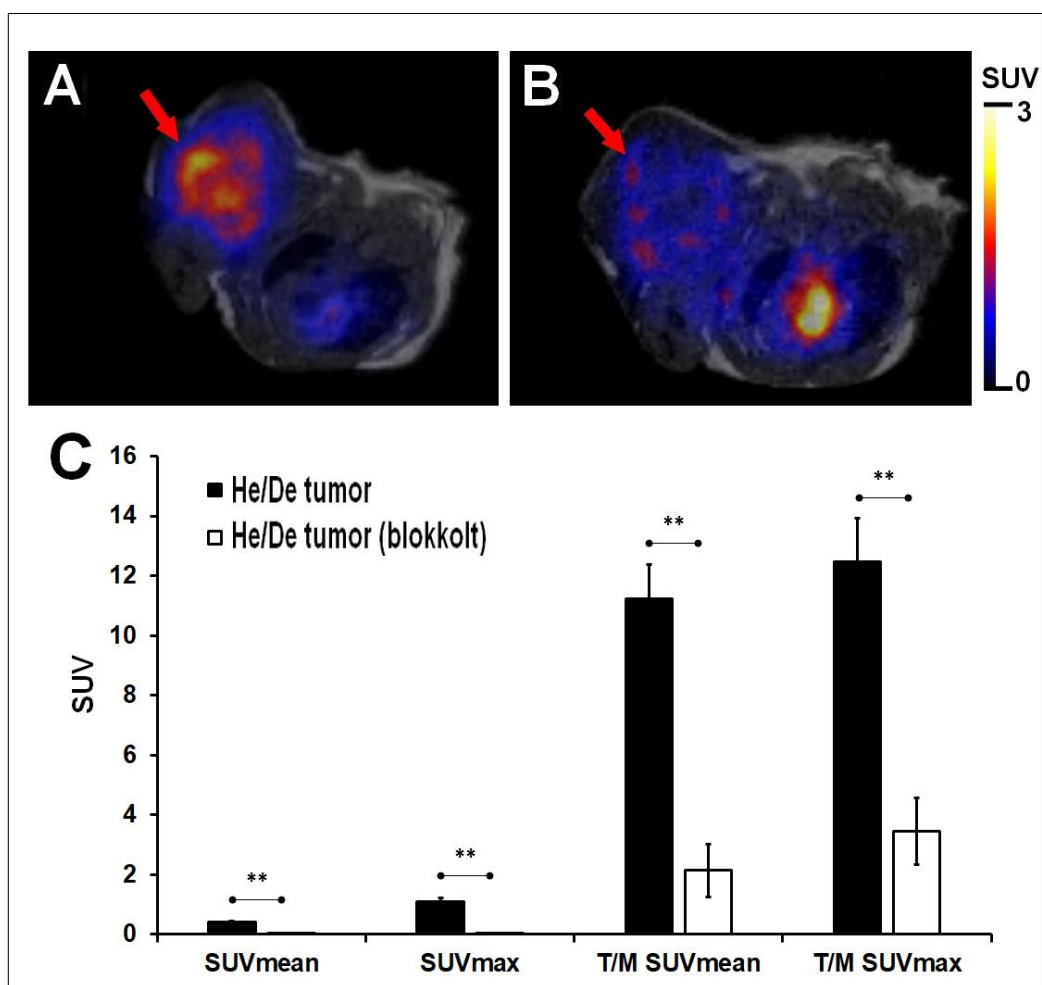
90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) intravénás injekciója után PET/MR képalkotást végeztünk. A PET képek elemzése során azt találtuk, hogy a teljes tumorban a SUVmean és SUVmax értékek  $0,42\pm 0,04$  és  $1,69\pm 0,13$  voltak (7. ábra/D). A bomláskorrigált PET képek kvantitatív és kvalitatív analízise során heterogén radiotracer felvételt tapasztaltunk a subcutan transzplantált He/De tumorban. Jelentős különbségeket tapasztaltunk a tumorok radiotracer halmozásában a kvalitatív vizsgálatok során (7. ábra), ezt a heterogenitást a kvantitatív vizsgálatokból származó SUV értékek is alátámasztották. Ennek fényében CD13 avid (+, radiotraceret halmozó) és nem avid (-, radiotraceret nem halmozó) területeket tudtunk vizuálisan megkülönböztetni, ahol a SUVmean és SUVmax értékek  $0,14\pm 0,04$  és  $0,18\pm 0,07$  volt a nem avid (CD13 negatív) területeken, míg az avid (CD13 pozitív) területen ezek az értékek  $0,83\pm 0,08$  és  $1,79\pm 0,15$  voltak. Az avid és nem avid területek SUV értékei közötti különbségek szignifikánsak ( $p\leq 0,01$ ) voltak.



7. ábra: APN/CD13 receptort expresszáló subcutan He/De tumorok *in vivo* PET/MRI képalkotása. Reprezentatív coronális (A) és axiális (B, C) PET/MRI felvételek 13 nappal a He/De tumor transzplantációját és 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) injekciója után. Fehér nyilak: CD13 pozitív, avid régiók, sárga nyilak: nem avid régiók. D: a heterogén He/De tumorok ( $n=10$ ) kvalitatív képanalízise. Szignifikancia szint:  $p\leq 0,01$  (\*\*).

A  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) APN/CD13 specificitását blokkolási vizsgálatokkal is alátámasztottuk *in vivo* PET képalkotás segítségével. A blokkolási vizsgálatok során  $200\ \mu\text{g}$  (a jelölt peptid kb.  $100\times$ -a) jelöletlen, kelátorral konjugált NGR származékot (NOTA-c(NGR)) injektáltunk a kísérleti állatokba a radiojelölt,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) injekciója előtt. A  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) halmozása a He/De tumorokban csökkent a korábban injektált

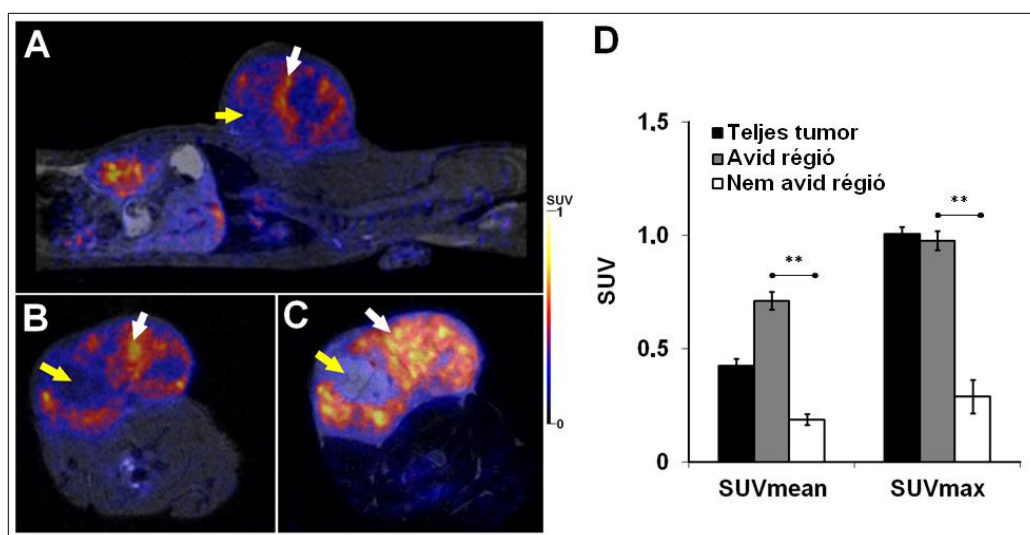
jelöletlen, kelátorral konjugált peptidnek köszönhetően (8. ábra/B). A SUV értékek kvantitatív elemzése során szignifikánsan alacsonyabb SUVmean ( $0,04 \pm 0,01$ ), SUVmax ( $0,05 \pm 0,01$ ), T/M SUVmean ( $2,14 \pm 0,89$ ) és T/M SUVmax ( $3,45 \pm 1,11$ ) értékeket tapasztaltunk a hideg, jelöletlen peptid adását követően. Az alapvizsgálatoknál, ahol csak a radiojelölt,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) került injektálásra, a T/M SUVmean és T/M SUVmax értékek  $11,23 \pm 1,15$  és  $12,46 \pm 1,47$  voltak (8. ábra/C). Ezek az eredmények igazolják a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) APN/CD13 specificitását.



8. ábra: Reprezentatív bomláskorrigált axiális PET/MRI képek subcutan transzplantált He/De tumoros (piros nyilak) patkányokról 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) injektálását követően. A: alap, B: NOTA-c(NGR)-rel blokkolt, C:  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel vizsgált subcutan He/De tumoros patkányok ( $n=5$ /csoport) PET felvételeiből származó SUV értékek kvantitatív analízise. T/M: tumor-izom arány. Szignifikancia szint:  $p \leq 0,01$ (\*\*).

### 4.3.3 $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazzal végzett *in vivo* vizsgálati eredmények

A subcutan He/De tumorok hypoxiás területeinek vizsgálatára hypoxia-specifikus  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol radiotracerrel PET/MRI vizsgálatokat végeztünk. Heterogén radiotracer eloszlást tapasztaltunk a PET/MRI képek kvalitatív analízise során 14 nappal a He/De tumorok indukcióját követően (9. ábra). Magas radiotracer felvételű (avid régiók) és alacsony radiotracer halmozású (nem avid régiók) területeket tudtunk megkülönböztetni (9. ábra/A-C). A kvantitatív elemzés során a teljes tumor SUVmean értéke  $0,43\pm 0,03$ , a SUVmax érték  $1,01\pm 0,03$  volt (9. ábra/D). A tumor heterogenitását alátámasztotta a PET képeken látható avid és nem avid régióinak kvantitatív elemzése is. A He/De tumorok avid régióinak SUVmean értéke  $0,71\pm 0,04$ , a SUVmax érték  $0,98\pm 0,04$  volt. Továbbá, szignifikánsan alacsonyabb ( $p\leq 0,01$ ) SUV értékeket mértünk a tumor nem avid régióiban, ahol a SUVmean  $0,19\pm 0,02$ , a SUVmax  $0,29\pm 0,07$  volt (9. ábra/D).



9. ábra: *In vivo* PET/MRI képalkotás He/De tumoros állatokon  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felhasználásával. Subcutan He/De tumoros patkányok reprezentatív sagittális (A) és axiális (B, C) bomláskorrigált PET/MRI felvételei 14 nappal a tumor indukciója és 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol injektálása után. Fehér nyilak: hypoxiás régiók (avid), sárga nyilak: nem hypoxiás régiók (nem avid). D: Subcutan He/De tumoros állatok ( $n=15$ ) PET képeinek kvantitatív SUV analízise. Szignifikancia szint:  $p\leq 0,01$ (\*\*).

#### 4.3.4 Subcutan He/De tumoros F-344 patkányok angiogenezisének és hypoxiájának *ex vivo* vizsgálata

A He/De tumorral subcutan injektált F-344 patkányokat 90 perccel a radiotracerek injektálását követően túlaltattuk és tumoraikat, valamint néhány apró darabot a combizomból eltávolítottunk, majd ezek tömegét és radioaktivitását lemértük és a radiotracer felvételt ID%/g-ban határoztuk meg. A 3. táblázatban látható mindhárom radiotracer fokozódó felvétele a növekedő daganatokban. A blokkolási vizsgálatokban a jelöletlen NOTA-c(NGR) injektálását követő <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) ID% értéke szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) csökkent a He/De tumorokban. Ez a megfigyelést azt jelzi, hogy a pozitronemittáló izotóppal jelölt NOTA-c(NGR) felvétele blokkolásra került a jelöletlen NOTA-c(NGR) injektálásának hatására, megerősítve azt a feltételezést, hogy a <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) specifikusan a CD13/APN-hez kötődik.

*3. táblázat: He/De tumoros állatok ex vivo szervi megoszlásos vizsgálata 90 perccel a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>, <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) és a <sup>68</sup>Ga-DOTA-Nitroimidazol injektálását követően, valamint 9±1, 12±1 és 15±1 nappal a tumor indukciót követően. Szignifikancia szint a blokkolt és a nem blokkolt He/De tumorok között 90 percnél:  $p \leq 0,01$  (\*\*). A blokkoláshoz 200 µg jelöletlen NOTA-c(NGR) került felhasználásra. T/M: tumor-izom arány.*

<b>Tumor</b>	<b><sup>68</sup>Ga-NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> (n=3)</b>	<b><sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) (n=3)</b>	<b><sup>68</sup>Ga-DOTA-Nitroimidazole (n=3)</b>
He/De (kis tumor, 9±1 napos)	0,09±0,01	0,10±0,01	0,12±0,05
He/De (közepes tumor, 12±1 napos)	0,16±0,03	0,23±0,09	0,21±0,06
He/De (nagy tumor, 15±1 napos)	0,31±0,05	0,41±0,08**	0,28±0,04
He/De blokkolt (15±1 napos)	-	0,09±0,03	-
T/M arány (15±1 napos)	5,35±0,89	9,15±1,02	5,69±0,40

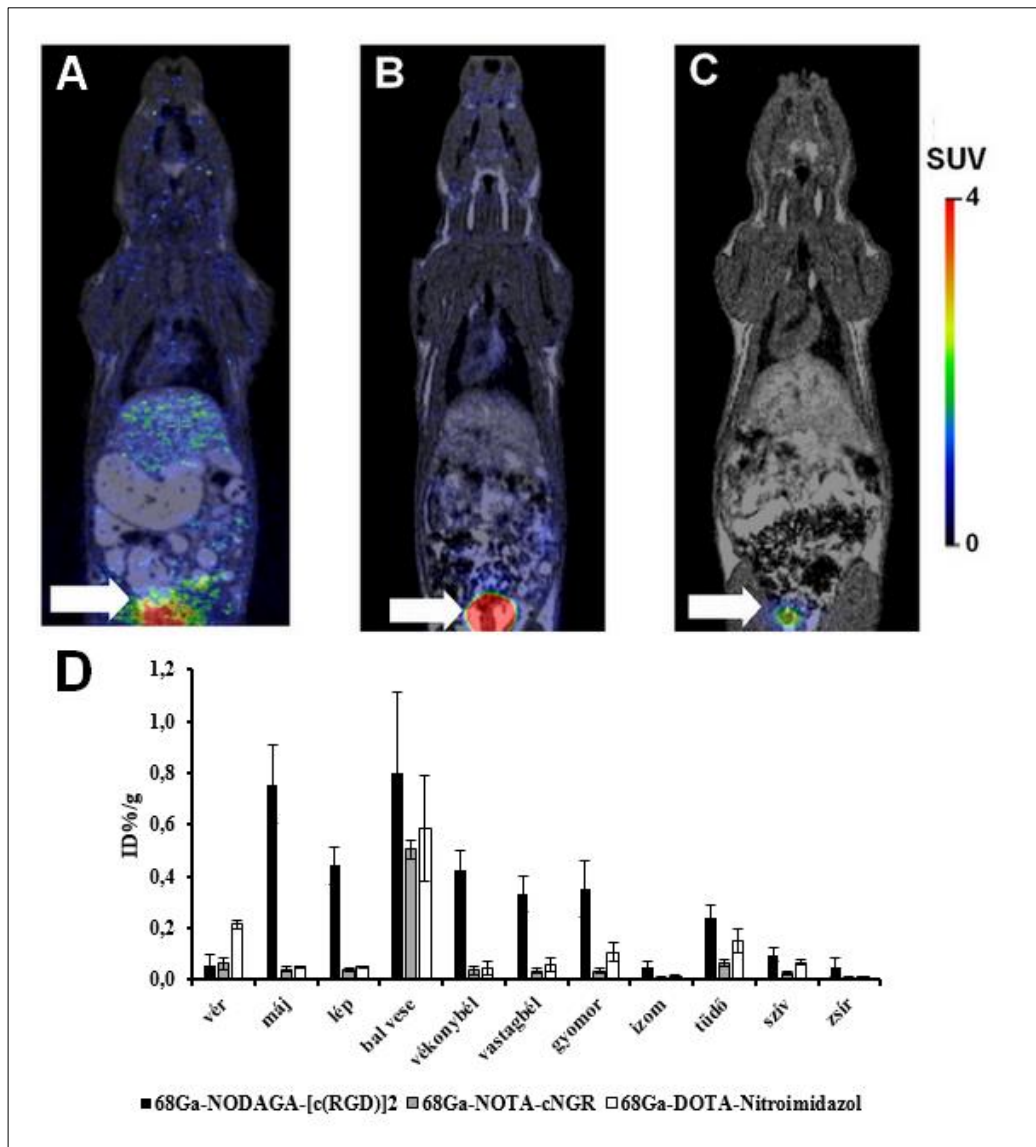
#### 4.4 Kontroll F-344 patkányok *in vivo* és *ex vivo* vizsgálata $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel, $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel és $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazollal

A kontroll, egészséges F-344 patkányokról egésztest PET/MRI-t készítettünk a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) vagy a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol radiotracerek intravénás injektálását követő 90 perc múlva. A 10. ábrán (A, B és C) lévő coronális metszetű PET/MRI felvételekből jól látszik, hogy mindhárom radiotracer a vizeletelvezető rendszeren keresztül ürül, melyet a fehér nyíllal jelölt húgyhólyagbeli aktivitás jelez.

A kontroll patkányok  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-vel végzett szervi megoszlásos vizsgálatából (10. ábra) megállapítható a radiotracer vizeletelvezető rendszeren (bal vese ID%/g=0,798±0,314), valamint a májon (ID%/g=0,756±0,152) keresztüli ürülése, melyet a PET/MRI képek is alátámasztanak. Ezen kívül emelkedett tracer halmozás figyelhető meg a lépben (ID%/g=0,441±0,071), vékonybélben (ID%/g=0,423±0,074), vastagbélben (ID%/g=0,334±0,069), gyomorban (ID%/g=0,352±0,110) és tüdőben (ID%/g=0,241±0,047).

