

# Nanorészecskék alkalmazása a nukleáris medicinában

Doktori értekezés

**Polyák András**

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár, az MTA doktora  
Hivatalos bírálók: Dr. Tekes Kornélia egyetemi tanár, PhD  
Dr. Lengyel Zsolt orvos igazgató, PhD  
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szilvási István egyetemi tanár, PhD  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dabasi Gabriella egyetemi docens, PhD  
Dr. Környei József egyetemi docens, PhD

Budapest

2013.

# Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
1.1. Kolloidok, radiokolloidok, nanokolloidok, nanorészecskék és mikrorészecskék alkalmazása a nukleáris medicinában .....	6
1.2. A spontán eredetű betegségben szenvedő állatok összehasonlító kórtani jelentősége .....	8
1.3. Példák <sup>99m</sup> Tc-mal jelzett nanorészecskék különböző alkalmazására a nukleáris medicinában .....	10
1.3.1. Órszem nyirokcsomó kimutatása humán vizsgálatokban megfelelő részecskeméretű, HSA alapú nanokolloidok segítségével .....	10
1.3.2. Az órszem nyirokcsomó azonosítása az állatorvosi onkológiai gyakorlatban HSA alapú nanorészecskék segítségével .....	13
1.3.3. <sup>99m</sup> Tc-mal jelzett, doxorubicint hordozó nano- és mikrorészecskék .....	14
1.3.4. <sup>99m</sup> Tc-mal jelzett önrendeződő biopolimer-bázisú nanorészecskék alkalmazása folát receptort kifejező tumorok SPECT és SPECT/CT vizsgálataihoz .....	15
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>19</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>21</b>
3.1. Az in vitro vizsgálatok módszerei .....	21
3.1.1. Kiindulási anyagok .....	21
3.1.2. A klinikai vizsgálatok során alkalmazott Senti-Scint <sup>®</sup> nanokolloid .....	21
3.1.3. Humán szérum albumin (HSA) alapú, doxorubicint hordozó nanorészecskék (és mikrorészecskék) előállítása .....	22
3.1.4. Folát tartalmú, önrendeződéssel létrejövő Kitozán - $\gamma$ -PGA (BBS-NP) nanorészecskék előállítása .....	23
3.1.5. A nanorészecskék, radiokolloidok részecskeméretének vizsgálatai .....	24
3.1.6. A <sup>99m</sup> Tc-DoxHSA180, <sup>99m</sup> Tc-DoxHSA430 és <sup>99m</sup> Tc-DoxHSA1800 minták transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM-) vizsgálatai .....	25
3.1.7. A nanokolloidok jelzése <sup>99m</sup> Tc-mal és a jelzettségi stabilitás	

in vitro nyomonkövetése .....	26
3.1.7.1. A $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, a $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és a $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 minták jelzése .....	
3.1.7.2. A $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP minták jelzése .....	26
3.1.7.3. A Senti-Scint <sup>®</sup> $^{99m}\text{Tc}$ -jelzése .....	27
3.1.8. A $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék viselkedésének vizsgálata sejtkötődési kísérletekben .....	28
3.1.8.1. A kísérleti sejtvonal .....	28
3.1.8.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálat a nanorészecskék sejtkötődésének megállapítására .....	28
3.2. In vivo vizsgálatok, biológiai alkalmazások .....	29
3.2.1. A $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 minták biológiai vizsgálatai egészséges patkány állatmodellen .....	29
3.2.2. Tumor-transzplantált Fischer 344 patkányok vizsgálata .....	30
3.2.3. Spontán beteg kutya folát receptort kifejező szájüregi daganatának vizsgálata $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskékkel .....	32
3.2.4. Spontán beteg kutyák őrszem nyirokcsomóinak vizsgálata Senti-Scint <sup>®</sup> -tel .....	33
3.2.5. Az őrszem nyirokcsomó humán vizsgálatai Senti-Scint <sup>®</sup> -tel .....	36
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>39</b>
4.1. Az HSA nanokolloiddal (Senti-Scint <sup>®</sup> -tel) végzett humán őrszem nyirokcsomó vizsgálatok.....	39
4.1.1. Az alkalmazott radiokolloid jelzettségi határfokának és részecskeméret-eloszlásának vizsgálata .....	39
4.1.2. Az őrszem nyirokcsomó vizsgálatok klinikai eredményei .....	41
4.2. Spontán beteg kutyák őrszem nyirokcsomóinak vizsgálata Senti-Scint <sup>®</sup> -tel ....	43
4.2.1. In vitro eredmények .....	43
4.2.2. In vivo eredmények .....	45
4.3. A doxorubicint hordozó $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 nanorészecskék vizsgálatának eredményei .....	48
4.3.1. A részecskékbe adszorbeált és a nem-megkötött doxorubicin arány megállapítása .....	48
4.3.2. A $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800	

készítmények részecskeméretének vizsgálata .....	49
4.3.3. A $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatai .....	51
4.3.4. A jelzetségi hatásfok-vizsgálatok eredményei .....	53
4.3.5. A $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények biológiai vizsgálatai egészséges patkány állatmodellen ..	55
4.4. $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP önrendeződő biopolimer-bázisú nanorészecskék folát receptort kifejező tumorokon történő SPECT és SPECT/CT vizsgálatai.....	61
4.4.1. A részecskeméret-eloszlások és a jelzetségi hatásfokok vizsgálata .....	61
4.4.2. A jelzett $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék halmozódása HeDe sejtvonalakon .....	63
4.4.3. A $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék in vivo eredményei 1.: a HeDe-tumor-transzplantált Fischer 344 patkányok vizsgálatai .....	64
4.4.4. A $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék in vivo eredményei 2.: A nanorészecskék klinikai alkalmazása spontán eredetű daganatos megbetegedésben szenvedő kutyán .....	71
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>75</b>
5.1. Az őrszem nyirokcsomó humán vizsgálatai Senti-Scint <sup>®</sup> -tel .....	76
5.2. Az őrszem nyirokcsomó állatorvosi onkológiai gyakorlatban történő detektálása $^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett Senti-Scint <sup>®</sup> -tel .....	79
5.3. $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 doxorubicint hordozó nano- és mikrorészecskékkel végzett kísérleteink eredményeinek értékelése .....	81
5.4. $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék előállításának és első SPECT és SPECT/CT vizsgálatainak értékelése .....	83
<b>6. Következtetések .....</b>	<b>87</b>
<b>7. Összefoglalás .....</b>	<b>91</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>92</b>
<b>9. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>93</b>
<b>10. Saját közlemények jegyzéke .....</b>	<b>109</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>111</b>

## Rövidítések jegyzéke

$^{99m}\text{Tc}$	a technécium 99-es tömegszámú metastabil radioizotópja
$^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP	$^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett, folát receptort célzó nanorészecskék
$^{99m}\text{Tc}$ -DMSA	$^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett dimerkapto-borostyánkősav
$^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180	$^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett, 180 nm-es átlagos részecskeméretű, doxorubicint hordozó HSA alapú nanorészecskék
$^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430	$^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett, 430 nm-es átlagos részecskeméretű, doxorubicint hordozó HSA alapú nanorészecskék
$^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800	$^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett, 1800 nm-es átlagos részecskeméretű, doxorubicint hordozó HSA alapú mikrorészecskék
$^{99m}\text{Tc}$ -MDP	$^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett metilén-difoszfónát
CH	„chitosan”, kitozán
DLS	“dynamic light scattering”, dinamikus fényszórás fotometria
EPR-effektus	“enhanced permeation and retention”-effektus, megnövekedett átszűrődési és visszatartási effektus
FA	„folic acid”, folsav
HE	hematoxin-eozin
HSA	humán szérum albumin
ITLC	„instant thin layer chromatography”, vékonyréteg kromatográfia
IH	immunhisztokémia
MDR	multi-drog rezisztencia
MEK	metil-etil-ke-ton
MR	„magnetic resonance imaging”, mágneses rezonancia spektroszkópia
$\gamma$ -PGA	poli-gamma-glutaminsav
RES	“reticuloendothelial system”, retikulo-endoteliális rendszer
ROI	“region of interest”
SCC	“squamous cell carcinoma”, pikkelysejtes karcinóma
SLN	„sentinel lymph node”, őrszem nyirokcsomó
SPECT	„single photon emission computed tomography”
SPECT/CT	SPECT és „computed tomography” egy készülékben
SRCA	“subrenal capsule assay”, vesetok-próba
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp

# 1. Bevezetés

## 1.1. Kolloidok, radiokolloidok, nanokolloidok, nanorészecskék és mikrorészecskék alkalmazása a nukleáris medicinában

A *nukleáris medicina* Hevesy György 1943-ban kémiai Nobel-díjjal jutalmazott felfedezése (a radioaktív nyomjelzéses vizsgálati módszerek kifejlesztése és alkalmazása) nyomán született meg, és a nyílt radioaktív készítmények *in vitro* vagy *in vivo* izotópdiaosztikai, képalkotó vagy terápiás célú felhasználását jelenti. Az *in vivo* orvosi képalkotó módszerekben alkalmazott radiofarmakonok között a Hevesy György Nobel-díja óta eltelt évtizedek alatt megjelentek a kolloid alapú készítmények is, kezdetben elsősorban a vérátáramlási (perfúziós) vizsgálatok kontrasztanyagaként. A nukleáris medicina a kolloidok *méretéből* fakadó farmakokinetikai (vagy épp ellenkezőleg, a „helyben maradási képességből” adódó) előnyöket kezdte használni, a radioaktív izotóppal megjelzett kolloid anyagok, azaz a *radiokolloidok* alkalmazásával pedig bővültek és javultak az izotópdiaosztikai és izotópterápiás módok és eredmények. A kolloidika '90-es és 2000-es évekbeli, nanotechnológia néven történő „újjászületése” lehetőséget teremtett ismét új típusú radiofarmakonok kifejlesztésére, és emellett felvetette annak a lehetőségét is, hogy a nukleáris medicina nyomonkövetésben, képalkotásban lévő lehetőségei új típusú, nanotechnológiával készült gyógyszerek (célzott hatóanyag-bevitelben alkalmazott hordozó részecskék) fejlesztésének is fontos segítője legyen azok biológiai hasznosulásának felderítésében.

Az értekezésben bemutatott vizsgálatokban a felhasznált kolloid készítmények, radiofarmakonok egy része „*nanorészecskének*” van elnevezve, míg egy másik részük az értekezéshez kapcsolódó közleményekben és saját gyógyszerleírásában is következetesen „*radiokolloid*” néven szerepel. Ennek oka, hogy a kétezres évektől a 100 nanométer, majd az 1000 nm alatti kolloid készítmények elnevezését fokozatosan felváltotta a nanorészecske (“nanoparticle”) kifejezés. Míg kolloid rendszereknek általában 1-2 nanométernél nagyobb, de 500 nanométernél (vagy a definíció forrásától függően 1000 nm-nél vagy akár pár mikronnál) kisebb részecske-természetű diszperz rendszereket nevezünk [Wolfram 1971, Szekrényesy 2000, Hórvölgyi 2011], addig a

nanorészecskék alatt a készítőik eredetileg néhány-tíz nanométeres kolloid részecskéket értettek, amelyek szintén a „közönséges molekulák” maximum 1-2 nm-es mérete fölöttiek, de kisebbek 80-100 nm-nél. Az évek során a kezdeti 80-100 nm-es felső határ a közleményekben bemutatott nanorészecskék esetében is kitolódott, és ma már az 500 vagy 1000 nm-nél kisebb részecskeméretű termékeket, gyógyszer-alkotókat is gyakran nanorészecskének nevezünk. A kifejezés maga a nanotechnológia megjelenésével terjedt el, ez utóbbit pedig minden olyan folyamat elnevezésére használjuk, amely során az anyagot a nanométeres mérettartományban módosítjuk vagy állítjuk elő. E részecskék, és a nanotechnológia egyéb orvosi alkalmazási területeinek mára új gyűjtőneve, tudománya is van, ez a *nanomedicina* [Jain 2008]. (A dolgozatban olvasható „*nanorészecske*”, „*nanokolloid*”, „*radiokolloid*” kifejezések tehát jelen esetben ugyanazt jelentik: minden alkalommal 1-2 nanométer feletti, de 1000 nm alatti, radioaktív izotóppal jelzett, részecsketermészetű készítményeket, radiofarmakonokat takarnak. A nem nano-tartományba eső részecskékből álló, hanem 1000 nm, azaz 1 mikron fölötti, néhány mikronos szemcseméretű kolloid rendszereket, ma a nanorészecskék nevezéktani logikáját követve *mikrorészecskékné*k is nevezünk.)

Az értekezésben bemutatott kolloidokat  $^{99m}\text{Tc}$ -mal történő radioaktív nyomjelzéssel együtt alkalmaztuk. A technécium 99-es tömegszámú metastabil izotópja ( $^{99m}\text{Tc}$ ) a gamma-kamerás diagnosztikában, a SPECT és SPECT/CT képalkotásos módszerekben, és azon belül a radiokolloidokkal végzett diagnosztikában is a legszélesebb körben alkalmazott radionuklid a nagyon előnyös fizikai és kémiai tulajdonságai miatt: a viszonylag alacsony, 140 keV-es energiájú, de a SPECT kamerával kitűnően detektálható gamma-kibocsátása, és a rövid, nagyjából 6 órás fizikai felezési ideje és viszonylag egyszerű hozzáférhetősége folytán (izotópgenerátor-termék).

A bemutatott készítmények vizsgálatai több esetben állatkísérleteken alapulnak, ezek egy része „hagyományos” laborállatokon végzett vizsgálat, egy másik részük viszont az állatkísérletek egy újabb, etikusabb, és sok esetben pontosabb kórtani modellt nyújtó fajtájú, ún. spontán beteg társállatokon végzett vizsgálat.

## **1.2. A spontán eredetű betegségben szenvedő állatok összehasonlító kórtani jelentősége**

A gyógyszerkészítmények, így a citosztatikumok és a radiofarmakonok kutatásában is általában a tumoros egerek és patkányok állatmodellként való felhasználása az általánosan elfogadott módszer, mégis számos új daganatellenes készítmény bukik el a későbbi alkalmazása, a betegek tényleges kezelése során a szer magas toxicitása vagy alacsony hatásfoka miatt [Simon 2008]. A kísérleti állatban indukált vagy beültetett tumor ugyanis nem minden esetben viselkedik az emberben “természetes” körülmények között kifejlődő daganatokkal megegyezően, és ez igaz a primer tumorokra és az áttétes daganatokra is. Az a tény, hogy a rágcsáló állatmodellen végzett kezelések csak ritkán ültethetők át egyértelműen az emberi klinikai terápiás módokba, olyan alapvető különbségekre mutat rá, amelyek azt indokolják, hogy alternatív állatmodelleket is bevonjunk a kutatásokba [Kamb és mtsai 2001].

Ha daganatos betegségről van szó, akkor az embernek az a (kísérleti) állat tud ideális modellje lenni (a rendelkezésre állási és a költség-hatékonysági szempontok mellett), amelynél a betegség hisztopatológiai, sejtes és molekuláris tulajdonságokban, biológiai viselkedésben és a terápiára adott válaszban nagyon hasonló vagy pontosan azonos az emberi megfelelőjének. Egyszerűbben, az emberi onkológiai kezelésben a tumorválasz és a mellékhatások egy specifikus terápia esetén pontosan meg kell, hogy jósolhatóak legyenek az állatmodell alapján [Knapp és mtsai 2000].

A társállatok spontán eredetű betegségei pontosan ezért lettek jó modelljei az emberének. A *spontán beteg társállatok* minden környezeti rizikófaktorban osztoznak a gazdáikkal, betegségeik nem mesterségesen előidézettek, hanem indikátorai a tulajdonosok potenciális betegségeinek, a környezeti tényezők egyezősége miatt pedig a társállatbetegségek kórokkutatásának (etiológiájának) eredményei pontos egyezőséget mutatnak a humán etiológia eredményeivel [Kelsey és mtsai 1998]. Az állatok spontán eredetű daganatainak összehasonlító kórtani jelentősége nem új keletű felismerés, valójában az elmúlt 30-40 évben születtek eredmények az immunológia [Pang, Argyle 2009, Withrow és mtsai 1991, Madewell 1981, Theilen, Hills 1982], sugárbiológia [Powers 1987], hipertermia [Page, Thrall 1994], illetve több daganattípus kezelésével



kapcsolatban (oszteoszarkóma, lágyszöveti szarkóma, limfóma, melanóma és más típusú rákos megbetegedések összefüggésében) [Vail, MacEwen 2000, Withrow és mtsai 1991, Gordon és mtsai 2009, Mueller és mtsai 2007].

A spontán beteg társállatok körén belül a kutyák (*Canis lupus familiaris*) külön kitűnő modellt nyújtanak összetett emberi kórképekre a könnyű hozzáférhetőségük és a faj számos kultúrában kitüntetett szerepet betöltő helyzete miatt [Rowell és mtsai 2011]. Az ember után a kutyáknál lehet megfigyelni a legnagyobb fenotípusos változékonyságot, és a kutyák esetében van a legtöbb leírt természetes eredetű betegség az emlősök között [Starkey és mtsai 2005]. Nagyjából 400, az emberéhez hasonló örökletes betegséget írtak le kutyában, beleértve daganatos megbetegedéseket, szívbetegségeket vagy idegrendszeri elváltozásokat [Ostrander és mtsai 2000, Sargan 2004]. A kutyák daganatai szövettanilag nagyon hasonlítanak az emberekéhez és hasonlóan reagálnak a hagyományos kezelésekre is. Kezeletlen daganataik az emberekéhez hasonló agresszív növekedést mutatnak, viszont a betegség gyorsabb lefolyású, így az ő esetükben arányosan rövidebb túlélési idővel kell számolni, míg összehasonlító kórtani vizsgálatok esetén rövidebb nyomkövetési idővel, ez pedig alapvető előnye ezeknek a vizsgálatoknak. A kutyák esetén ezeken felül a kezelés általában a daganatos betegség későbbi stádiumában kezdődik, mint az emberekben. Míg a kutyák esetében a teljes gyógyult állapot a kezelés utáni 18 hónapban már meghatározható, addig az ember esetében 7 éves a nyomkövetési idő [Paoloni, Khanna 2008]. Egy új terápiás szer randomizált klinikai kipróbálása társállatok esetén 1-3 évet vehet igénybe, míg egy hasonló részletes vizsgálat 5-15 évet is igénybe venne emberben [Khanna és mtsai 2002]. Azzal, hogy az egyes társállatokban mérhető biológiai markereket pontosan megfeleltetjük, validáljuk az emberi szervezet biomarkereire, ezeknek a hosszú klinikai vizsgálatoknak jelentősen lerövidíthetjük az idejét [Hansen, Khanna 2004]. Mindemellett az új daganatellenes szerek vagy a nukleáris medicina területén az újonnan kifejlesztett izotópos kontrasztanyagok, radiofarmakonok klinikai próbái a társállatok esetén nincsenek a hagyományos emberi klinikai tesztek keretei közé szorítva, és ez lehetővé teszi, hogy a házi kedvenc kutyák gyógyítása során olyan új gyógyszereket is kipróbáljunk, amelyek még akár évekkel a forgalmazás előtt állnak. E törekvések ráadásul teljes egészében találkoznak a kutyák gazdáinak elképzelésével. Az esetek döntő többségében támogatják, hogy kedvencük

betegségének pontosabb diagnózisát, és az állat gyógyulását olyan új, ígéretes (akár radiokolloid alapú) tumordiagnosztikai és (nanorészecske alapú) daganatterápiás gyógyszerrel segítsük, amelyeknek az emberi használatra történő bevezetése még folyamatban van, viszont a kedvenc kezelésében szerzett tapasztalatok meggyorsítják annak bevezetését is [Gordon és mtsai 2009].

### **1.3. Példák $^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett nanorészecskék különböző alkalmazására a nukleáris medicinában**

#### **1.3.1. Őrszem nyirokcsomó kimutatása humán vizsgálatokban megfelelő részecskeméretű, HSA alapú nanokolloidok segítségével**

A pár száz nanométeres radiokolloidok egyik nagyon jelentős felhasználási területe a nukleáris medicinában a '90-es évek második felétől, de még inkább a 2000-es évektől az *őrszem nyirokcsomó* kimutatása lett. Az őrszem nyirokcsomó elmélet azon a megfigyelésen alapul, hogy az elsődleges (primer) tumor a nyirokáramon keresztül a legközelebbi nyirokcsomóval keringési összeköttetésben van, az áttétképződés első helye pedig mindig ez az első (őrszem) nyirokcsomó. Az elmélet szerint tehát a daganatok nyirokúti (limfogén) áttétképződése az érintett nyirokcsomókon megfelelő sorrendet követ, és a daganatba vagy közvetlenül mellé beadott kontrasztanyaggal meghatározható egy vagy több olyan nyirokcsomó, amelyekben először képződik az áttét, ha képződik. Ezeket a nyirokcsomókat őrszem vagy szentinel nyirokcsomóknak (SLN, „sentinel lymph node”) nevezzük, mivel lényegében „őrzik” a többi nyirokcsomót, és jelzik az áttétképződést, az igazoltan áttétmentes őrszem nyirokcsomók pedig szinte teljesen biztossá teszik, hogy a többi nyirokcsomó sem tartalmaz áttétet. Melanómában szenvedő betegekben például az őrszem nyirokcsomó állapota a metasztázis szemszögéből bizonyítottan tükrözi a sorban azt követő további nyirokcsomók állapotát is, amennyiben az daganatos sejtekre negatív, úgy a továbbiak is azok lesznek [Reintgen és mtsai 1994]. Az emlődaganatban szenvedő betegek megfelelő kezelésében a nyirokcsomókon keresztül történő áttétképződés felbecsülése,

meghatározása, értékelése ugyancsak kulcsfontosságú a kezelés megválasztásánál, és betegség kórjóslatánál [Veronesi és mtsai 1987].

Az őrszem nyirokcsomók vizuális, intraoperatív azonosítására kezdetben „kék festéket”, ún. patent-kék vagy izoszulfán-kék festéket használtak [Bircher 2006], majd pedig izotópos kontrasztanyagokat. A radioizotópos diagnosztikumokkal, a *radiofarmakonokkal* végzett gamma-kamerás nyirokúti- és nyirokcsomó-vizsgálatok a *limfoszcintigráfiai* vizsgálatok. A limfoszcintigráfia tehát segít abban, hogy sebészeti beavatkozás során azonosítsuk és pontosan metsszük ki az őrszem nyirokcsomót vagy vegyünk belőle szövetmintát az áttétképződés felderítése érdekében. A limfoszcintigráfia segítségével történő őrszem nyirokcsomó azonosítást először péniszkarcinóma kezelésével kapcsolatban írták le 1977-ben [Cabanas 1977], majd továbbfejlesztették humán malignus melanóma stádiumba sorolásához 1992-ben [Morton és mtsai 1992]. Később emlődaganatoknál [Cox és mtsai 1998], feji és nyaki daganatoknál [Ames és mtsai 1998], pénisz- [Alazraki és mtsai 1997] és vulváris tumoroknál [De Hullu és mtsai 1998], a gyomor- és bélrendszerhez tartozó [Wood és mtsai 2002] és prosztatata tumoroknál [Wawroschek és mtsai 1999] is alkalmazták ezt a megoldást. 2000-ben az őrszem nyirokcsomó detektálás első alkalmazója, Dr. Ramon M. Cabanas a vizsgálati módszert összefoglalva általános leírást nyújtott a helyes kórkép felállításához [Cabanas 2000].

A SLN-detektálásra használt radiofarmakonok vagy receptor–ligand kölcsönhatást kihasználó készítmények (mannóz receptort célzó radiofarmakonok, pl. a „Lymphoseek” [Uccini és mtsai 1997, Takahasi és mtsai 1998, Vera és mtsai 2001, Wallace és mtsai 2007]), vagy a nyirokutak jellegéből, *belső méretéből* kifolyólag pontosan behatárolt részecskeméret-tartományba eső kolloidikai termékek lettek [Schauer, Becker, Reisen, Possinger 2005], vagy esetleg a két mechanizmus együttes alkalmazásán alapulnak [Ocampo-García és mtsai 2011].

A limfoszcintigráfiában alkalmazott radiofarmakonokat a stabil izotópmegkötés (magas jelzetségi hatások) mellett az jellemzi, hogy gyorsan jutnak be a nyirokáramba az injekció pontjából, ugyanakkor egyáltalán nem, vagy csak nagyon lassan jutnak ki onnan a véráramba. Az őrszem nyirokcsomó lehető leghatékonyabb megtalálásához az

ilyen célzatú, kolloid mérettartományú radiofarmakonok fejlesztésénél tehát elsősorban a helyes részecskeméret-eloszlás megválasztása volt a feladat, de emellett a részecskék száma és fajtája (anyaga), az általuk hordozott, közölt sugárdózis, az injektált térfogat és a beadás pontos helye is tisztázandó kérdés volt. A nem receptor-affin kolloid részecskéket nem-specifikusan fagocitálják a nyirokrendszer makrofágjai a nyirokcsomókban, a radioaktív kontrasztanyag nyirokrendszeren keresztüli továbbjutásának mértéke, sebessége pedig érzékenyen függ a megfelelően megválasztott, megtervezett és megalkotott, stabil részecskék méretétől.

E vizsgálatok széles körű elterjedéséig több, különböző részecskeméretű radiokolloid készítményt fejlesztettek limfoszcintigráfiai alkalmazásra, az 5–10 nanométeres részecskeméretűtől az ezer nanométer fölötti termékekig. A kutatások azt mutatták, hogy a kisebb, 20-50 nm alatti részecskeméretű radiofarmakonok a gamma-kamerás felvételeken több nyirokcsomót rajzolnak ki, mivel a kisebb részecskéknek sokkal gyorsabb az áthaladásuk a nyirokutakon, így ezek jó része gyorsan tovább áramlik a nyirokcsomó-láncon. Ez a jelenség lerontotta a szentinel-detektálási hatásfokot, megnehezítette az őrszem nyirokcsomó intraoperatív azonosítását a többi, aktivitást halmozó helyi nyirokcsomó között [Taylor és mtsai 1999]. Az ennél nagyobb szemcseméretű radiokolloidok kevesebb számú nyirokcsomót indikálnak (más szóval az őrszem nyirokcsomók által visszatartott kolloid-részecskék száma jelentősen megnő), és lassabban ürülnek (mosódnak) ki belőlük, lehetőséget teremtve arra is, hogy a sebészeti beavatkozást (a biopsziát) az injektálást követő napon végezzék el a betegen [Taylor és mtsai 1999]. Az alkalmazott kolloidok túl nagy mérete (pl. nem várt szemcse-összetapadás, aggregáció) esetén ugyanakkor a radiofarmakon lassan vagy egyáltalán nem vándorol a nyirokutakban, lehetetlenné téve ezzel a diagnózist. Több, független vizsgálat is igazolta tehát, hogy az optimális részecskeátmérő valahol 20 és 500 nm között van [Wilher et al 1999, Eshima és mtsai 2000, Tanis és mtsai 2002].