Az egészséges patkányokon  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel elvégzett *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatok (10. ábra) alapján kijelenthető, hogy a radiotracer a vizeletelvezető rendszeren (vese ID%/g=0,504±0,038) keresztül ürül ki a szervezetből. Továbbá, a vérben (ID%/g=0,063±0,023) és a tüdőben (ID%/g=0,067±0,012) emelkedett tracerfelvételt tapasztaltunk.

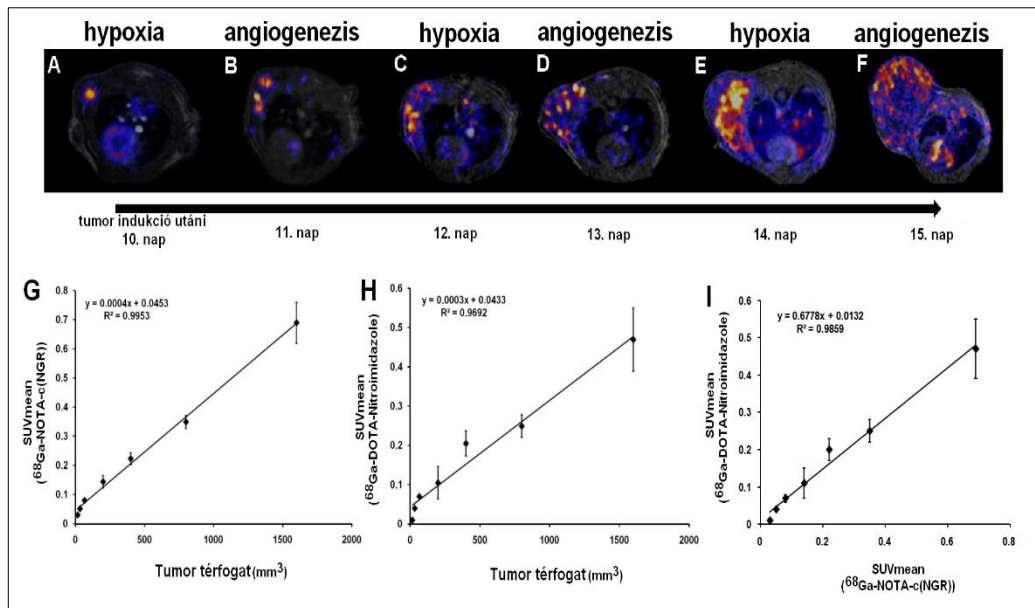
Az egészséges patkányok  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazollal végzett *ex vivo* vizsgálatából egyértelműen megállapítható a radiotracer vizeletelvezető rendszeren (vese ID%/g=0,584±0,205) keresztüli ürülése. Emellett a vér (ID%/g=0,214±0,017) is emelkedett tracer tartalommal jellemezhető, valamint a gyomorban (ID%/g=0,108±0,038) és a tüdőben (ID%/g=0,151±0,043) is magas  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvételt tapasztaltunk.



10. ábra: Egészséges, kontroll F-344 patkányok in vivo coronális PET/MRI felvételei  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> (A),  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) (B) és  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol (C) felhasználásával, valamint ugyanezen radiotracerok ex vivo szervi megoszlásos vizsgálata (D). Fehér nyíl: húgyhólyag.

#### 4.5 Hypoxia és angiogenezis összefüggésének *in vivo* vizsgálata a tumor növekedés függvényében subcutan He/De tumorokon

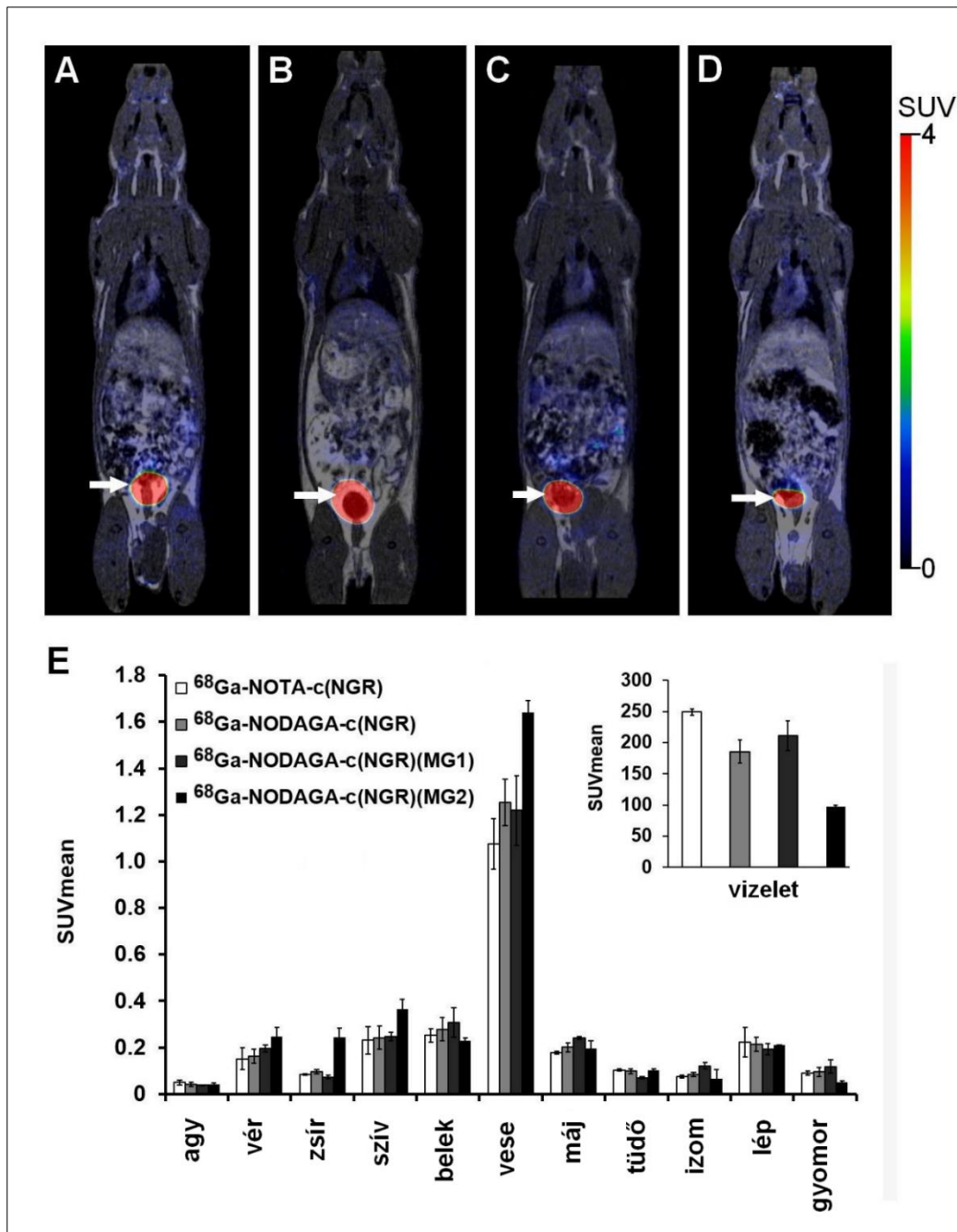
A radiotracerek injektálása után 90 perccel PET/MRI vizsgálatokat végeztünk a hypoxia és angiogenezis kapcsolatának vizsgálata céljából. A subcutan He/De tumoros patkányokat napi rendszerességgel vizsgáltuk felváltva hypoxiát célzó  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazollal és angiogenezist célzó  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel (11. ábra). A kvalitatív PET/MRI vizsgálatok kimutatták, hogy a tumor növekedésével arányosan nőtt a tumoron belüli hypoxia és angiogenezis mértéke is. A hypoxiás és angiogenikus területek méretének változása korrelált a tumor térfogatának változásával, melyet a kvantitatív SUV adatok is alátámasztanak. A tumorok  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvétele fokozódott a tumor méretének növekedésével. A kvantitatív vizsgálatot az egész tumorra nézve határoztuk meg. Körülbelül 16, 33, 66, 200, 400, 800 és 1600 mm<sup>3</sup> tumortérfogatnál a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel végzett PET vizsgálatból származó SUVmean értékek  $0,03\pm 0,01$ ;  $0,05\pm 0,01$ ;  $0,08\pm 0,004$ ;  $0,14\pm 0,02$ ;  $0,22\pm 0,02$ ,  $0,35\pm 0,02$  és  $0,69\pm 0,07$  voltak. A  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) korrelált ( $R^2=0,9953$ ) a tumor növekedésének mértékével (11. ábra/G). Hasonló eredményeket kaptunk a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazollal végzett vizsgálatok esetén, ahol a SUVmean értékek  $0,01\pm 0,004$ ;  $0,04\pm 0,005$ ;  $0,07\pm 0,01$ ;  $0,11\pm 0,04$ ;  $0,20\pm 0,03$ ;  $0,25\pm 0,03$  és  $0,47\pm 0,08$  volt a 16, 33, 66, 200, 400, 800 és 1600 mm<sup>3</sup> tumorméretnél. Ebben az esetben is korrelációt ( $R^2=0,9692$ ) figyeltünk meg az emelkedett  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol és a tumortérfogat között (11. ábra/H). A két radiotracer akkumulációját vizsgálva a tumornövekedés függvényében, azt találtuk, hogy mind a két radiofarmakon fokozott növekedést mutat az idő előrehaladtával, egymással szorosán korrelálva (11. ábra/I). Az *in vivo* PET vizsgálatokból származó adatokat az *ex vivo* mérési eredmények is megerősítették (3. táblázat).



11. ábra: Subcutan He/De tumorok hypoxiás és APN/CD13 expresszáló területeiről készült *in vivo* PET/MRI felvételei és kvantitatív analízise a tumor térfogatváltozásának függvényében. Subcutan He/De tumorok reprezentatív axiális PET/MRI felvételei 90 perccel a  $^{68}\text{Ga-DOXA-Nitroimidazole}$  (A, C, E) és  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  (B, D, F) injektálása után. He/De tumorokról készült PET/MRI felvételek kvantitatív analízise  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  (G) és  $^{68}\text{Ga-DOXA-Nitroimidazole}$  (H) felhasználásával a tumor térfogatváltozásának függvényében, valamint a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  és  $^{68}\text{Ga-DOXA-Nitroimidazole}$  közötti korreláció vizsgálata a tumornövekedés folyamán (I). Az adatok átlag $\pm$ SD-ben kerültek kifejezésre.

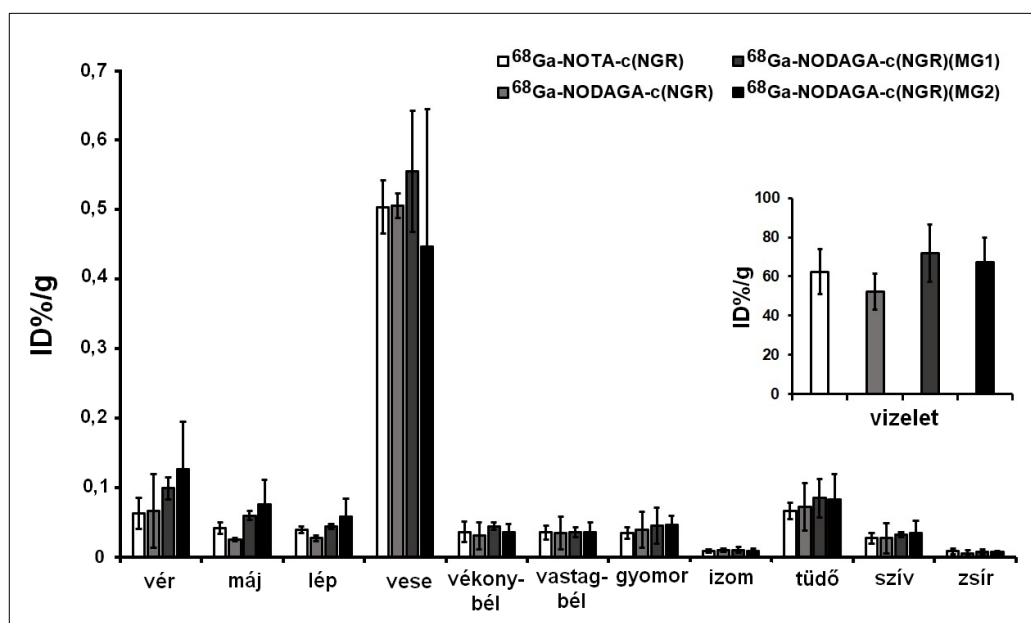
#### 4.6 Kontroll F-344 patkányok *in vivo* PET/MRI és *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálata különböző NGR származékokkal

A  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub>, (továbbiakban:  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1)) és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c[CH<sub>2</sub>-CO-Lys-Asn-N(Me)Gly-Arg-Cys]-NH<sub>2</sub> (továbbiakban:  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2)) normál megoszlásának megállapításához teljes test *in vivo* PET/MRI és *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatokat végeztünk kontroll, egészséges F-344 patkányokon 90 perccel a radiotracerek injektálását követően. A kontroll patkányokról készült bomláskorrigált coronális PET/MRI képek a 12. ábrán láthatóak. A PET képek kvalitatív analízisekor alacsony halmozást figyeltünk meg a hasi és mellkasi szervekben mind a négy vizsgált radiotracer esetében a 90 perces inkubálási idő után. Ezzel szemben, jelentős halmozás látható a vizeletelvezető rendszerben (12. ábra, fehér nyíl). A PET képek kvantitatív SUV analízise során (12. ábra) nem találtunk szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ) eltérést a vizsgált szervek és szövetek között, amikor a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) radiotracerek halmozását hasonlítottuk össze.



12. ábra: Kontroll, egészséges F-344 patkányok in vivo PET/MRI vizsgálata 90 perccel a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  (A),  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (B),  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)(MG1)}$  (C) és  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)(MG2)}$  (D) injektálása után. Fehér nyilak: húgyhólyag (vizelettel telve). E: kontroll patkányok (n=3/radiotracer) kvantitatív SUV analízise 90 perccel az injektálás után. SUV: standardizált felvételi érték. A SUV értékek átlag±SD-ben kerültek kifejezésre.

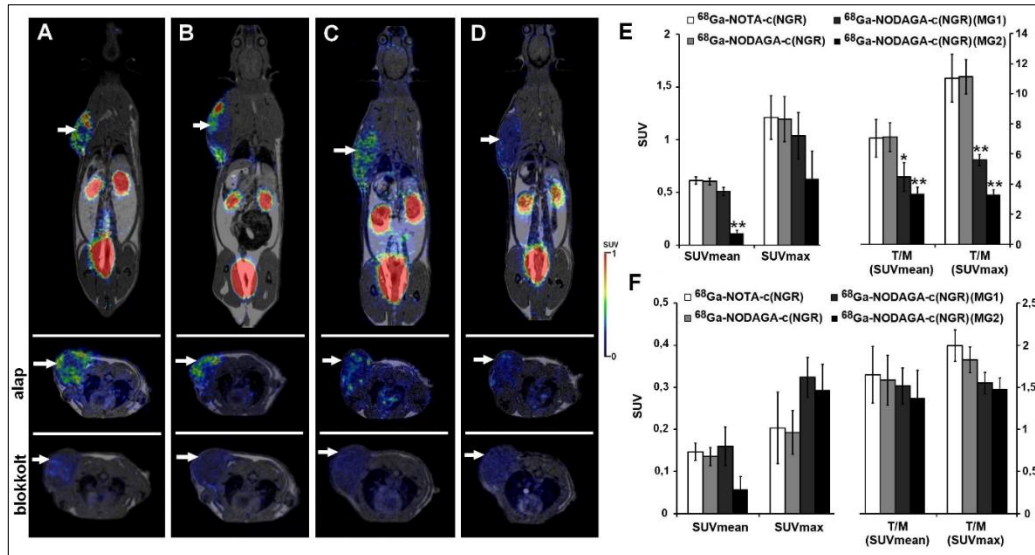
Az *in vivo* PET/MRI eredmények jól korreláltak a 13. ábrán látható *ex vivo* szervi megoszlásos eredményekkel. Az *in vivo* PET/MRI képalkotás után az állatokat túlaltattuk, szerveiket, szöveteiket eltávolítottuk és azok tömegét, valamint radioaktivitását megmértük. Említésre méltó radiotracer halmozódott fel a vesékben ( $ID\%/g \approx 0,5$ ) és a vizeletben ( $ID\%/g \approx 50-85$ ), a többi szervben és szövetben, ezeknél jóval alacsonyabb halmozást (alacsony  $ID\%/g$  értékek) tapasztaltunk. A radiotraceret összehasonlítva relatív magas halmozódást mutatott a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) a vérben, májban és a lépben, azonban ez az eltérés nem volt szignifikáns.



13. ábra: Kontroll F-344 patkányok *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálata 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$  jelzett NGR származékok injektálását követően. Az  $ID\%/g$  értékek átlag $\pm$ SD-ben lettek kifejezve.

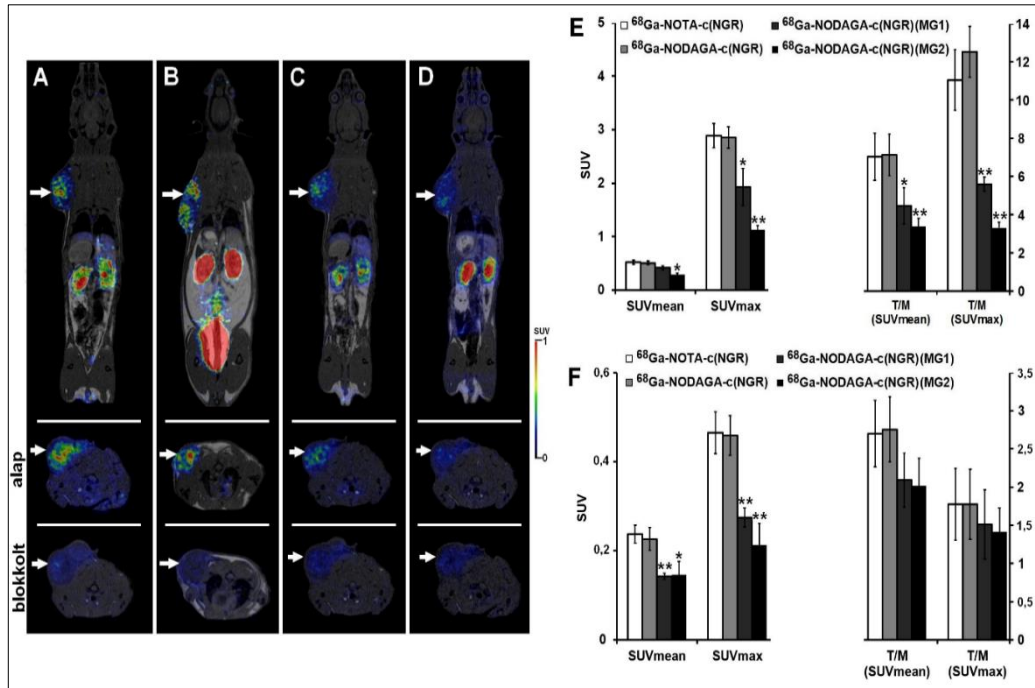
#### 4.7 Subcutan He/De és Ne/De tumoros F-344 patkányok *in vivo* PET/MRI és *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálata különböző NGR származékokkal

A  $^{68}\text{Ga}$ -al jelölt NGR származékok APN/CD13 specificitásának *in vivo* vizsgálatához a subcutan He/De és Ne/De tumoros F-344 patkányokat intravénásan injektáltuk a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) radiotracerekkel és 90 perc inkubálási idő után az állatokat elaltattuk és teljes test PET/MRI vizsgálatokat végeztünk. A 14. ábrán és a 15. ábrán láthatóak a subcutan He/De és Ne/De tumoros patkányokról készült bomláskorrigált teljes test coronális és axiális PET/MRI felvételek. A subcutan növekedő tumorok jól láthatóak 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) injektálása után, azonban mérsékelt felvételt tapasztaltunk a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) esetében (14. ábra/ fehér nyilak és 15. ábra/ fehér nyilak). Ezt a megfigyelést a PET képek kvantitatív SUV analízise is alátámasztotta (14. ábra/E és 15. ábra/E). Szignifikánsan ( $p \leq 0,05$  és  $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb tracer felvételt tapasztaltunk a He/De (SUVmean:  $0,11 \pm 0,03$ ; SUVmax:  $0,63 \pm 0,26$ ) és Ne/De (SUVmean:  $0,29 \pm 0,03$ ; SUVmax:  $1,13 \pm 0,07$ ) tumorokban a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) injektálása után, mint a másik három vizsgált radiotracer esetében, ahol a SUVmean és SUVmax értékek ennek kb. 2-5-szöröse voltak a He/De tumorokban és 1,5-3-szorosai voltak a Ne/De tumorokban. Hasonló tendenciát véltünk felfedezni a tumorhátter (izom) arányokban mind a két tumor esetében, ahol szintén a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) mutatta a legalacsonyabb arányt. Összességében a NOTA és NODAGA kelátorokkal konjugált c(NGR)-ek nagyobb mértékben halmozódtak a He/De és Ne/De tumorokban, mint a NODAGA kelátorral konjugált MG1 és MG2 változatok (4. táblázat, 5. táblázat). A  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) és  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) APN/CD13 specificitásának igazolására *in vivo* blokkolási vizsgálatokat végeztünk, melynél 200  $\mu\text{g}$  jelöletlen c(NGR) injektálása történt 5 perccel a  $^{68}\text{Ga}$  jelölt c(NGR) származékok injektálása előtt. A 14. ábra és a 15. ábra alsó sorában látható alap és blokkolási axiális képek mutatják, hogy a jelöletlen c(NGR) injektálása mind a négy c(NGR) származék akkumulációját csökkentette a He/De és Ne/De tumorokban az alap állapothoz viszonyítva. A kvantitatív SUV analízis (14. ábra/F és 15. ábra/F, 4. táblázat, 5. táblázat) is megerősítette a vizuális értékelést, a radiotracer felvétel szignifikánsan csökkent He/De és Ne/De tumorokban a blokkolás hatására, ezzel alátámasztva az c(NGR) származékok APN/CD13 specificitását *in vivo*.



14. ábra: He/De tumorok in vivo vizsgálata különböző  $^{68}\text{Ga}$  jelzett c(NGR) származékokkal.

Reprezentatív coronális (felső sor) és axiális (középső sor: alap, alsó sor: blokkolt) PET/MRI felvételek 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) (A),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (B),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) (C), és  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) (D) injektálását követően. A He/De tumorokról készült alap (E) és blokkolt (F) PET felvételek kvantitatív SUV analízise 90 perccel a radiotracerek injektálása és  $11 \pm 1$  nappal a tumorok indukciója után. Szignifikancia szint:  $p \leq 0,05$  (\*) és  $p \leq 0,01$  (\*\*). SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. A SUV értékek  $\text{átlag} \pm \text{SD}$ -ben kerültek kifejezésre.



15. ábra: Ne/De tumorok in vivo vizsgálata különböző  $^{68}\text{Ga}$  jelzett c(NGR) származékokkal. Reprezentatív coronális (felső sor) és axiális (középső sor: alap, alsó sor: blokkolt) PET/MRI felvételek 90 perccel a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  (A),  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  (B),  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)(MG1)}$  (C), és  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)(MG2)}$  (D) injektálását követően. A Ne/De tumorokról készült alap (E) és blokkolt (F) PET felvételek kvantitatív SUV analízise 90 perccel a radiotracer injektálása és  $11 \pm 1$  nappal a tumorok indukciója után. Szignifikancia szint:  $p \leq 0,05$  (\*) és  $p \leq 0,01$  (\*\*). SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. A SUV értékek  $\text{átlag} \pm \text{SD}$ -ben kerültek kifejezésre.

4. táblázat: He/De tumorok SUV analízise 90 perccel a radiotracer és 11±1 nappal a tumoros sejtek injektálása után. A SUV értékel átlag±SD- ben kerültek kifejezésre. Szignifikancia szint az alap és blokkolt mérések között:  $p \leq 0,05$  (\*) és  $p \leq 0,01$  (\*\*). A blokkolás során 200 µg jelöletlen c(NGR) injektálása történt. T/M: tumor- izom arány.

		SUVmean	SUVmax	T/M (SUVmean)	T/M (SUVmax)
Alap	<sup>68</sup> Ga-NOTA-c(NGR)	0,61±0,03	1,21±0,21	7,04±1,24	11,04±1,59
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR)	0,60±0,03	1,20±0,22	7,12±0,96	11,12±1,14
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1)	0,51±0,04	1,04±0,22	4,46±0,95	5,59±0,37
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2)	0,11±0,03	0,63±0,26	3,37±0,44	3,31±0,29
Blokkolt	<sup>68</sup> Ga-NOTA-c(NGR)	0,15±0,02**	0,20±0,09**	1,65±0,34**	1,99±0,19**
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR)	0,14±0,02**	0,19±0,05**	1,58±0,30**	1,82±0,15**
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1)	0,16±0,05**	0,32±0,05**	1,52±0,21*	1,55±0,13**
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2)	0,06±0,03*	0,29±0,06*	1,37±0,33*	1,48±0,13*

5. táblázat: Ne/De tumorok SUV analízise 90 perccel a radiotracer és 11±1 nappal a tumoros sejtek injektálása után. A SUV értékel átlag±SD- ben kerültek kifejezésre. Szignifikancia szint az alap és blokkolt mérések között:  $p \leq 0,05$  (\*) és  $p \leq 0,01$  (\*\*). A blokkolás során 200 µg jelöletlen c(NGR) injektálása történt. T/M: tumor- izom arány.

		SUVmean	SUVmax	T/M (SUVmean)	T/M (SUVmax)
Alap	<sup>68</sup> Ga-NOTA-c(NGR)	0,52±0,04	2,89±0,23	7,04±1,24	11,04±1,59
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR)	0,51±0,03	2,85±0,20	7,13±1,10	12,52±1,33
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1)	0,42±0,04	1,93±0,35	4,46±0,95	5,59±0,37
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2)	0,29±0,03	1,13±0,07	3,37±0,44	3,31±0,29
Blokkolt	<sup>68</sup> Ga-NOTA-c(NGR)	0,24±0,02**	0,46±0,05**	2,70±0,44**	1,77±0,47**
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR)	0,23±0,03**	0,46±0,04**	2,75±0,43**	1,78±0,46**
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1)	0,14±0,01**	0,27±0,02**	2,09±0,35*	1,51±0,45**
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2)	0,15±0,04*	0,21±0,05**	2,01±0,36	1,41±0,31*

Az *in vivo* SUV adatokhoz hasonlóan az *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatból származó ID%/g értékek is a <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) esetében mutatták a legmagasabb dúsulást a vizsgált tumorokban, melyet a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR), <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) (MG1), és végül a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) (MG2) követett. A blokkolás az *ex vivo* vizsgálatoknál (6. táblázat) is sikeres volt, szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb ID%/g értékeket kaptunk a blokkolt tumorban, mint a nem blokkolt, alap tumorban. Sem az *in vivo*, sem pedig az *ex vivo* vizsgálatoknál nem találtunk jelentős különbséget a két vizsgált tumor között a négy c(NGR) származék egyikével sem.

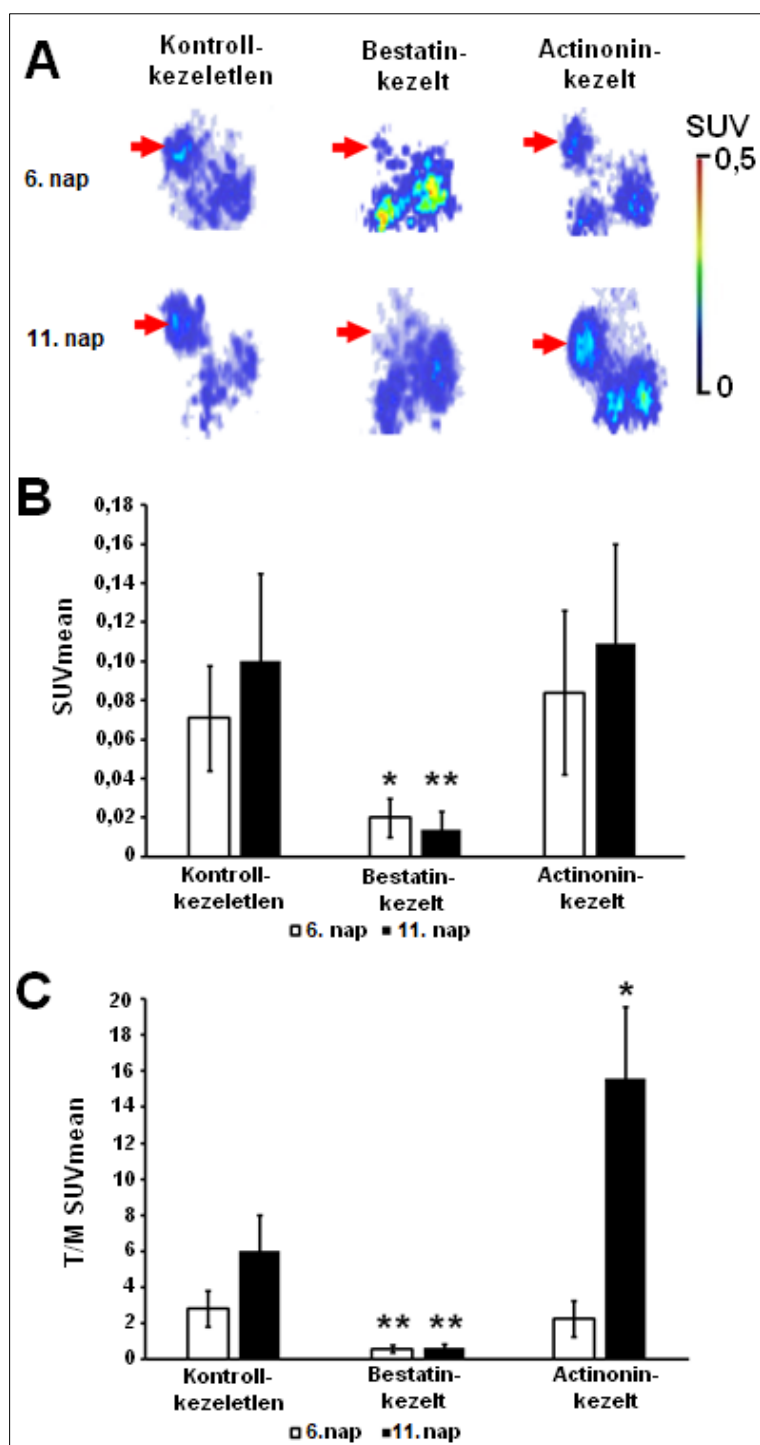
6. táblázat: A He/De és Ne/De tumorok ex vivo szervi megoszlásos vizsgálata a négy c(NGR) származékkal, 90 perccel a tracerek injektálása és  $11 \pm 1$  nappal a tumorok indukciója után. Az ID%/g értékek átlag $\pm$ SD-ben kerültek kifejezésre. A szignifikancia szint a blokkolt és az alap tumorok között  $p \leq 0,01$  (\*\*). A blokkoláskor 200  $\mu$ g jelöletlen c(NGR) injektálása történt. T/M: tumor-izom arány.

Tumor	<sup>68</sup> Ga- NOTA- c(NGR)	<sup>68</sup> Ga- NODAGA- c(NGR)	<sup>68</sup> Ga- NODAGA- c(NGR) (MG1)	<sup>68</sup> Ga- NODAGA- c(NGR) (MG2)
<b>He/De (n=5)</b>	0,69 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,11	0,34 $\pm$ 0,08
<b>He/De T/M arány</b>	9,99 $\pm$ 1,60	7,95 $\pm$ 1,39	6,13 $\pm$ 0,96	5,56 $\pm$ 0,94
<b>He/De (blokkolt) (n=3)</b>	0,12 $\pm$ 0,04**	0,09 $\pm$ 0,02**	0,14 $\pm$ 0,01**	0,11 $\pm$ 0,02**
<b>Ne/De (n=5)</b>	0,83 $\pm$ 0,23	0,79 $\pm$ 0,18	0,66 $\pm$ 0,12	0,40 $\pm$ 0,08
<b>Ne/De T/M arány</b>	7,10 $\pm$ 1,27	6,58 $\pm$ 1,24	6,15 $\pm$ 0,77	5,73 $\pm$ 0,41
<b>Ne/De (blokkolt) (n=3)</b>	0,10 $\pm$ 0,02**	0,11 $\pm$ 0,04**	0,17 $\pm$ 0,05**	0,09 $\pm$ 0,03**

## 4.8 APN/CD13 inhibitorok hatásának vizsgálata subcutan HT1080 és B16F10 tumoros egereken $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) felhasználásával

### 4.8.1 Subcutan HT1080 tumoros állatok *in vivo* és *ex vivo* vizsgálata

Az actinonin és bestatin- mint természetesen előforduló APN inhibitorok-, subcutan HT1080 tumorok APN/CD13 expressziójára gyakorolt hatását *in vivo* és *ex vivo* körülmények között is vizsgáltuk  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) radiotracerrel. A tumorindukciótól számított negyedik naptól kezdve, 7 napon keresztül napi egyszeri intraperitoneális actinonin (5 mg/kg) vagy bestatin (15 mg/kg) kezelést kaptak az állatok. A tumor injektálásától számított 6. és 11. napon 20 perces statikus PET felvételeket készítettünk 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) injektálását követően a kontroll, kezeletlen és kezelt (actinonin vagy bestatin) állatok tumoros területéről. A PET képek kvalitatív analízise során megállapítottuk, hogy mind a kontroll, mind pedig az actinonin- kezelt állatok tumora jól azonosítható volt a 6. és 11. napi PET felvételeken (16. ábra/A). Meglepő módon az actinonin- kezelt tumorok  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) felvétele a 11. napra fokozódott a kontroll tumorok tracer felvételéhez képest. Ezzel ellentétben, a bestatin- kezelt tumorokat nehéz volt azonosítani, az alacsony  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) felvétel miatt, mely megerősíti a kezelés hatására csökkent APN/CD13 expressziót (16. ábra/A, piros nyilak).

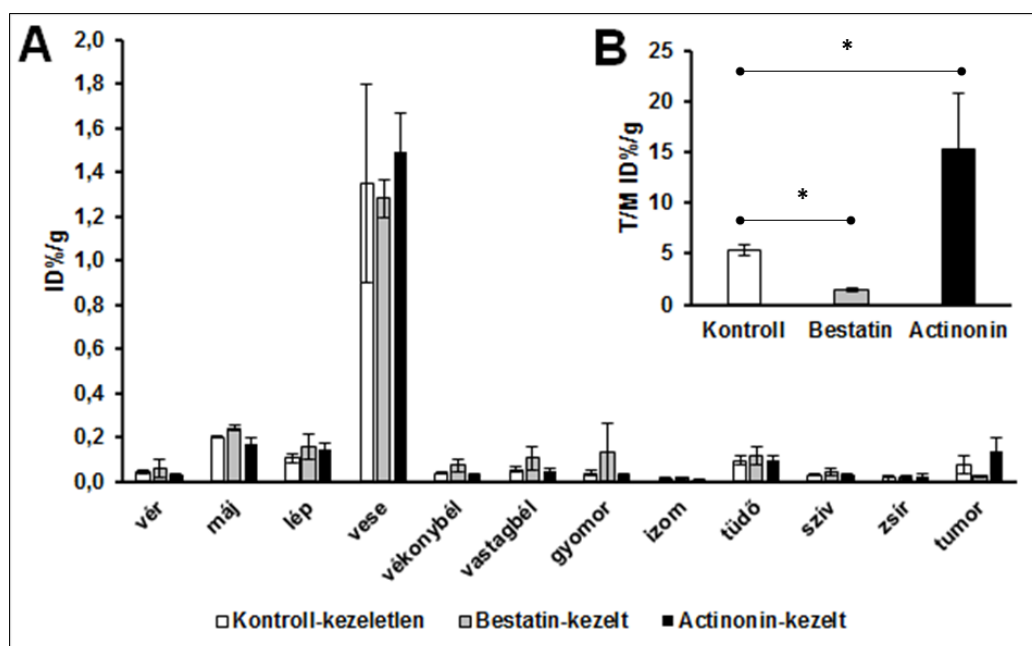


16. ábra: Kontroll- kezeletlen, valamint actinonin- és bestatin- kezelt subcutan HT1080 tumoros állatok in vivo PET képkalkotása. A: HT1080 tumoros állatok reprezentatív coronális PET felvételei 90 perccel a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  injektálása, valamint 6 (felső sor) és 11 (alsó sor) nappal a daganatok indukcióját követően. B és C ábrarészek: Bomláskorrigált PET képek kvantitatív analízise. SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. Piros nyilak: subcutan HT1080 tumor. Szignifikancia szint:  $p \leq 0,05$  (\*) és  $p \leq 0,01$  (\*\*). Az adatok átlag $\pm$ SD-ben kerültek kifejezésre.