### **1.3.2. Az őrszem nyirokcsomó azonosítása az állatorvosi onkológiai gyakorlatban HSA alapú nanorészecskék segítségével**

A daganatos megbetegedések nem csak az emberben, hanem a társállatokban is vezető halálokok közé tartoznak. A kutyákban a spontán eredetű tumorok gyakorisága kétszerese az emberek esetében megfigyelténél, a patológiai, szövettani, biokémiai tulajdonságaik ugyanakkor nagyon hasonlóak az emberi rosszindulatú daganatokéhoz. A képalkotó diagnosztika felbontóképessége szempontjából fontos tény, hogy kutya esetében maga a tumorméret is összehasonlítható a humán betegekével, a daganat növekedési sebessége (a betegség progressziója) viszont általában kétszerese az ember esetében megfigyeltének [Hahn és mtsai 1994]. Ezek a jegyek alkalmassá teszik arra is a spontán eredetű daganatos állatokat, hogy megbízható modellként szolgáljanak az emberi onkológiai kutatások számára a nyilvánvaló anatómiai különbségek ellenére is [Knapp és mtsai 1997].

Az őrszem nyirokcsomó elmélet első sikeres humán klinikai alkalmazása előtt évtizedekkel már számos kutatócsoport foglalkozott a kérdéssel különböző állatmodelleket tanulmányozva. E vizsgálatok során a kutatók egészséges kutya [Noris és mtsai 1982, Metcalf és mtsai 1986, Sautet és mtsai 1992, Hodges és mtsai 1992, Rogers és mtsai 1993], nyúl [Strand és mtsai 1979, Ergun és mtsai 1998, Taylor és mtsai 1999, Jánoki és mtsai 2000, Balogh és mtsai 2001], sertés [Tafra és mtsai 1999] és macska [Metcalf és mtsai 1986, Morton és mtsai 1992] állatmodelleket is tanulmányoztak. Az őrszem nyirokcsomó vizsgálatok ezzel együtt mégis ritkának mondhatók a klinikai állatorvosi gyakorlatban [Noris és mtsai 1982, Metcalf és mtsai 1986, Sautet és mtsai 1992, Rogers és mtsai 1993, Jánoki és mtsai 2000, Balogh és mtsai 2001]. A limfoszcintigráfiában használatos radiokolloidok kutatása és fejlesztése során indokoltá vált tehát, hogy újabb in vivo modelleket, spontán beteg állatokat is bevonjunk a kísérletekbe.

### 1.3.3. <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett, doxorubicint hordozó nano- és mikrorészecskék

A 2000-es években a kontrasztanyagokat és daganatellenes hatóanyagokat célba juttató nanorészecskék (nanohordozók) kutatása is egyre inkább előtérbe került. A megfigyelések szerint kolloid hatóanyag-hordozók alkalmazásával jelentősen lehet csökkenteni a citosztatikumok mellékhatásait, és ezzel együtt növelni a terápiás hatásfokukat [B.Mishra és mtsai 2009]. A sűrűn alkalmazott daganatellenes ágens, a *doxorubicint* is kipróbálták ilyen kísérletekben, amelynek a klinikai alkalmazhatóságát egyébként behatárolja a magas fokú szívkárosító mellékhatása [Singal és mtsai 2000, Minotti és mtsai 2004]. A tapasztalatok azt mutatták, hogy a doxorubicin kardiotoxicitása jelentősen csökkenthető, ha a hatóanyagot egy hordozó nanorendszerre kapcsoljuk [Dreis és mtsai 2007]. Az ilyen nanohordozók általában relatív nagy mennyiségű hatóanyagot képesek hordozni minimális nemkívánatos hatóanyag-veszteség mellett, jól tárolhatóak, a hatóanyag célzott és szabályozott bevitelét is el lehet velük érni, és emellett képesek akár kiküszöbölni a multi-drog rezisztencia (MDR) hatást is [Cuvier és mtsai 1992, K. Cho és mtsai 2008]. A doxorubicint, mint hordozott, célba juttatott hatóanyagot többféle különböző hordozó felhasználásával alkalmazták már, de leginkább liposzómákkal [Sells és mtsai 1987, Treat és mtsai 1990, Rahman és mtsai 1990]. Ezek egyik legismertebb képviselője a Doxil nevű daganatterápiás szer, amely szerkezetét tekintve pegilált liposzómába zárt doxorubicin [Sells és mtsai 1987, Francis 1998]. A citosztatikumot a liposzómák mellett számos más, nanorészecske méretű polimer hordozóval is alkalmazták: poli-butil-cianoakriláttal (PBCA) [Gulyaev és mtsai 1999, Steiniger és mtsai 2004], poli-izohexil-cianoakriláttal (PIHCA) [Cuvier és mtsai 1992, PLGA-nanorészecskékkel (poli-tejsav-glikolsav) [Yoo és mtsai 1999] vagy zselatinnal [Leo és mtsai 1997, Leo és mtsai 1999].

A doxorubicint hordozó kolloidoknak számos előnyük van a magában alkalmazott doxorubicinnal szemben: egyrészt az ún. EPR-effektusnak (“enhanced permeation and retention effect”), azaz a “magnövekedett átszűrődési és visszatartási effektusnak” köszönhetően a hatóanyag magnövekedett passzív halmozását lehet elérni a daganatban helyesen megválasztott és megalkotott részecskemérettel [Maedea és mtsai 2000]. Emellett a nanohordozók képesek tovább keringeni a véráramban és szintén többféle

tumor esetén képesek kiküszöbölni a multi-drog rezisztenciát (MDR) [Barraud és mtsai 2005].

A hatóanyagok nanorészecskék általi megkötésére különböző módok ismertek. Lehetőség van egy előre megalkotott nanorendszer részecskéinek a felületére kötni a célba juttatni kívánt ágenst [Yoo és mtsai 1999, Eatock és mtsai 1999], de akár „bele is lehet csomagolni” azt a részecskékbe preparálásuk során, a belső polimer mátrixukba kötve [Dreis és mtsai 2007] vagy ahogy a Doxil esetén is, liposzómák belsejébe zárva [Sells és mtsai 1987, Treat és mtsai 1990, Rahman és mtsai 1990]. Ha az anyag csupán adszorbeálva van a részecskék felületére, az vezethet a hatóanyag túl korai, túl könnyű deszorpciójához, “ elvesztéséhez”, lebomlásához, kiürüléséhez, ugyanakkor a részecskékbe való belefoglalás, belesomagolás tovább képes megkötni a hatóanyagot, így ez a mód megvédheti annak aktivitását, hátráltathatja a túl korai lebomlását a gyógyszerkészítmény tárolása során, de a szervezetbe jutás után is [Dreis és mtsai 2007].

Hatóanyagok hordozására az izotópdiaosztikában is alkalmazott humán szérum album alapú kolloidok is jól alkalmazhatók számos előnyös tulajdonságuk folytán: ezek az anyagok a szervezet által könnyen lebonthatók (biodegradábilisak), a szervezet által jól tolerált készítmények [Weber és mtsai 2000]. Ezek mellett az elkészítésük egyszerű, könnyen reprodukálható [Langer és mtsai 2003] és olcsó, illetve több más készítmény elé helyezi őket az a tény, hogy esetükben lehetőség van arra, hogy a célba juttatott ható- vagy kontrasztanyag kovalens kötéssel legyen a hordozóhoz kötve, köszönhetően a HSA erre alkalmas funkciós csoportjainak [Nobs és mtsai 2004, Wartlick és mtsai 2004, Dinauer és mtsai 2005, Steinhauser és mtsai 2006].

#### **1.3.4. <sup>99m</sup>Tc-mel jelzett önrendező biopolimer-bázisú nanorészecskék alkalmazása folát receptort kifejező tumorok SPECT és SPECT/CT vizsgálataihoz**

A fentiekén túl a hatóanyag-hordozó nanorendszerek specifikusan célzott területre eljutó, terápiás hatást kifejtő változatai is jól ismertek mára a daganatos megbetegedések diagnosztikájában és kezelésében. A szemcseméretükből fakadó előnyeik mellett,

köszönhetően a részecskék célba juttató („targeting”) ligandjának, ezek a nanorendszerek sokféle molekula szelektív és hatékony bevitelére alkalmasak, a kemoterápiás hatóanyagok [Leamon and Reddy 2004, Ganta és mtsai 2008, Phillips és mtsai 2010] mellett gének [Sudimack and Lee 2000, Ganta és mtsai 2008], kontrasztanyagok [Phillips és mtsai 2010, Veiseh és mtsai 2010] vagy radionuklidok [Sudimack and Lee 2000, Ke és mtsai, 2004] juttathatóak velük specifikusan a daganatsejtekbe.

Az egyik legegyszerűbb célba juttató mechanizmus ligandja, amely segítheti ilyen nanorészecskék tumorsejtekbe való bejutását, a *folsav*. *Folát-receptort* számos típusú daganat sejtje kifejez relatív magasabb koncentrációban a felszínén az egészséges szövetek sejtjeire jellemző előforduláshoz képest [Elnakat és mtsai 2004]. A folsav, mint célba juttató („targetáló”) molekula specifikusan kötődik a tumoros sejt folát-receptorára (FR) és receptor-mediált endocitózis útján bejut a sejtekbe [Sudimack and Lee, 2000]. Mára számos olyan radiofarmakont fejlesztettek ki, amelyek a folsavat, mint targetáló ligandot tartalmazzák: dendrimereket [Agashe és mtsai 2007], liposzómákat [Awasthi és mtsai 2003], poliszacharidokat [Guo és mtsai 2011, Jing és mtsai 2012], peptideket és fehérjéket [Komarek és mtsai 2005, Mata és mtsai 2007] és más kis molekulájú hordozó-rendszereket, mint pl. a „<sup>99m</sup>Tc-citro-folate”-ot [Altiparmak és mtsai 2010]. Létezik több olyan készítmény is, amelyiket <sup>99m</sup>Tc radioizotópot hordozó radiofarmakonként alkalmaznak [Ke és mtsai 2004, Lu és mtsai 2011, Onursal és mtsai 2011]. Mind a kis molekulású, mind a nanométeres tartományba eső, makromolekula-alapú, a folát-receptor mechanizmusát kihasználó radiofarmakonok és hordozók nagy érdeklődésre tartanak számot a bennük rejlő jobb hatásfokú tumordiagnosztikai és terápiás lehetőségek miatt.

A kontraszt- vagy hatóanyag-hordozó nanorendszerek egyre gyakoribb kiindulási anyaga a *kitozán* vagy annak valamely származéka [Guo és mtsai 2011, Jing és mtsai 2012]. A kitozán egy egyenes láncú poliszacharid, a természetben nagy mennyiségben előforduló, megújuló forrású biopolimer ( $\beta$ -[1 $\rightarrow$ 4]-2-amino-2-dezoxi-D-glükopiranoz), amelyet rákok páncéljából, *kitinből* állítanak elő. A kitozán a kitin N-deacetilezése során keletkezik, amikor is egy  $\beta$ -[1 $\rightarrow$ 4]-kötésű 2-acetamido-2-dezoxi-D-glükopiranozból és 2-amino-2-dezoxi-D-glükopiranozból álló kopolimer jön létre. A



keletkező kitozán deacetilezésének foka és a polimer láncok molekulatömege határozza meg leginkább a poliszacharid fizikai és kémiai tulajdonságait, a deacetilezettség foka pedig általában 40% és 99% között van. Ezzel együtt a kitozánnak az orvosi alkalmazása szempontjából van néhány nagyon különleges, általános tulajdonsága: a kitozán szervezetbarát (biokompatibilis), lebontható (biodegradábilis), csekély immunválaszt idéz elő, nagyon alacsony mértékű a toxicitása és mindezek mellett vannak antibakteriális tulajdonságai is. Nem véletlen, hogy nagy számú, különböző felhasználási módját írták már le: orvosi, gyógyszeres alkalmazásait [Khor, Lim 2003, Berger és mtsai 2004, Dodane, Vilivalam 1998, Rabea és mtsai 2003], komplexképző lehetőségeit [Guibal és mtsai 2001, Schmuhl és mtsai 2001], táplálék-kiegészítőként történő és más felhasználási módjait [Kurita 1998, Shahidi és mtsai 1999, Majeti and Kumar 2000].

Ezek mellett több közlemény szól olyan *polielektrolit komplexekről* is, amelyek kitozánt tartalmaznak [Assaad és mtsai 2011, Wu és mtsai 2011, Ji és mtsai 2012]. A polielektrolit-komplex nanorészecskékben sok lehetőség rejlik, a hatóanyag-hordozás szempontjából az egyik legfontosabb tulajdonságuk, hogy nagyszámú, jól kihasználható funkciós csoportot tartalmaznak. Emellett az ellentétes töltésű biopolimerek képesek a makromolekulák között lévő elektrosztatikus kölcsönhatások révén *önrendeződéssel* formálódni („self-assembly”), és így stabil nanorészecskéket [Zheng és mtsai 2007, Umerska és mtsai 2012], hidrogéleket [Tsao és mtsai 2010, Ji és mtsai 2012] vagy filmeket [Feng és mtsai 2005, Silva és mtsai 2008] is kialakítani. Az így kialakult nanorészecskék, köszönhetően a viszonylagosan kis szemcseméretüknek, a szervezetbe jutva aktív vagy passzív mechanizmusok folytán könnyen áthatolnak sejtmembránokon is, alkalmassá téve őket arra, hogy hatóanyagot vagy kontrasztanyagot juttassanak be a sejtekbe. Egy jól működő hordozó nanorészecske a véráramba jutva képes elegendő hosszú ideig stabil állapotban a keringésben maradni, és a hozzá kapcsolt daganat-specifikus antitest vagy receptor ligand molekula segítségével képes specifikusan egy adott daganatos sejterületen felhalmozódni, így a ható- vagy kontrasztanyag nagy helyi koncentrációját okozni. Ez után küldetését teljesítve képes lebomlani, és különösebb mellékhatások nélkül, a vesén és a húgyutakon át távozni a vizsgált vagy kezelt szervezetből. A polielektrolit nanorészecskék kémiai, farmakokinetikai, toxikológiai előnyei kihasználva tehát az egyszerű hatóanyagoknál és a kis molekulájú

radiofarmakonoknál sokkal hatékonyabb, szelektívebb és kisebb mellékhatásokat kiváltó daganatterápiás gyógyszereket és tumor-diagnosztikumokat kapunk [Garcia-Bennett és mtsai 2011].

Polielektrolit komplex jól használható kiindulási anyaga lehet a poli-gamma-glutaminsav is. A poli-gamma-glutaminsav (poli- $\gamma$ -glutaminsav,  $\gamma$ -PGA) ismétlődő glutaminsav egységekből áll, vízdoldékony, biodegradábilis, nem toxikus polianion, a szervezetben nem vált ki immunreakciót, ennek megfelelően ezt az anyagot és származékait széles körben alkalmazzák is a kozmetikai és élelmiszer-iparban [Shih and Van 2001], de a gyógyászatban [Akagi és mtsai 2005, Hsieh és mtsai 2005, Lin és mtsai 2006] és a vízkezelésben is [Inbaraj és mtsai 2006].

A kísérleteinkben a folsav aminocsoportokon keresztül kötődött a poli-gamma-glutaminsavra ( $\gamma$ -PGA), a stabil nanorészecskék pedig elkészítésük után vizes környezetben álltak rendelkezésre. A nanorendszer gyártási módszerének bemutatása 2008-ban jelent meg először közleményben [Hajdu és mtsai 2008], majd a folát-receptort célzó nanorészecske hatóanyag-hordozó [Keresztessy és mtsai 2009], illetve MR-kontrasztanyagként felhasználható, gadolínium-komplex változatáról jelent meg leírás 2013-ban [Hajdu és mtsai 2013]. Ezekben a közleményekben a nanohordozó különböző fizikokémiai vizsgálatai (pl. annak igazolása, hogy a nanorendszer különálló, gömbszerű részecskéket alkot vizes környezetben és száraz fázisban egyaránt) mellett a nanorészecskék intracelluláris halmozódását is tanulmányozták folát-receptort bizonyítottan kifejező A2780/AD humán (multidrog-rezisztens) petefészki tumor sejtvonalakon, illetve a sejtvonalakon és kísérleti állatokon történő toxicitási vizsgálatokkal igazolták, hogy a nanohordozó kis mértékben sem toxikus.

## 2. Célkitűzések

Célunk volt teljesen új diagnosztikai radiofarmakon-jelölt készítmények előállítása, és a megfelelő és stabil részecskeméret-eloszlás jelentőségének a bemutatása kolloid radiofarmakonok és hatóanyag-hordozók példáin keresztül. Célunk volt továbbá a spontán beteg társállatok (kutyák) összehasonlító kórtani vizsgálatainak elvégzése egy humán célra kifejlesztett radiofarmakon és az új radiofarmakon-jelölt készítmény alkalmazásával. Ezek mellett célunk volt annak igazolása, hogy a nukleáris medicina képzőképző módszerei fontos segítői az új típusú, nanotechnológiával készült gyógyszerek (teranosztikumok, célzott hatóanyag-bevitelben alkalmazott hordozó részecskék) fejlesztésének azok biológiai nyomonkövetésében. A tényleges kísérletek a következők voltak:

### 1. Előállítás, radioaktív jelzés

- Egy új típusú, önrendeződéssel létrejövő, folát receptort kifejező tumor típusokat targetáló nanorendszer, nanorészecske termék első ízben történő,  $^{99m}\text{Tc}$  izotóppal történő radioaktív jelzése: a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP készítmény előállítása.
- Humán szérum albumin (HSA) alapú, doxorubicint hordozó nanorészecskék és mikrorészecskék előállítása több részecskeméretű változatban, majd ezek  $^{99m}\text{Tc}$  izotóppal történő jelzése: a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények előállítása.
- A Senti-Scint<sup>®</sup> HSA nanokolloid  $^{99m}\text{Tc}$  izotóppal történő jelzése.

### 2. Jellemzés, in vitro nyomonkövetés

- A  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények doxorubin-megkötési hatásfokának vizsgálata nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel.

- A Senti-Scint<sup>®</sup>, <sup>99m</sup>Tc-BBS-NP, <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA180, <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA430 és <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA1800 készítmények jelzettségi-hatásfok vizsgálata vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) módszerrel.
- A Senti-Scint<sup>®</sup>, <sup>99m</sup>Tc-BBS-NP, <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA180, <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA430 és <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA1800 készítmények részecskeméretének vizsgálata és nyomonkövetése dinamikus fényszórás fotometriával (DLS).
- A <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA180, <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA430 és <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA1800 készítmények transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálata.
- Konfokális mikroszkópos vizsgálat a <sup>99m</sup>Tc-BBS-NP nanorészecskék sejtkötődésének megállapítására, hepatocelluláris karcinóma (Hepatocarcinoma Debreceniensis, HeDe) sejtvonallal, a nanorészecskék fluoreszcens jelzésével.

### 3. Biológiai alkalmazás, in vivo nyomonkövetés

- A jelzett <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA180, <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA430 és <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA1800 készítmények vizsgálata egészséges Wistar-patkányokon.
- A jelzett <sup>99m</sup>Tc-BBS-NP nanorészecskék vizsgálata folát receptort kifejező hepatocelluláris karcinóma (HeDe) tumor-sejtvonallal (SRCA-módszerrel) transzplantált Fischer 344 patkányokon, a <sup>99m</sup>Tc-DMSA radiofarmakon összehasonlító kontroll-vizsgálatával együtt.
- A jelzett <sup>99m</sup>Tc-BBS-NP nanorészecskék vizsgálata spontán eredetű, folát receptort kifejező szájüregi tumorban szenvedő kutyán.
- Ismert daganatos betegségben szenvedő kutyák őrszem nyirokcsomó (SLN) vizsgálata <sup>99m</sup>Tc-jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> HSA nanokolloiddal, a gamma-kamerás, gamma-szondás és kékfestéses SLN-detektálási módszerek alkalmazásával.
- Emlődaganatos női betegek klinikai őrszem nyirokcsomó (SLN) vizsgálata <sup>99m</sup>Tc-jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> HSA nanokolloiddal, a gamma-kamerás, gamma-szondás és kékfestéses SLN-detektálási módszerek együttes alkalmazásával.

## 3. Módszerek

### 3.1. Az in vitro vizsgálatok módszerei

#### 3.1.1. Kiindulási anyagok

A felhasznált human szérum albumint a C.A.F.-D.C.F.-től (cvba-scr1, Albumin 20%), a 8%-os glutáraldehid oldatot a Sigma-tól (Steinheim, Németország) vásároltuk. A doxorubicin (50mg/25ml doxorubicinum chloratum) és a steril fiziológiás sóoldat ("Salsol A", 0,9% w/v of NaCl) a TEVA-tól származott (Teva Pharmaceutical Works Ltd., Debrecen). A  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetátot egy UltraTechnekov (10,75 GBq) technécium generátorról nyertük (Covidien Imaging Solutions, USA). Az acetonitrilt (HPLC-grade ACN) a Carlo Erba-tól szereztük be, a többi szükséges vegyszer, az etanol, a metil-etilketon (MEK) és az egyéb reagensek a Reanal-tól származtak. A vékonyréteg (ITLC-SG) a Pall Corporation terméke volt. Az állatkísérleteknél használt xilazin-hidrokloridot és a ketamint a CP-Pharma-tól (Németország) vásároltuk. A felhasznált kitozán (CH, deacetilezettségi fok: 88%) Sigma-Aldrich Ltd. Hungary-tól származott. A poli- $\gamma$ -glutaminsav ( $\gamma$ -PGA) preparálását a BBS Nanotechnológia Kft. debreceni laboratóriumában végeztük. A vízben oldódó 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimidet (EDC) és a folsavat (folsav-dihidrát, FA) szintén a Sigma-Aldrich Ltd., Hungary-tól vásároltuk.

#### 3.1.2. A klinikai vizsgálatok során alkalmazott Senti-Scint<sup>®</sup> nanokolloid

A humán vizsgálatok során és a spontán beteg kutyák vizsgálataiban egyaránt alkalmazott radiofarmakon a Senti-Scint<sup>®</sup> volt, amely humán szérum albumin (HSA) alapú nanokolloid, és a Medi-Radiopharma Kft. (Érd, HU) bocsátotta a rendelkezésünkre liofilizált formában. A készítmény  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát elútummal történő beoldása során a jelzéshez külön segédanyagot nem igényelt, csupán a jelzés és

a beoldódás megfelelő hatásfoka érdekében, a gyártó erre vonatkozó előírásai szerint 20 perces, szobahőmérsékleten történő inkubálási időt biztosítottunk az előkészítése során.

### **3.1.3. Humán szérum albumin (HSA) alapú, doxorubicint hordozó nanorészecskék előállítása**

Kísérleteink során a doxorubicint humán szérum albumin mátrixba kötöttük, és ezután a HSA-ból több különböző részecskeméretű kolloid rendszert állítottunk elő. A nano- és mikroméretű részecskék előállítására egy korábban kidolgozott módszert választottunk [Weber és mtsai 2000, Langer és mtsai 2003]. Az elkészítésükhöz 200 µl-nyi doxorubicin oldatot (1 mg/ml-es doxorubicinum chloratum oldatból) adtuk hozzá 200 µl (20 mg/ml) HSA oldathoz. Mivel deszolvatáció sebességén kívül a kiinduló HSA oldat pH-ja befolyásolja a későbbi részecskék méretét (Langer és mtsai 2003), ezért három különböző pH beállítást (pH6,2-es, pH7,5-ös és pH8,2-es) alkalmaztunk 0,1N HCl és 0,1N NaOH oldatok segítségével. A három mintának a későbbi részecskemérési eredményeik alapján a  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  neveket adtuk. A három keveréket két órán át kevertettük 650 rpm fordulaton, szobahőmérsékleten a doxorubicin HSA-ra való eredményes, jó hatásfokú abszorpciója érdekében, a korábbi, erre vonatkozó leírásokat követve [Dreis és mtsai 2007, Wagner és mtsai 2010]. A deszolvatációs művelethez 3 ml 96v/v%-os etanolt adagoltunk lassan, 1 ml/perces sebességgel folyamatos kevertetés mellett (650 rpm) egy előzőleg pontosan kalibrált "Masterflex" lamináris pumpa (Cole-Palmer Co., Chicago, Ill., USA) segítségével. A következő lépésként mindhárom mintához 10 µl 8%-os glutáraldehid oldatot adtunk a keresztkötések létrejöttének érdekében, majd 24 órás, szintén 650 rpm-es kevertetés következett szobahőmérsékleten. Az elkészített kolloid részecskéket 8 perces, 16000g-n történő centrifugálással tisztítottuk, majd pH7,5-ös foszfát pufferrel vettük fel őket újra oldatba vortex [Wagner és mtsai 2010], és 5 perces ultrahangos kezelés segítségével [Dreis és mtsai 2007].

*A nem-megkötött doxorubicin mennyiségének meghatározása.* A 8 perces, 16000 g-n történő centrifugálás után az oldatok felülúszóból mintákat vettünk abból a célból, hogy

meghatározzuk a (leülepitett) HSA kolloid által nem-adszorbeált (felülószóban lévő) doxorubicin koncentrációját. Ehhez a mennyiségi meghatározáshoz egy UV-VIS detektorral kapcsolt Agilent 1200 HPLC rendszert (Agilent Technologies Inc.) használtunk LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (Merck, Németország) fordított fázisú oszloppal, az elválasztáshoz víz és acetonitril 7:3-as elegyét használtuk 0,8 ml/perces átfolyási sebességgel [Configliacchi és mtsai 1996]. A doxorubicin-hányadot 250nm-es UV-vel állapítottuk meg [Dreis és mtsai 2007], a retenciós idő 12 perc volt. A nem-megkötött doxorubicin koncentrációt a preparáció után 1 órával, 24 órával és egy héttel ellenőriztük, ez idő alatt a mintákat fénytől elzárva, szobahőmérsékleten tároltuk.

### **3.1.4. Folát tartalmú, önrendeződéssel létrejövő Kitozán - $\gamma$ -PGA (BBS-NP) nanorészecskék előállítása**

*A  $\gamma$ -PGA – FA konjugátum szintézise.* A folsav aminocsoporton keresztül kötöttük a poli- $\gamma$ -glutaminsavhoz karbodiimides (EDC) technika segítségével, ez az eljárás korábban közzétett publikációkban [Keresztessy és mtsai 2009, Hajdu és mtsai 2013] van, részletesebben bemutatva. A 10mg-nyi EDC-t desztillált vízben oldva,  $n=0,0337$ mmol-os mennyiségben,  $M=297,18$ g/mol-os koncentrációban, cseppenként adtuk hozzá a  $\gamma$ -PGA oldathoz (ennek térfogata 100 ml, a koncentrációja 0,5 mg/ml, a pH-ja 6,5 volt), majd a reakcióelegyet egy órán keresztül  $4^{\circ}\text{C}$  fokon, és ezután egy órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. A folsavat ezután adtuk hozzá (18 mg-ot, dimetil-szulfoxidban, DMSO-ban), majd ezt az elegyet 24 órán keresztül kevertettük szobahőmérsékleten.