A 6. napi rekonstruált és bomláskorrigált PET képek kvantitatív analizéséből megállapítható a bestatin- kezelt tumorok szignifikánsan ( $p \leq 0,05$  és  $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb SUVmean értéke ( $0,02 \pm 0,01$ ) a kontroll- kezeletlen ( $0,07 \pm 0,03$ ) és az actinonin- kezelt ( $0,08 \pm 0,04$ ) tumorok felvételéhez képest (16. ábra/B). Ez a szignifikáns különbség a 11. napi vizsgálatokkor is láthatóak voltak, ahol a bestatin- kezelt, kontroll- kezeletlen és actinonin- kezelt tumorok SUVmean értékei  $0,01 \pm 0,01$ ;  $0,10 \pm 0,05$  és  $0,11 \pm 0,05$  voltak. A kontroll- kezeletlen és az actinonin- kezelt csoportokban minimális emelkedést láttunk a SUVmean értékekben a 6. és 11. nap között. Ezzel szemben, gyenge csökkenést tapasztaltunk a bestatin- kezelt csoport SUVmean értékében, azonban a csökkenés nem volt szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ). Továbbá, nem szignifikánsan, de relatíve magasabb  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  felvételt figyeltünk meg az actinonin- kezelt csoportban, a kezeletlen- kontroll csoport ugyanezen értékéhez viszonyítva (16. ábra/B), melyet a PET képek is alátámasztanak (16. ábra/A). Meghatároztuk a kontroll és kezelt tumorok kontrasztosságát, azaz a T/M SUVmean értékeket is, mely jelzi a kezelések hatékonyságát (16. ábra/C). A kontroll és bestatin csoportok T/M SUVmean értékeit összehasonlítva szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb T/M SUVmean értékeket ( $0,57 \pm 0,2$  a 6. napon és  $0,61 \pm 0,20$  a 11. napon) kaptunk a bestatin- kezelt csoportban minden vizsgálati időpontban. Az actinonin- kezelt csoportok esetében relatív alacsonyabb T/M SUVmean értéket ( $2,25 \pm 1,0$ ) kaptunk a 6. napon és szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) magasabb T/M értéket láttunk a 11. napon ( $15,57 \pm 4,0$ ). A kontroll csoport 6. és 11. napi T/M SUVmean értékei  $2,8 \pm 1,0$  és  $6,0 \pm 2,0$  voltak (16. ábra/C). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a bestatin a subcutan transzplantált HT1080 tumorok hatékony inhibitora.

A 11. napon az állatokat Isoflurán altatás alatt intravénásan injektáltuk  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ -rel. Majd a 90 perces inkubálási idő után 20 perces statikus PET felvételeket, majd szervi megoszlásos vizsgálatokat végeztünk. Az *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatok eredménye (17. ábra) jól korrelált az *in vivo* vizsgálati eredményekkel. A vesében magas ( $\text{ID\%/g} = 1,28 - 1,50$ ), míg a májban mérsékelt ( $\text{ID\%/g} = 0,17 - 0,24$ ) tracer felvételt láttunk. Relatív alacsony tracer felvételt tapasztaltunk a hasi és mellkasi régióban. A kezelt és kontroll állatok egészséges szerveinek és szöveteinek  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  felvételében szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ) különbséget nem láttunk. A kontroll, actinonin- és bestatin- kezelt állatok T/M ID%/g értékei  $5,30 \pm 0,56$ ,  $15,27 \pm 5,52$  és  $1,45 \pm 0,15$  voltak. Ezek jól korrelálnak az *in vivo* képalkotás során kapott T/M SUVmean értékekkel. A kontroll állatok T/M értékeihez viszonyítva szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) magasabb T/M értéket kaptunk az actinonin-

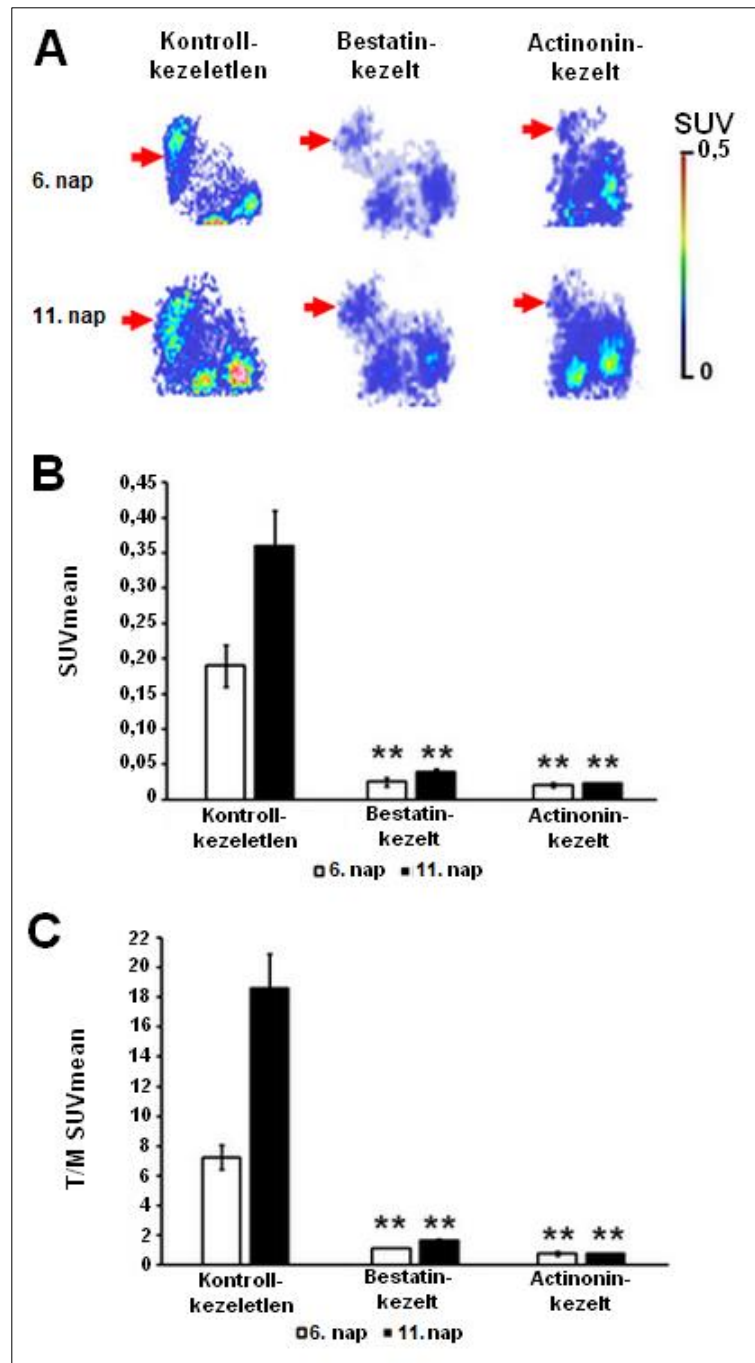
kezelt csoportban és szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) alacsonyabb értéket a bestatin- kezelt csoportban.



17. ábra: Kontroll- kezeletlen, valamint actinonin- és bestatin- kezelt subcutan HT1080 tumoros állatok ex vivo szervi megoszlásos vizsgálata  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ -rel (A). B: Kontroll, actinonin- és bestatin- kezelt állatok tumorainak T/M (tumor ID%/g/izom ID%/g) értékei. Szignifikancia szintek:  $p \leq 0,05$  (\*).

#### 4.8.2 Subcutan B16F10 tumoros állatok in vivo és ex vivo vizsgálata

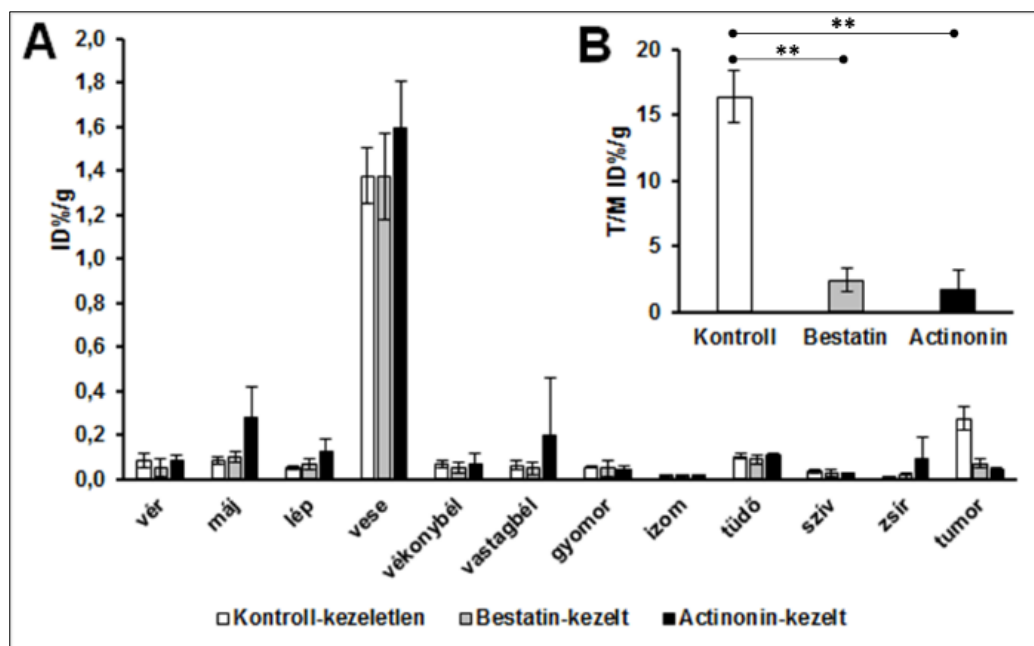
Az actinonin és bestatin gátlószerek subcutan B16F10 tumorokra gyakorolt hatásának vizsgálata céljából 6 és 11 nappal a tumorsejtek subcutan injektálása, valamint 90 perccel a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  intravénás injektálása után 20 perces statikus PET felvételeket készítettünk (18. ábra). A PET képek kvalitatív elemzése során látható volt a magas  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  felvétel a kontroll csoport tumoraiban, továbbá, mérsékelt halmozást tapasztaltunk az actinonin és bestatin kezelt tumorokban (18. ábra/A, piros nyilak).



18. ábra: Kontroll- kezeletlen, valamint actinonin- és bestatin- kezelt subcutan B16F10 tumoros állatok *in vivo* PET képalkotása. A: B16F10 tumoros állatok reprezentatív coronális PET felvételei 90 perccel a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  injektálása, valamint 6 (felső sor) és 11 (alsó sor) nappal a daganatok indukcióját követően. B és C ábrarészek: Bomláskorrigált PET képek kvantitatív analízise. SUV: standardizált felvételi érték; T/M: tumor-izom arány. Piros nyilak: subcutan B16F10 tumor. Szignifikancia szint:  $p \leq 0,05$  (\*) és  $p \leq 0,01$  (\*\*). Az adatok átlag $\pm$ SD-ben kerültek kifejezésre.

A kvantitatív analízis során a 6. napi PET felvételen szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb SUVmean értékeket mértünk az actinonin- ( $0,02 \pm 0,00$ ) és bestatin- ( $0,03 \pm 0,01$ ) kezelt csoportokban, a kontroll- kezeletlen csoport tumorainak emelkedett SUVmean értékéhez ( $0,19 \pm 0,03$ ) viszonyítva (18. ábra/B). Ez a szignifikáns különbség a 11. vizsgálati napon készült PET felvételeknél is megmaradt, ahol az actinonin-, bestatin- kezelt és a kontroll csoportok SUVmean értékei  $0,02 \pm 0,00$ ,  $0,04 \pm 0,00$  és  $0,36 \pm 0,05$  voltak. Figyelemreméltó SUVmean érték emelkedés történt a 6.-ról a 11. napra a kontroll csoport esetében, míg ez az emelkedés elhanyagolható volt az actinonin- és bestatin- kezelt csoportoknál. A kontroll csoport esetében szintén jelentős növekedés következett be a T/M SUVmean értékek tekintetében, ahol a 6. napi T/M SUVmean  $7,24 \pm 0,80$ , a 11. napi T/M SUVmean  $18,60 \pm 2,32$  volt. Az actinonin- és bestatin- kezelt csoportok T/M SUVmean értékeit a kontroll csoportéhoz viszonyítva szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb értékeket kaptunk a 6. és 11. napon. A 6. és 11. napi T/M SUVmean értékek az actinonin- kezelt csoportban  $0,75 \pm 0,15$  és  $0,74 \pm 0,05$ , a bestatin- kezelt csoportban  $1,11 \pm 0,01$  és  $1,63 \pm 0,09$  volt (18. ábra/C).

Ahogy a subcutan HT1080 tumoros egereknél, úgy a B16F10 tumoros állatoknál is elvégeztük az *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatokat a PET képalkotást követően, a tumor indukciótól számított 11. napon (19. ábra). A vesében magas ( $ID\%/g = 1,38-1,59$ ), míg a májban mérsékelt ( $ID\%/g = 0,08-0,28$ ) tracer felvételt láttunk. Relatív alacsony tracer felvételt tapasztaltunk a hasi és mellkasi régióban. A kezelt és kontroll állatok egészséges szerveinek és szöveteinek  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c}$  (NGR) felvételében szignifikáns ( $p \leq 0,05$ ) különbséget nem láttunk. Az *ex vivo* T/M értékek (T/M  $ID\%/g$ ) ebben az esetben is korreláltak az *in vivo* T/M SUVmean értékekkel. A kontroll, actinonin- kezelt és bestatin- kezelt csoportok  $ID\%/g$  értékei  $16,38 \pm 1,97$ ,  $1,71 \pm 1,45$  és  $2,40 \pm 0,92$  voltak. A legmagasabb T/M értékeket a kontroll csoportban kaptuk, ennél szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) alacsonyabb értékeket láttunk a bestatin- és actinonin- kezelt csoportokban.

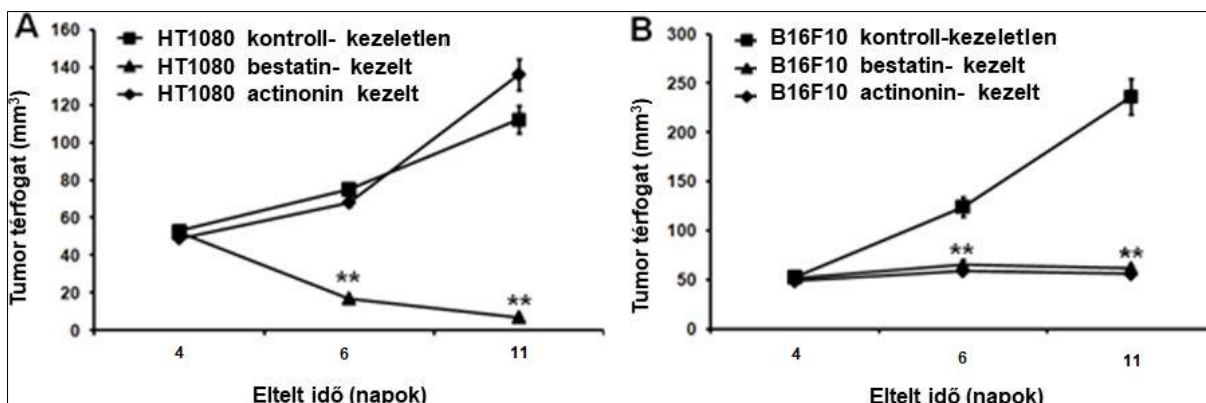


19. ábra: Kontroll- kezeletlen, valamint actinonin- és bestatin- kezelt subcutan B16F10 tumoros állatok ex vivo szervi megoszlásos vizsgálata <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR)-rel (A). B: Kontroll, actinonin- és bestatin- kezelt állatok tumorainak T/M (tumor ID%/g/izom ID%/g) értékei. Szignifikancia szintek:  $p \leq 0,01$  (\*\*).