*Önrendező nanorészecskék készítése.* Az önrendeződéssel (“self-assembly”) létrejövő, stabil polielektrolit nanorészecskék a  $\gamma$ -PGA-FA és a kitozán láncai között lejátszódó ionos gélképződés során alakultak ki. A kitozánt HCl-ben oldottuk fel, majd a pH-t 6,5-re állítottuk NaOH segítségével. Az 1 mg/ml-es kitozán oldatot 0,2 ml/s sebességgel adtuk hozzá folyamatos keverés mellett a  $\gamma$ -PGA-FA oldathoz. A 0,3 mg/ml-es, pH9,0-es  $\gamma$ -PGA-FA vizes oldatot (1 ml / 5 másodperces sebességgel) a 0,3

mg/ml-es pH4,0-es CS-oldathoz adtuk, ekkor opálos kolloid rendszer fejlődött. A reakciót UV-VIS spektrofotometriával (Thermospectronic Biomate 5 típusú UV-VIS spektrofotométerrel) ellenőriztük, a transzmittancia 96%-os volt  $\lambda=500$  nm-es hullámhosszon, 7,4-es pH-n, ez az érték a nyomon kísért 4 héten keresztül állandó maradt fiziológiás pH-n. A konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz a nanorészecskéket fluoreszcens jelzésnek vetettük alá, ehhez először a CS pilimerlánchoz kapcsoltuk a 250 $\mu$ g mennyiségű fluoreszcein-izotiocianátot (FITC, 250  $\mu$ l DMSO-ban) 24 órás folyamatos kevertetés mellett, szobahőmérsékleten, majd a nanorészecskék képzéséhez az CS-FITC oldathoz az előzővel megegyező módon adtuk hozzá a  $\gamma$ -PGA-FA oldatot. A nanorészecskék alkalmazása előtt a sterilitás érdekében a biopolimer oldatot steril boxban, 0,22  $\mu$ m-es steril szűrőn engedték át.

### **3.1.5. A nanorészecskék, radiokolloidok részecskeméretének vizsgálatai**

Az őrszem nyirokcsomó detektálására használt HSA alapú radiokolloidok méretét, méreteloszlását dinamikus fényszórásos fotometriával (DLS) 830 nm-es hullámhosszú lézerefényt alkalmazó DynaPro-műszerrel (Protein Solution Inc. N.Y., USA) határoztuk meg. A radiofarmakon részecskeméret-eloszlásait a jelzési eljárás előtt és után is ellenőriztük. A humán vizsgálatokhoz felhasznált 12 minta, majd a spontán beteg állatok vizsgálatához felhasznált 6 kolloid minta méréséhez 20 $\mu$ l-es térfogatú mintákat használtunk, a vizsgálatokat szobahőmérsékleten végeztük. A minták vizsgálata előtt a mérések pontosságát különböző részecskeméretű (60, 150, 700 nm), monodiszperz polisztirol részecskeméret-standard minták mérésével ellenőriztük (Duke Scientific Polystyrene Standard).

A doxorubicint hordozó HSA kolloidok és az folát receptort célzó polielektrolit nanorészecskék részecskeméret-eloszlását és a részecskefrakciók polidiszperzítást szintén a dinamikus fényszórásos fotometria (DLS) módszerével határoztuk meg 633 nm-es hullámhosszú lézerefényt használó Zetasizer Nano ZS készüléket alkalmazva (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Worcestershire, UK). A részecskeméret-



méréseket minden esetben 25°C fokon, optikailag homogén polisztirén küvettákkal végeztük. A folátos nanorészecskék esetén ( $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$ ) a minták részecskeméretének időbeli változásainak in vitro nyomonkövetése céljából 1, 6 és 24 órával a jelzés után ellenőrző méréseket végeztünk, ez alatt a mérésre szánt mintákat fénytől elzárva, szobahőmérsékleten tároltuk. A doxorubicint hordozó részecskék ( $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ ) esetén a részecskeméreteket egy hetig követtük nyomon (2, 4 és 7 napos mintákat is vizsgáltunk), a relatív polidiszperzitási értékeket és a részecskefrakciók mérettartományait vizsgáltuk. Meghatároztuk a részecskefrakció mérhető minimumát és maximumát is.

Az önrendeződéssel kialakított nanorészecskék esetén az egy részecskére jutó folsav molekula számának a meghatározását a Malvern Zetasizer Nano ZS készülék segítségével végeztük. A részecskefrakció átlagos méretéhez tartozó átlagos részecskesúlyt (Daltoni egységben) és a  $\gamma$ -PGA és a kitozán nanorészecskéken beüli tömegaránya ismert volt, az egységnyi  $\gamma$ -PGA-ra jutó folsav mennyiségét pedig UV-VIS abszorpciós spektroszkópia (Thermospectronic Biomate 5 típusú UV-VIS spektrofotométer,  $\lambda_{\text{max}1}=368$  nm,  $\varepsilon=9,120$ ,  $\lambda_{\text{max}2}=283$  nm,  $\varepsilon=25,100$ ) segítségével határoztuk meg [Keresztessy és mtsai 2009]. Ezek után már a kiszámolható volt egy közelítő becslés az egy nanorészecskére eső folsav molekulák számára.

### **3.1.6. A $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ és $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ minták transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM-) vizsgálatai**

Minthogy a kísérletek során a vizsgált egy mikrométer fölötti részecskeméretű, doxorubicint hordozó kolloid minta ( $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ ) részecskefrakciójának mérethatárai közel estek a részecskeméretek meghatározására első sorban alkalmazott dinamikus fényszórásos fotometria felső mérési határához (6-10 mikron), indokoltnak látszott transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatokkal is ellenőriznünk, hogy a vizsgált oldatban nem fordulnak-e elő korábban a DLS műszer által nem detektálható, nagyobb méretű részecskék.

A TEM vizsgálatokhoz a minták előkészítése negatív festéses technikával [Harris and Reiber 2007] történt, a mérésekhez ammónium-molibdát kontrasztanyagot és szénrel bevont mintahordozó fémrácsot (“grid”-et) használtunk. A képek MegaView III kamerával (JEOL, Japan) készültek különböző nagyításokat alkalmazva, majd Soft Imaging Systems programmal dolgoztuk fel őket.

### **3.1.7. A nanokolloidok jelzése $^{99m}\text{Tc}$ -mal és a jelzettségi stabilitás in vitro nyomonkövetése**

#### *3.1.7.1. A $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , a $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ és a $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ minták jelzése*

A doxorubicint hordozó HSA kolloidok esetén a jelzéshez 2 ml doxorubicint hordozó HSA kolloidhoz redukáló ágensként 40  $\mu\text{g}$   $\text{SnCl}_2$ -t tartalmazó ( $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{l}$  térfogatban 0,1M HCl oldatban) oldatot adtunk, majd 1ml 1000 MBq aktivitású generátor-elútum pertechnetát ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) oldatot adtunk az elegyhez. A jelzés 60 perces szobahőmérsékletű inkubálás és többszöri összerázás során ment végbe [Configliacchi és mtsai 1996]. A jelzettségi hatásfokokat vékonyréteg-kromatográfiával határoztuk meg, szilikagéles üvegszálás vékonyréteg lapon (ITLC-SG) [European Pharmacopoeia 6.0, 1029-1030] metil-etil-ke-ton (MEK) lettek kifejlesztő futtató oldatot alkalmazva. Raytest MiniGita műszer, vékonyréteg-szkenner (“Mini Gamma Isotope Thin Layer Analyzer”) segítségével mértük meg a futtatott lapok aktivitás-eloszlását, és vettük fel a kromatogramokat. A jelzés után 1, 6 és 24 óra elteltével ellenőriztük a jelzettségi hatásfokokat. Ezeket a radiokémiai stabilitás-vizsgálatra szánt mintákat eközben fénytől elzárva, szobahőmérsékleten tároltuk.

#### *3.1.7.2. A $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$ minták jelzése*

A BBS-NP nanorészecskék jelzésekor 2,6 ml mennyiségű vizes alapú BBS-NP nanorészecske szuszpenzióhoz redukáló ágensként 40  $\mu\text{g}$  ón-kloridod ( $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{l}$  0,1M HCl oldatban) adtunk hozzá, majd az elegyhez 1 ml térfogatú, 900 MBq aktivitású steril generátor-elútum pertechnetát ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) oldatot mértünk. A jelzés 60

perces, szobahőmérsékleten folyó inkubálás során ment végbe. A steril, aszeptikus környezetet megfelelő eszközökkel és a jelzés közbeni steril box használatával biztosítottuk. A jelzettségi hatások vizsgálatát vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel végeztük, ITLC-SG lapok felhasználásával, metil-etil-keton (MEK) kifejesztőt alkalmazva. A kifejesztett vékonyréteg-lapokon az aktivitás eloszlását Raytest MiniGita TLC-szkennerrel (Mini Gamma Isotope Thin Layer Analyzer) vizsgáltuk. A jelzettségi hatásokokat 1, 6 és 24 órával a jelzést követően ellenőriztük, ez idő alatt a radiokémiai mintákat fénytől elzárt helyen, szobahőmérsékleten tároltuk. Az esetleges kolloid szennyezők és műtermékek jelenlétének kizárására a  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzés előtti és után részecskeméret-eloszlási vizsgálatok eredményeinek összehasonlításával jutottunk.

### 3.1.7.3. A Senti-Scint® $^{99m}\text{Tc}$ -jelzése

A liofilizált formában rendelkezésre álló Senti-Scint® radiofarmakon tehát a 600–1110 MBq aktivitású, 3 ml térfogatú  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát (Sorin, Dry-gen) generátor-elúttal történő beoldása során a jelzéshez külön segédanyagot nem igényelt, a gyártó (Medi-Radiopharma Kft.) erre vonatkozó előírásai szerinti 20 perces, szobahőmérsékleten történő inkubálási időt biztosítottuk a minták számára. A radiokémiai tisztaságot, a jelzettségi hatásokat vékonyréteg-kromatográfiával, szilikagéles, üvegszálas vékonyréteg-kromatográfiás lapok (ITLC-SG, Kieselgel, Merck és Gelman Sciences, Mich., USA) segítségével határoztuk meg és ellenőriztünk a jelzés után közvetlenül, majd 2 és 6 órával is (futtató elegy: MEK, metil-etil-keton). A jelzettségi hatások elfogadható alsó határának a 95%-ot jelöltük meg. A radiofarmakont a jelzése után egy órán belül alkalmaztuk. A biológiai alkalmazás során 15 és 37 MBq közötti aktivitású, 100 és 400  $\mu\text{l}$  közötti térfogatú  $^{99m}\text{Tc}$ -Senti-Scint® mintákat injektáltunk szubkután, közel a primer tumorhoz.

### **3.1.8. A <sup>99m</sup>Tc-BBS-NP nanorészecskék viselkedésének vizsgálata sejtkötődési kísérletekben**

#### *3.1.8.1. A kísérleti sejtvonala*

A hepatocelluláris karcinóma (Hepatocarcinoma Debreceniensis, HeDe) sejtvonala sejtjeit [Trencsenyi és mtsai 2007] RPMI 1640 tápfolyadékban növesztettük, amit kiegészítettünk 10 % FBS-sel, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnel. Az exponenciálisan növekvő sejteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett tenyésztettük és naponta passzáztuk. Tripán-kék kizárásos festéssel a sejtek több mint 95%-a életképesnek bizonyult.

#### *3.1.8.2. Konfokális mikroszkópos vizsgálat a nanorészecskék sejtkötődésének megállapítására*

Megközelítőleg lyukanként 20000 db. HeDe sejtet ültettünk egy 8-lyukú sejttenyésztő edénybe („plate”-be). A jelzett <sup>99m</sup>Tc-BBS-NP nanorészecskéket hozzáadtuk a sejtekhez 0,3 mg/ml koncentrációban, lyukankénti 10-10 µl-es mennyiségben, majd a sejttenyészeteket 37°C-on 24 óráig inkubáltuk RPMI tápfolyadékban, 5% CO<sub>2</sub> mellett. A tápfolyadékot leszívással távolítottuk el, majd a sejteket PBS és citrát pufferrel mostuk. A sejteket frissen készített, PBS-ben pufferált 1%-os formaldehidben 4°C-on, 10 percig fixáltuk. A mintákat Olympus FluorView 1000 konfokális mikroszkóppal, 60-szoros nagyítású UPLSAPO olajimmerziós objektívvel tettük láthatóvá. A korábban nanorészecskékre kötött fluoreszcens festék (ld. 3.1.4. fejezet) láthatóvá tétele HeNe lézer segítségével történt, a gerjesztés 543 nm-es hullámhosszon, a detektálási tartomány 560 és 610 nm között volt. A képeket az Olympus FluorView FV10-ASW 1.5 szoftvercsomaggal elemeztük.

## 3.2. In vivo vizsgálatok, biológiai alkalmazások

A kísérleti állatok (paktányok) tartása és kezelése minden esetben az állatok védelméről és kíméletéről szóló 2002. évi LXVII. törvénnyel módosított 1998. évi XXVIII. törvény, az állatkísérletek végzéséről szóló, 103/2002. (V.10.) Korm. számú rendelettel módosított 243/1998. (XII.31.) Korm. számú rendelet, és az Európai Unió állatok tartásáról szóló direktívái szerint zajlott.

Ezen felül az “Útmutatás az állatok helyes tartására és felhasználására a rákkutatásban” (“Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research”) című ajánlást [Workman és mtsai 2010] tartottuk szem előtt.

A vizsgálatokba bevett spontán beteg kutyák tulajdonosai írásos beleegyezésüket adták az állatokon történő diagnosztikai vizsgálatok és kezelések elvégzéséhez.

### 3.2.1. A $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ és $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ minták biológiai vizsgálatai egészséges patkány állatmodellen

A doxorubicint hordozó részecskék vizsgálatainak célja az volt, hogy megfigyeljük, hogy a beadott  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett készítmények részecskemérete változik-e, illetve tapasztalható-e a részecskék szervezeten belüli lebomlása az intravénás alkalmazást követően. Emellett cél volt, hogy korábban publikált, hasonló részecskeméretű készítmények biodisztribúciós adataival összevethető adatokat nyerjünk.

A három különböző részecskeméretű  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  minta különböző biológiai viselkedését 3 egészséges, 180-200 grammos Wistar patkány szcintigráfias felvételeivel követtük nyomon. A gamma kamerát előzőleg a  $^{99m}\text{Tc}$  140 keV-es gamma foton csúcsára állítottuk be. 200  $\mu\text{l}$  mennyiségű  $^{99m}\text{Tc}$ -vel jelzett ágens injektáltunk a patkányok farokvénáján keresztül. Az injektált aktivitás 120 MBq volt. Dorzoventrális és baloldali laterális felvételeket készítettünk

Nucline X-ring (Mediso) SPECT gamma kamera és LEHR kollimátor segítségével 5, 15, 30, 60 perccel, majd 2, 8 és 22 órával az injekciók után, hogy meghatározzuk az egyes aktivitás-halmazódások, szerv-aktivitások időbeli változásait. A kísérleti állatokat 5 mg/ttg (mg/testsúly gram) xilazin és 10 mg/ttg ketamin-hidroklorid kombinációjával altattuk. Az összes szcintigráfias képet 60 másodperces gyűjtéssel, exponálással nyertük ki, 1024x1024x16-os mátrix-felbontást használva. A kritikus vizsgált szervek a szív, máj, lép, a váll-ízület csontjai és a hólyag volt. Meghatároztuk a szervek körvonalát a szcintigráfias képek kiértékelése során, grafikusán körülrajzoltuk, majd ROI-módszerrel kiszámoltuk a szerv-aktivitásokat. A később tárgyalt, és az 5. táblázatban bemutatott százalékos injektált aktivitás-értékeket (I.D.%) a  $^{99m}\text{Tc}$  izotóp bomlását figyelembe véve korrigáltuk.

### **3.2.2. Tumor-transzplantált Fischer 344 patkányok vizsgálata**

*Tumor-modell.* A tumor modell sejtvonalként a hepatocelluláris karcinóma (HeDe) szolgált. A kísérleti sejtvonalakat olyan tumorindukált Fischer 344 patkányokból izoláltuk, amelyek 1 napos koruktól fogva 5-7 hónapon keresztül injekció formájában N-nitroso-dimetilamin (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, No 77561) kezelést kaptak 125  $\mu\text{g}$ -os állatonkénti dózisban, fiziológiás sóoldatban feloldva. A kifejlődött tumorokat a kémiai tumorigenezis után eltávolítottuk. Ezek a tumorszövetek szolgálták a későbbiekben felhasználható HeDe sejtvonalakhoz [Trencsényi és mtsai 2007].

*Kísérleti állatok.* 150 és 200 g közötti testsúlyú 11 kifejlett Fischer 344 patkányt (Charles River Hungary Ltd., Gödöllő, Hungary) használtunk a tumor-transzplantációs vizsgálatokhoz. Az állatokat hagyományos laboratóriumi körülmények között tartottuk, standard laboratóriumi tápot és csapvizet kaptak.

*A kísérleti tumor-transzplantáció.* A tumor-transzplantációhoz egymillió HeDe sejtet vettünk fel 10  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatban, majd helyeztünk Gelaspon<sup>®</sup> lemezre (Germed, Rudolstadt, Germany). A retroperitoneumot minden esetben hasi metszéssel nyitottuk fel, majd a bal vese feltárása után a sejteket tartalmazó zselatin gél-lemezt a bal vesetok alá helyeztük be [Trencsényi és mtsai 2007]. A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP kísérleti anyaggal

történő vizsgálatokat 10 nappal a műtéti sebek összevarrása után végeztük el [Paragh és mtsai 2003]. A sebészeti, transzplantációs beavatkozások során az anesztéziára xilazint és ketamin-hirdokloridot alkalmaztunk intraperitoriálisan, majd az állatok meloxicam-ot kaptak posztoperatív fájdalomcsillapítóként.

*In vivo SPECT vizsgálatok.* A tumor-transzplantált kísérleti állatokat két csoportra osztottuk, mindkét csoport 4 állatból állt. Az első csoport 0,5 ml 125 MBq aktivitású  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecske készítményt kapott farokvénán keresztüli injekcióval, a második, kontroll csoport azonos aktivitású és azonos térfogatú  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-t.

A szcintigráfias vizsgálatokat az állatok 5 mg/ttg xilazin és 10 mg/ttg ketamin-hidroklorid általi altatásában végeztük. Az állatokról ventrodorzális és jobboldali laterális felvételeket készítettünk Nucline X-ring (Mediso, Hungary) kamera segítségével, LEHR kollimátort használatával, 30 perccel, 1, 2, 4, 8 és 24 órával az injektálás után. A gamma kamera előzetesen kalibrálva volt a  $^{99m}\text{Tc}$  radionuklid 140 KeV-os sugárzására. A szcintigráfias képeket 60 másodpercig gyűjtöttük a kamerával (kivéve a 24 órás felvételeket, azok 300 másodperces exponálással készültek), 1024x1024x16-es felbontású és bitmélységű beállítás mellett. A szervek injektálás utáni aktivitását ROI (Region Of Interest) kijelölésekkel határoztuk meg, ebben az Interview szoftver (Mediso Ltd., Hungary) állt a rendelkezésünkre.

*Ex vivo szerveloszlási vizsgálatok.* Az injektálást követő 30. percben, majd a 2., 8. és 24. órában mindkét csoportból 1-1 kísérleti állatot intrakardiális T61<sup>®</sup> injekcióval (Intervet B.V., The Netherlands) áldoztunk fel, majd a kiválasztott szervek, a szív, a máj, a lép, a jobb vese és a tumoros bal-vese aktivitását mértük gamma-szcintillációs számlálóval ("NZ-310 NaI(Tl) crystal gamma scintillation counter"). A szerv-mintákat az aktivitásmérések előtt fiziológiás sóoldattal mostuk le, majd szárítás után megmértük a tömegüket is. Minden időpontban vettünk az állatokból vérmintát, ezek aktivitását azonos módon mértük meg. A kapott beütésszám- és tömeg-eredményekből meghatároztuk az injektált aktivitás egyes szervekre és a szervek egységnyi tömegére eső hányadát, azaz az I.D./teljes szerv és az I.D/g szerv értékeket. A vér esetén a vérminta tömegéből és a kísérleti állat teljes testsúlyából extrapoláltunk a teljes vérmennyiség aktivitás-mennyiségére és aktivitás-koncentrációjára. A hólyag-

aktivitásokat a ventrodorzális felvételek ROI-analízise alapján állapítottuk meg a megfelelő időpontokban.

Az ún. *EPR-effektus* (a “megnövekedett átszűrődési és visszatartási effektus”) már relatív kisméretű, korai stádiumban lévő tumoroknál is fellép, és okozhatja nano-méretű részecskék passzív halmozását. Ennek a jelenségnek a vizsgálatára egy azonosan tumor-transzplantált Fischer 344 patkánynak folsav nélküli, de azonos részecskeméretű  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett nanorészecske változatot injektáltunk, azonos injektált aktivitással. Két órával az injektálás után erről az állatról is szcintigráfias felvételeket készítettünk, és a szerveit az *ex vivo* szerveloszlási vizsgálatokkal azonos módon vizsgálatuk.

*Specifikus receptor-blokkoló vizsgálat* céljából további két kísérleti állatnak injektáltunk a jelzett nanorészecskék alkalmazását megelőzően egy órával azonos, de nem jelzett nanorészecskéket azonos mennyiségben (0,5 ml), majd ezen állatok szcintigráfias felvételeit szintén az aktív készítmény injektálása után 2 órával értékeltük ki, szintén ROI-analízist alkalmazva.

*SPECT/CT vizsgálatokra* injektálás után 6. órával került sor két kísérleti állatnál, egésztest fúziós képek készültek egy nagyfelbontású hibrid SPECT/CT kamera segítségével (nanoSPECT/CT, Mediso Ltd., Hungary), részletesebb felvételeket eredményezve. A fúziós képeket a Mediso Interview szoftverével értékeltük ki.

### **3.2.3. Spontán beteg kutya folát receptort kifejező szájüregi daganatának vizsgálata $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskékkel**

A folát receptort célzó, jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék klinikai használhatóságát egy spontán eredetű szájüregi tumorban szenvedő 7 éves tacsó kutyán vizsgáltuk. A tumor szabad szemmel is jól látható és kitapintható volt. A vizsgálatra az állat tulajdonosai előzőleg írásos beleegyezésüket adták. A szájüregi tumor előzetes diagnózisát  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP szcintigráfiával, majd tüvel vett citológiai vizsgálat után állítottuk fel, illetve szövettani vizsgálattal támasztottuk alá. A nem-fekélyes, a szájüreg felső régiójában elhelyezkedő tumor mérete 3,5 x 4,2 cm volt. A daganatból vett 4



hónappal korábbi szövetminta hisztopatológiai vizsgálata kimutatta, hogy a tumor fajtája folát receptort kifejező pikkelysejtes karcinóma (“squamous cell carcinoma” – SCC). Két hónappal a sebészeti eltávolítás után a tumor helyileg kiújult, majd gyors növekedést mutatott.

Az 1 mg/ttkg (mg/ testsúly kg) xilazin és 10 mg/ttkg ketamin-hidroklorid iv. injekciójával elbódított állat 500 MBq aktivitású jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP készítménnyel injektáltuk, az injektált térfogat 2 ml volt. Az injektálás után 10 perccel ventrodorzális és laterális egésztest felvételeket készítettünk, majd két órával az injektálást követően háromdimenziós a koponya-SPECT vizsgálatot végeztünk az állaton. A SPECT után ismételt (2 órás) ventrodorzális és baloldali laterális egésztest felvételeket is készítettünk. Az egyes szervekben (szív, máj, vesék, hólyag), illetve a tumorban felhalmozódott  $^{99m}\text{Tc}$ -aktivitásokat, a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP kontrasztanyag szervezoslási értékeit az egésztest felvételek alapján, ROI-analízissel állapítottuk meg.

### **3.2.4. Spontán beteg kutyák őrszem nyirokcsomóinak vizsgálata Senti-Scint<sup>®</sup>-tel**

A  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> HSA nanokolloiddal végzett őrszem nyirokcsomó vizsgálatba 24, ismert daganatos betegségben szenvedő kutyát vontunk be. Ezeknek az állatoknak jól tapintható, a bőrfelszínhez közeli helyezkedésű, 3 cm-nél nagyobb átmérőjű tumorjuk volt, kimutatható távoli metasztázis nélkül (negatív nyaki Röntgenvizsgálattal, negatív hasi ultrahang eredménnyel és/vagy negatív onkológiai szcintigráfias lelettel). A betegek összesítő adatait az 1. táblázat tartalmazza. A kísérletekhez az állatok tulajdonosai a tájékoztatást követően írásbeli beleegyezésüket adták.

*Szcintigráfia.* 20 és 37 MBq aktivitású, 100  $\mu\text{l}$  térfogatú  $^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett humán szérum albumin nanokolloid készítményt,  $^{99m}\text{Tc}$ -Senti-Scint<sup>®</sup>-et injektáltunk szubkután, közel a primer tumorhoz. A pontos injektált aktivitást a jelzett anyagot tartalmazó fecskendő injektálás előtti és utáni gamma-kamera által mért aktivitásainak különbségéből állapítottuk meg. Az állatokról ventrodorzális és laterális felvételeket

készítettünk 1 és 3 órával a radiokolloid alkalmazása után a primer tumor és a mellé helyeződő helyi nyirokcsomók régiójáról digitális gamma-kamera segítségével (Nucline X-ring, Mediso Kft.). A felvételek paramétereinek beállításánál 256x256x16-os mátrixméretet és 3 perces gyűjtési időt használtunk.

**1. táblázat:** A  $^{99m}\text{Tc}$ -Senti-Scint<sup>®</sup>-tel végzett őrszem nyirokcsomó-vizsgálatban résztvevő spontán beteg kutyák adatai [Balogh és mtsai 2002]

	1. csoport (n = 13)	2. csoport (n = 6)	3. csoport (n = 2)	4. csoport (n = 3)
Szövetteni eredmény	Emlőkarcinóma	Emlőadenóma	Pajzsmirigy és mellékpajzsmirigy karcinóma	Fibroszarkóma a nyaki régióban
Kor (évek)	6-13	6-11	8-10	8-9
Nem: nőstény / ivartalanított	12/1	5/1	0/1	1/0
Nem: hím / ivartalanított	0/0	0/0	1/0	2/0
Testtömeg [kg]	7.5-56	6-27	11-32	25-42
Fajta	Puli (2) Keverék (4) Schnauzer (2) Dobermann (2) Németjuhász (1) Mopsz (1) Dán dog (1)	Dobermann (2) Westhighland terrier(1) Tacsó (1) Pekingi palotakutya(1) Bolognai pinszi (1)	Uszkár (1) Csau-csau (1)	Boxer (1) Schnauzer (1) Keverék (1)

A ROI adatgyűjtést az injektálási pont és a kirajzolódó, azonosítható nyirokcsomók, a vesék és a húgyhólyag körülrajzolásával végeztük, a kinyert, mért beütésszámokat a teljes injektált aktivitással hasonlítottuk össze, az ahhoz mért arányait számoltuk. A vizsgált testtájokról leborotváltuk az állatok szőrét, és a beazonosított őrszem nyirokcsomók helyét alkoholos filccel jelöltük a bőrükön.

*Intraoperatív detektálás.* A műtét előtt 5-10 perccel 1%-os, 100 µl térfogatú patent-kék oldatot injektáltunk a korábban radiokolloiddal injektált pontba. Az anesztéziát intravénásan adagolt 60 mg-nyi medetomidin-hidrokloriddal (Domitor, Pfitzer) és testsúly-kilogrammonkénti 500 mg diazepammal (Seduxen, Richter Gedeon Rt.) végeztük. Az őrszem nyirokcsomó keresését egy intraoperatív gamma-szonda (Europrobe, Eurorad) segítségével végeztük (1. ábra). A primer tumort és a felderített őrszem nyirokcsomót eltávolításuk után ex vivo is ellenőriztük a gamma-szondával. A műtéti beavatkozás végeztével az anesztéziát testsúly-kilogrammonkénti 300 mg atipamezol-hidrokloriddal (Antisedan, Pfitzer) szakítottuk meg.



**1. ábra:** Az őrszem nyirokcsomó intraoperatív detektálása kutyában, a  $^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> radiokolloid primer tumor helye mellé történő injektálása után, kék színű csomagolásban a gamma-szonda [Balogh és mtsai 2002]

*Kiegészítő vizsgálatok.* A műtéti seb bevarrása után az állatokat ismét gammakamerával vizsgáltuk meg, esetlegesen visszamaradt aktivitás-halmozásokat keresve, illetve a kimetszett szövetmintákról is készítettünk szcintigráfias felvételeket. A

radiofarmakon injektálása előtt, majd azt követően 1, 2, 3, 4, 6, és 10 órával 1 ml-es vér- és vizeletmintákat vettünk fel. E minták és a kimetszett szövetminták (a kimetszett tumor, a nyirokcsomók és a környező szövetekből származó minták) aktivitását is gamma-számlálóval vizsgáltuk (NK-350, Gamma Kft., Hu.), ezeket az eredményeket ismert, kalibrált aktivitású standard-oldatok aktivitásértékeivel vetettük össze. Az állattól 1 méterre mérhető külső dózisértékek megfelelően alacsony mértékét hordozható gamma-mérő műszerrel (FAG FH 40, Eberline, Germany) ellenőriztük a kutya hazabocsátása előtt, 10 órával a radiokolloid beadása után.

*Patológiai vizsgálatok.* A kimetszett primer tumorokat és őrszem nyirokcsomókat 8%-os formaldehid oldatban fixáltuk és tároltuk a szövettani vizsgálatok számára. A primer tumorokat hematoxilin-eozin (HE) festéssel vizsgáltuk. Az őrszem nyirokcsomók egyik feléből 3 µm-es szeleteket készítettünk és HE-festéssel vizsgáltuk őket, másik felükből citokeratin antigénnel immunhisztokémiai (IH) vizsgálatot végeztünk (AE1/AE3, DAKO, Switzerland).

### **3.2.5. Az őrszem nyirokcsomó humán vizsgálatai Senti-Scint<sup>®</sup>-tel**

A vizsgálat során 128 emlődaganatos női beteg eredményeit értékeltük, akik esetében kimetszéses biopszia és szövettani vizsgálatok történtek mind az elsődleges tumor, mind a sebészeti eltávolított nyirokcsomók tekintetében. A betegek klinikai adatait a 2. táblázat foglalja össze. A nyomonkövetési idők 8 és 43 hónap közt mozogtak (átlagosan  $22 \pm 7$  hónap volt). A betegeknél kitapintható nyirokcsomót nem lehetett észlelni, ugyanakkor a szövettani vizsgálattal alátámasztott diagnózisuk szerint emlőtumor volt megállapítható náluk. A kizárásos kritériumok közé tartoztak a fertőzéses megbetegedések, esetlegesen előforduló fertőzött területek, a nem begyógyult hegek, a hematómák, a multicentrikus primer elváltozások, a feltételezhető vagy ismert hónalj-tájéki vagy más területeken kimutatható áttétek, az elvégzett preoperatív kemoterápiás és mellkasi sugárterápiás kezelések. A vizsgálatok elvégzéséhez a betegek előzetesen írásos beleegyezésüket adták.

**2. táblázat:** Az HSA nanokolloid segítségével elvégzett őrszem nyirokcsomó-vizsgálatban résztvevő 128 beteg klinikai besorolása [Mirzaei és mtsai 2003]

Kor	33 – 90 év
átlag	63 ± 13 év
Posztmenopauzális	109 eset (85%)
Kitapintható tumor	92 eset (72%)
Tumorméret (mm)	5 – 40 mm
átlag	17,36 ± 7,97 mm
A tumor elhelyezkedése	
Belső-felső negyed	14 eset (10,9%)
Külső-felső negyed	76 eset (59,4%)
Belső-alsó negyed	17 eset (13,2%)
Külső-alsó negyed	6 eset (4,7%)
Mellbimbó	15 eset (11,7%)
Tumortípus	
in situ duktális karcinóma	14 (10,9%)
invazív duktális karcinóma	76 (59,4%)
invazív lobuláris karcinóma	35 (27,3%)
invazív tubuláris karcinóma	3 (2,4%)

A vizsgálat teljes egészében az azt végző klinika etikai iránymutatásai szerint történt. Minden beteget rendszeres klinikai vizsgálatokkal követtük nyomon, tumormarkerek szintek mérésével, mammográfiával és ultrahangos vizsgálatokkal.

*Betegvizsgálati protokoll.* 18 órával a műtéti beavatkozást megelőzően a betegek 400 µl térfogatú, 15 MBq aktivitású <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett HSA nanokolloid (Senti-Scint®) injekciót kaptak szubkután alkalmazva, a tumor és a bőr közé injektálva. Az injektálás pontos helyeit a mammográfiás felvételek és/vagy az ultrahangos vizsgálatok

eredményei alapján választottuk ki. Az injektlás pontján a radiofarmakon szétáramlását közvetlenül a gyógyszer beadása után masszírozással segítettük elő. Az injektlást követően 30 és 60 perccel, illetve szükség esetén 4 órával elülső planáris mellkasi felvételek készültek gamma-kamera segítségével (General Electrics, Helix, Haifa) nagy felbontású kollimátor segítségével, a kamera 140 keV-es energiacsúcsra állításával. Mindegyik statikus felvétel 10 perces gyűjtéssel készült. Abban az esetben, amikor az elülső (anterior) felvételeken nem volt kivehető egyértelmű őrszem-nyirokcsomó halmozás, oldalsó (laterális) felvételek is készültek az emlő-hónalj régiókról. A statikus gamma-kamerás felvételek után és alapján gamma-szondával is (Navigator “gamma probe”, Waterdown, Mass, USA) meghatároztuk az őrszem nyirokcsomó pontos helyzetét, és ennek helyét a beteg bőrén festékkel jelöltük. A műtét során szubareoláris kékfestékes injekciót (Lymphazurin 1%, USSC, Norwalk, Canada) alkalmaztunk minden betegen, hogy az segítsen pontosan beazonosítani és eltávolítani a szentinel nyirokcsomót, illetve emellett a műtéti területen „gamma-próbát” is végeztünk steril csomagolásban lévő gamma-szonda segítségével. A patent-kékkel megfestődött és a radioaktívnek bizonyult nyirokcsomókat eltávolítottuk. Mindezek után vagy az emlőmirigyek eltávolítása vagy a teljes emlő eltávolítása következett, amelyet a teljes axilláris blokk-disszekció követett.

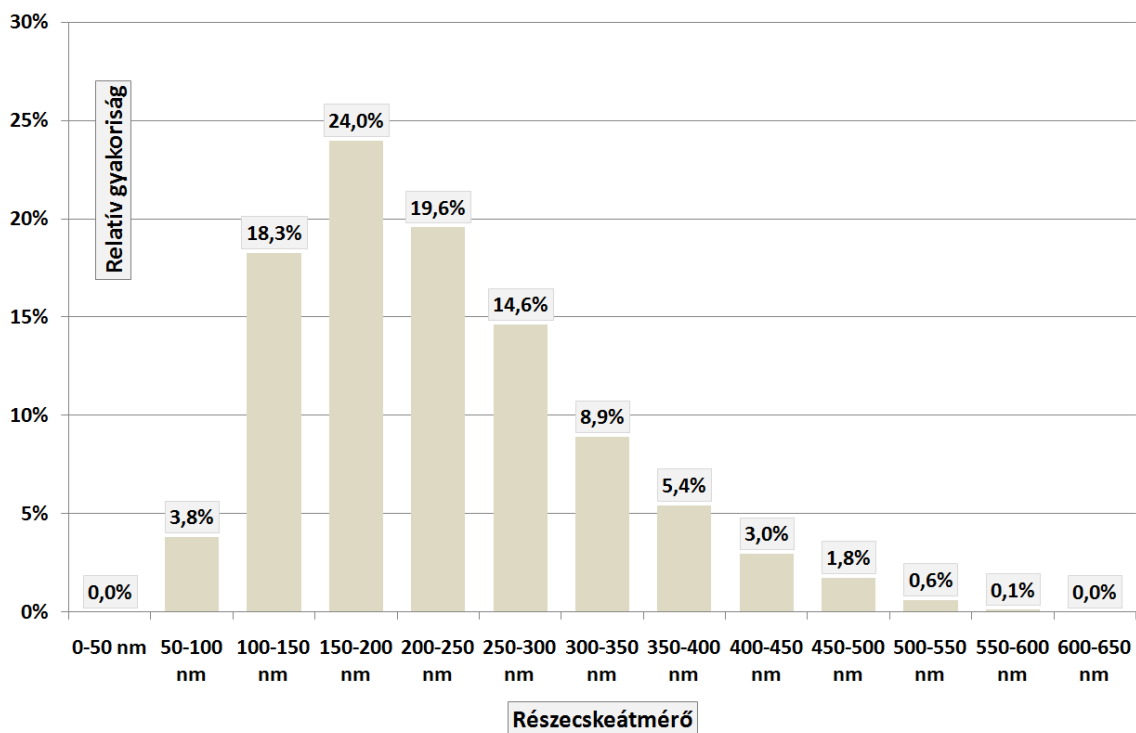
*Patológiai vizsgálatok.* A nyirokcsomókat patológiai vizsgálatoknak vetettük alá. Ha a műtét során a hónalji nyirokcsomó metasztázisra nézve pozitívnek bizonyult, akkor radikális műtétet hajtottak végre, amely során a hónalj összes nyirokcsomóját eltávolították. Ha a fagyasztásos metszés során nem találtak a nyirokcsomókban áttétet, de a későbbi, részletes vizsgálatok (hematoxin-eozin (HE) festéssel, illetve a citokeratin antigénnel végzett immunhisztokémiai (IH) tesztek) mégis áttéteket állapítottak meg (Cytokeratin AE1/AE3, IgG1-M3515, Dako, Calif., USA), akkor a pácienseknek egy második műtét során távolították el a hónalji nyirokcsomóit. Ezeket az eltávolított nyirokcsomókat is HE-festéses vizsgálatnak vetettük alá.

## 4. Eredmények

### 4.1. Az HSA nanokolloiddal (Senti-Scint<sup>®</sup>-tel) végzett humán őrszem nyirokcsomó vizsgálatok

#### 4.1.1. Az alkalmazott radiokolloid jelzettségi hatásfokának és részecskeméret-eloszlásának vizsgálata

A klinikai vizsgálatokban alkalmazott radiokolloid (Senti-Scint<sup>®</sup>) jelzettségi hatásfoka minden esetben 99% fölötti volt ( $99,4\% \pm 0,3\%$ ), és ez az izotópmegkötési képesség az in vitro vizsgálatok során tartósan megmaradt. A részecskeméret-eloszlási vizsgálatok azt mutatták, hogy a vizsgálatokban felhasznált 12 különböző gyártási számú HSA radiokolloid részecskéinek 90%-a minden esetben 100 nm és 600 nm közé esett, illetve a teljes frakciók 100%-a 50 és 600 nm között volt (2. ábra).



2. ábra: A humán őrszem nyirokcsomó vizsgálatok során felhasznált 12 HSA radiokolloid (Senti-Scint<sup>®</sup>) minta összesített, átlagos részecskeméret eloszlása

A 2. ábra a vizsgálatokban alkalmazott 12 különböző gyártási számú Senti-Scint® radiokolloid minták jelzés utáni összesített, átlagos részecskeméret-eloszlását ábrázolja, az egyes részecskeméret-tartományokhoz tartozó relatív gyakorisági értékekkel. A 3. táblázat az egyes minták részecskeméretének jellemző értékeit mutatja.

**3. táblázat:** A humán őrszem nyirokcsomók vizsgálata során felhasznált 12 db. különböző gyártási számú SC1 – SC12 jelű HSA radiokolloid (Senti-Scint®) átlagos részecskemérete (“mean diameter”), és az egyes részecskefrakciók abszolút mérettartománya („range”)

Minta	Átlagos hidrodinamikai részecskeátmérő nm-ben	A frakció mérettartománya nm-ben
SC1	177	91 - 470
SC2	203	86 - 612
SC3	171	71 - 594
SC4	180	72 - 512
SC5	152	86 - 348
SC6	176	90 - 378
SC7	159	82 - 475
SC8	194	78 - 532
SC9	171	74 - 441
SC10	143	79 - 311
SC11	226	95 - 566
SC12	151	79 - 367
<b>Átlag</b>	<b>175 nm</b>	<b>82 - 467 nm</b>
<b>± SD</b>	<b>23,7 nm</b>	

Az összes alkalmazott nanokolloid átlagos hidrodinamikai részecskeátmérője 175 nm ( $\pm$ SD:23,7nm) volt, az minták frakcióinak átlagos mérettartománya pedig 82 nm és 467 nm közé esett (3. táblázat).



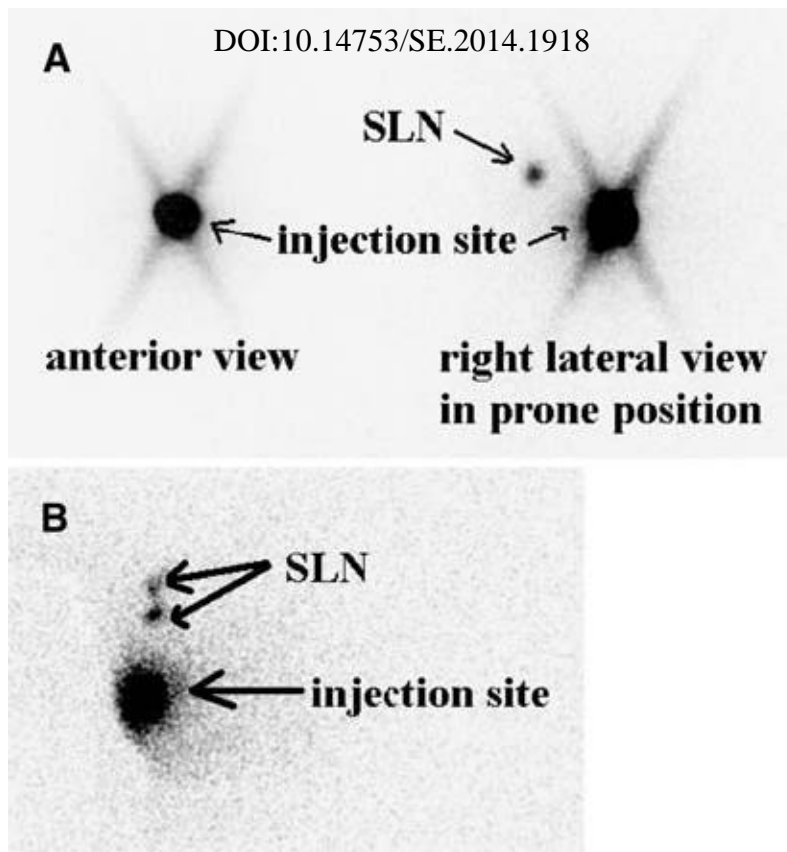
#### **4.1.2. Az őrszem nyirokcsomó vizsgálatok klinikai eredményei**

A Senti-Scint<sup>®</sup> nanokolloid segítségével végzett preoperatív limfoszcintigráfiai leképezés (3. ábra) és a gamma-szondával végzett intraoperatív gamma-detektálás egyaránt 203 őrszem nyirokcsomót talált a 128 betegből 122-ben (a betegek 95%-ában). Csupán 12 esetben volt szükséges, hogy 4 órás statikus felvételeket is készítsünk, és ezek közül 6 esetben 18 órával az injekció után is negatívnak bizonyult szentinel nyirokcsomóra a képalkotási vizsgálat eredménye. A szövettani vizsgálatok 38 esetben igazoltak a nyirokcsomókban metasztázist, ezek közül öt esetben ez csak immunhisztokémiai módszerrel, citokeratin antitestekkel volt kimutatható.

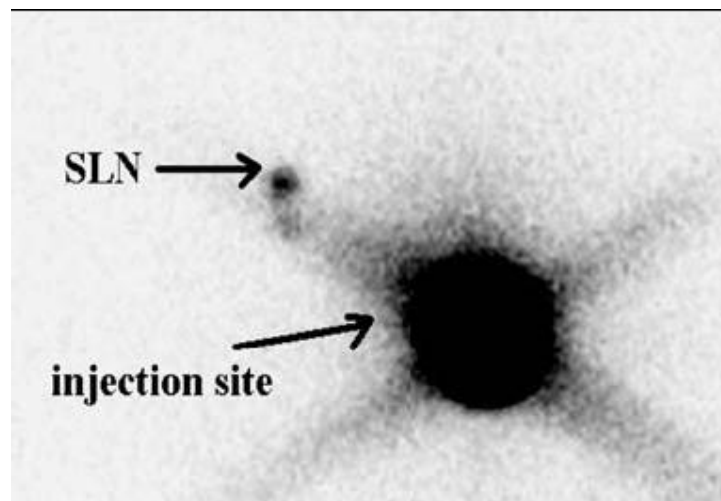
Egyetlen beteg volt, akinél egy hónalji nyirokcsomóban metasztázis volt kimutatható, miközben az sem a preoperatív limfoszcintigráfias képalkotásban nem volt detektálható, sem a kékfestéses módszerrel nem volt fellelhető. Ebben az esetben az áttétes nyirokcsomó műtét közben volt kitapintható, az áttét pedig szövettanilag volt kimutatható, miközben a nyirokcsomó sem a limfoszcintigráfias, sem az intraoperatív gamma-szondás detektálással nem volt azonosítható.

Gamma-kamerával az emlő belső nyirokcsomói irányába mutató nyirokáram 5 esetben volt detektálható (4. ábra), és egy esetben volt kimutatható emlőn belüli nyirokcsomó (5. ábra). Ezekben a betegekben teljes hónalji nyirokcsomó eltávolítás történt, majd ezt követték a részletes patológiai vizsgálatok. Egyetlen ilyen esetben sem voltak kimutathatók áttétes ellenoldali nyirokcsomók. A kékfestéses módszer 183 őrszem nyirokcsomót igazolt 105 betegben, azaz a betegek 82%-ában, két esetben csak ez a módszer azonosította be a szentinel nyirokcsomót, a radiokolloiddal végzett vizsgálat nem.

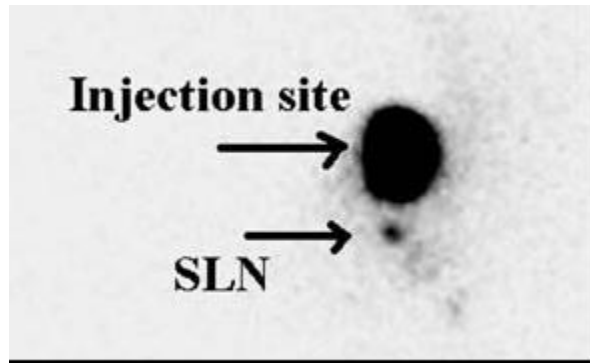
A sebészeti beavatkozások után a 128 beteg egyikében sem tapasztaltunk tumor-kiújulást.



**3. ábra:** A: Az emlő jobb felső-külső negyedében elhelyezkedő tumor: az injekció helye („injection site”) és az őrszem nyirokcsomó (SLN) elülső (anterior) és jobb-oldalsó („right-lateral”) nézetből. B: Az emlő jobb felső-külső negyedében elhelyezkedő tumor: az injekció helye („injection site”) és két darab őrszem nyirokcsomó (SLN) a jobb oldali hónaljban, elülső (anterior) nézetből. [Mirzaei és mtsai 2003]



**4. ábra:** Az emlő bal alsó-belső negyedében helyezkedő tumor: a baloldalon jól kirajzolódó szegycsont melletti őrszem nyirokcsomó látható, vélhetően egy másodikkal együtt. A nyirokáram nem látszik az axilla irányában (anterior nézet) [Mirzaei és mtsai 2003]



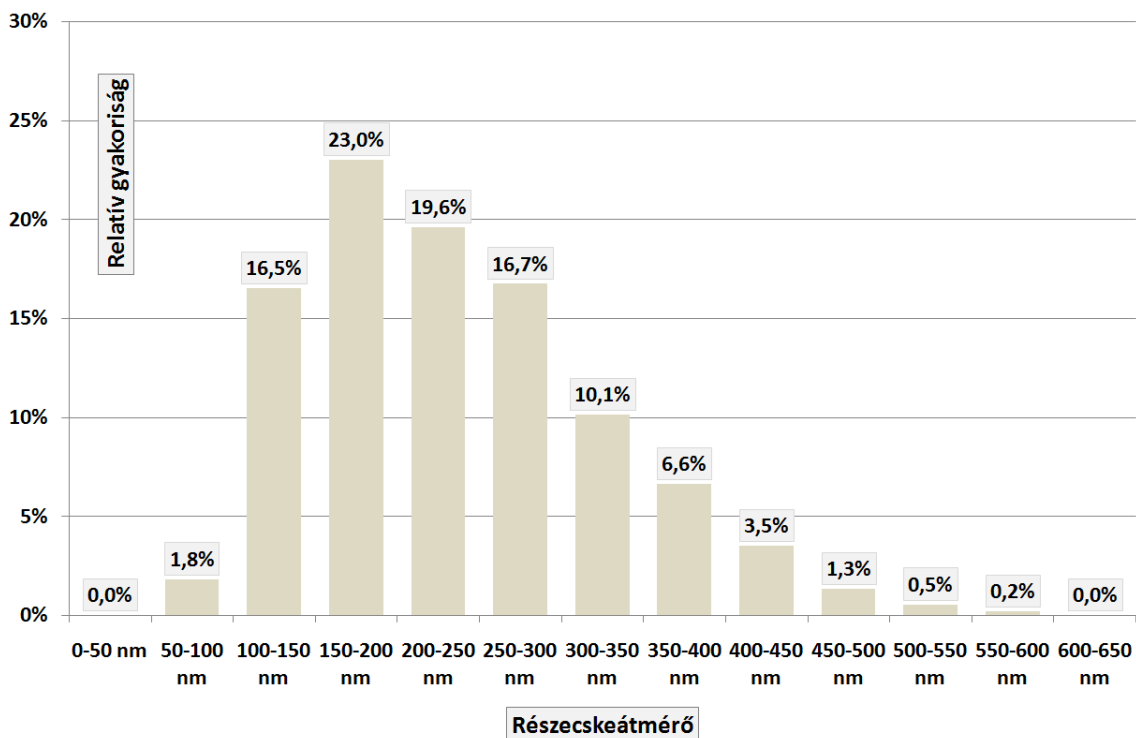
**5. ábra:** Az emlő bal felső-külső negyedében helyezkedő tumor: az injekciós helye („injection site”) és az emlőn belüli őrszem nyirokcsomó (SLN) kirajzolódása baloldali laterális nézet hason fekvő helyzetben [Mirzaei és mtsai 2003]

## 4.2. Spontán beteg kutyák őrszem nyirokcsomóinak vizsgálata Senti-Scint<sup>®</sup>-tel

### 4.2.1. In vitro eredmények

Az állatorvosi klinikai vizsgálatokban alkalmazott 6 különböző gyártási számú HSA radiokolloid (Senti-Scint<sup>®</sup>) jelzettségi hatásfoka ezúttal is minden esetben 98% fölötti volt ( $99,1\% \pm 0,6\%$ ). Ez az izotópmegkötési képesség a 6 órás in vitro vizsgálatok során tartósnak bizonyul. A részecskeméret-eloszlási vizsgálatok azt mutatták, hogy a 6 különböző gyártási számú HSA radiokolloid részecskéinek 90%-a 100 nm és 600 nm közé esett, illetve a teljes frakciók 100%-a 50 és 600 nm között volt (6. ábra).

A 6. ábra a vizsgálatok során felhasznált 6 különböző gyártási számú Senti-Scint<sup>®</sup> radiokolloid (SC13 – SC18) jelzés utáni összesített, átlagos részecskeméret-eloszlását ábrázolja, a 4 táblázat az egyes injektált nanokolloidok frakcióinak jellemző értékeit foglalja össze.



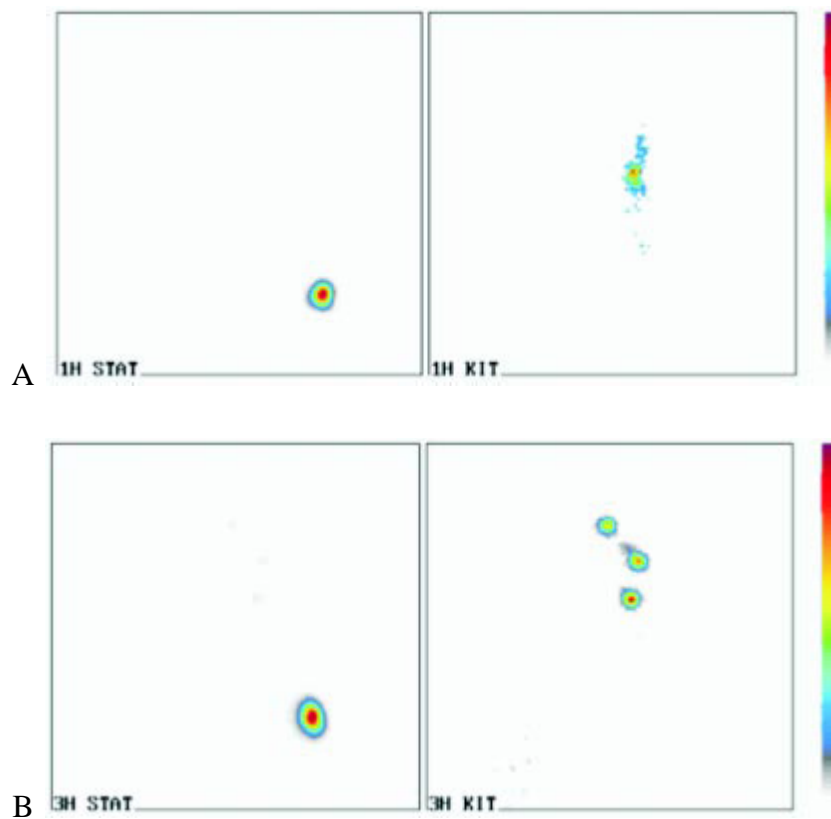
**6. ábra:** A kutyák őrszem nyirokcsomó vizsgálatait során felhasznált 6 különböző gyártási számú HSA radiokolloid (Senti-Scint®) összesített, átlagos részecskeméret eloszlása, az egyes mérettartományokhoz tartozó, %-ban megadott relatív gyakoriság-értékekkel

**4. táblázat:** Az állatorvosi klinikai őrszem nyirokcsomó vizsgálatok során felhasznált különböző gyártási számú HSA radiokolloid (Senti-Scint®) átlagos részecskemérete (“mean diameter”), illetve az egyes részecskefrakciók abszolút mérhető mérettartománya („range”), és ezek átlagai

Minta	Átlagos hidrodinamikai részecskeátmérő nm-ben	A frakció mérettartománya nm-ben
SC13	154	78 - 356
SC14	173	86 - 382
SC15	223	81 - 575
SC16	209	88 - 498
SC17	177	90 - 462
SC18	183	94 - 429
<b>Átlag ± SD</b>	<b>187 nm 25,2 nm</b>	<b>86 - 450 nm</b>

#### 4.2.2. In vivo eredmények

Egy órával és három órával a radiokolloid alkalmazása után átlagosan 2% és 5% közötti injektált aktivitás-hányad volt mérhető az őrszem nyirokcsomók környékén (7. ábra). A vesék és a húgyhólyag kontúrja a 3 órás felvételeken tűnt elő, és általában együtt kevesebb, mint 5%-át halmozták a teljes injektált dózisonak (5. táblázat). A 24 daganatban szenvedő páciensben 35 őrszem nyirokcsomót találtunk, ami betegenként, tumoronként hozzávetőleg másfél nyirokcsomót jelent. Ezek csupán 23%-a, 8 darab volt megnagyobbodott, azaz tapintással is beazonosítható. A különböző detektálási módok között érzékenységekben jelentős eltérések voltak. A 35 őrszem nyirokcsomó közül 34-et (97%-ot) intraoperatív gamma-szondával találtunk meg, ez azt jelenti, hogy e módszerrel csupán egy érintett nyirokcsomó maradt rejtve.