#### 4.8.3 Az actinonin és bestatin hatására bekövetkező térfogatbeli változások vizsgálata

Négy nappal a HT1080 és B16F10 tumorok indukcióját követően 7 napon keresztül napi egyszeri intraperitoneális actinonin vagy bestatin kezelést kaptak az állatok. A tumorok <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) felvétele mellett azok méretbeli változását is nyomon követtük. Azt találtuk, hogy a kontroll- kezeletlen HT1080 tumoros állatok tumorának mérete a 4. napon  $53,2 \pm 2,3 \text{ mm}^3$  volt, a 6. napon  $75,2 \pm 3,5 \text{ mm}^3$  volt, a 11. napon pedig  $112 \pm 7,36 \text{ mm}^3$  volt. Ehhez hasonló tumorméreteket tapasztaltunk az actinonin- kezelt csoportnál is, ahol a 4., 6. és 11. napi tumortérfogatok  $49,1 \pm 2,0 \text{ mm}^3$ ;  $68,08 \pm 2,5 \text{ mm}^3$  és  $136,0 \pm 8,5 \text{ mm}^3$  voltak. A kontroll tumorokhoz képest szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) kisebb tumorméreteket mértünk a bestatin- kezelt csoportban, ahol a 4. napon  $52,3 \pm 2,8 \text{ mm}^3$  volt, a 6. napon  $17,0 \pm 1,2 \text{ mm}^3$  volt, és a 11. napon  $7,0 \pm 2,0 \text{ mm}^3$  volt a tumortérfogat (20. ábra/A). A subcutan B16F10 tumoros állatok közül az actinonin- és bestatin- kezelt tumorok méretbeli növekedése elhanyagolható volt. A bestatin- kezelt csoportban a 4, 6. és 11. napon mért tumorméret  $52,1 \pm 2,6 \text{ mm}^3$ ;  $65,0 \pm 5,2 \text{ mm}^3$  és  $62,0 \pm 2,8 \text{ mm}^3$  volt. Az actinonin- kezelt csoportban a 4. napon mért tumorméret  $49,0 \pm 2,7 \text{ mm}^3$ , a 6. napon  $59,0 \pm 4,9 \text{ mm}^3$ , végül a 11. napon  $56,1 \pm 2,1 \text{ mm}^3$  volt.

Ezzel szemben a kontroll- kezeletlen B16F10 tumorok jelentősen növekedtek a 11. napra (20. ábra/B).

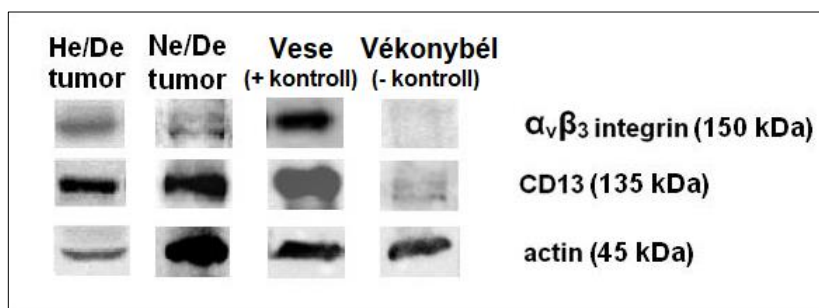


20. ábra: A bestatin és actinonin kezelés hatása a tumorok méretére. A kezelések a tumoros sejtek injektálását követő 4. napon kezdődtek, a tumorok 52- 55 mm<sup>3</sup>-es méreténél. A: subcutan HT1080 tumorok növekedése, B: subcutan B16F10 tumorok növekedése.

Szignifikancia szint:  $p \leq 0,01$ .

#### 4.9 Western blot analízis

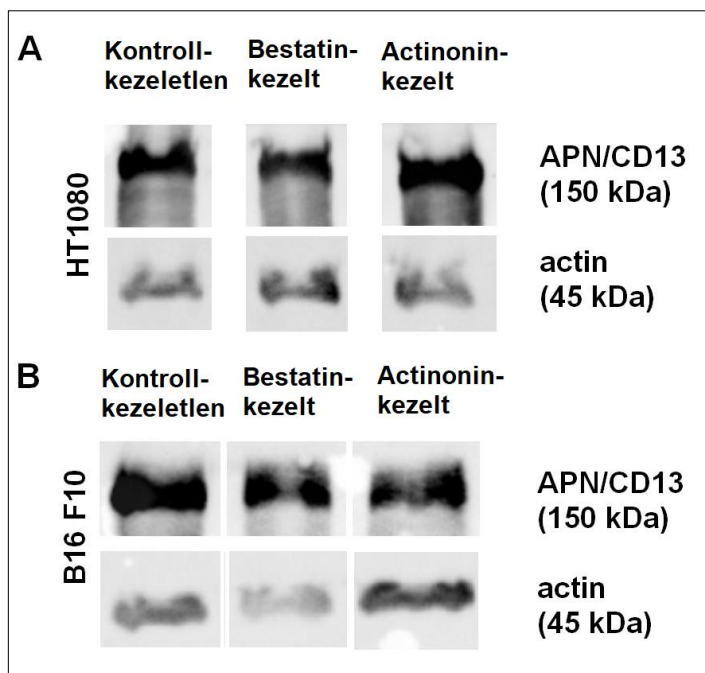
A subcutan He/De és Ne/De tumor  $\alpha_v\beta_3$  és APN/CD13 expresszióját (21. ábra), valamint a HT1080 és B16F10 tumorok APN/CD13 expresszióját (22. ábra) western blot vizsgálattal igazoltuk. A subcutan He/De és Ne/De tumorban a két vizsgált angiogenikus marker közül az APN/CD13 expresszió erősebb pozitivitást mutatott, mint az  $\alpha_v\beta_3$  (21. ábra).



21. ábra: He/De és Ne/De tumorok  $\alpha_v\beta_3$  és APN/CD13 expressziójának vizsgálata western blot analízissel

A kezeletlen, valamint actinonin- és bestatin-kezelt HT1080 és B16F10 tumorok APN/CD13 expresszióját is vizsgáltuk western blot analízissel (22. ábra). Szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a kontroll és kezelt HT1080 tumorminták (22. ábra/A) APN/CD13

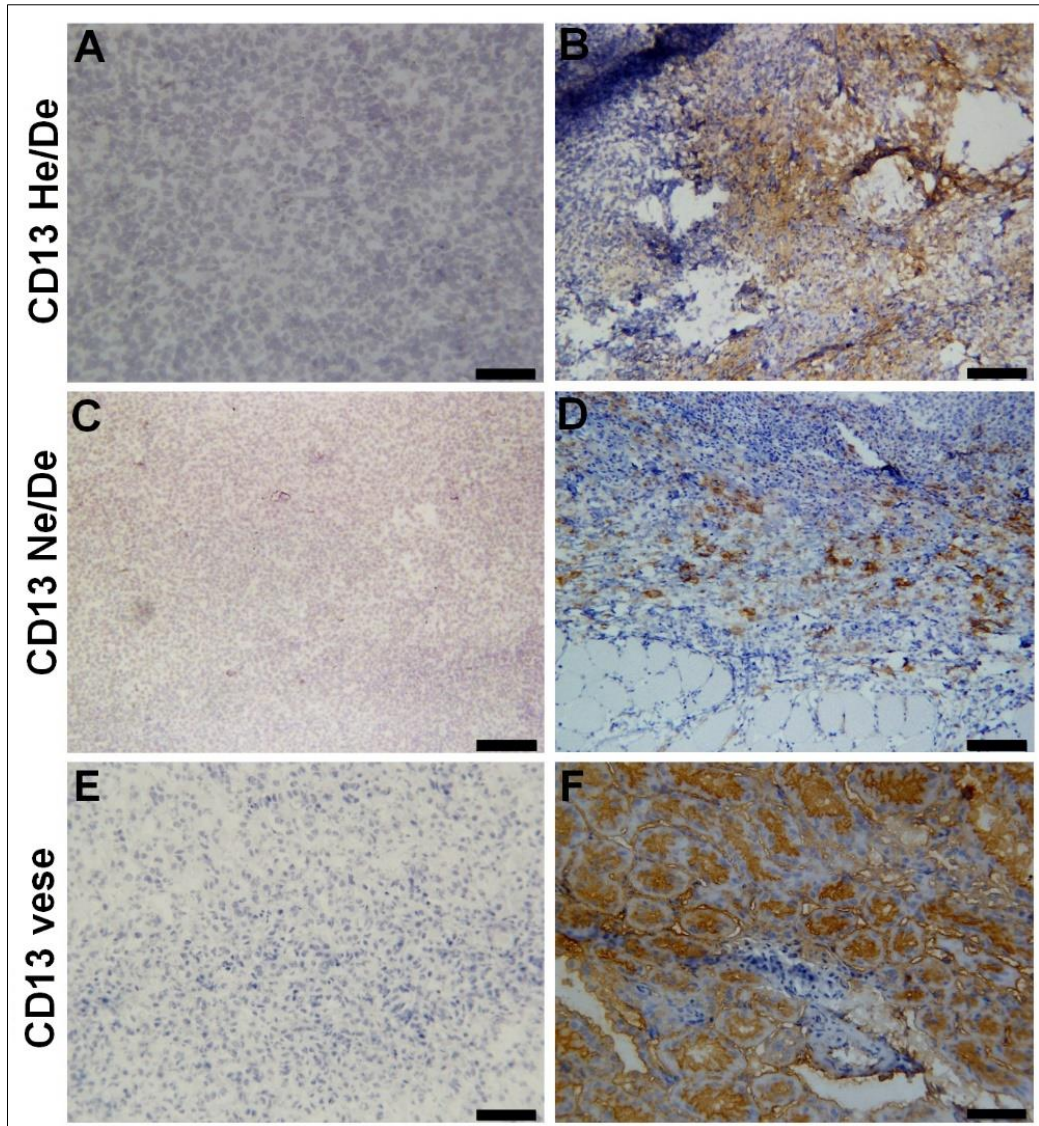
proteintartalma között. A kontroll B16F10 tumorok (22. ábra/B) APN/CD13 fehérje expressziója azonban szignifikánsan magasabb volt, mint az actinonin vagy bestatin kezelt B16F10 tumor mintáké.



22. ábra: Subcutan HT1080 (A) és B16F10 (B) tumorok APN/CD13 expressziójának western blot vizsgálata.

#### 4.10 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A He/De és Ne/De tumorok APN/CD13 expresszióját immunhisztokémiai vizsgálatokkal is igazoltuk. Pozitív kontrollként patkány vesét alkalmaztunk. A 23. ábrán látható He/De és Ne/De tumorok erős, bár elszórt pozitivitása (barna festődés) a tumorok teljes területén, mely a PET képeken látható heterogén radiotracer felvétellel korrelál. Ez az eredmény is alátámasztja a  $^{68}\text{Ga}$  jelölt c(NGR) származékok erős kötődési affinitását az APN/CD13 molekulához a He/De és Ne/De tumorokban.



23. ábra: Subcutan He/De (B) és Ne/De(D) kémiaailag indukált patkány tumorok immunhisztokémiai vizsgálata 11 nappal a tumorok indukcióját követően. Pozitív kontrollként patkány vese (F) került felhasználásra. Az anti-CD13 primer antitest láthatóvá tételéhez 3,3-diaminobenzidint (DAB) (barna festődés) alkalmaztunk. Negatív kontrollként (A, C, E) primer antitest jelenléte nélkül, csak DAB hozzáadása történt. Nagyítás: 20x, szeletvastagság: 200  $\mu$ m.

## 5. Megbeszélés

A daganatok hypoxiája és angiogenezise egy intenzíven kutatott terület a klinikai és preklinikai PET képalkotás és radiogyógyszer fejlesztés területén. A daganaton belüli hypoxia jelentősen befolyásolja a sugár- és kemoterápiával szembeni ellenállóképességet, továbbá, a hypoxia gyakran a neoangiogenikus molekulák (pl. VEGF, APN/CD13) expressziójának beindításáért is felelős (Liu és mtsai., 2009). A daganatokon belüli új ér képződésének kiemelt szerepe van a tumor növekedésében, a tumor progressziójában, áttétképzésében és az anti-angiogenikus molekulákon alapuló daganatellenes terápiák hatékonyságában (Otsuki és mtsai., 2018; Zheng és mtsai., 2017; Zou és mtsai., 2012). A humán klinikai rutinképalkotás során az  $^{18}\text{F}$ FDG-t,  $^{18}\text{F}$ -FLT-t vagy a  $^{11}\text{C}$ -metionint alkalmazzák a daganatok és áttétek kimutatására, azonban ezek a molekulák nem specifikusak sem hypoxiára, sem pedig az angiogenikus markerek vizsgálatára, továbbá, kevésbé alkalmasak a specifikus daganatellenes (pl. daganat érképződését gátló) terápia hatékonyságának követésére (Gao és mtsai., 2017). Továbbá, az  $^{18}\text{F}$ FDG-ről ismert, hogy kevésbé dúsul pl. jól differenciált hepatocelluláris daganatokban, így diagnosztikus értéke ezekben a daganattípusokban csekély (Gao és mtsai., 2017). Ezen tények miatt növekszik az igény a daganatok angiogenikus markereire specifikus radiofarmakonok fejlesztése iránt. Az angiogenezis, vagyis új ér képződésének folyamatának egyik kulcsfontosságú molekulája az APN/CD13. Ismert, hogy számos malignus szolid tumorban nagy mennyiségben expresszálódik (Wickström és mtsai., 2011), mely összefüggésben van a prognózissal (Schreiber és mtsai., 2018), diagnosztikus marker és potenciális célpont a daganatellenes terápiában. Az APN/CD13 molekulák ligandjai a 3 aminosavból álló NGR peptidszekvenciák, melyeket megfelelő kelátorral konjugálva és pozitronsugárzó izotóppal jelölve olyan PET radiotraceret kapunk, melyek alkalmasak lehetnek az APN/CD13- t expresszáló daganatok PET diagnosztikájára. Ezen felül alkalmasak lehetnek a daganatok érképződését célzó anti-angiogenikus terápiák hatékonyságának követésére is.

Dolgozatomban három vizsgálatsorozat került bemutatásra. Az első fázisban a hypoxia-angiogenezis közötti kapcsolat vizsgálata történt kémiai indukált, patkány eredetű He/De (hepatocelluláris carcinoma) daganaton, melynek során  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazolt alkalmaztunk a hypoxia- és  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub>-t, valamint  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-t injektáltunk a neoangiogenezis kimutatására, követve velük a tumor méretbeli változását. Az

*in vivo* PET/MRI képalkotás mellett *ex vivo* szervi megoszlásos és western blot vizsgálatokat is végeztünk.

A kutatómunka második fázisában hepatocelluláris carcinoma (He/De) és mesoblastos nephroma (Ne/De) sejtekkel subcutan transzplantált F-344 patkányokon vizsgáltuk a <sup>68</sup>Ga-al jelzett négy különböző c(NGR) származék APN/CD13 specificitását *in vivo* PET/MRI képalkotással, melyet *ex vivo* szervi megoszlásos és immunhisztokémiai vizsgálatokkal is kiegészítettünk.

Végül, a kutatómunka harmadik részében két APN/CD13 gátlószer, az actinonin és a bestatin terápiás hatását követtük <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR)-rel subcutan HT1080-al transzplantált CB17 SCID és B16F10-el subcutan transzplantált C57BL/6 egereken. Az *in vivo* PET képalkotás mellett szervi megoszlásos *ex vivo* vizsgálatokat, valamint western blot vizsgálatokat is végeztünk.

A kutatómunka során kapott új eredmények:

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

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

A kutatómunka első fázisában első lépésként a He/De tumorok hypoxiás területeit azonosítottuk *in vivo* PET képalkotással. Jól ismert, hogy a parciális oxigéntenzió ( $p\text{O}_2$ ) csökkenésével hypoxiás területek jelennek meg a tumoron belül, ami a nitroimidazol és származékainak feldúsulását okozza a hypoxiás tumorsejtekben. A He/De tumorok transzplantációját követő 10. napon már magas  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvételt tapasztaltunk a subcutan He/De tumorok  $125\text{ mm}^3$ -es méreténél. Továbbá, a 11. naptól kezdve egyértelműen elkülöníthetőek voltak a hypoxiás ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol avid) és normoxiás ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol nem avid) régiók, melyet az avid területek szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) magasabb SUV értékei is alátámasztottak (9. ábra). Ezt a fajta heterogenitást más kutatócsoportok is leírták, ők azt találták, hogy az egész tumor akár 50-60%-át is kitehetik a hypoxiás területek (Lapi és mtsai., 2009; Sutherland és mtsai., 1996). Továbbá, a He/De tumorok *in vivo* PET vizsgálatainál APN/CD13 és  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor expressziót vizsgáltunk a korábban említett radioaktívan jelzett NGR és RGD származékokkal. Más szerzők publikációiból ismert, hogy az APN/CD13 és az  $\alpha_v\beta_3$  integrin molekulák receptorként funkcionálnak és nagy mennyiségben kifejeződnek az endothél sejtek felszínén. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az NGR peptidszekvenciák az APN/CD13-hoz, míg az RGD molekulák az  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorokhoz specifikusan kötődnek, továbbá a  $^{68}\text{Ga}$ -al jelölt NGR és RGD szekvenciák alkalmas radiotracerek az angiogenezis *in vivo* PET vizsgálatára (Shao és mtsai., 2014a; Buehler és mtsai., 2006; Máté és mtsai., 2015; Satpati és mtsai., 2018). Kutatócsoportunk korábbi publikációjában (Máté és mtsai., 2015), primer