7. ábra: Ventrális helyi statikus felvételek egy emlőtumorban szenvedő kutyáról, 15 MBq aktivitású, 100  $\mu$ l térfogatú peritumorálisan, szubkután alkalmazott  $^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett HSA nanokolloid (Senti-Scint<sup>®</sup>) injektálása után 1 órával (A) és 3 órával (B) [Balogh és mtsai 2002]

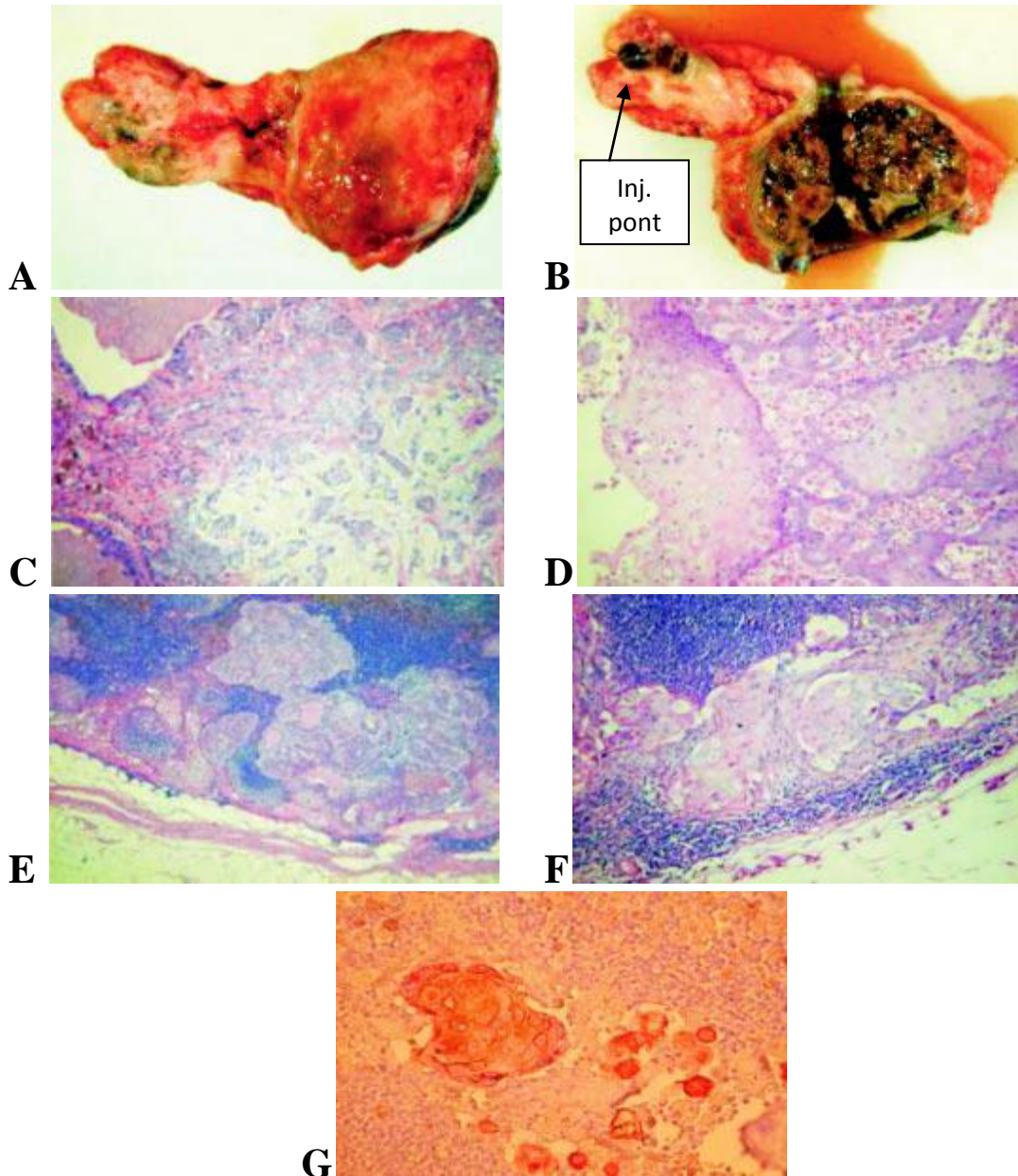
**5. táblázat:** ROI adatok emlőtumorban szenvedő kutya szcintigráfias felvételei alapján, az injektált dózis százalékos hányadában megadva (I.D.%), 15 MBq aktivitású, 100 µl térfogatú peritumorálisan, szubkután alkalmazott <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett HSA nanokolloid (Senti-Scint®) injektálása után 1 órával és 3 órával [Balogh és mtsai 2002]

	1 óra után	3 óra után
Az injektálás pontja ( I.D.%)	92 ± 4	76 ± 12
Őrszem nyirokcsomó(k) ( I.D.%)	2 ± 2	5 ± 2
Vesék ( I.D.%)	Nem látható	< 3
Hólyag ( I.D.%)	< 2	< 5

Az érintett nyirokcsomókból 31 (89%) tisztán kivehető és azonosítható volt a gamma-kamerás felvételeken, a kékfestéses módszer 27 esetben (77%) volt eredményes (8. ábra A és B része). 16 esetben (46%) az őrszem nyirokcsomók pozitívnak bizonyultak a hematoxin-eozin (HE) festéses vizsgálat szerint (8. ábra C, D, E és F része) és 22 esetben (63%) az immunhisztokémiai (IH) módszer alapján (8G ábra). Egyik nyirokcsomó sem volt HE-pozitív és IH-negatív. A különböző őrszem nyirokcsomó detektálási módszerek eredményeit a 6. táblázat foglalja össze.

**6. táblázat:** A különböző őrszem nyirokcsomó detektálási módszerekkel azonosított nyirokcsomó száma és aránya a vizsgált 24 kutya páciensben [Balogh és mtsai 2002]

	Szignifikánsan megnagyobbodott, kitapintható	Kékfestéssel azonosítható	Szcintigráfiával azonosítható	Gamma-szondával intraoperatíván azonosított
Detektált nyirokcs.	8 (23%)	27 (77%)	31 (89%)	34 (97%)



**8. ábra:** 7 éves dobermann emlőmirigyén elhelyezkedő 2,5 cm-es átmérőjű tumorjának hisztopatológiai vizsgálatai. **A, B:** Az emlőtájéki nyirokcsomókkal együtt kimetszett tumor, jól láthatóan kéken megfestett őrszem nyirokcsomókkal és injektálási ponttal a primer tumor mellett. **C, D:** A daganat szövettani vizsgálata rosszindulatú kevert-típusú duktális karcinómát eredményezett, amelynek néhány régiójában myoepitheliális proliferáció (C), karcinóma planocellulare területek (D), és hyalin metaplasia keveredett. **E, F:** A kimetszett nyirokcsomókban talált áttétek duktális tubulopapilláris karcinómának (E) illetve karcinóma planocellulare-nek (F) bizonyultak. **G:** IH-vizsgálat: anti-citokeratin által megfestett őrszem nyirokcsomó metasztázis. [Balogh és mtsai 2002]

A vérminták grammonkénti aktivitása minden esetben kisebb volt az injektált dózis 0,1%-ának megfelelő aktivitásánál, míg a vizeletminták aktivitás-értékei mindig ennek a 0,2%-os hányada alatt maradtak. A vérminták aktivitásának maximum-értékeit 2 órával, a vizeletmintákét pedig 6 órával a radiofarmakon beadása után figyeltük meg. A kimetszett szövetminták minden esetben az injektált aktivitás több, mint 90%-át hordozták. 10 órával az injektálás után az állat 1 méteres távolságában mérhető dózisérték mindig kisebb volt, mint 0,2 mSv. Az egyes állatok teljes testtömegére számolt effektív dózisérték minden esetben kisebb volt, mint 0,5 mSv.

### 4.3. A doxorubicint hordozó $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 nanorészecskék vizsgálatának eredményei

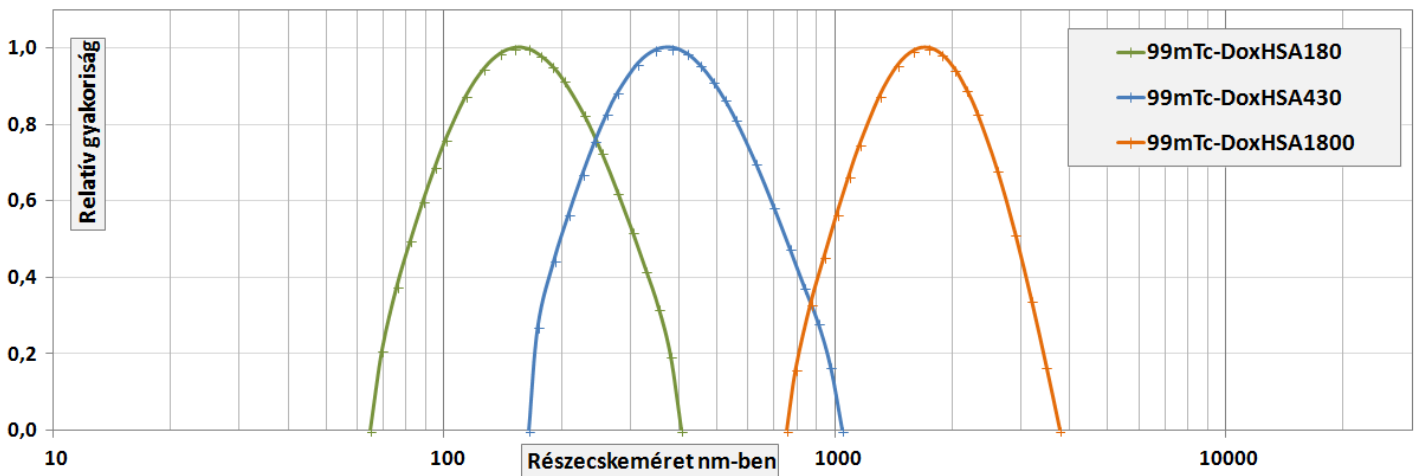
#### **4.3.1. A részecskékbe adszorbeált és a nem-megkötött doxorubicin arány megállapítása**

A 3.1.3-as pontban leírt kolloidok képzésénél alkalmazott centrifugálás során kinyert felülúszó-minták vizsgálatából kimutattuk, hogy az 1mg/ml-es doxorubicin koncentrációból a kolloid preparálás során a részecskék mindhárom minta ( $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800) esetében 95% fölötti hányadot adszorbeáltak. A doxorubicin-megkötési határfokuk vizsgálata azt mutatta, hogy 6, 24 és 48 órával a  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzés után a doxorubicin mennyiség 95% fölötti aránya kötődött a HSA részecskemátrixba.



### 4.3.2. A $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ és $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ készítmények részecskeméretének vizsgálata

A jelzési kísérlethez három különböző pH beállítás mellett három különböző részecskeméretű mintát használtunk fel. E három sarzs kezdeti, közvetlenül a preparálás utáni átlagos részecskeméretének közelítő értéke 180 nm, 430 nm és 1800 nm volt, amelyeket  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  névvel szerepeltetünk a későbbiekben. A részecskeméret-eloszlásokat a 9. ábra hisztogramja ábrázolja, az ordináta a relatív gyakoriságot mutatja. A leggyakoribb részecskeátmérőhöz (“mean diameter”-hez) tartozó relatív gyakoriságokat egységesen 1-nek vettük fel. A részecskefrakciók legjellemzőbb értékeit az 7. táblázat összesíti. A 180, 430 és 1800 nm-es átlagos részecskeméretre viszonylagosan magas, 35,5% és 44,1% közötti százalékos eloszlások (polidiszperzitások) tartoztak.



**9. ábra:** A három, további vizsgálatokra kiválasztott  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  kolloid rendszer részecskeméret-eloszlási hisztogramja: a relatív gyakoriságok maximumait 1-nek vettük fel, hogy közös hisztogramban ábrázoljuk őket [Polyak és mtsai 2011]

**7. táblázat:** A minták részecskefrakcióinak jellemző értékei [Polyak és mtsai 2011]

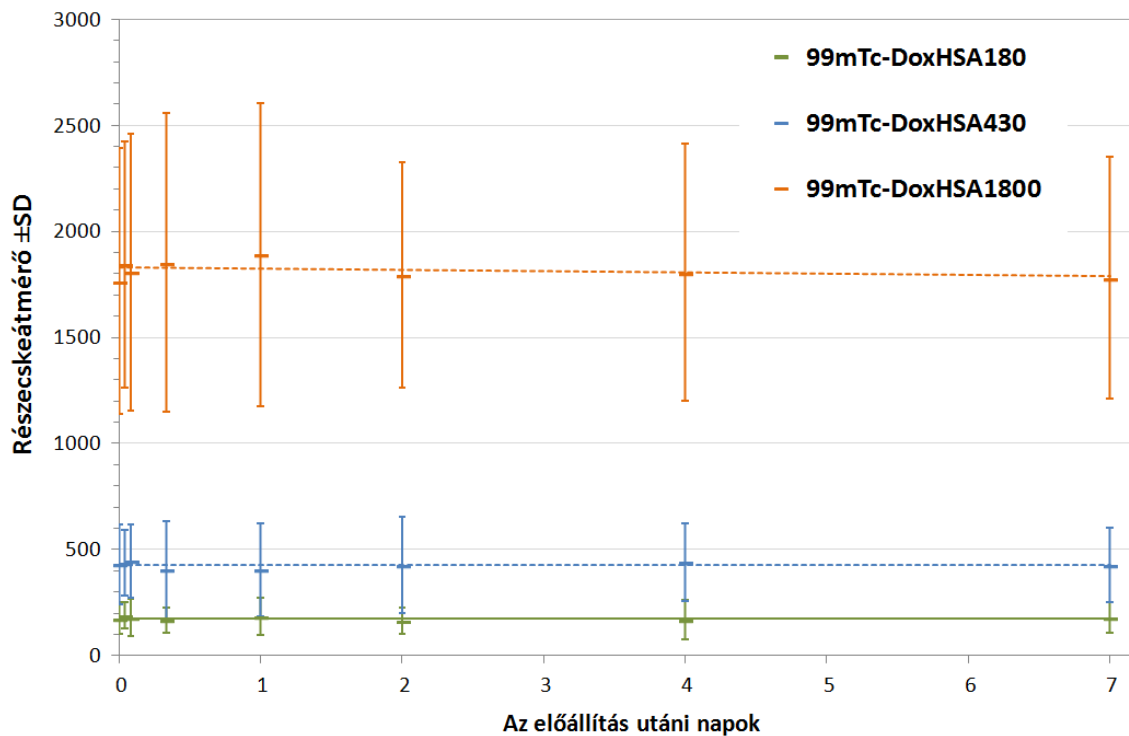
Minta	Átlagos részecskeméret (nm)	Polidiszperzitás (%)	A teljes frakció részecskeméret-tartomány (nm)
1. <sup>99m</sup> Tc-DoxHSA180	176	43,3	65 – 405
2. <sup>99m</sup> Tc-DoxHSA430	429	44,1	165 – 1044
3. <sup>99m</sup> Tc-DoxHSA1800	1764	35,5	755 – 3762

A részecskeméretetek esetleges időbeli változását 7 napon át követtük nyomon in vitro sorozatmérésekkel. Az előállítás utáni 1., 2., 4. és 7. napon meghatároztuk a relatív polidiszperzítási értékeket és a részecskefrakciók mérettartományait. A mérések eredményeit a 8. táblázat foglalja össze, illetve az ingadozásokat a 10. ábra szemlélteti grafikusán.

**8. táblázat:** A <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA180, <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA430 és <sup>99m</sup>Tc-DoxHSA1800 in vitro méretstabilitása: a “Mean D” az átlagos részecskeméretet jelöli T<sub>0</sub> időpontban (közvetlenül a preparálás után) és 7 napos átlagban, a “Polyd” értékek pedig a polidiszperzítási T<sub>0</sub> és 7 napos átlag-értékeket jelölik, emellett a mért részecskeméretetek és polidiszperzítások szórása van feltüntetve (±SD) [Polyak és mtsai 2011]

	<sup>99m</sup> Tc- DoxHSA180 (nm)		<sup>99m</sup> Tc- DoxHSA430 (nm)		<sup>99m</sup> Tc- DoxHSA1800 (nm)	
	Mean D	Polyd	Mean D	Polyd	Mean D	Polyd
T <sub>0</sub> (kezdeti)	175,8	76,1	429,0	189,3	1764,0	626,1
1 óra	189,3	61,6	438,0	152,8	1843,5	581,4
2 óra	177,6	87,0	444,9	173,4	1807,4	653,0
8 óra	167,6	59,6	402,5	231,4	1853,3	705,8
1 nap	185,1	85,6	403,8	220,8	1891,4	714,4
2 nap	163,8	60,8	425,7	225,8	1794,7	532,8
4 nap	168,9	90,8	438,2	183,6	1806,3	606,8
7 nap	180,3	71,4	427,0	173,4	1781,0	570,0
7 napos átlag	176,0	74,1	426,1	193,8	1817,7	623,8
7 napos ±SD	8,3	11,9	14,6	26,9	39,3	60,3

A minták átlagos részecskemérete egy szűk, 2%-os tartományon belül ingadozott, az méretbeli változások ugyanakkor egy esetben sem voltak egyirányúak, trend-szerűek. A 180 nm-es és az 430 nm-es minta 1,8%-os és 1,2%-os átlagos méretnövekedést mutatott, míg a 1800 nm-es mikrorészecske-frakciónál enyhe, 1,9%-os átlagos méretcsökkenést tudunk kimutatni az egy hetes nyomonkövetés alatt. Ezek alapján tehát megállapítható volt, hogy a vizsgált egy hét alatt a készítmények nagyfokú in vitro részecskeméret-stabilitást mutattak.

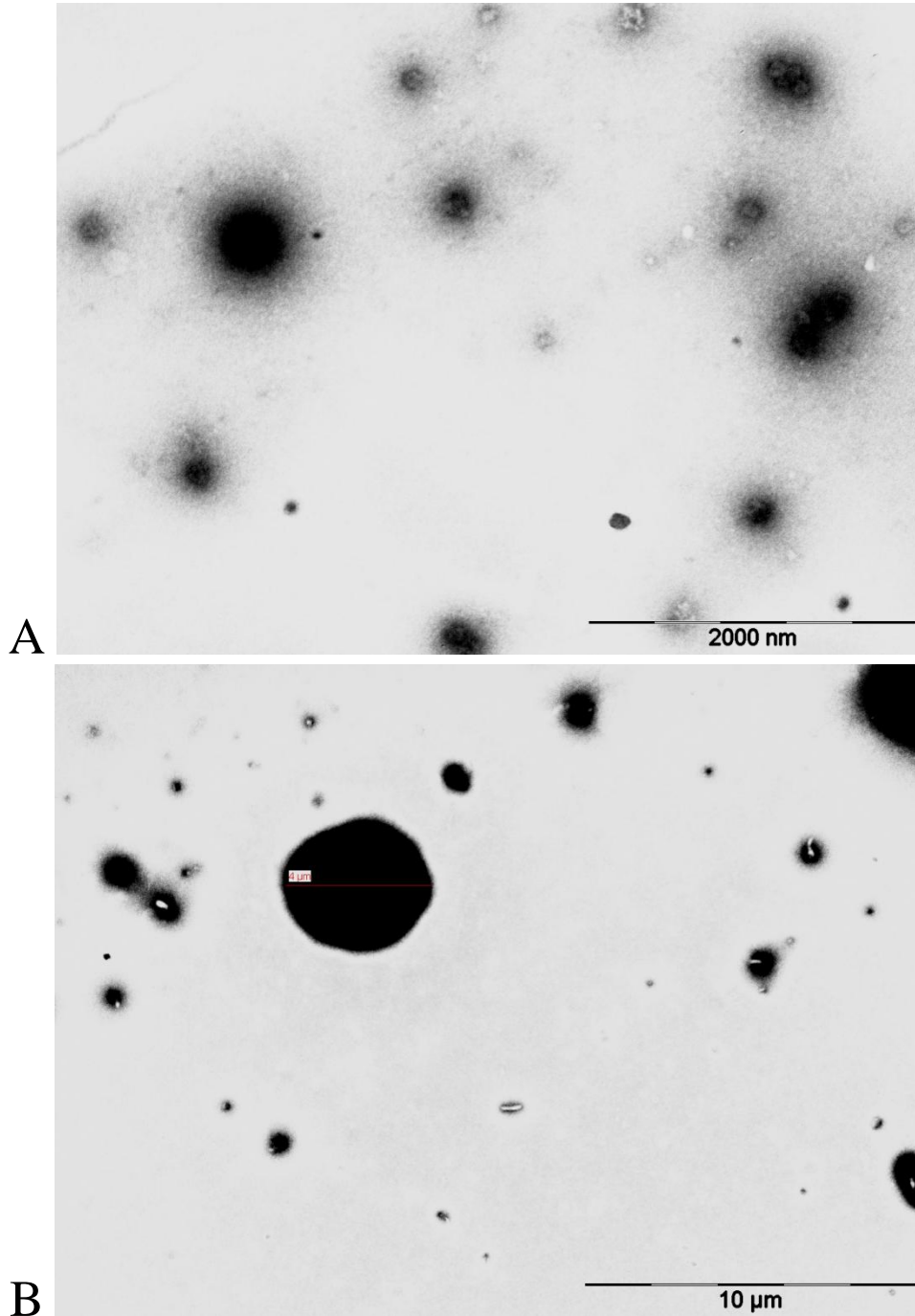


**10. ábra:** A  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  kolloid készítmény részecskeméret-eloszlásának változása az idő függvényében [Polyak és mtsai 2011]

#### 4.3.3. A $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ és $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ készítmények transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatai

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok megmutatták, hogy mindhárom minta esetén gömbszerű részecskék alkotják a preparátumokat (11. ábra). Mindhárom mintán

igazolni lehetett a viszonylagosan széles részecskeméret előfordulást, a polidiszperzitást, de mindhárom vizsgálat esetén igazolni lehetett grafikusán is, hogy az egyes minták frakciói a korábban DLS-módszerrel mért mérethatárokon belül maradnak.

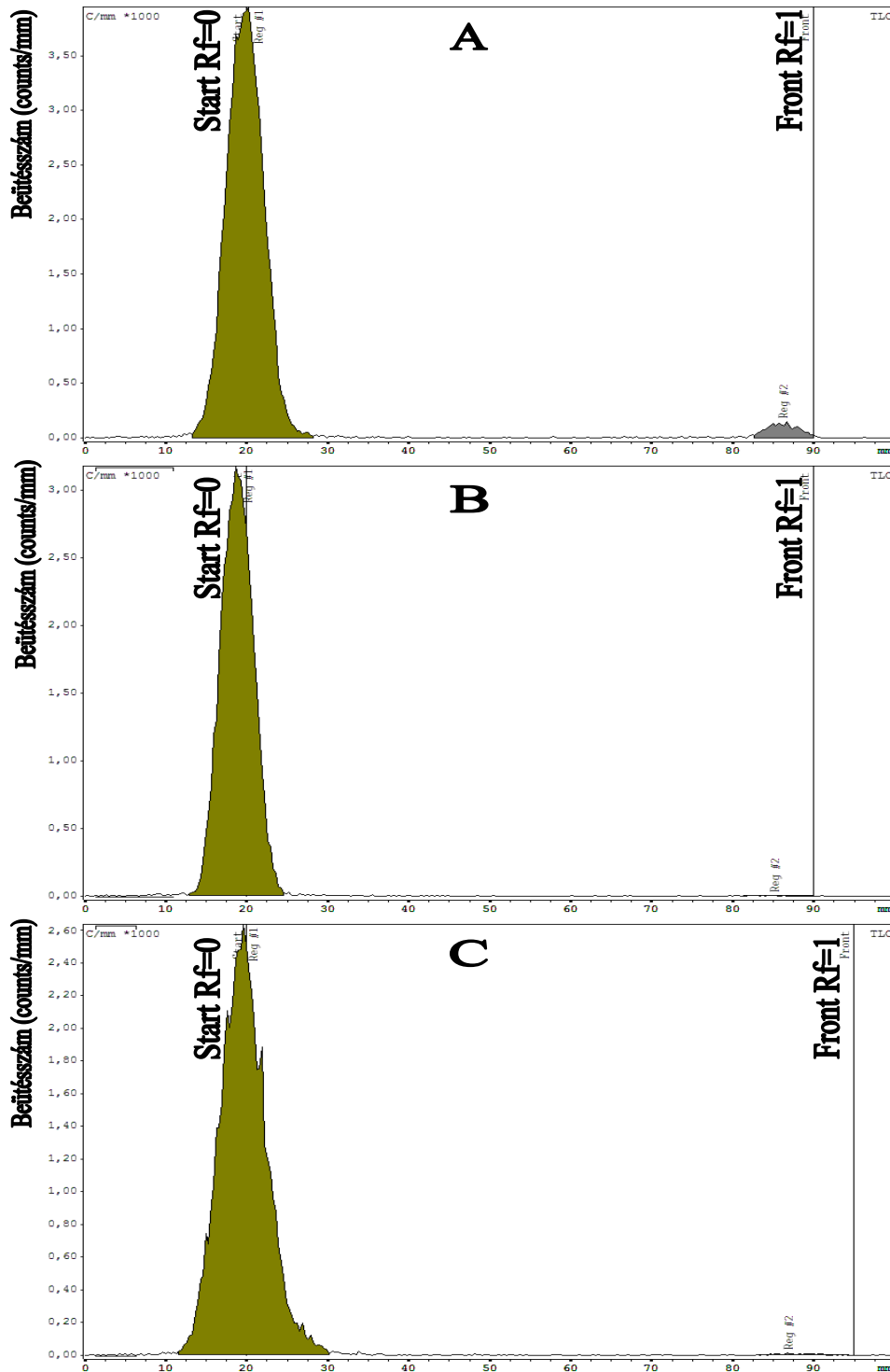


**11. ábra:** A doxorubicint hordozó HSA kolloidok transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata: A:  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180 minta, B:  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 minta [Polyak és mtsai 2011]

Ezen felül, ami a TEM-vizsgálatok szempontjából a legfontosabb volt, hogy a legnagyobb szemcseméretű készítmény ( $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ ) képein nem láttunk a korábban mért legnagyobb előforduló részecskeméreténél nagyobb részecskéket. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok megállapítható volt, hogy egyértelműen és kielégítően alátámasztották a műszeres részecskeméret-vizsgálatok eredményeit.

#### **4.3.4. A jelzettségi határfok-vizsgálatok eredményei**

A minták  $^{99m}\text{Tc}$ -ot megkötő határfokát a jelzést követő első, 6. és 24. órában vizsgáltuk meg. A vizsgálatokra szánt mintákat ezen idők alatt szobahőmérsékletű, fénytől elzárt helyen tároltuk. A jelzettségi határfokokat a TLC szkennertől felvett kromatogramok görbe alatti területeinek szoftveres integrálása után azok aránya adta eredményül. A jelzett, kolloid minta minden esetben a “felcseppentési”, startponton maradt ( $R_f \sim 0$ ), ott volt mérhető, míg a nano- és mikrorészecskékhez nem kötődött, szabad  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát az oldatfronttal együtt futott ( $R_f \sim 1$ ). Az eredmények tehát azt igazolták, hogy az összes, különböző méretű kolloid minta minden esetben 95% fölötti hányadát kötötte meg az izotópnak 1 órával a jelzés után, majd mindhárom minta későbbi időpontokban (6 és 24 órával később) is stabil, 97% fölötti jelzettségi határfokot (9. táblázat, 12. ábra).



**12. ábra:** A  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 minta TLC-vizsgálatainak kromatogramjai a jelzés utáni 1 órával (A), 6 órával (B) és 24 órával (C) Raytest MiniGita TLC-szkennert alkalmazva. A jelzett anyag (Reg#1) a startponton volt detektálható ( $R_f=0$ ), a kolloidhoz nem kötődött  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát (Reg#2) a fronttal együtt haladt ( $R_f=1$ ) [Polyak és mtsai 2011]

**9. táblázat:** A  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  minta vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatainak eredményei a jelzés utáni 1, 6 és 24 órával Raytest MiniGita TLC-szkennert alkalmazva. A jelzett anyag (Reg#1 komponens) a startponton volt detektálható ( $R_f=0$ ), a kolloidhoz nem kötődött  $^{99m}\text{Tc-pertechnetát}$  (Reg#2 komponens) a fronttal együtt haladt ( $R_f=1$ ) [Polyak és mtsai 2011]

	Komponens	Rf	Terület (össz. beütésszám)	Terület (%)
1 órás	Reg #1	0,000	21930,09	97,37
	Reg #2	0,948	592,09	2,63
6 órás	Reg #1	0,004	15509,48	99,98
	Reg #2	0,939	592,09	0,02
24 órás	Reg #1	0,009	17140,33	99,88
	Reg #2	0,924	20,67	0,12

#### 4.3.5. A $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ és $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ készítmények biológiai vizsgálatai egészséges patkány állatmodellen

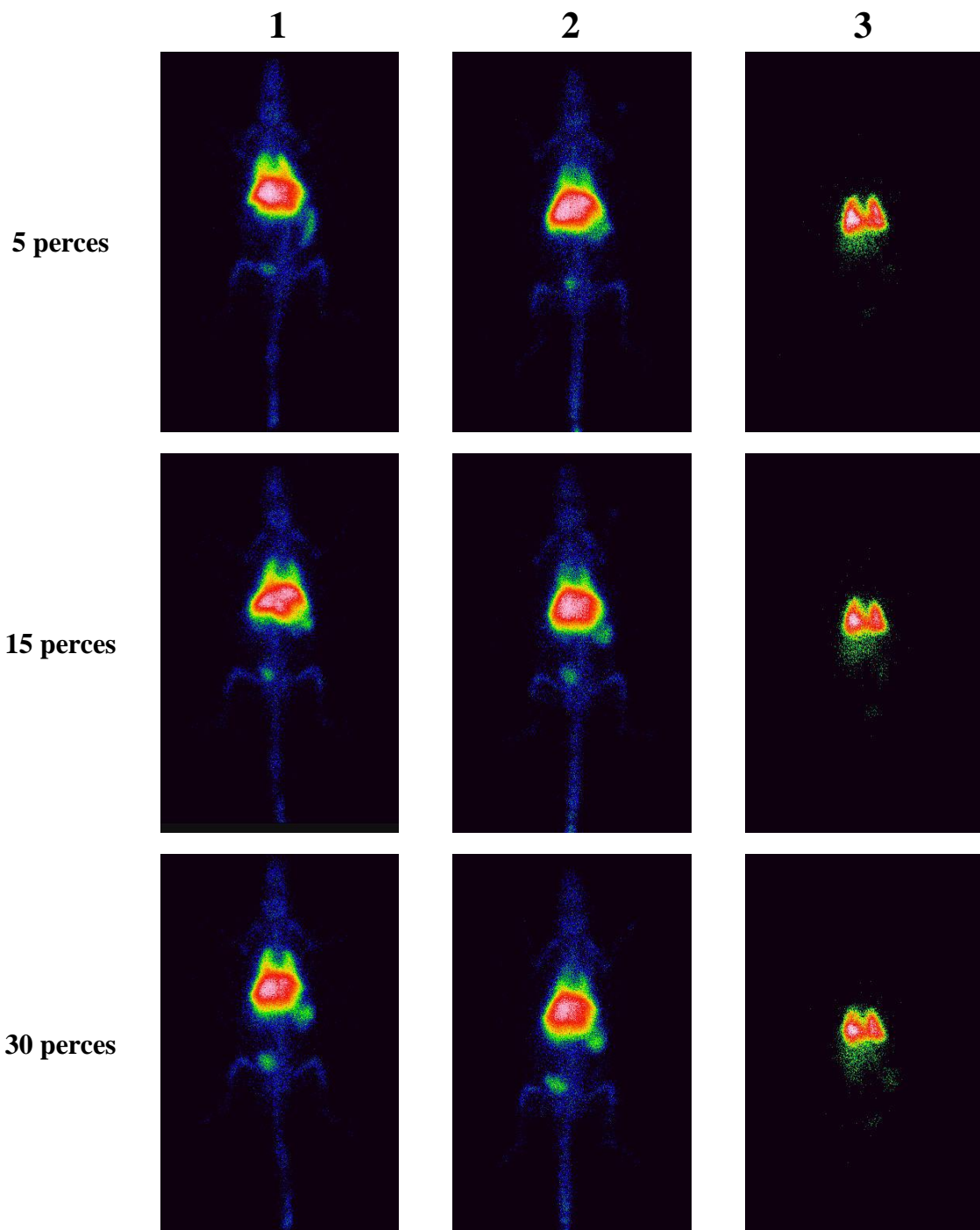
A  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  készítményekkel iv. injektált kísérleti Wistar patkányok túléltek a kísérleteket, a megfigyelés ideje alatt egyiknél sem volt tapasztalható semmiféle klinikai mellékhatás (fájdalomra utaló jelek vagy nyáladás, remegés, légzés-kimaradás, hányás, nyugtalanság).

Egyik injektált radiokolloid esetén sem láttunk egyik mérési időpont gamma-kamerás felvételein sem jelentős pajzsmirigy, nyálmirigy vagy gyomor-nyálkahártya aktivitást. A korai felvételek alapján injektált nano- és mikrorészecskék mindhárom esetben gyorsan eltűntek a véráramból, az injektálást követő 5. perc után már nem rajzolódott ki a nagyerek.

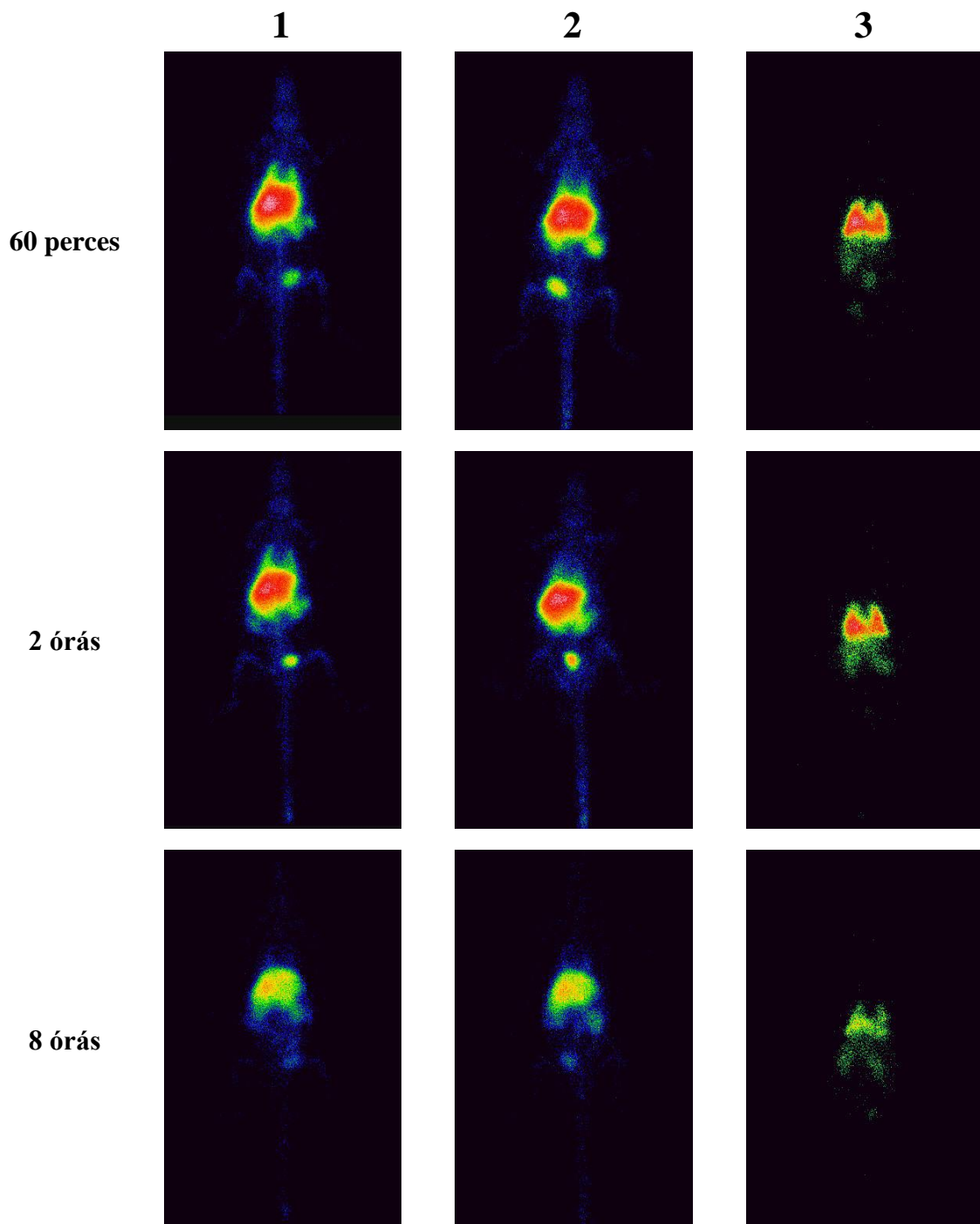
A jelzett  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  nanorészecskék szervezoslási eredményei között csupán kismértékű különbségeket találtunk (13. ábra 1. és 2. oszlopainak képsorozatai). A jelzett anyagokat mindkét esetben az injektálást követő 10-30 percben felvették az ún. RES szervek (a máj, a lép és a csontvelő), majd ezután fokozatosan megindult a jelzett anyag lassú kiürülése húgyutakon keresztül (vesén, hólyagon, vizeleten keresztül). A 22 órás felvételen azt láttuk, hogy a kezdeti injektált aktivitásnak (I.D.) csupán alig több mint 50%-a mérhető összesen az egésztest felvételeken (I.D.%), tehát az injektált aktivitás közel 50%-a kiürült az állatok szervezetéből (10. táblázat).

Ezzel szemben a legnagyobb részecskeméretű  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  mikrorészecskék biodisztribúciós adatai jelentősen különböztek a másik kettő készítményétől. A  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  részecskék az injektálás után az aktivitás legnagyobb része (I.D.%), közel 78,6%-a azonnal a tüdőben rajzolódott ki (13. ábra „A” részén a 3. oszlop képei), majd két órával később is több, mint 60%-a, 8 órával később pedig még mindig közel 40%-a (13. ábra „B” részén a 3. oszlop képei) a tüdőben volt mérhető. A tüdő mellett a májban kevesebb, de lassan növekvő mértékű halmozást figyeltünk meg, a tüdőből kiürülő aktivitás jó része minden bizonnyal a májban volt detektálható. Lép- és csontaktivitás nem volt kivehető a képeken. A nagyrészt a tüdőben felhalmozódott  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  radiokolloid ezzel együtt fokozatosan lebomlott, és az injektálás utáni 22. órában a tüdőben az injektált aktivitás 28%-a volt csak detektálható (ld. 10. táblázat C része).





**13. ábra - A:** Wistar-patkányok SPECT-kamerás ventrodorzális egésztest felvétele három különböző méretű doxorubicint hordozó HSA kolloid intravénás alkalmazása után, 5 perces, 15 perces és 30 perces időpontokban. Az injektált aktivitás 60MBq volt 200 $\mu$ l-es térfogatban. Oszlopok: 1:  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , 2:  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ , 3:  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  [Polyak és mtsai 2011]



**13. ábra - B:** Wistar-patkányok SPECT-kamerás ventrodorzális egésztest felvétele három különböző méretű doxorubicint hordozó HSA kolloid intravénás alkalmazása után, 60 perces, 2 órás és 8 órás időpontokban. Az injektált aktivitás 60MBq volt 200 $\mu$ l-es térfogatban. Oszlopok: 1:  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ , 2:  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ , 3:  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  [Polyak és mtsai 2011]

**10. táblázat:** A  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  radiokolloidok biodisztribúciós értékei különböző időpontokban. A százalékos injekált aktivitás-értékeket (I.D.%) a  $^{99m}\text{Tc}$  izotóp bomlását figyelembe véve korrigáltuk. [Polyak és mtsai 2011]

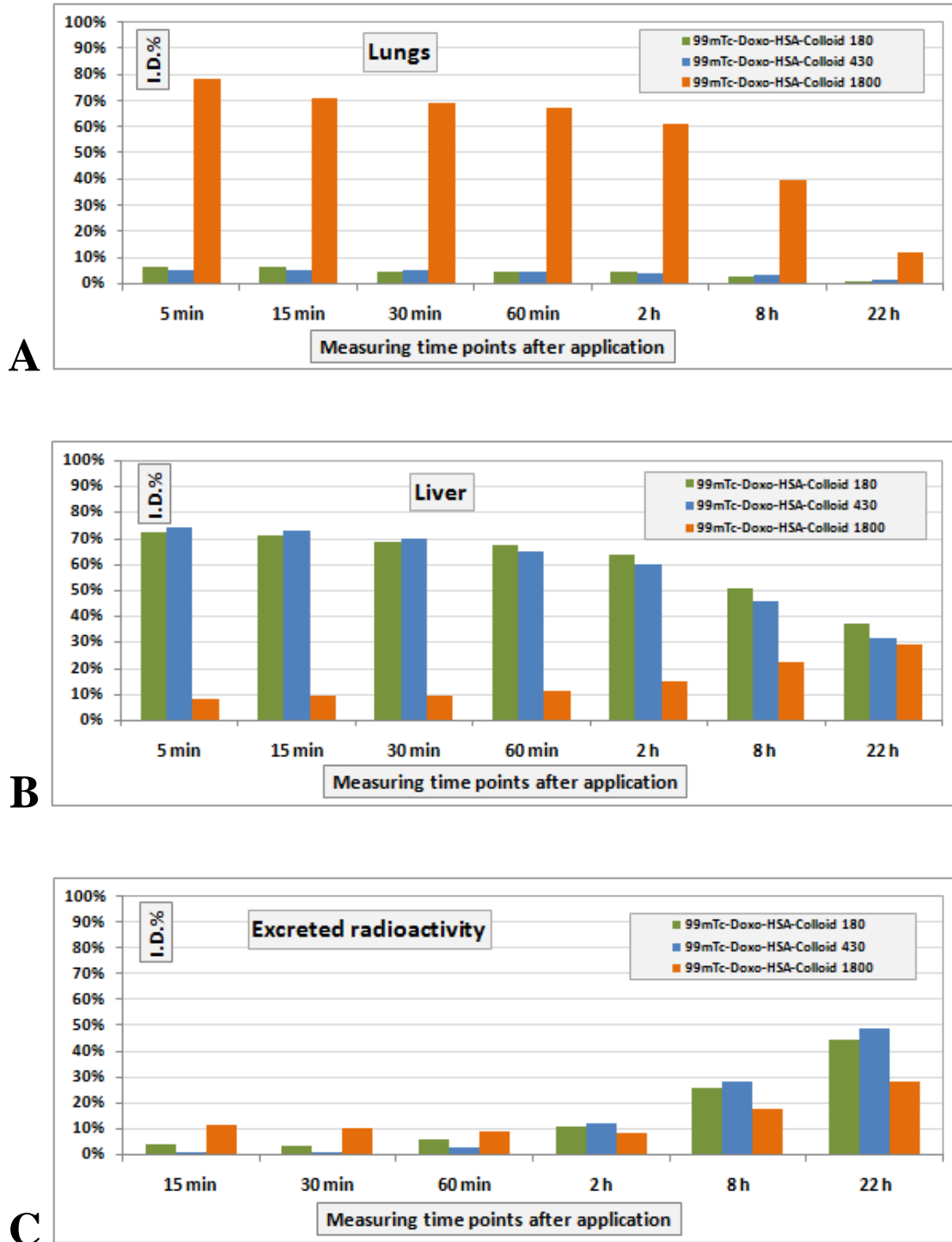
<b>A</b> - $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$							
Az injekáltás után eltelt idő:	5 perc	15 perc	30 perc	60 perc	2 óra	8 óra	22 óra
teljes aktivitás:	100,0%	95,7%	96,5%	93,8%	89,4%	74,3%	55,7%
tüdő	6,3%	6,2%	4,5%	4,3%	4,6%	2,5%	0,9%
máj	72,5%	71,3%	68,4%	67,1%	63,8%	50,9%	37,1%
lép	2,2%	1,0%	2,4%	1,2%	2,8%	2,7%	1,4%
vesék	1,7%	1,9%	2,6%	1,7%	3,1%	5,6%	3,8%
hólyag	1,0%	1,2%	1,8%	0,7%	2,9%	1,9%	1,0%
kiürült aktivitás		4,3%	3,5%	6,2%	10,6%	25,7%	44,3%

<b>B</b> - $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$							
Az injekáltás után eltelt idő:	5 perc	15 perc	30 perc	60 perc	2 óra	8 óra	22 óra
teljes aktivitás:	100,0%	99,1%	98,9%	97,2%	88,0%	71,9%	51,3%
tüdő	5,0%	5,2%	5,4%	4,9%	4,0%	3,2%	1,6%
máj	73,9%	72,8%	70,1%	64,9%	59,7%	45,7%	31,4%
lép	1,7%	1,9%	2,0%	3,3%	4,0%	3,5%	3,5%
vesék	2,2%	2,1%	1,9%	4,7%	3,3%	3,8%	3,0%
hólyag	0,6%	1,5%	2,0%	4,7%	4,5%	2,5%	1,1%
kiürült aktivitás		0,9%	1,1%	2,8%	12,0%	28,1%	48,7%

<b>C</b> - $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$							
Az injekáltás után eltelt idő:	5 perc	15 perc	30 perc	60 perc	2 óra	8 óra	22 óra
teljes aktivitás:	100,0%	88,7%	89,6%	91,2%	91,4%	82,6%	71,8%
tüdő	78,6%	71,0%	68,9%	67,2%	61,2%	39,9%	12,0%
máj	8,3%	9,4%	9,3%	11,2%	14,9%	22,5%	29,0%
lép	0,3%	0,6%	1,4%	1,7%	0,6%	1,7%	2,3%
vesék	0,7%	0,8%	1,0%	2,0%	1,2%	2,5%	2,0%
hólyag	0,1%	0,1%	0,2%	0,2%	0,1%	1,6%	0,8%
kiürült aktivitás		11,3%	10,4%	8,8%	8,6%	17,4%	28,2%



14. ábra: A  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  radiokolloid aktivitások százalékos szervezoslási eredményei (I.D.%): A: tüdő, B: a máj, C: a kiürült aktivitás-hányadok [Polyak és mtsai 2011]

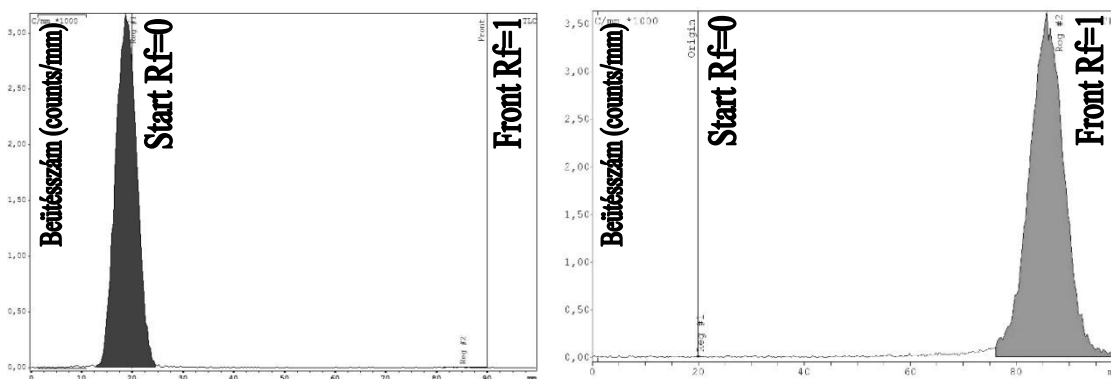
A 14. ábra oszlopdigramjai jól szemléltetik, hogy a nagyobb méretű radiokolloid tehát inkább a tüdőben halmozódott, és lassabban bomlott el, míg a két kisebb méretű nanorészecske inkább mutatott máj aktivitást, és gyorsabb kiürülést.

#### 4.4. A $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP önrendeződő biopolimer-bázisú nanorészecskék folát receptort kifejező tumorokon történő SPECT és SPECT/CT vizsgálatai

##### 4.4.1. A részecskeméret-eloszlások és a jelzettségi hatások vizsgálata

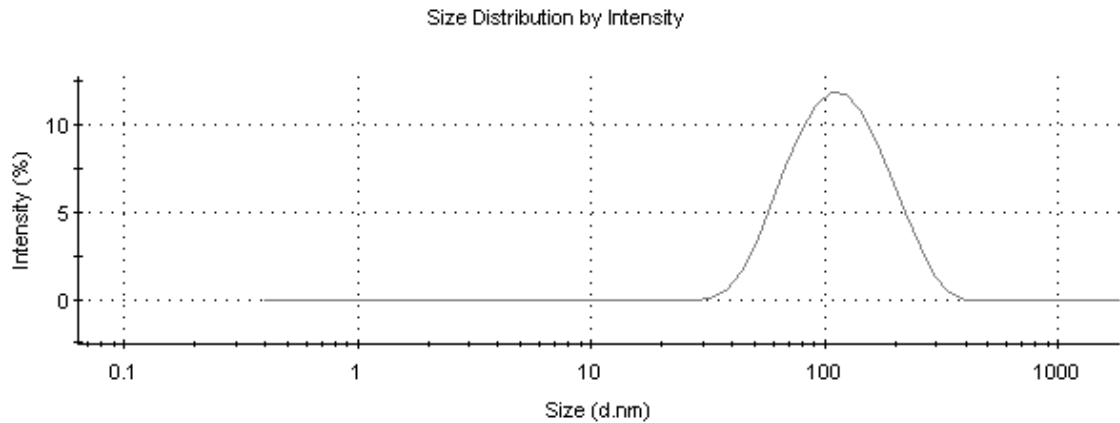
A kísérleteinkben a  $^{99m}\text{Tc}$ -mal először jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék fizikokémiai, morfológiai tulajdonságait korábban közölt vizsgálatok részletesen tárgyalják [Hajdu és mtsai 2008, Keresztessy és mtsai 2009, Hajdu és mtsai 2013]. E megelőző közleményekben igazolt volt, hogy a reakció-paraméterektől függően a kolloid rendszer részecsketermészetű, és stabil, 75 nm és 200 nm-es hidrodinamikai átmérő közé eső részecskék áll. Az elkészített nanorendszer transzmittanciája 90% fölötti értékre esett, a részecskék pedig száraz környezetben is megtartották globuláris formájukat.

A jelzés a  $^{99m}\text{Tc}$ -elútumban pertechnetát formában jelenlévő technéciumot ón-kloridos ( $\text{SnCl}_2$ ) redukciója után jött létre (ld. 3.1.7.2. fejezet). A jelzettségi hatásfokot 1, 6 és 24 órával a nyomjelzés után vizsgáltuk vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel. Az ITLC eredményeket a 15. ábra mutatja be. A jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP mintával párhuzamosan  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát az azonos futatóoldatban elútumot vizsgáltunk kontrollként. A szabadon maradt, részecskékhez nem kötődött  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát (16. ábra, B) az oldatfronttal együtt vándorolt ( $R_f \sim 1$ ), míg a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék (16. ábra, A) által megkötött aktivitás-mennyiség az alsó startponton (felcseppentési ponton) maradt ( $R_f \sim 0$ ). A jelzett készítmény a teljes 24 órás nyomonkövetés során 97% fölötti hatásfokkal és stabilan kötötte a  $^{99m}\text{Tc}$  izotópot.