vesetumorban (He/De) szignifikánsan magasabb tracerfelvételt írtunk le  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR)-rel, mint a kereskedelemben kapható  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA [c(RGD)]<sub>2</sub>-vel. A jelenlegi munkában leírt hepatocelluláris carcinoma modellben szintén megfigyelhető volt ez a típusú különbség a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA [c(RGD)]<sub>2</sub> halmozásának mértéke között (6. és 7. ábra). Ennek oka a He/De tumorokban magasabb mértékben kifejeződő APN/CD13 molekula, melyet western blot vizsgálattal támasztottunk alá (21. ábra). A subcutan He/De tumorokban erős heterogenitás volt megfigyelhető a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és a  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-[c(RGD)]<sub>2</sub> felvételt illetően, hasonlóan a hypoxia vizsgálatokhoz, az angiogenezis vizsgálatát célzó radiotracerekkel is megkülönböztethetőek voltak tracer avid és nem avid régiók. Az angiogenikus fenotípus rendkívül változatos lehet egy tumoron belül, melyet a hypoxia és a tumor asszociált gyulladási folyamatok (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-6) jelentősen befolyásolhatnak. Mindezen tényezők a genetikai instabilitással együtt egy abnormális, heterogén angiogenezist generálnak (Cao és mtsai., 2009). A tumornövekedést nagyban befolyásolja az oxigén és tápanyag ellátás. Csökkent oxigénellátás (hypoxia) esetén HIF transzkripciós faktorok aktiválódnak, melyek olyan gének expresszióját indukálják, melyek a tumor túléléséért és progressziójáért felelősek. A hypoxia és a HIF indukálta folyamatok egyike a tumorok neoangiogenezise (Krock és mtsai., 2011). Kísérleteink alapfeltevése az volt, hogy a hypoxiás és az angiogenikus területek együtt növekednek a tumor térfogatának növekedésével. A feltevésünk igazolódott, mikor azt láttuk, hogy a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) és a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvétel emelkedett és erős korrelációt mutatott a tumor térfogatának növekedésével (11. ábra/G és H). Továbbá, azt is feltételeztük, hogy a hypoxia fokozódásával az angiogenezis mértéke növekszik és következményesen a tumor mérete is nő. Ezt a feltételezést indirekt módon megerősítette az a tény, hogy a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazol felvétel fokozódásával erősen korrelált a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) halmozódás is a He/De tumorban (11. ábra/I). A hypoxia és az angiogenezis kapcsolatát már más munkacsoportok is vizsgálták. Egy általános nézet szerint a hypoxia következménye az angiogenezis, hiszen ilyenkor az oxigén iránti igény fokozódik, melynek eredményeképpen új erek alakulnak ki (Koh és mtsai., 2011; Michiels, 2004; Naumov és mtsai., 2006; Ziyad és mtsai., 2011). Azonban más betegségekkel (máj fibrózis, sebgyógyulás) kapcsolatban megállapították, hogy a hypoxia és az angiogenezis közötti kapcsolat nem ilyen egyértelmű, sokkal bonyolultabb, mint ahogyan azt korábban gondolták. Valójában a hypoxia lehet a szövetek károsodásakor ok, de lehet következmény is. A hypoxia nem csak a csökkent vérrellátás eredménye, hanem sokszor inkább a proliferáció és a gyulladási válaszok által indukált folyamat (Aguilar-Cazares és mtsai., 2019; DiPietro, 2016; Elpek, 2015). A

tumorokban a hypoxia kialakulhat anélkül is, hogy bármilyen köze volna az oxigén ellátáshoz. Az oxigén felhasználása az eredeti állapot ötszörösére emelkedik fokozott proliferációkor, következésképpen a hypoxia indukálta angiogenezis már kis tumorméretnél is bekövetkezhet. A kb. 100 sejtből álló kisméretű tumorok angiogenezist képesek indukálni a csökkent parciális oxigéntenzióval, mely a fokozott oxigénfogyasztás következtében alakul ki. Kísérletünk első fázisában azt figyeltük meg, hogy a hypoxiás területek már kis tumorméretnél láthatóak a He/De tumorokban  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Nitroimidazollal végzett PET/MRI képalkotással (11. ábra). Összefoglalva tehát elmondható, hogy a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR) nem csak a Ne/De tumorok (Máté és mtsai., 2015), hanem a He/De tumorok APN/CD13 expressziójának kimutatására is alkalmas radiotracer. Az APN/CD13 és hypoxia specifikus radiofarmakonok jelentősen hozzájárulnak a hypoxia és az angiogenezis kapcsolatának jobb megértéséhez a tumorokban. Ebből kifolyólag az angiogénikus molekulák *in vivo* detektálása – melyek potenciális terápiás célpontok-, valamint a tumor növekedése során ezek expressziójának változásának követése, kulcsfontossággal bírnak a daganatellenes terápiák fejlesztése során.

A kutatómunkánk második felében hepatocelluláris carcinoma (He/De) és mesoblastos nephroma (Ne/De) sejtekkel subcutan transzplantált és egészséges, kontroll patkányokon vizsgáltuk az intravénásan injektált  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG1) vagy  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) radiotracerek *in vivo* és *ex vivo* eloszlását, azok APN/CD13 specificitását. Az irodalomból már ismert, hogy az aszparagin-glicin-arginin peptidszekvenciák specifikusan kötődnek az APN/CD13 molekulához, ennek okán számos tanulmányban leírták a különböző pozitronsugárzó izotópokkal (pl.:  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ) jelzett NGR származékok alkalmasságát a daganatok APN/CD13 expressziójának és a neovascularizáció *in vivo* vizsgálatára (Máté és mtsai., 2015; Shao és mtsai., 2014a, 2014b; Zhang és mtsai., 2014). A c[KNGRE]-NH<sub>2</sub> esetében-ahol a targetáló rész rendkívül jó kémiai inertséggel jellemezhető- egy kelátor csere történt. A keletkező NODAGA-c(NGR) minden alegysége megegyezik a referenciaként említett NOTA-c(NGR)-rel, kivéve az aromás gyűrű hiányát és az eltérő kelátorral való kötést. Ennek nyomán azt feltételeztük, hogy a hidrofil-lipofil tulajdonságok megtartása mellett, nagyon hasonló tulajdonságokkal jellemezhető a két radiotracer. Továbbá, két tioéter ciklizált c(NGR) származék NODAGA kelátorral való konjugálása is megtörtént, ami egy tiourea kötést és egy extra aromás gyűrűt eredményezett, amivel az analógok hidrofil tulajdonságaik a referencia vegyülethez hasonlóan megmaradtak. Az MG1 és MG2 analógok szerkezetüket tekintve csupán egy metil csoportban különböznek egymástól. Az *in vitro* lipofilicitási vizsgálatok azt

mutatták, hogy az újonnan szintetizált  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) származékok mindegyike nagy hidrofilitással jellemezhető (a LogP értékek -2,2 és -4,1 közöttiek). Ezt a megfigyelést a kontroll F-344 patkányokon elvégzett *in vivo* PET és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok is alátámasztották, hidrofíl tulajdonságaik révén a vizeletelvezető rendszeren keresztül ürülnek és viszonylag alacsony felvétel tapasztalható a hasi és mellkasi szervekben (12. ábra). A  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(NGR) (MG2) relatív magasabb máj-, lép- és tüdőbeli halmozása, a többi farmakonhoz képest kisebb hidrofilitásából eredhet. Az NGR alapú radiotracer alacsony hasi régióbeli halmozódását más munkacsoportok is leírták, például  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NGR (Zhang és mtsai., 2014),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-NGR (Satpati és mtsai., 2018) és  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-NGR (Shao és mtsai., 2014a, 2014b) radiotracer esetében. Az egészséges szervekbeli alacsony radiotracer halmozódás a képminőséget is javítja, hiszen alacsony háttéraktivitással magas tumor-háttér (pl. izom) arány érhető el, mely megkönnyíti a képek értékelését és a tumorok identifikálását leletezés során. Azt azonban érdemes megjegyezni, hogy az NGR molekulához konjugált kelátorok eltérő szerkezetükből és fizikokémiai tulajdonságukból adódóan (pl.: HBED-CC, NOTA, NODAGA) kedvezően befolyásolják a radiogyógyszerek halmozódását a vizsgált szervekben (Satpati és mtsai., 2018; Trencsényi és mtsai., 2017).

A vizsgálatsorozat második felében subcutan He/De és Ne/De daganatos F-344 patkányokon vizsgáltuk a négy c(NGR) származék APN/CD13 specificitását, ahol a tumorok mind a négy APN/CD13 receptor kimutatását célzó radiotracerrel beazonosíthatóak voltak, azonban halmozásuk mértéke eltérő volt. Összességében azt figyeltük meg, hogy a NOTA és NODAGA kelátorokkal konjugált c(NGR) molekulák magasabb akkumulációt mutattak a He/De és Ne/De tumorokban a NODAGA konjugált MG1 és MG2 molekulákhoz viszonyítva (4. és 5. táblázat). A négy analóg közötti különbség eredhet a kémiai tulajdonságaikból (pl. az MG1 alacsonyabb stabilitása és az MG2 gyengébb kötési képessége), továbbá, annak ellenére, hogy azonos méretű tumorokat vizsgáltunk, jól ismert, hogy az angiogenikus markerek expressziós szintje változik a tumor növekedésével, fokozódhat különböző tumortípusokban és erősen függ a hypoxia jelenlététől és annak fokától (Deshpande és mtsai., 2011). Az *in vivo* és *ex vivo* blokkolási kísérleteinkben jelöletlen c(NGR) molekulát injektáltunk 5 perccel a  $^{68}\text{Ga}$  jelzett c(NGR) származékok injektálása előtt, ami szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) csökkentette mind a két tumorban a radiotracer felvételét (14. és 15. ábra), csakúgy, mint a más szerzők által leírt humán xenograft modellekben (Satpati és mtsai., 2018; Shao és mtsai., 2014a, 2014b; Zhang és mtsai., 2014). Ezek a blokkolási eredmények azt mutatják, a  $^{68}\text{Ga}$  jelzett c(NGR) származékok specifikusan az APN/CD13 molekulákhoz kötődnek hozzá. A He/De

és Ne/De tumorok APN/CD13 expresszióját western blot vizsgálattal és immunhisztokémiával igazoltuk. A neoangiogenezist célzó markerek közül az APN/CD13 egy ígéretes target a PET képalkotás területén, azonban a megfelelő <sup>68</sup>Ga jelölt NGR alapú radiotracerek (jelen esetben a legjobb kötési tulajdonságokkal jellemezhető <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR) és <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) elengedhetetlenek a tumorok neoangiogenezisének pontos kimutatására és a daganatok érképződését gátló terápiák hatékonyságának követésére.

Kísérleteink utolsó fázisában az actinonin és bestatin, mint APN/CD13 gátlószer terápia hatását követtük <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR)-rel. Az APN/CD13 gátlószernek két csoportja ismert, a többnyire bakteriális eredetű természetes- és a szintetikus gátlószer. Dolgozatomban a természetes eredetű gátlószer családjába tartozó két inhibitorral, a *Streptomyces olivoreticuli*-ből származó bestatinnal és a *Streptomyces Cutter C/2*-ből izolált actinoninnal (Bauvois és mtsai, 2006) dolgoztunk. A gátlószer hatását HT1080 és B16F10 tumorokon vizsgáltuk, melyekről korábbi publikációkban western blot, immunhisztokémia, immunfluoreszcencia, áramlási cytometria és RT-PCR módszerek segítségével bizonyítást nyert APN/CD13 pozitivitásuk (Guzman- Rojas és mtsai., 2012; Shim és mtsai., 2003; Saiki és mtsai., 1993; von Wallbrunn és mtsai., 2008). Az *in vivo* vizsgálati eredményeink jól korreláltak ezekkel az *in vitro* eredményekkel, hiszen a kontroll- kezeletlen állatok HT1080 és B16F10 tumorai jól láthatóak voltak a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR)-rel végzett PET képeken. Következő lépésként az actinonin és bestatin kezelések következtek subcutan HT1080 és B16F10 tumorokon, melyek hatását szintén <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR)-rel követtük. Xu és munkatársai (1998) korábban már vizsgálták az actinonin hatását humán (HL60, NB4) és egér (AKR) leukémia és lymphoma (RAJI, DAUDI) sejtvonalakon. Az *in vitro* vizsgálatokban az actinonin gátolta mind az APN pozitív, mind az APN negatív sejtvonalakat. A szerzők azt feltételezték, hogy az actinonin hatása nem csak az APN/CD13 direkt gátlásán keresztül következik be. Az *in vivo* vizsgálatokban szingenikus AKR tumorral transzplantált egereken vizsgálták a gátlószer hatását 5 mg/kg-os dózírálásban. Teljes tumornövekedést gátló hatást értek el ezzel a dózírálással, azonban a humán lymphomák esetében ez a hatás elmaradt. Az általunk végzett *in vivo* vizsgálatokban azt tapasztaltuk, hogy a HT1080 tumorok APN/CD13 expressziója nem csökkent a kezelés hatására (16. ábra). Ezzel szemben a subcutan transzplantált B16F10 tumorokban jelentősen csökkent a tumorok mérete és radiotracer felvétele a kontroll- kezeletlen tumorhoz viszonyítva (18. ábra). Ahogyan Xu és munkatársai (1998) is említették, egy lehetséges magyarázat erre az, hogy ezek az APN gátlószer (mint az actinonin és a bestatin) immunmodulátorként működhetnek. Ebből következik, hogy a

HT1080-al subcutan transzplantált T és B sejt hiányos CB17 SCID egerekben nem várható az actinonin immunmoduláns hatása. Egy másik lehetséges magyarázat a kapott eredményre a dozírozás. Az 5 mg/kg-os dozírozás elegendőnek bizonyult a szingenikus egér leukémiák növekedésének gátlására, de a humán fibrosarcománál nem hozta az elvárt tumorellenes hatást. Következésképpen elmondható, hogy a különböző tumorok actinoninra való érzékenysége eltérő, így további dózisfüggő vizsgálatok szükségesek. A bestatinnal végzett gátló vizsgálatoknál azt találtuk, hogy ez a természetes APN/CD13 inhibitor mind a két daganattípusnál hatásosnak bizonyult (16., 18. és 20. ábra). A bestatin kezelt HT1080 és B16F10 tumorok APN/CD13 expressziója, <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) felvétele és a tumorok mérete jelentősen csökkent a kezelés hatására. Az APN/CD13 megtalálható számos tumoron és immun sejten (pl.: T és B sejt prekurzorok, monocyták, dendritikus sejtek) (Mina- Osorio, 2008; Lendeckel és mtsai., 2000). Ebből következik, hogy a bestatin direkt módon képes gátolni a tumorok növekedését és angiogenezisét az APN/CD13 blokkolása révén, valamint tumorellenes immunválaszt is képes generálni. Fokozza a sejt mediált immunitást azáltal, hogy blasztogén hatást fejt ki a T sejtekre (Talmadge és mtsai., 1986; Saito és mtsai., 1978; Ishizuka és mtsai., 1980) és makrofágokat aktivál (Talmadge és mtsai., 1986; Ishizuka és mtsai., 1980). Ishizuka és munkatársai (1980) publikálták, hogy magas dózisban a bestatinnak mitogén hatása van a B sejtekre. Továbbá, facilitálja a T sejt prekurzorok CD4+ T<sub>helper</sub> sejtté való differenciációját (Wakabayashi és mtsai., 1991). Abe és munkacsoportja (1985) arról számolt be, hogy a bestatin aktiválja a csontvelő őssejtjeit, így hatékonyan gátolhatja a tumorok növekedését egyéb citotoxikus szerekkel együtt. Amoscontó és munkatársai (1994) publikációjukban említették, hogy a bestatin a beadás módjától és dózisától függően képes gátolni vagy fokozni az NK sejtek (CB17 SCID és C57BL/6 egerek is rendelkeznek vele) aktivitását. Ez lehet a magyarázat arra, hogy a bestatin kifejtette tumorellenes hatását az immunrendszerrel nem rendelkező HT1080 subcutan tumoros CB17 SCID és subcutan B16F10 tumoros C57Bl/6 egerekben is. Összefoglalva tehát elmondható, hogy a <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) alkalmas radiotracer subcutan HT1080 és B16F10-el transzplantált egerekben az actinonin és bestatin- mint APN/CD13 gátlószerek- terápiás hatásának követésére.

A PET képalkotás területén ígéretes célpontnak bizonyul az APN/CD13 molekula, mely expressziójáról a pozitronemittáló izotóppal jelölt NGR peptidszekvenciák adnak információt, mind a tumorok diagnosztikája során, mind a daganatellenes terápiák hatékonyságának követésében.

## 6. Összefoglalás

Az angiogenezis, egy már létező érből történő új ér képződésének folyamata, mely általános értelmezés szerint a csökkent oxigénellátottság (hypoxia) következménye. Azonban a folyamat már kis tumorméretnél, normál oxigén ellátásnál is megjelenik, összefüggésben a fokozódó proliferációval. Az angiogenezis folyamatában kiemelkedő fontosságú az APN/CD13 molekula, mely enzim, receptor és szignalizációs molekula is egyben. Számottevő mennyiségű tumoros sejt expresszálja a felszínén, melyek vizsgálatát lehetővé teszik az APN/CD13-hoz specifikusan kötődő és pozitron emittáló izotóppal jelzett NGR szekvenciák. Kutatómunkánk első lépésében a hypoxia és angiogenezis összefüggését vizsgáltuk He/De tumorokon angiogenezis ( $^{68}\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2 [\alpha\upsilon\beta_3]$ ) és  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  [APN/CD13]) és hypoxia ( $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazol}$ ) tracerekkel. A tumorok méretének növekedésével korrelált mind a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ , mind pedig a  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazol}$  felvétel, továbbá, a két radiotracer felvétele egymással is korrelációt mutatott. Az említett radiofarmakonok segíthetnek megérteni a daganatokban zajló hypoxia és angiogenezis közötti összefüggéseket. A kutatómunka második lépésében 4 különböző APN specifikus tracer vizsgálatát végeztük kontroll és He/De, valamint Ne/De tumoros patkányokon. Mind a négy APN/CD13-t célzó radiofarmakon a vizeletelvezető rendszeren keresztül ürült ki a kísérleti állatok szervezetéből. A négy  $^{68}\text{Ga}$  jelzett NGR származék alacsony háttérbeli halmozásuknak köszönhetően alkalmas volt a He/De és Ne/De tumorok kimutatására, azonban halmozásuk mértékében mutatkoztak különbségek. A daganatok diagnosztikájára a  $^{68}\text{Ga-NOTA-c (NGR)}$  és a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  bizonyult a legmegfelelőbbnek. A vizsgálatsorozat utolsó harmadában az APN/CD13 receptort gátló szerek terápiás hatékonyságát követtük  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  radiotracerrel. A kontrollkezeletlen subcutan HT1080 és B16F10 tumorok detektálására alkalmas volt a  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ . Az actinonin hatékony APN/CD13 gátlószernek bizonyult a subcutan B16F10 tumoroknál, azonban a HT1080 tumorok növekedését és angiogenezisét nem tudta megállítani. A bestatin mind a subcutan HT1080, mind a B16F10 tumorok növekedését és angiogenezisét gátolta, mely a csökkent  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  felvételben és a tumorok méretének csökkenésében nyilvánult meg. A dolgozatban bemutatott radiofarmakonok lehetőséget biztosítanak a tumorok angiogenezisének *in vivo* vizsgálatára PET képalkotással, valamint alkalmas tracerek az APN/CD13-at célzó daganatellenes terápiák hatékonyságának követésére is.