**15. ábra:** A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecske készítmény (A) és a  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát kontroll minta (B) jelzés után 24 órával elvégzett ITLC-vizsgálatának kromatogramja Raytest MiniGita TLC-szennert alkalmazva. A jelzett kontrasztanyag (A) a startponton volt detektálható ( $R_f \sim 0$ ), a kolloidhoz nem kötődött  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetát (B) a fronttal együtt haladt ( $R_f \sim 1$ )

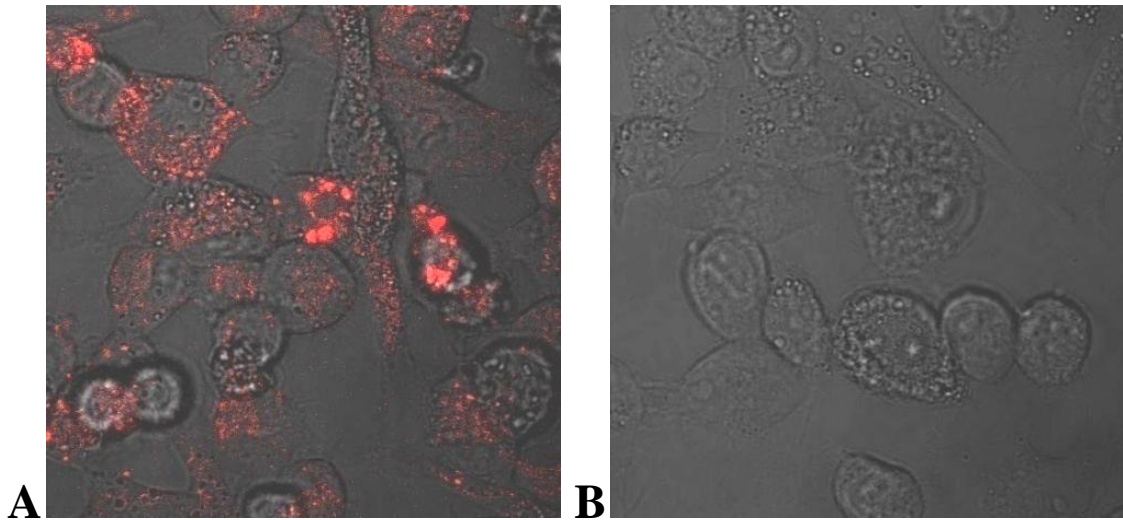
A jelzett nanorészecskéket tartalmazó oldat víztisztán átlátszó volt, aggregációra, csapadék vagy más melléktermék jelenlétére utaló opálosodás, zavarosság vagy kiülepedés nem volt megfigyelhető. A dinamikus fényszórásos fotometria részecskeméret-vizsgálatok (ld. 3.1.5. fejezet) alapján a jelzés során a nanorendszer részecskeméret-eloszlása stabil volt, a jelzési procedúra nem változtatta a részecskék méretét, illetve a jelzést követő 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás sem. Az átlagos részecskeátmérő a jelzés után 1 órával 124 nm volt (16. ábra), szűk eloszlás, relatív alacsony polidiszperzitás mellett ( $\text{PDI}_{1\text{h}} = 0.175$ ). Ezek az értékek a jelzés után 24 órával elvégzett ellenőrző mérés során sem mutattak jelentős változást (az átlagos részecskeméret 136 nm volt, a polidiszperzitás  $\text{PDI}_{24\text{h}} = 0.181$ ). A nanorészecskénti folsav molekulák számának 3.1.5. fejezetben leírt módszer szerinti becslése alapján egyetlen, ideálisan átlagos részecskeméretű nanorészecskére hozzávetőleg 300 db. folsav molekula kötődhet (a számított érték: 308 FA molekula volt).



**16. ábra:** Az önrendeződő  $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$  nanorészecskék részecskeméret-eloszlása a jelzést követően 1 órával. Az átlagos részecskeméret 124 nm. [Polyak és mtsai 2013]

#### 4.4.2. A jelzett $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$ nanorészecskék halmozódása HeDe sejt vonalakon

A jelzett nanorészecskék specifikus halmozódását folát receptort kifejező HeDe tumor-sejt vonalakon, Olympus FluoView 1000 típusú konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A 17. ábra a fluoreszcens konfokális mikroszkópos képeket mutatja. A folsavat tartalmazó  $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$  nanorészecskék láthatóan a folát-receptort kifejező sejtek felszínére kapcsolódnak (vörös színű foltok), majd a tumorsejtek internalizálják a részecskéket.



**17. ábra:** Konfokális mikroszkópos képek jelzett, folátos  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészcscékkel inkubált (A) és a kontroll HeDe sejtekről (B) [Polyak és mtsai 2013]

#### 4.4.3. A $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészcscék in vivo eredményei 1.: a HeDe-tumor-transzplantált Fischer 344 patkányok vizsgálatai

A tumor transzplantált patkányokban klinikai mellékhatásokat (fájdalmakra utaló jeleket, nyálképződést, reszketést, remegést, nehézlégzést, hasmenést, nyugtalanságot vagy eszméletvesztést) nem figyeltünk meg a vizsgálatok során.

*Szerveleszlások.* A különböző szervek aktivitás-értékeit 30 perccel, illetve 2, 8 és 24 órával az injektálás után vizsgáltuk. A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP készítmény injektálása után kismértékű visszatartott vér-háttér volt megfigyelhető, és a  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett nanorészcscék viszonylag gyorsan megjelentek az ún. RES-szervekben (markáns máj, és kisebb mértékű lép és csontvelő aktivitás volt látható és mérhető), emellett a kezdeti (30 perces és 2 órás) felvételek alapján az aktivitás egy része azonnal ürülni kezdett a vesén és húgyutakon keresztül. Nem megkötött, “szabad”  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetátra utaló jelek, úgymint a pajzsmirigyben, nyálmirigyekben vagy a bél-nyálkahártyában lévő aktivitáshalmozódás nem volt megfigyelhető. Az eredményeket a teljesen injektált aktivitás százalékos arányaiban számoltuk és adtuk meg teljes szervekre (I.D./teljes szerv) és egységnyi tömegű szövetre vonatkoztatva (I.D./g szerv). A jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP



nanorészecskékre vonatkozó szerveleszlási értékeket az 11. táblázat tartalmazza, a kontrollként vizsgált  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA szerveleszlási értékeit pedig a 12. táblázat foglalja össze. A szcintigráfias képeken megfigyelt magas RES aktivitás a szervek mért aktivitás-értékekben is jól látszott. Az injekciózás utáni első 30 percen belül a jelzett nanorészecskék 44,38%-a halmozódott a májban és 16,53%-a lépben. Ezen felül kimutatható volt, hogy minden vizsgált időpontban magasabb aktivitás halmozódott a tumoros bal vesében, mint a nem-tumoros, normál jobb vesében. A folát receptort kifejező beültetett, indukált HeDe-tumorú bal vese a teljes injektált  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett nanorészecskék 9%-körüli hányadát halmozta, míg a jobb vese, a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP részecskeméretére jellemző normál kiürülésnek megfelelő 2%-körüli I.D./teljes szerv értéket.

**11. táblázat:** a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék százalékos aktivitás-halmozódási értékei a teljes injektált aktivitásra vonatkoztatva (I.D./ teljes szerv és I.D./g szerv értékek) HeDe sejtvonallal tumor-transzplantált Fischer 344 patkányokban, az injektálást követő 30 perccel, illetve 2, 8 és 24 órával [Polyak és mtsai 2013]

Post inj.	Szív		Máj		Lép		Tumoros bal vese		Normál jobb vese	
	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)
1. - 30 p.	4,32	6,86	44,38	5,73	16,53	36,33	7,96	6,75	2,06	1,56
2. - 2 óra	2,31	3,71	39,05	5,10	18,68	43,95	9,62	7,65	1,85	1,46
3. - 8 óra	1,73	2,79	33,19	4,21	15,21	34,57	9,08	6,99	1,78	1,34
4. - 24 óra	0,68	1,07	31,84	3,98	10,65	24,34	8,54	6,91	1,61	1,30

Post inj.	Hólyag*		Vér**		Kiürülés aránya***
	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D. (%)
1. - 30 p.	5,30	-	6,31	0,51	0,00
2. - 2 óra	16,57	-	4,64	0,39	20,44
3. - 8 óra	2,51	-	1,51	0,13	28,83
4. - 24 óra	2,42	-	0,65	0,05	54,46

\* ROI analízissel számolva

\*\* a testtömegből és a vérminta tömegéből és aktivitásából extrapolálva

\*\*\* az egésztest vizsgálat során a teljes mérhető aktivitás ROI-analíziséből számolva

**12. táblázat:** a kontrollként használt  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA százalékos aktivitás-halmozódási értékei a teljes injektált aktivitásra vonatkoztatva (I.D./ teljes szerv és I.D./g szerv értékek) HeDe sejtvonallal tumor-transzplantált Fischer 344 patkányokban, az injektálást követő 30 perccel, illetve 2, 8 és 24 órával [Polyak és mtsai 2013]

Post inj.	Szív		Máj		Lép		Tumoros bal vese		Normál jobb vese		
	Állat száma, időpont	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)
5. - 30 p.		3,97	5,99	12,03	1,45	6,48	14,73	5,66	4,40	3,68	2,83
6. - 2 óra		1,22	1,96	8,76	1,10	3,81	8,42	3,02	2,43	2,65	2,19
7. - 8 óra		0,79	1,28	6,14	0,79	2,56	6,21	1,12	0,87	0,76	0,63
8. - 24 óra		0,54	0,82	3,35	0,41	1,12	2,57	0,59	0,47	0,43	0,32

Post inj.	Hólyag*		Vér**		Kiürülés aránya***	
	Állat száma, időpont	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D./teljes szerv (%)	I.D./g szerv (%)	I.D. (%)
5. - 30 p.		16,87	-	6,64	0,57	0,00
6. - 2 óra		36,54	-	2,97	0,25	48,32
7. - 8 óra		2,85	-	0,34	0,03	76,89
8. - 24 óra		0,63	-	0,32	0,03	85,68

\* ROI analízissel számolva

\*\* a testtömegből és a vérminta tömegéből és aktivitásából extrapolálva

\*\*\* az egésztest vizsgálat során a teljes mérhető aktivitás ROI-analíziséből számolva

A nyálmirigyekben, pajzsmirigyekben és a gyomor-nyálkahártyával elhanyagolható vagy a kimutatási határ alatti aktivitás-értékeket tudunk mérni a teljes in vivo nyomonkövetési idő alatt. Ez a  $^{99m}\text{Tc}$  nagyon alacsony pertechnetát, azaz

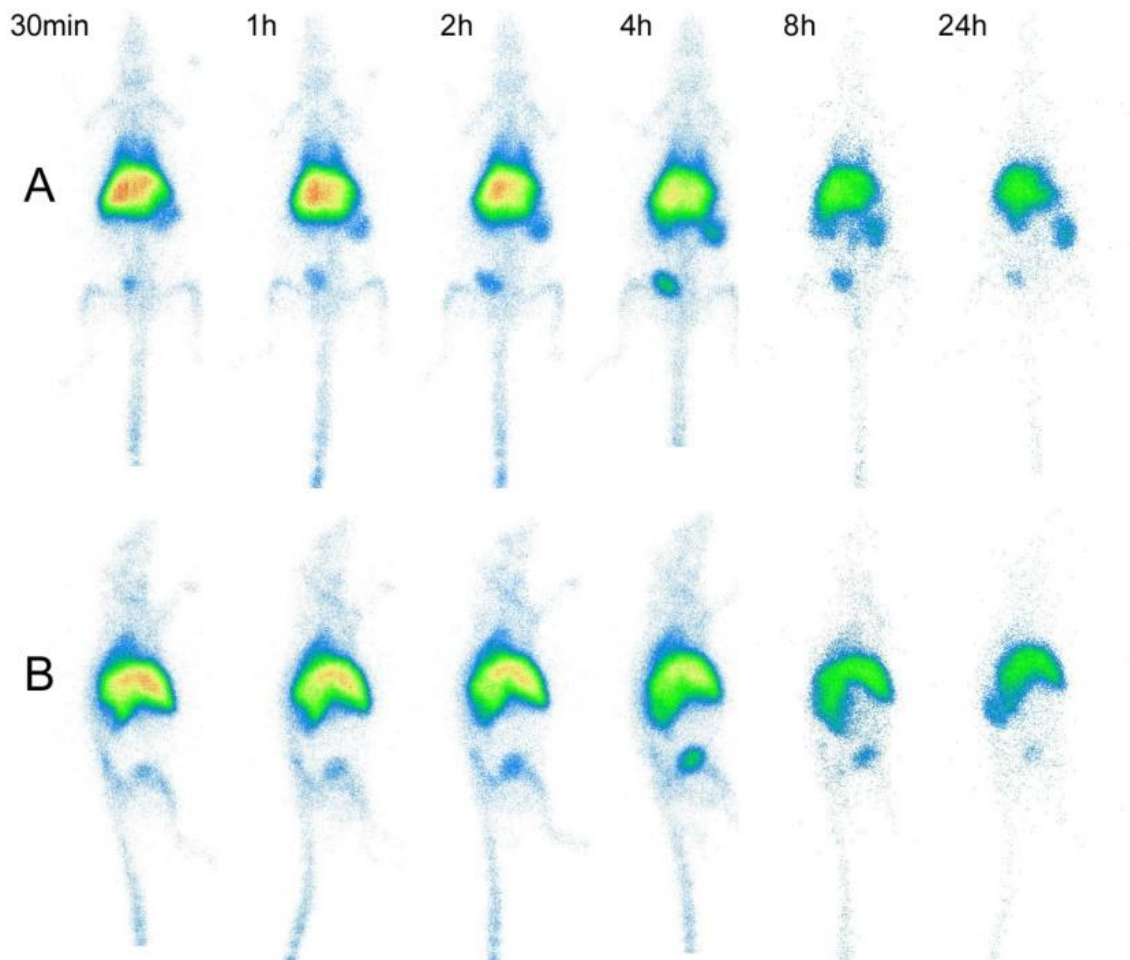
nanorészecskéhez nem-kötődött formában való jelenlétére, vagyis a hordozó részecskék nagyfokú in vivo radiokémiai stabilitására utalt az i.v. alkalmazás után.

A  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-val injektált kontroll Fischer 344 patkányokban szintén volt aktivitáshalmozásbeli különbség a tumoros és az ellenoldali vesék közt (a tumoros bal vese a teljes injektált aktivitás 5,66%-át halmozta az injektálást követő 30, percen, míg a kontralaterális oldal az I.D. 3,68%-t). Ez a nanorészecskék specifikus tumorhalmozásához képest enyhébb radiofarmakon-akkumuláció csupán a kezdeti 30 perces időpontban volt megfigyelhető, és a kontrasztanyag kiürülési sebessége is jelentősen magasabb volt (a vesék specifikus aktivitása a kezdeti időpontot követően gyorsan csökkent). A 8. órára már csupán az injektált  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA 1,12%-a volt mérhető a tumoros, és 0,76%-a a nem-tumoros vesében, az ugyanerre vonatkozó értékek pedig 24 órával az i.v. alkalmazás után 0,59% és 0,43% voltak. A kontroll állatokban megfigyelt máj és lépére vonatkozó aktivitáshalmozások is sokkal gyorsabb kiürülést mutattak a nanorészecskével injektált állatok értékeivel összevetve. A máj által halmozott  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA aktivitás az injektálást követő 30 percen 12,03% volt, és ez 6,14%-ra csökkent a 8 órás mérésre.

Az összehasonlító EPR-vizsgálatok azt mutatták, hogy folát-mentes  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék passzív tumorhalmozása egyértelműen alacsonyabb hatásfokú volt az aktív mechanizmussal célbajutatott, a hepatocelluláris karcinóma folát-receptorait "kihasználó", folátot tartalmazó  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP variánssal szemben. A nanorészecskék „folát-mentes”, tehát aktív folyamattal nem specifikusan sejtfelszíni receptorra célbajuttatott változatának vizsgálata során a vizsgált injektálás utáni 2 órás időpontban a szervezoslási értékek a tumor-halmozásokat kivéve nagyon hasonló mértékeket mutattak, mint a folátos változat esetében. Magas RES-aktivitás-értékek mellett (máj aktivitás-aránya a teljes I.D.-hez képest: 36,88%, a lép szerv-értéke: 17,56%) a jelzett nanorészecskék jelentősen kisebb szelektivitást, specificitást mutattak a tumoros vese esetében (a tumoros bal vese I.D.%-a 2,84%, a jobb vesének pedig 1,97% volt), de tumoros és a kontralaterális oldal aktivitás-különbsége egyben azt is sugallta, hogy az ún. EPR-hatásnak is van (segítő) szerepe a folátos, célzottan targetált  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék magas tumorhalmozódásának az esetében is. Az elvégzett specifikus receptor-gátló vizsgálatok azt eredményezték, hogy a tumorral rendelkező kísérleti

állatok daganat-specifikus  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP kontrasztanyag-halmozása 52% és 67%-kal csökkent azokban az esetekben, amikor a tumorok sejtfelszíni receptorait előzőleg blokkoltuk.

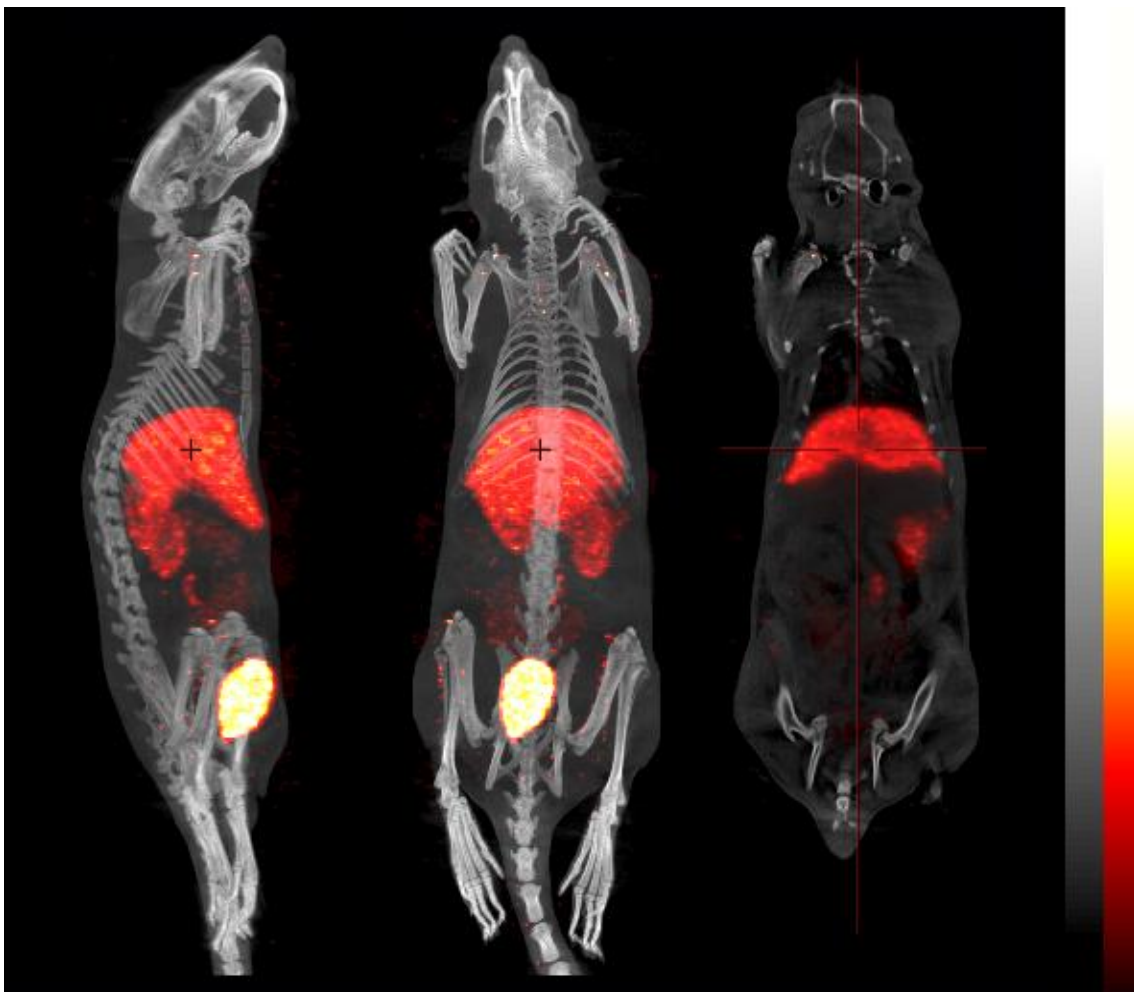
*A gamma-kamerás vizsgálat eredményei.* A gamma-kamerával készült képek a 18. ábrán láthatóak. Jól körülírható máj, hólyag és tumoros bal vese halmozást láttunk már 30 perccel a jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP kontrasztanyag i.v. injektálása után, majd a 8 órás felvételeken szintén máj, bal vese és húgyhólyag halmozás volt azonosítható és mérhető a ventrodorzális (18. ábra, A-képsorozat) és a baloldali laterális felvételeken is (18. ábra, B-képsorozat).



**18. Ábra:** SPECT kamerával készült ventrodorzális (A) és baloldali laterális (B) képek HeDe-tumor-transzplantált Fischer 344 patkányról a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék injektálása után 30 perccel, és 1, 2, 4, 8 és 24 órával. [Polyak és mtsai 2013]

22 órával az injektálást követően még mindig elhatárolható tumoros bal vese- és máj-aktivitást figyeltünk meg. A nem-tumoros, normál jobb vese mindvégig egyértelműen alacsonyabb mennyiségű  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP-halmozást mutatott.

A SPECT/CT vizsgálat eredményei. Hat órával a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék injektálása után az egyik tumor-transzplantált állatról a hagyományos SPECT-kamerás felvételek mellett a vizsgálatokat kisállat nanoSPECT/CT kamerával készült felvételekkel egészítettük ki (19. ábra).

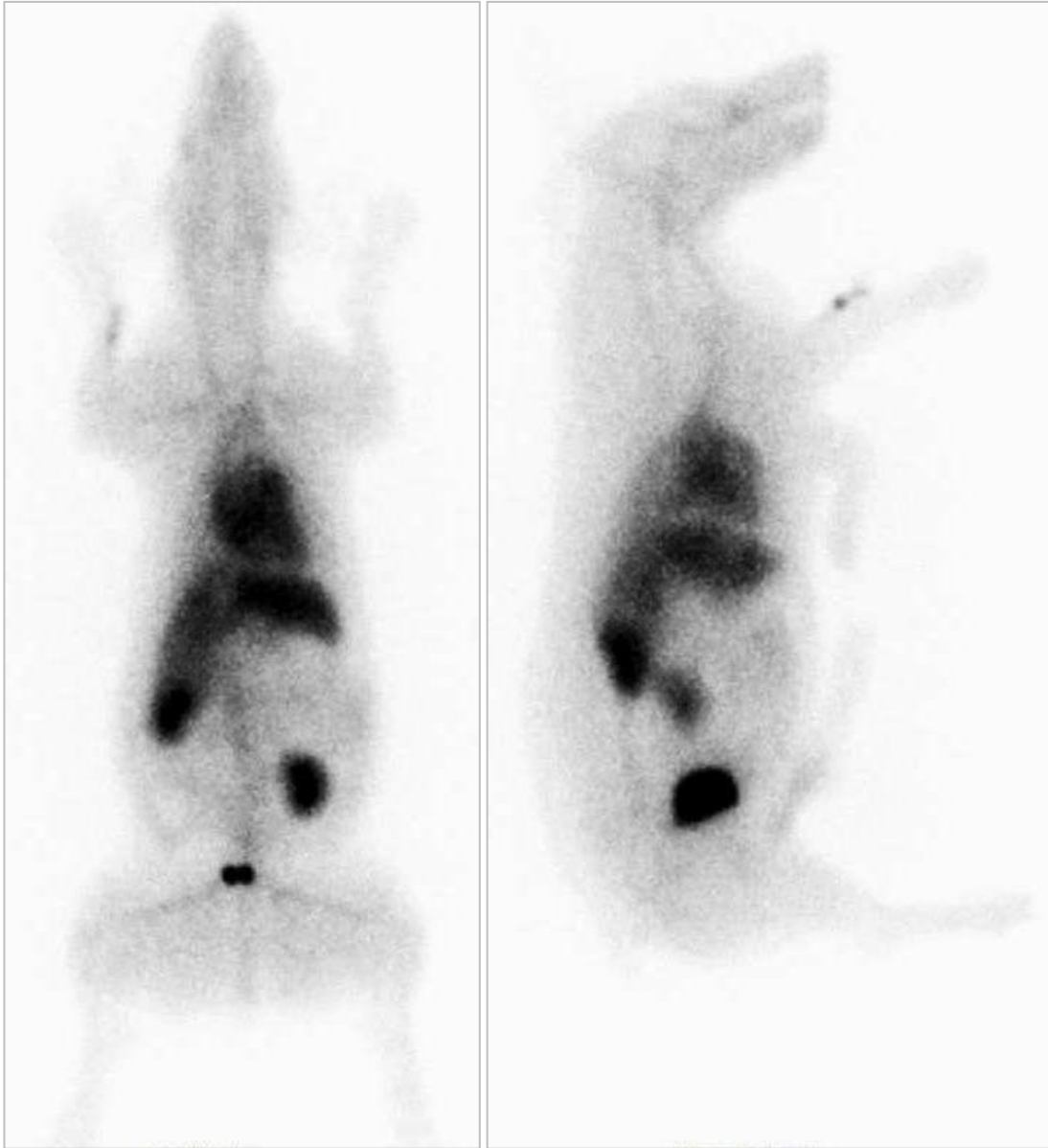


**19. ábra:** NanoSPECT/CT kamerával készült baloldali laterális és ventrodorzális képek HeDe-tumor-transzplantált Fischer 344 patkányról a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék injektálása után 6 órával – a CT rétegek szürkeárnyalatos skálán, a SPECT rétegek színes skálán láthatóak [Polyak és mtsai 2013]

Ez a vizsgálat sokkal nagyobb felbontású, részletesebb képekkel pontosította és támasztotta alá a többi képalkotó vizsgálatunk során megfigyelt szervezoslási eredményeket. A 16. ábra kiválasztott, reprezentatív bal oldali laterális és ventrodorzális szeleteket mutat, a CT rétegek szürkeárnyalatos képen jelennek meg, míg a SPECT felvétel színes skálával mutatja az eltérő aktivitás-halmozásokat (a világosabb, sárgába majd fehérbe hajló tónusok jelentik a magasabb aktivitás-sűrűséget). A 6 órás nanoSPECT/CT képeken a sokkal könnyebben és egyértelműbben beazonosítható tumoros bal vesét láthattunk, a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecske jól mérhető és körülírható specifikus tumor-halmozásával. A SPECT/CT képeken ezen kívül szintén kizárható volt a radionuklid leválása a hordozó nanorészecskékről (elhanyagolható nyál- és pajzsmirigy aktivitás), és szintén kizárható volt a nanorészecskék esetleges aggregációja is (elhanyagolható tüdő-felvételt láttunk).