## 7. Summary

Angiogenesis is the process of the formation of new blood vessels from a pre-exist vessel. In general view angiogenesis is the result of the reduced oxygen supply (hypoxia). However, this process may appear in small tumor volume and normal oxygen supply, connected with the augmentative proliferation. In angiogenic process APN/CD13 is an important molecule, which has three main functions, such as enzyme, receptor and signaling molecule. Several solid tumors expresses APN/CD13 on the cell surface, which can be visualised by APN/CD13 specific and positron isotope labeled NGR sequences. In first part of our research work the relationship between angiogenesis and hypoxia was investigated in subcutan He/De tumor bearing animals using angiogenesis ( $^{68}\text{Ga-NODAGA-[c(RGD)]}_2$  [ $\alpha_v\beta_3$ ] and  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  [APN/CD13]) and hypoxia ( $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazole}$ ) specific tracers. Strict correlation was seen between tumor volume and  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  uptake as well as tumor volume and  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazole}$  uptake, moreover  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  and  $^{68}\text{Ga-DOTA-Nitroimidazole}$  uptake correlated well with each other. The hypoxia- and angiogenesis- specific radiotracers may help to better understand the correlation between hypoxia and angiogenesis. In the second part of our research, four  $^{68}\text{Ga}$  labeled c(NGR) derivatives were compared in control and tumor bearing (He/De, Ne/De) animals using PET/MRI imaging. All of the investigated radiotracers excreted through the urinary system of the control animal's body. The four c(NGR) derivatives showed low accumulation in background organs and high accumulation in He/De and Ne/De tumors, however the degree of the accumulation was different.  $^{68}\text{Ga-NOTA-c(NGR)}$  and  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  showed the most ideal properties for diagnostic imaging. In our preclinical studies the last step was the investigation of APN/CD13 inhibitors efficiency on HT1080 and B16F10 tumors using  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$ .  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  was a convenient radiotracer to identify control-untreated subcutan HT1080 and B16F10 tumors. Actinonin was efficiently inhibited the tumor enlargement and the  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  uptake in B16F10 tumors, at the same time it was ineffective on HT1080 tumors. Bestatin- the other APN/CD13 inhibitor- succesfully inhibited the tumor growth and angiogenic process in both of the HT1080 and B16F10 tumors, which were manifested in reduced  $^{68}\text{Ga-NODAGA-c(NGR)}$  uptake and shrunken tumor volumes. All of the demonstrated radiotracers are applicable tools in APN/CD13 expressing tumors diagnosis and in following of anti-APN/CD13 therapy's efficiency.

## 8. Irodalomjegyzék

Abe F, Shibuya K, Ashizawa J, Takahashi K, Horinishi H, Matsuda A, Ishizuka M, Takeuchi T, Umezawa H. Enhancement of antitumor effect of cytotoxic agents by bestatin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1985; 38(3):411-4. doi: 10.7164/antibiotics.38.411.

Aguilar-Cazares D, Chavez-Dominguez R, Carlos-Reyes A, Lopez-Camarillo C, Hernandez de la Cruz ON, Lopez-Gonzalez JS. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front Oncol*. 2019; 9:1399. doi: 10.3389/fonc.2019.01399.

Amoscato AA, Spiess RR, Brumfield AM, Herberman RB, Chambers WH. Surface aminopeptidase activity of rat natural killer cells. I. Biochemical and biological properties. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1221(3):221-32. doi: 10.1016/0167-4889(94)90244-5.

Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*. 1998; 279(5349):377-80. doi: 10.1126/science.279.5349.377.

Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varnier JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(8):604-17. doi: 10.1038/nrc2353.

Bauvois B. Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene*. 2004; 23(2):317-29. doi: 10.1038/sj.onc.1207124.

Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev*. 2006; 26(1):88-130. doi: 10.1002/med.20044.

Bellacn K, Lewis EC. Aortic ring assay. *J Vis Exp*. 2009; (33):1564. doi: 10.3791/1564.

Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood*. 2001; 97(3):652-9. doi: 10.1182/blood.v97.3.652.

Bhagwat SV, Petrovic N, Okamoto Y, Shapiro LH. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood*. 2003; 101(5):1818-26. doi: 10.1182/blood-2002-05-1422.

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal

keratinocytes during wound healing. *J Exp Med.* 1992; 176(5):1375-9. doi: 10.1084/jem.176.5.1375.

Buehler A, van Zandvoort MA, Stelt BJ, Hackeng TM, Schrans-Stassen BH, Bennaghmouch A, Hofstra L, Cleutjens JP, Duijvestijn A, Smeets MB, de Kleijn DP, Post MJ, de Muinck ED. cNGR: a novel homing sequence for CD13/APN targeted molecular imaging of murine cardiac angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(12):2681-7. doi: 10.1161/01.ATV.0000245807.65714.0b.

Caley MP, Martins VL, O'Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015; 4(4):225-234. doi: 10.1089/wound.2014.0581.

Cao M, Liang Y, Shen C, Miller KD, Stantz KM. Developing DCE-CT to quantify intra-tumor heterogeneity in breast tumors with differing angiogenic phenotype. *IEEE Trans Med Imaging.* 2009; 28(6):861-71. doi: 10.1109/TMI.2008.2012035.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9(6):653-60. doi: 10.1038/nm0603-653.

Chang YW, Chen SC, Cheng EC, Ko YP, Lin YC, Kao YR, Tsay YG, Yang PC, Wu CW, Roffler SR. CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells. *Int J Cancer.* 2005; 116(2):243-52. doi: 10.1002/ijc.21089.

Chen L, Sun W, Li J, Liu Z, Ma Z, Zhang W, Du L, Xu W, Fang H, Li M. The first ratiometric fluorescent probes for aminopeptidase N cell imaging. *Org Biomol Chem.* 2013; 11(2):378-82. doi: 10.1039/c2ob26564h.

Chen H, Wang H, Qin XJ, Chen C, Feng L, Chen LZ, Dua LP, Li MJ. A bestatin-based fluorescent probe for aminopeptidase N cell imaging. *Chinese Chem Lett.* 2015; 26(5): 513-6. doi: 10.1016/j.ccllet.2015.01.023.

Corti A, Ponzoni M. Tumor vascular targeting with tumor necrosis factor alpha and chemotherapeutic drugs. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1028:104-12. doi: 10.1196/annals.1322.011.

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; 18(11):1185-90. doi: 10.1038/81183.

Curnis F, Arrigoni G, Sacchi A, Fischetti L, Arap W, Pasqualini R, Corti A. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res.* 2002; 62(3):867-74.

Danziger RS. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev.* 2008; 13(3):293-8. doi: 10.1007/s10741-007-9061-y.

De Ruyscher D, Haustermans K, Thorwarth D. FDG and Beyond. *Recent Results Cancer Res.* 2016; 198:163-73. doi: 10.1007/978-3-662-49651-0\_8.

Deshpande N, Ren Y, Foygel K, Rosenberg J, Willmann JK. Tumor angiogenic marker expression levels during tumor growth: longitudinal assessment with molecularly targeted microbubbles and US imaging. *Radiology.* 2011; 258(3):804-11. doi: 10.1148/radiol.10101079.

Di Matteo P, Arrigoni GL, Alberici L, Corti A, Gallo-Stampino C, Traversari C, Doglioni C, Rizzardi GP. Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59(1):47-59. doi: 10.1369/jhc.2010.956644.

DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol.* 2016; 100(5):979-984. doi: 10.1189/jlb.4MR0316-102R-.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20(21):4368-80. doi: 10.1200/JCO.2002.10.088.

Elpek GÖ. Angiogenesis and liver fibrosis. *World J Hepatol.* 2015; 7(3):377-91. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.377.

Eppard E, Wuttke M, Nicodemus PL, Rösch F. Ethanol-Based Post-processing of Generator-Derived <sup>68</sup>Ga Toward Kit-Type Preparation of <sup>68</sup>Ga-Radiopharmaceuticals. *J Nucl Med.* 2014; 55(6):1023-8. doi: 10.2967/jnumed.113.133041.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9(6):669-76. doi: 10.1038/nm0603-669.

Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell.* 1996; 87(7):1153-5. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81810-3.

Fukasawa K, Fujii H, Saitoh Y, Koizumi K, Aozuka Y, Sekine K, Yamada M, Saiki I, Nishikawa K. Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2006; 243(1):135-43. doi: 10.1016/j.canlet.2005.11.051.

Gao JJ, Gao ZH, Zhao CR, Yuan Y, Cui SX, Zhang XF, Cheng YN, Xu WF, Tang W, Qu XJ, LYP, a novel bestatin derivative, inhibits cell growth and suppresses APN/CD13 activity in human ovarian carcinoma cells more potently than bestatin. *Invest New Drugs.* 2011; 29(4):574-82. doi: 10.1007/s10637-010-9391-9.

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

González Buitrago JM, Navajo JA, García Díez LC, Herruzo A. Seminal plasma leucine aminopeptidase in male fertility. *Andrologia.* 1985; 17(2):139-42. doi: 10.1111/j.1439-0272.1985.tb00973.x.

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(19):7311-5. doi: 10.1073/pnas.86.19.7311.

Guo Q, Sui ZG, Xu W, Quan XH, Sun JL, Li X, Ji HY, Jing FB. Ubenimex suppresses Pim-3 kinase expression by targeting CD13 to reverse MDR in HCC cells. *Oncotarget.* 2017; 8(42):72652-65. doi: 10.18632/oncotarget.20194.

Guzman-Rojas L, Rangel R, Salameh A, Edwards JK, Dondossola E, Kim YG, Saghatelian A, Giordano RJ, Kolonin MG, Staquicini FI, Koivunen E, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(5):1637-42. doi: 10.1073/pnas.1120790109.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86(3):353-64. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80108-7.

Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 1997; 277(5322):48-50. doi: 10.1126/science.277.5322.48.

Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance

in human colon cancer. *Gastroenterology*. 2002; 122(2):376-86. doi: 10.1053/gast.2002.31095.

Hata R, Nonaka H, Takakusagi Y, Ichikawa K, Sando S. Design of a Hyperpolarized Molecular Probe for Detection of Aminopeptidase N Activity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016; 55(5):1765-8. doi: 10.1002/anie.201509457.

He X, Hu Y, Shi W, Li X, Ma H. Design, synthesis and application of a near-infrared fluorescent probe for in vivo imaging of aminopeptidase N. *Chem Commun (Camb)*. 2017; 53(68):9438-9441. doi: 10.1039/c7cc05142e.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999; 79(4):1283-316. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.

Hendriks G, Hackeng TM, van Gorp R, Bauwens M, Schurgers LJ, Mottaghy FM, Post MJ, Dijkgraaf I. Use of Cyclic Backbone NGR-Based SPECT to Increase Efficacy of Postmyocardial Infarction Angiogenesis Imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2017; 2017:8638549. doi: 10.1155/2017/8638549.

Ikeda N, Nakajima Y, Tokuhara T, Hattori N, Sho M, Kanehiro H, Miyake M. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(4):1503-8.

Inoi K, Goto S, Nomura S, Isobe K, Nawa A, Okamoto T, Tomoda Y. Aminopeptidase inhibitor ubenimex (bestatin) inhibits the growth of human choriocarcinoma in nude mice through its direct cytostatic activity. *Anticancer Res*. 1995; 15(5B):2081-7.

Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Yamamoto H, Yoshikawa K, Hirano K. Inhibition of aminopeptidase N (AP-N) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) by zinc suppresses the invasion activity in human urological cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2001a; 24(3):226-30. doi: 10.1248/bpb.24.226.

Ishii K, Usui S, Yamamoto H, Sugimura Y, Tatematsu M, Hirano K. Decreases of metallothionein and aminopeptidase N in renal cancer tissues. *J Biochem*. 2001b; 129(2):253-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002852.

Ishizuka M, Sato J, Sugiyama Y, Takeuchi T, Umezawa H. Mitogenic effect of bestatin on lymphocytes. *J Antibiot (Tokyo)*. 1980; 33(6):653-62. doi: 10.7164/antibiotics.33.653.

Jia X, Han Q, Wang Z, Qian Y, Jia Y, Wang W, Hu Z. Targeting peptide functionalized liposomes towards aminopeptidase N for precise tumor diagnosis and therapy. *Biomater Sci.* 2017; 5(3):417-21. doi: 10.1039/c6bm00898d.

Kehlen A, Lendeckel U, Dralle H, Langner J, Hoang-Vu C. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 2003; 63(23):8500-6.

Kehlen A, Geisler M, Olsen J, Sablotzki A, Langner J, Riemann D. IL-10 and TGF-beta differ in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes. *Int J Mol Med.* 2004; 13(6):877-82. doi: 10.3892/ijmm.13.6.877.

Koh MY, Lemos R Jr, Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 $\alpha$ - to HIF-2 $\alpha$ -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 2011; 71(11):4015-27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4142.

Kolb AF, Hegyi A, Maile J, Heister A, Hagemann M, Siddell SG. Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 440:61-7. doi: 10.1007/978-1-4615-5331-1\_8.

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

Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Pfenninger A, Frick W, Jähne G, Rhein M, Wendler W, Lottspeich F, Hochleitner EO, Orsó E, Schmitz G. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem.* 2005; 280(2):1306-20. doi: 10.1074/jbc.M406309200.

Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2011; 2(12):1117-33. doi: 10.1177/1947601911423654.

Lajtos I, Emri M, Kis SA, Opposits G, Pótári N, Király B, Nagy F, Trón L, Balkay L. Performance evaluation and optimization of the MiniPET-II scanner. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* 2013; 707: 26-34. doi: 10.1016/j.nima.2012.12.079.

Lapi SE, Voller TF, Welch MJ. Positron Emission Tomography Imaging of Hypoxia. *PET Clin.* 2009; 4(1):39-47. doi: 10.1016/j.cpet.2009.05.009.

Lendeckel U, Kähne T, Riemann D, Neubert K, Arndt M, Reinhold D. Review: the role of membrane peptidases in immune functions. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 477:1-24. doi: 10.1007/0-306-46826-3\_1.

Liu L, Liang Z, Guo K, Wang H. Relationship between the expression of CD133, HIF-1 $\alpha$ , VEGF and the proliferation and apoptosis in hypoxic human prostate cancer cells. *Oncol Lett.* 2017; 14(4):4065-4068. doi: 10.3892/ol.2017.6726.

Löhn M, Mueller C, Thiele K, Kähne T, Riemann D, Langner J. Aminopeptidase N-mediated signal transduction and inhibition of proliferation of human myeloid cells. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 421:85-91. doi: 10.1007/978-1-4757-9613-1\_12.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999; 155(3):739-52. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5.

Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Cueva C, Alba F, Ramírez M. Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. *Clin Chem.* 1999; 45(10):1797-802. doi: 10.1093/clinchem/45.10.1797.

Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015; 5(5):378-89. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.007.

Máté G, Kertész I, Enyedi KN, Mező G, Angyal J, Vasas N, Kis A, Szabó É, Emri M, Bíró T, Galuska L, Trencsényi G. In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer (68)Ga-NOTA-c(NGR). *Eur J Pharm Sci.* 2015; 69:61-71. doi: 10.1016/j.ejps.2015.01.002.

Menrad A, Speicher D, Wacker J, Herlyn M. Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.* 1993; 53(6):1450-5.

Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol.* 2004; 164(6):1875-82. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63747-9.

Mina-Osorio P, Ortega E. Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with Fc $\gamma$ Rs in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(6):1008-17. doi: 10.1189/jlb.1204714.

Mina-Osorio P, Shapiro LH, Ortega E. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(4):719-30. doi: 10.1189/jlb.0705425.

Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med.* 2008; 14(8):361-71. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.003.

Mishima Y, Terui Y, Sugimura N, Matsumoto-Mishima Y, Rokudai A, Kuniyoshi R, Hatake K. Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. *Cancer Sci.* 2007; 98(3):364-72. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00393.x.

Morgan R, Endres J, Behbahani-Nejad N, Phillips K, Ruth JH, Friday SC, Edhayan G, Lanigan T, Urquhart A, Chung KC, Fox DA. Expression and function of aminopeptidase N/CD13 produced by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: role of CD13 in chemotaxis of cytokine-activated T cells independent of enzymatic activity. *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67(1):74-85. doi: 10.1002/art.38878.

Nakase K, Kita K, Shiku H, Tanaka I, Nasu K, Dohy H, Kyo T, Tsutani H, Kamada N. Myeloid antigen, CD13, CD14, and/or CD33 expression is restricted to certain lymphoid neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 1996; 105(6):761-8. doi: 10.1093/ajcp/105.6.761.

Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle.* 2006; 5(16):1779-87. doi: 10.4161/cc.5.16.3018.

Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, Cooke JP. Murine model of hindlimb ischemia. *J Vis Exp.* 2009; (23):1035. doi: 10.3791/1035.

Norén K, Hansen GH, Clausen H, Norén O, Sjöström H, Vogel LK. Defectively N-glycosylated and non-O-glycosylated aminopeptidase N (CD13) is normally expressed at the cell surface and has full enzymatic activity. *Exp Cell Res.* 1997; 231(1):112-8. doi: 10.1006/excr.1996.3455.

O'Connell PJ, Gerkis V, d'Apice AJ. Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N). *J Biol Chem.* 1991; 266(7):4593-7.

Oh CW, Hoover-Plow J, Plow EF. The role of plasminogen in angiogenesis in vivo. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(8):1683-7. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00182.x.

Orsó E, Werner T, Wolf Z, Bandulik S, Kramer W, Schmitz G. Ezetimib influences the expression of raft-associated antigens in human monocytes. *Cytometry A*. 2006; 69(3):206-8. doi: 10.1002/cyto.a.20229.

Ota K, Uzuka Y. Clinical trials of bestatin for leukemia and solid tumors. *Biotherapy*. 1992; 4(3):205-14. doi: 10.1007/BF02174207.

Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 39(2):212-20. doi: 10.1016/j.bcmd.2007.04.001.

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

Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*. 2011; 179(3):1573-85. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.033.

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; 130(5):1189-96. doi: 10.1083/jcb.130.5.1189.

Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*. 2000; 60(3):722-7.

Passaniti T, Vitolo MI. In Vivo Matrigel Angiogenesis Assays. In: Augustin HG. *Methods in Endothelial Cell Biology*. 2004; 207-22. doi: 10.1007/978-3-642-18725-4\_20.

Pastorino F, Brignole C, Di Paolo D, Nico B, Pezzolo A, Marimpietri D, Pagnan G, Piccardi F, Cilli M, Longhi R, Ribatti D, Corti A, Allen TM, Ponzoni M. Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. *Cancer Res*. 2006; 66(20):10073-82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2117.

Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, Tjan-Heijnen VC, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1806(1):18-28. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.01.001.

Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001; 86(1):346-55. doi: 10.1055/s-0037-1616232.

Petrovic N, Bhagwat SV, Ratzan WJ, Ostrowski MC, Shapiro LH. CD13/APN transcription is induced by RAS/MAPK-mediated phosphorylation of Ets-2 in activated endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(49):49358-68. doi: 10.1074/jbc.M308071200.

Petrovic N, Schacke W, Shapiro LH. CD13/Aminopeptidase N in Tumor Growth and Angiogenesis. In Hooper NM, Lendeckel U. *Aminopeptidases in Biology and Disease*, Chapter 9. 2004; 179-200.

Pohle K, Notni J, Bussemer J, Kessler H, Schwaiger M, Beer AJ. <sup>68</sup>Ga-NODAGA-RGD is a suitable substitute for (18)F-Galacto-RGD and can be produced with high specific activity in a cGMP/GRP compliant automated process. *Nucl Med Biol.* 2012; 39(6):777-84. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2012.02.006.

Proost P, Mortier A, Loos T, Vandercappellen J, Gouwy M, Ronsse I, Schutyser E, Put W, Parmentier M, Struyf S, Van Damme J. Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood.* 2007; 110(1):37-44. doi: 10.1182/blood-2006-10-049072.

Qian CN. Hijacking the vasculature in ccRCC--co-option, remodelling and angiogenesis. *Nat Rev Urol.* 2013; 10(5):300-4. doi: 10.1038/nrurol.2013.26.

Rangel R, Sun Y, Guzman-Rojas L, Ozawa MG, Sun J, Giordano RJ, Van Pelt CS, Tinkey PT, Behringer RR, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(11):4588-93. doi: 10.1073/pnas.0611653104.

Ribatti D, Nico B, Floris C, Mangieri D, Piras F, Ennas MG, Vacca A, Sirigu P. Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. *Oncol Rep.* 2005; 14(1):81-4. doi: 10.3892/or.14.1.81.

Rich DH, Moon BJ, Harbeson S. Inhibition of aminopeptidases by amastatin and bestatin derivatives. Effect of inhibitor structure on slow-binding processes. *J Med Chem.* 1984; 27(4):417-22. doi: 10.1021/jm00370a001.

Riemann D, Kehlen A, Langner J. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today*. 1999; 20(2):83-8. doi: 10.1016/s0167-5699(98)01398-x.

Risau W, Drexler H, Mironov V, Smits A, Siegbahn A, Funa K, Heldin CH. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors*. 1992; 7(4):261-6. doi: 10.3109/08977199209046408.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. 2013. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Caaveiro JMM, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Kales SC, Kirshner S, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Trask OJ Jr, Weidner JR, Wildey MJ, Xia M, Xu X, editors. *Assay Guidance Manual [Internet]*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004–.

Saiki I, Fujii H, Yoneda J, Abe F, Nakajima M, Tsuruo T, Azuma I. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer*. 1993; 54(1):137-43. doi: 10.1002/ijc.2910540122.

Saito M, Takegoshi K, Aoyagi T, Umezawa H, Nagai Y. Stimulatory effect of bestatin, a new specific inhibitor of aminopeptidases, on the blastogenesis of guinea pig lymphocytes. *Cell Immunol*. 1978; 40(2):247-62. doi: 10.1016/0008-8749(78)90333-7.

Saitoh Y, Koizumi K, Minami T, Sekine K, Sakurai H, Saiki I. A derivative of aminopeptidase inhibitor (BE15) has a dual inhibitory effect of invasion and motility on tumor and endothelial cells. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29(4):709-12. doi: 10.1248/bpb.29.709.

Sanz B, Perez I, Beitia M, Errarte P, Fernández A, Blanco L, Estalella I, Loizate A, Irazusta J, López JJ, Larrinaga G. Aminopeptidase N activity predicts 5-year survival in colorectal cancer patients. *J Investig Med*. 2015; 63(5):740-6. doi: 10.1097/JIM.0000000000000199.

Satpati D, Sharma R, Sarma HD, Dash A. Comparative evaluation of <sup>68</sup>Ga-labeled NODAGA, DOTAGA, and HBED-CC-conjugated cNGR peptide chelates as tumor-targeted molecular imaging probes. *Chem Biol Drug Des*. 2018; 91(3):781-788. doi: 10.1111/cbdd.13143.

Schreiber CL, Smith BD. Molecular Imaging of Aminopeptidase N in Cancer and Angiogenesis. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018; 2018:5315172. doi: 10.1155/2018/5315172.

Scornik OA, Botbol V. Bestatin as an experimental tool in mammals. *Curr Drug Metab.* 2001; 2(1):67-85. doi: 10.2174/1389200013338748.

Shao Y, Liang W, Kang F, Yang W, Ma X, Li G, Zong S, Chen K, Wang J. <sup>68</sup>Ga-labeled cyclic NGR peptide for microPET imaging of CD13 receptor expression. *Molecules.* 2014a; 19(8):11600-12. doi: 10.3390/molecules190811600.

Shao Y, Liang W, Kang F, Yang W, Ma X, Li G, Zong S, Chen K, Wang J. A direct comparison of tumor angiogenesis with <sup>68</sup>Ga-labeled NGR and RGD peptides in HT-1080 tumor xenografts using microPET imaging. *Amino Acids.* 2014b; 46(10):2355-64. doi: 10.1007/s00726-014-1788-x.

Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Park HJ, Shim BS, Choi SH, Kwon HJ. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem Biol.* 2003; 10(8):695-704. doi: 10.1016/s1074-5521(03)00169-8.

Song Y, Liu P, Wang C, Zhang Q, Ge X, Zhuang A, Zhou H. The clinical significance and expression of TGF- $\beta$ 1 and CD13 in primary lesion and metastasis of gastric cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2017; 10(7):10643–51.

Söderberg C, Giugni TD, Zaia JA, Larsson S, Wahlberg JM, Möller E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol.* 1993; 67(11):6576-85. doi: 10.1128/JVI.67.11.6576-6585.1993.

Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol.* 2004; 85(5):233-48. doi: 10.1111/j.0959-9673.2004.00396.x.

Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* 2001; 155(3):459-70. doi: 10.1083/jcb.200106070.

Surowiak P, Drag M, Materna V, Suchocki S, Grzywa R, Spaczyński M, Dietel M, Oleksyszyn J, Zabel M, Lage H. Expression of aminopeptidase N/CD13 in human ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16(5):1783-8. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00657.x.

Sutherland RM, Ausserer WA, Murphy BJ, Laderoute KR. Tumor Hypoxia and Heterogeneity: Challenges and Opportunities for the Future. *Semin Radiat Oncol.* 1996; 6(1):59-70. doi: 10.1053/SRAO0060059.

Tahergorabi Z, Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci.* 2012; 15(6):1110-26. doi: 10.22038/ijbms.2012.4929.

Talmadge JE, Lenz BF, Pennington R, Long C, Phillips H, Schneider M, Tribble H. Immunomodulatory and therapeutic properties of bestatin in mice. *Cancer Res.* 1986; 46(9):4505-10.

Tang Y, Shao A, Cao J, Li H, Li Q, Zeng M, Liu M, Cheng Y, Zhu W. cNGR-based synergistic-targeted NIR fluorescent probe for tracing and bioimaging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci. China Chem.* 2014; 61:184–91. doi: 10.1007/s11426-017-9092-9.

Tani K, Ogushi F, Huang L, Kawano T, Tada H, Hariguchi N, Sone S. CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161(5):1636-42. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9902008.

Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol.* 1985; 101(6):2330-4. doi: 10.1083/jcb.101.6.2330.

Tillmanns J, Schneider M, Fraccarollo D, Schmitto JD, Länger F, Richter D, Bauersachs J, Samnick S. PET imaging of cardiac wound healing using a novel [68Ga]-labeled NGR probe in rat myocardial infarction. *Mol Imaging Biol.* 2015; 17(1):76-86. doi: 10.1007/s11307-014-0751-2.

Tokuda N, Levy RB. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 211(3):244-50. doi: 10.3181/00379727-211-43967.

Trencsényi G, Dénes N, Nagy G, Kis A, Vida A, Farkas F, Szabó JP, Kovács T, Berényi E, Garai I, Bai P, Hunyadi J, Kertész I. Comparative preclinical evaluation of 68Ga-NODAGA and 68Ga-HBED-CC conjugated procainamide in melanoma imaging. *J Pharm Biomed Anal.* 2017; 139:54-64. doi: 10.1016/j.jpba.2017.02.049.

Umezawa H, Aoyagi T, Suda H, Hamada M, Takeuchi T. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo).* 1976; 29(1):97-9. doi: 10.7164/antibiotics.29.97.

Vahrmeijer AL, Hutteman M, van der Vorst JR, van de Velde CJ, Frangioni JV. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013; 10(9):507-18. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.123.

van Hensbergen Y, Broxterman HJ, Hanemaaijer R, Jorna AS, van Lent NA, Verheul HM, Pinedo HM, Hoekman K. Soluble aminopeptidase N/CD13 in malignant and nonmalignant effusions and intratumoral fluid. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(12):3747-54.

Varner JA, Cheresh DA. Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *Important Adv Oncol*. 1996; 69-87.

Vats K, Satpati D, Sharma R, Kumar C, Sarma HD, Banerjee S. Preparation and comparative evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-cNGR and  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-PEG2 -cNGR as tumor-targeting molecular imaging probes. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2018; 61(2):68-76. doi: 10.1002/jlcr.3585.

Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(2):223-32. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158014.

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

von Wallbrunn A, Waldeck J, Hölthke C, Zühlsdorf M, Mesters R, Heindel W, Schäfers M, Bremer C. In vivo optical imaging of CD13/APN-expression in tumor xenografts. *J Biomed Opt*. 2008; 13(1):011007. doi: 10.1117/1.2839046.

Wakabayashi Y, Hashimoto M, Saitoh K, Osawa H, Koike M, Hirose S. Effects of bestatin (Ubenimex) on human T-cell colony formation. *Anticancer Drugs*. 1991; 2(1):39-43. doi: 10.1097/00001813-199102000-00005.

Watt VM, Willard HF. The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. *Hum Genet*. 1990; 85(6):651-4. doi: 10.1007/BF00193592.

Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci*. 2011; 102(3):501-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01826.x.

Wulfaenger J, Niedling S, Riemann D, Seliger B. Aminopeptidase N (APN)/CD13-dependent CXCR4 downregulation is associated with diminished cell migration, proliferation and invasion. *Mol Membr Biol.* 2008; 25(1):72-82. doi: 10.1080/09687680701551855.

Xu W, Li Q. Progress in the development of aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005; 5(3):281-301. doi: 10.2174/1568011053765949.

Xu Y, Lai LT, Gabrilove JL, Scheinberg DA. Antitumor activity of actinonin in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(1):171-6.

Yang E, Shim JS, Woo HJ, Kim KW, Kwon HJ. Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein, galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363(2):336-41. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.179.

Zhang J, Lu X, Wan N, Hua Z, Wang Z, Huang H, Yang M, Wang F. <sup>68</sup>Ga-DOTA-NGR as a novel molecular probe for APN-positive tumor imaging using MicroPET. *Nucl Med Biol.* 2014; 41(3):268-75. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2013.12.008.

Zhang Q, Wang J, Zhang H, Zhao D, Zhang Z, Zhang S. Expression and clinical significance of aminopeptidase N/CD13 in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Ther.* 2015; 11(1):223-8. doi: 10.4103/0973-1482.138007.

Zhang X, Xu W. Aminopeptidase N (APN/CD13) as a target for anti-cancer agent design. *Curr Med Chem.* 2008; 15(27):2850-65. doi: 10.2174/092986708786242840.

Zheng YB, Gong JH, Liu XJ, Li Y, Zhen YS. A CD13-targeting peptide integrated protein inhibits human liver cancer growth by killing cancer stem cells and suppressing angiogenesis. *Mol Carcinog.* 2017; 56(5):1395-1404. doi: 10.1002/mc.22600.

Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes Cancer.* 2011; 2(12):1085-96. doi: 10.1177/1947601911432334.

Zou M, Zhang L, Xie Y, Xu W. NGR-based strategies for targeting delivery of chemotherapeutics to tumor vasculature. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012; 12(3):239-46. doi: 10.2174/187152012800228751.

## 9. Tárgyszavak

Aminopeptidáz N (APN/CD13), angiogenezis, Pozitron Emissziós Tomográfia, PET/MR képalkotás, tumoros állatmodell, 68 Gallium, NGR

## 10. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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

## 11. Függelék



**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/431/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kis, A.**, Dénes, N., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Beke, L., Matolay, O., Enyedi, K. N., Méhes, G., Mező, G., Bai, P., Kertész, I., Trencsényi, G.: In Vivo Molecular Imaging of the Efficacy of Aminopeptidase N (APN/CD13) Receptor Inhibitor Treatment on Experimental Tumors Using <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(NGR) Peptide.  
*BioMed Res. Inter.* 2021, 1-11, 2021.  
IF: 3.411 (2020)
2. **Kis, A.**, Dénes, N., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Józai, I., Enyedi, K. N., Rácz, S., Garai, I., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo assessment of aminopeptidase N (APN/CD13) specificity of different <sup>68</sup>Ga-labelled NGR derivatives using PET/MRI imaging.  
*Int. J. Pharm.* 589, 1-11, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119881>  
IF: 5.875
3. **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Dénes, N., Vágner, A., Nagy, G., Garai, I., Fekete, A., Szikra, D. P., Hajdu, I., Matolay, O., Méhes, G., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo Imaging of Hypoxia and Neoangiogenesis in Experimental Syngeneic Hepatocellular Carcinoma Tumor Model Using Positron Emission Tomography.  
*Biomed Res. Int.* 2020, 1-10, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4952372>  
IF: 3.411





**További közlemények**

4. Dénes, N., **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Jósza, I., Hajdu, I., Arató, V. Z., Enyedi, K. N., Mező, G., Hunyadi, J., Trencsényi, G., Kertész, I.: In vivo preclinical assessment of novel <sup>68</sup>Ga-labelled peptides for imaging of tumor associated angiogenesis using positron emission tomography imaging.  
*Appl. Radiat. Isot.* 174, 1-10, 2021.  
IF: 1.513 (2020)
5. Trencsényi, G., **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Ráti, Á., Csige, K., Fenyvesi, É., Szente, L., Malanga, M., Méhes, G., Emri, M., Kertész, I., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Hajdu, I.: In vivo preclinical evaluation of the new <sup>68</sup>Ga-labeled beta-cyclodextrin in prostaglandin E2 (PGE2) positive tumor model using positron emission tomography.  
*Int. J. Pharm.* 576, 1-35, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118954>  
IF: 5.875
6. Forgács, V., Németh, E., Gyuricza, B., **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Mikecz, P., Mátyus, P., Helyes, Z., Horváth, Á. I., Kálai, T., Trencsényi, G., Fekete, A., Szikra, D. P.: Radiosynthesis and preclinical investigation of <sup>11</sup>C labelled 3-(4,5- diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime ([<sup>11</sup>C]SZV 1287).  
*ChemMedChem.* 15 (24), 2470-2476, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202000389>  
IF: 3.466
7. Trencsényi, G., Dénes, N., Nagy, G., **Kis, A.**, Vida, A., Farkas, F., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hunyadi, J., Kertész, I.: Comparative preclinical evaluation of <sup>68</sup>Ga-NODAGA and <sup>68</sup>Ga-HBED-CC conjugated procainamide in melanoma imaging.  
*J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 139, 54-64, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.049>  
IF: 2.831
8. Kertész, I., Vida, A., Nagy, G., Emri, M., Farkas, A., **Kis, A.**, Angyal, J., Dénes, N., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Bai, P., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Experimental Melanoma Tumors Using The Novel Radiotracer <sup>68</sup>Ga-NODAGA-Procainamide (PCA).  
*J. Cancer.* 8 (5), 774-785, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.17550>  
IF: 3.249





9. Nagy, G., Dénes, N., **Kis, A.**, Péli-Szabó, J., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hajdu, I., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: Preclinical evaluation of melanocortin-1 receptor (MC1-R) specific <sup>68</sup>Ga- and <sup>44</sup>Sc-labeled DOTA-NAPamide in melanoma imaging.  
*Eur. J. Pharm. Sci.* 106, 336-344, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.026>  
IF: 3.466
10. Máté, G., Kertész, I., Enyedi, K. N., Mező, G., Angyal, J., Vasas, N., **Kis, A.**, Szabó, É., Emri, M., Bíró, T., Galuska, L., Trencsényi, G.: In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer <sup>68</sup>Ga-NOTA-c(NGR).  
*Eur. J. Pharm. Sci.* 69, 61-71, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.002>  
IF: 3.773

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

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

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

Debrecen, 2021.09.03.