#### **4.4.4. A $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék in vivo eredményei 2.: A nanorészecskék klinikai alkalmazása spontán eredetű daganatos megbetegedésben szenvedő kutyán**

*Szervezoslási eredmények.* A 7 éves, szájüregi daganatban szenvedő tacsó kutya az 500 MBq aktivitású jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP készítmény i.v. injektálását követő 10. percben készített egésztest-vizsgálatainak képeit 20. ábra mutatja. Az aktivitást először leginkább a szív, a vérérdények, a máj, a lép, a két vese és kisebb mértékben a csontvelő halmozta. A 20. ábra szürkeárnyalatos képein a sötétebb tónus reprezentálja a magasabb aktivitás-koncentrációkat. A 10 perces felvételeken a szív, a máj és vesék a húgyhólyaggal mutatják a legmagasabb aktivitásokat, majd e halmozódások lassú kiürülése folytán adódnak a 13. táblázatban feltüntetett 2 órás szervezoslási eredmények. A tumor radiofarmakon-halmozódásában ez idő alatt lassú emelkedés volt megfigyelhető, majd a kutya  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP injektálását követő 2. órás vizsgálatban a teljes injektált aktivitás 3,11%-át lehetett a szájüregi daganatban mérni. Mindezek mellett mind a korai, mind a kései felvételeken alacsony nyálmirigy, pajzsmirigy, gyomor-nyálkahártya és tüdő aktivitások voltak detektálhatók.



**A**

**B**

**20. ábra:** 500 MBq aktivitású  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP i.v. injektálását követő 10. percben készült ventrodorzális (A) és baloldali laterális (B) egésztest felvételek a spontán eredetű szájüregi tumorban szenvedő, 7 éves hím tacskó kutyáról.

Az injektálást követő 2. órában a teljes aktivitás 11,97%-a halmozódott az állat szívében, 15,76%-a a májában, 8,85%-át volt mérhető összesen a két vesében, a húgyhólyagban pedig az aktivitás 1,35%-át mértük, mindemellett ebben az időpontban tehát az injektált aktivitás 3,11%-át mértük a tumorban (13. táblázat). A viszonylagosan

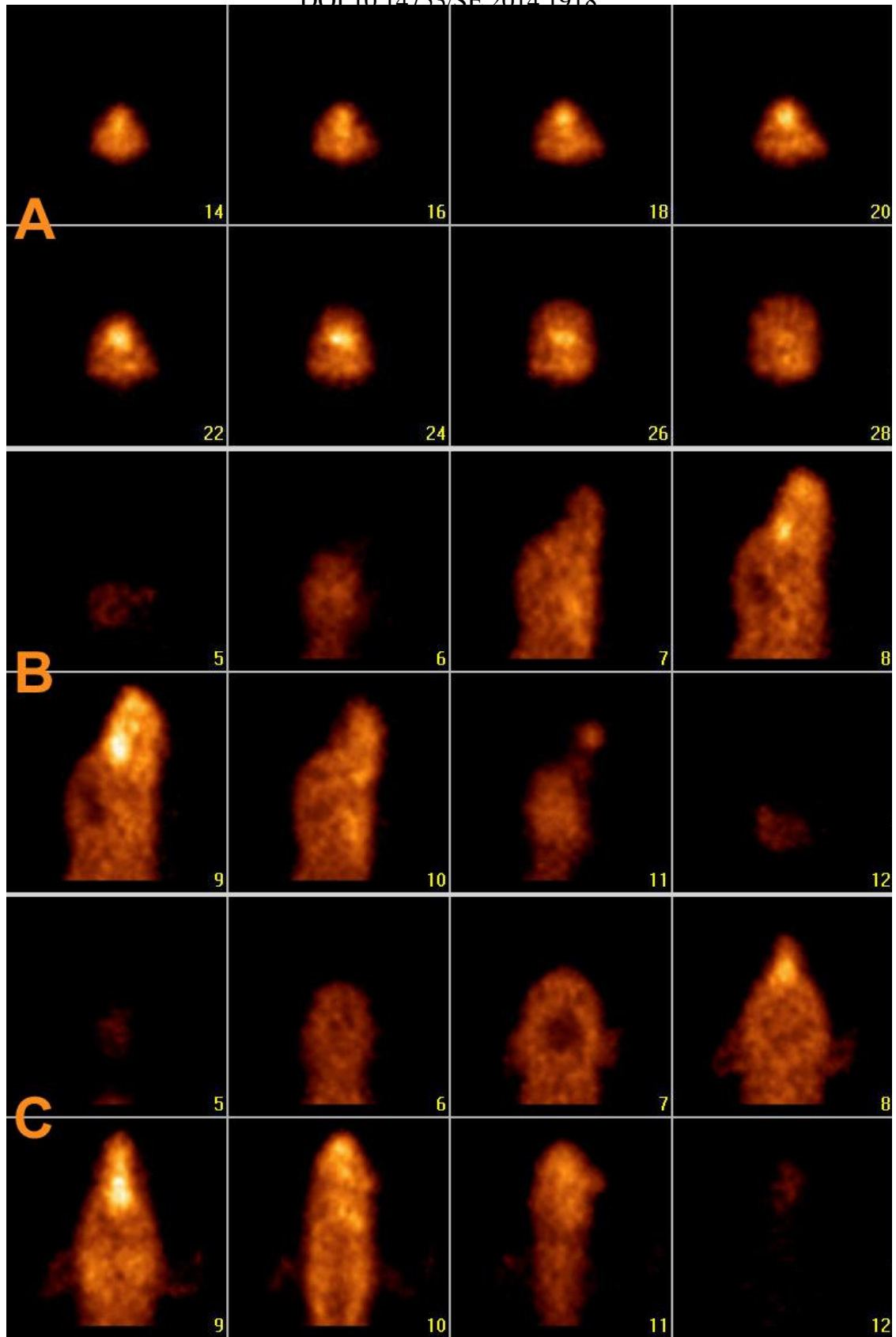


magas két órás szerv-aktivitás-értékek a korábbi kísérleti állatok esetéhez hasonlóan ebben az esetben is a jelzett nanorészecskék relatív lassú kiürülésére utaltak.

**13. táblázat:** A jelzett  $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$  nanorészecskék mért százalékos aktivitáshalmozódási értékei a spontán eredetű szájüregi tumorban szenvedő, 7 éves hím tacsó kutyában a teljes, 500 MBq injektált aktivitásra vonatkozóan, 2 órával az injektálást követően (százalékos I.D./ teljes szerv értékek)

	I.D./teljes szerv érték
Szív	11,97 %
Máj	15,76 %
Vesék	8,85 %
Hólyag	1,36 %
<b>Tumor</b>	<b>3,11 %</b>

*SPECT vizsgálat.* Az  $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$  nanorészecskék injektálását követő 2. órában az szájüregi daganatos kutya koponya régiójáról elvégzett háromdimenziós SPECT vizsgálatok során sokkal pontosabban és tisztábban körülírható tumorfelvételt figyeltünk meg (21. ábra). A háromdimenziós képalkotás során a tumort helyeződésének jellemzésére leginkább alkalmas, reprezentatív képeket mutatja az 18. ábra, ezen belül is az ábra A, B és C részében a transzverzális, koronális és szagittális szeleteket. Minden kisebb kép egy 2 mm-es szeletet jelent, így a diagnózis során tumor háromirányú kiterjedése és pontos helyeződése is pontosan leírhatóvá vált. A vörös-sárga árnyalatú képeken a világosabb színtónus mutatja a magasabb aktivitáskoncentrációkat.



**21. ábra:** Spontán eredetű szájüregi daganatban szenvedő tacsókó kutya transzverzális (A), szagittális (B) és koronális (C) SPECT felvételei koponya-régiójáról 2 órával az 500 MBq aktivitású  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP jelzett nanorészecskék i.v. injektálása után. (A kis képek számai az egyes SPECT-szeletek Interview szoftver által jelölt azonosítói.)

## 5. Megbeszélés

Értekezésemben példákat mutatok be különböző,  $^{99m}\text{Tc}$  izotóppal jelzett nanorészecskék, nanokolloidok különböző (diagnosztikai vagy más) célú, de egyaránt gamma-kamerával, SPECT és SPECT/CT képalkotó eljárások felhasználásával készült vizsgálatairól. Ezek során a spontán beteg állatok több féle összehasonlító kórtani vonatkozásban is felmerülnek: az emberi vizsgálatokkal párhuzamos, azok módszereivel megegyező, nagyobb betegszámú klinikai vizsgálatok folytán, és egy teljesen új diagnosztikum első alkalommal történő alkalmazásának humán SPECT készüléken való bemutatásával.

A dolgozat klinikai vizsgálatokon keresztül mutatja be limfoszcintigráfiás, intraoperatív gamma-szondás és patent-kék-festéses módszerek összevetésével, hogy az őrszem nyirokcsomó megtalálásában kulcsfontosságú szerepe van a felhasznált humán szérum albumin (HSA) alapú kolloid radiofarmakon (a Senti-Scint<sup>®</sup> termék) megfelelően megválasztott és megalkotott, stabil részecskeméretének. A bemutatott vizsgálatok egy része humán vizsgálat, egy második részük pedig humán SPECT-készüléken, de az állatorvosi klinikumban, spontán beteg kutyák részvételével készült.

Az értekezés emellett a HSA kolloidokkal megszerzett tapasztalatok alapján készített doxorubicinnel „töltött” HSA nano- és mikrorészecskékkel ( $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800) kapcsolatos vizsgálatokat mutat be, az in vitro stabilitásukat és a normál szerveszlásukat állatmodelleken, igazolandó ezzel az in vivo stabilitásukat is, és felvetve a doxorubicin mellékhatásait, szívkárosító hatását (kardiotoxicitását) csökkentő jövőbeli célzottabb terápiás módokat, továbbá felvetve a hordozó részecskék (méretük megválasztása általi) különböző célbajuttatási lehetőségeit is. Ezekben a vizsgálatokban az izotópos módszer, a  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzés, a SPECT készülék és képalkotás tehát nem mint „cél”, hanem mint a célzott hatóanyag-bevitel nyomonkövetésének lehetséges eszköze jelenik meg.

Az értekezés ezeken felül új típusú nanohordozókat is bemutat: egy teljesen új biopolimer nanorészecske első alkalommal történő technécium-jelzését, majd az elkészült  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorendszer SPECT és SPECT/CT képalkotási módszerekkel

történő első biológiai vizsgálatait, alkalmazását mutatja be folát receptort kifejező daganatban szenvedő állatmodellek eredményein, és egy spontán beteg kutya esetének leírásán keresztül.

### **5.1. Az őrszem nyirokcsomó humán vizsgálatai Senti-Scint<sup>®</sup>-tel**

Az őrszem nyirokcsomó biopsziás vizsgálata mára elfogadott eszközzé vált arra, hogy megelőzzük, hogy a legtöbb emlőtumoros betegnél alkalmazott teljes hónalj nyirokcsomó-eltávolítást („axillary lymph node dissection”) szükségtelenül automatikusan elvégezzék [Krag és mtsai 1998, Tafra és mtsai 2001]. A limfoszcintigráfia segít, hogy a hónalj irányába történő nyirokáramon keresztüli metasztatikus áttétképződéstől eltérő nyirokúti áttétet is beazonosítsuk [Keshtgar, Ell 1999]. Ezáltal lehetővé válik e betegségek pontosabb stádiumba-sorolása és a terápia pontosabb megtervezése. A pontosabb őrszem nyirokcsomó-felkutatás általi pontosabb stádiumba-sorolás által a kevésbé radikális beavatkozások pedig nem csupán ritkábbá, hanem egyszerűbbé, olcsóbbá is válnak. A helyes limfoszcintigráfiai feltérképezés, diagnózis felállítása attól függ, hogy sikerül-e pontosan beazonosítani egy a primer tumor nyirokelvezetését. A metasztatikusan érintett nyirokcsomóra tévesen negatív eredménye, amelyet vizsgálataink során e módszerrel egy esetben eredményül kaptunk, igen ritkának mondható, ez a probléma más leírások szerint is [Veronesi és mtsai 1987, Van Lancker és mtsai 1995] az érintett (pozitív) szentinel nyirokcsomójú betegek 3%-ánál jelentkezik csupán.

A korábban radiokolloiddal végzett limfoszcintigráfiai vizsgálatok során látszott, hogy a gamma-kamerás felvételeken jelentős különbségek figyelhetők meg az egyes betegeknél a nyirokáralmási tulajdonságokban, a detektált nyirokcsomók számában és halmazott aktivitásában [Taylor és mtsai 1999]. Emellett fontos felismerés volt, hogy ilyen eltérések az alkalmazott radiokolloid fajtája, illetve az injektálás és a képalkotó eljárás (vagy intraoperatív gamma-szondás vizsgálat) között eltelt idő szerint is mutatkoznak [Wilher et al 1999, Eshima és mtsai 2000, Tanis és mtsai 2002]. Ezek a tanulságok indokoltá tették, hogy az SLN vizsgálatokra használt nanokolloidok ideális, a korábban

kipróbált részecskeméreteknél viszonylag nagyobb méretét [Paganelli és mtsai 1998], és a vizsgálat egyéb ideális paramétereit megállapítsák, és standardizálják. A 100 nm kisebb részecskék őrszem nyirokcsomó detekálásban való használatának a hátránya, hogy a képkötés több másodlagos nyirokcsomót jelenít meg, a részecskék túl gyorsan vándorolnak a nyirokutakban. Ilyen esetben bár a nyirokcsomók megkülönböztetésére megoldást jelenthet a radiofarmakon ismételt injektálása és megismételt gamma-kamerás felvételek készítésével [Valdés Olmos és mtsai 2001], de ez a módszer az intraoperatív SLN-beazonosítást megnehezíti. Az ideálisnak megállapított részecskeméret-tartománynál nagyobb (500 és 1000 nm közötti) részecskénél pedig fennáll a veszélye annak, hogy ezek a részecskék nem képesek a nyirokáramban vándorolni, az injektálás helyén maradhatnak, és ez által az első (szentinel) nyirokcsomó detektálása is lehetetlenné válik [Schauer, Becker, Reisen, Possinger 2005].

Az értekezésben 128 emlődaganatos be női őrszem nyirokcsomó vizsgálatának eredményeit mutatjuk be. A liofilizált formában rendelkezésre álló Senti-Scint<sup>®</sup> radiofarmakont 600–1110 MBq aktivitású, 3 ml térfogatú <sup>99m</sup>Tc-pertechnetát generátor-elúttal felhasználásával jeleztük meg, majd a jelzetségi hatásfokot vékonyréteg-kromatográfiával határoztuk meg és ellenőriztünk a jelzés után közvetlenül, majd 2 és 6 órával is. A 12 jelzett radiokolloid minta részecskeméretét emellett dinamikus fényszórásos fotometriával mértük. A műtéti beavatkozásokat megelőzően a betegek 400 µl térfogatú, 15 MBq aktivitású <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett HSA nanokolloid (Senti-Scint<sup>®</sup>) injekciót kaptak szubkután alkalmazva, a tumor és a bőr közé injektálva. Az injektálást követően 30 és 60 perccel, illetve szükség esetén 4 órával elülső planáris mellkasi felvételek készültek gamma-kamera segítségével. A műtét során szubareoláris kékfestékes injekciót alkalmaztunk minden betegen, hogy az segítsen pontosan beazonosítani és eltávolítani a szentinel nyirokcsomót, illetve emellett a műtéti területen „gamma-próbát” is végeztünk steril csomagolásban lévő gamma-szonda segítségével. A limfoszcintigráfiai és gamma-szondával végzett SLN-detektálási eredményeket összevetettünk kékfestéses módszerrel végzett SLN-azonosítás eredményeivel, az előzőleg in vitro körülmények között megvizsgált és nyomonkövetett kolloid-szemcseméret tükrében.

A 99% fölötti, és stabilnak bizonyuló jelzettségi hatásfokkal megjelzett Senti-Scint<sup>®</sup> radiokolloid átlagos részecskeármérője a dinamikus fényszórásos fotometria vizsgálatok szerint 175 nm volt, az egyes minták teljes frakciói átlagosan 82 és 467 nm közé estek. A preoperatív limfoszcintigráfiai és intraoperatív gamma-szondás tesztekben a módszerrel sikerült megbízhatóan egy vagy két őrszem nyirokcsomót detektálni a vizsgált betegek 95%-ánál azokban az esetekben is, amikor a tumor maga nem volt kitapintható (sok esetben 5 mm-nél is kisebb volt). Mindeközben a kékfestéses módszerrel csupán 183 esetben, a betegek 82%-ánál sikerült egyértelműen beazonosítani a szentinel nyirokcsomót.

A Senti-Scint<sup>®</sup>-tel végzett vizsgálatoknál kulcsfontosságú gyakorlati elemnek bizonyult, hogy a <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett radiokolloid injektálása után közvetlenül az injektálási ponton masszírozással segítsük a radiofarmakon szétáramlását, ahogy ezt a tapasztalatot korábban [Alazraki és mtsai 1999] is publikálta. A vizsgálatokban az őrszem nyirokcsomó detektálására hasonló hatékonyságúnak bizonyult, mint a korábban De Cicco és mtsai 1998 által bemutatott leírásában. Ebben a munkában a szerzők azt állapították meg, hogy az alkalmazott radiokolloid készítménnyel akkor voltak a legpontosabbak és legeredményesebbek a vizsgálataik, amikor annak részecskemérete 200 nm és 1000 nm közé esett, az injektálási térfogat pedig alacsony, 0.4 ml körüli volt. Az értekezésben bemutatott őrszem nyirokcsomóval kapcsolatos eredményeink összefoglalásaként tehát a következőket állapíthatjuk meg:

1. A preoperatív limfoszcintigráfiai és intraoperatív gamma-szondás vizsgálatok hatékonyságában és pontosságában kulcsfontosságú szerepe van az eljárások során alkalmazott <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett radiokolloid, a Senti-Scint<sup>®</sup> megfelelően megválasztott és megalkotott, stabilan stabil részecskeméretének.
2. Ezen felül, összhangban Paganelli és mtsai (1998) korábban bemutatott eredményeivel, igazoltuk, hogy az ilyen méretű radiokolloidot a preoperatív, gamma-kamerás és intraoperatív, gamma-szondás módszerrel együttesen alkalmazva egy vagy két darab őrszem nyirokcsomó azonosítása megbízhatóan elvégezhető a betegek döntő többségénél, tehát megbízható pontossággal járulnak hozzá az emlőtumorok sebészeti kezeléséhez, és ez a módszer a kékfestéses eljárás pontosságát is meghaladja.

## **5.2. Az őrszem nyirokcsomó állatorvosi onkológiai gyakorlatban történő detektálása <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett Senti-Scint<sup>®</sup>-tel**

Az spontán eredetű tumorban szenvedő kutyák őrszem nyirokcsomó vizsgálatait úgy végeztük el, hogy azok az emberi vizsgálatoknak teljesen megfeleltethetők legyenek, és az emberi klinikai őrszem nyirokcsomó vizsgálatoknak teljes mértékben modellt nyújtsanak. Emellett cél az is volt, hogy bizonyítsuk, hogy a módszer tökéletesen alkalmazható állatorvosi (kutya) páciensekben is, az emberi vizsgálatokkal összevethető vizsgálati protokollal, minimális sebészeti beavatkozásokkal, humán gamma-kamerával, és az emberi vizsgálatok céljára kifejlesztett, megegyező részecskeméret-eloszlású radiofarmakonok segítségével.

A kutyákon végzett őrszem nyirokcsomó vizsgálatba 24, ismert daganatos betegségben szenvedő kutyát vontunk be. Ezeknek az állatoknak jól tapintható, a bőrfelszínhez közeli helyezkedésű, 3 cm-nél nagyobb átmérőjű tumorjuk volt, kimutatható távoli metasztázis nélkül (negatív nyaki Röntgen-vizsgálattal, negatív hasi ultrahang eredménnyel és/vagy negatív onkológiai szcintigráfiás lelettel). A kizárásos kritériumok közé tartoztak a fertőzőes megbetegedések, esetlegesen előforduló fertőzött területek, a nem begyógyult hegek, a hematómák, a multicentrikus primer elváltozások, a feltételezhető vagy ismert hónalj-tájéki vagy más területeken kimutatható áttétek, az elvégzett preoperatív kemoterápiás és mellkasi sugárterápiás kezelések. Ezek a kritériumok mind kórosan befolyásolhatják azokat a fiziológiai körülményeket, amelyek során a radiokolloid az elvárt (igazolt) nyirokáramlási kinetikát mutatja, ezért volt indokolt az összesített vizsgálatból a kizárásuk.

A kutyáknak 20 és 37 MBq aktivitású, 100 µl térfogatú, <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett, humán vizsgálatok céljára kifejlesztett Senti-Scint<sup>®</sup>-et injektáltunk szubkután, közel a primer tumorhoz. 1 és 3 órával a radiokolloid alkalmazása után készítettünk gamma-kamerás felvételeket az állatokról primer daganataról és a mellé helyeződő helyi nyirokcsomók régiójáról digitális gamma-kamera segítségével. Az injektálást megelőzően a liofilizált formában rendelkezésre álló Senti-Scint<sup>®</sup> radiofarmakont <sup>99m</sup>Tc-pertechnetát generátor-elúttal felhasználásával jeleztük meg, majd a jelzettségi hatásfokot vékonyréteg-kromatográfiával határoztuk meg és ellenőriztünk a jelzés után közvetlenül, majd 2 és 6

órával is. A 6 jelzett radiokolloid minta részecskeméretét dinamikus fényszórásos fotometriával is mértük.

A jó (98% fölötti), és stabilnak bizonyuló jelzettségi hatásfokkal megjelzett Senti-Scint<sup>®</sup> radiokolloid átlagos részecskeármérője a dinamikus fényszórásos fotometria vizsgálatok szerint 187 nm volt, az egyes minták teljes frakciói átlagosan 86 és 450 nm közé estek. A radiokolloid injektálása után az érintett nyirokcsomók 97%-át lehetett intraoperatív gamma-szondával azonosítani, 89%-a tisztán kivehető és azonosítható volt a gamma-kamerás felvételeken, míg a kékfestéses módszer az esetek 77%-ában volt eredményes.

Az állatkísérletek során felhasznált <sup>99m</sup>Tc-mal jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> készítmény tehát a humán vizsgálatokban tapasztaltnal megegyezően megbízható diagnosztikumnak bizonyult a SLN detektálásában, kiváló és tartósan stabil jelzettségi hatásfokkal, és megfelelő és stabil részecskeméret-eloszlással. A <sup>99m</sup>Tc-jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> megbízhatóan és tisztán mutatta a szcintigráfias felvételeken és indikálta az intraoperatív gamma-szondás detektálás során a szentinel nyirokcsomókat, miközben nem halmozódott a többi nyirokcsomóban, és ez egyéb szövetekben sem okoztak a diagnózist zavaró háttér-aktivitást.

Az humán célra kifejlesztett Senti-Scint<sup>®</sup> nanokolloid állatokon történő őrszem nyirokcsomó vizsgálatai az állatorvosi jelentőségükön túl azt is megmutatták, hogy a társállatok, és különösen a spontán tumoros betegségben szenvedő kutyák valós, pontos patológiai modelljéül is szolgálhatnak a humán SLN kutatási témáknak is úgy, hogy közben azok költségei jelentősen csökkenhetnek a hagyományos laborállat-modellek felhasználásakor fellépő költségekhez képest. Az eredmények alapján összefoglalóan az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. A kitapintásos és a kékfestéses módszerrel történő őrszem nyirokcsomó azonosítás önmagában nem kellően érzékeny, szelektív és megbízható eljárás.
2. A párhuzamosan alkalmazott módszerek (a kékfestéses, szcintigráfias és az intraoperatív gamma-detektálásos módszer) együttes alkalmazása a lehető legpontosabb módszer az őrszem nyirokcsomó detektálására.



3. A humán célra kifejlesztett,  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> nanokolloid a spontán eredetű daganatban szenvedő kutyák diagnózisának felállításában is ugyanolyan eredményességgel alkalmazható, mint a humán vizsgálatokban (ld. 5.1. fejezet).
4. A társálatok, különösen a spontán beteg kutyák pontos, és jól alkalmazható állatmodelljei lehetnek az őrszem nyirokcsomóval kapcsolatos kutatásoknak.
5. A lehető legpontosabb, legeredményesebb, legjobb hatásfokú őrszem nyirokcsomó detektálásban kulcsfontosságú szerepe van a felhasznált diagnosztikum megfelelően megválasztott, megalkotott és stabil részecskeméretének, és stabil izotópmegkötőképességének

### **5.3. A $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 doxorubicint hordozó nano- és mikrorészecskékkel végzett kísérleteink eredményeinek értékelése**

Kísérleteink során a doxorubicint humán szérum albumin mátrixba kötöttük, majd három különböző részecskeméretű kolloid rendszert állítottunk elő, ezeknek a méretük szerint kiválasztva a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 nevet adtuk. A részecskék előállítására egy korábban kidolgozott módszert választottunk [Weber és mtsai 2000, Langer és mtsai 2003].

A három különböző részecskeméretű minta sikeres, és jó hatásfokú (98% fölötti) technéciumal-jelzését ( $^{99m}\text{Tc}$ ) követően vizsgáltuk a részecskeméret-eloszlásukat dinamikus fotometriával (DLS), és transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) segítségével. Vizsgáltuk a részecskék in vitro doxorubicin-megkötési stabilitását ultracentrifugás ülepités utáni HPLC-vizsgálattal, ellenőriztük az esetleges in vitro jelzettségi hatásfok-változásokat vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) módszerrel a jelzés utáni 24. óráig. A biológiai vizsgálatok során normál szerveszlását vizsgáltuk egészséges Wistar patkányokon, a jelzett radiokolloidokkal intravénásan injektált állatokban SPECT kamera segítségével kísértük nyomon. A biodisztribúciós vizsgálatok eredményét összevetettük korábban leírt, hasonló részecskeméretű készítmények

eredményeivel. A vizsgálatok célja az volt, hogy választ kapjunk arra, hogy az előállított különböző részecskeméretű, a doxorubicin megkötése és a  $^{99m}\text{Tc}$  megkötése (a jelzettségi hatások) milyen mértékben marad állandó *in vitro* és *in vivo* környezetben, illetve a különböző részecskeméretű milyen esetleges későbbi célzott terápiás módszereket vethetnek fel.

Az eredményekkel bizonyítottuk, hogy a doxorubicint HSA részecskébe sikeresen adszorbeáltuk, a nano- és mikrorészecskéket pedig sikerrel állítottuk elő különböző, stabil részecskeméretűben, 176 nm-es, 429 nm-es és 1764 nm-es átlagos részecskeméretű készítmények formájában. A három mintát  $^{99m}\text{Tc}$ -mal jeleztük meg, és vizsgáltuk a fizikokémiai, kolloidikai, illetve radiokémiai stabilitásukat. A különböző méretű készítmények doxorubicin-megkötési hatásfoka 6, 24 és 48 órával a preparálás után 95% fölötti volt, emellett a kolloidok nagyfokú *in vitro* részecskeméret-stabilitást mutattak az 1 hetes nyomonkövetési idő alatt (a minták átlagos részecskemérete egy szűk, 2%-os tartományon belül ingadozott), és ezt az elektronmikroszkópos vizsgálatok is egyértelműen alátámasztották. Ezekon felül a  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzés is minden esetben (1, 6 és 24 órával a jelzés után) 97% fölötti jelzettségi hatásfokot mutatott, alkalmassá téve tehát a kísérleti anyagokat biológiai vizsgálatok céljára.

Az egészséges Wistar patkányokon SPECT-kamerával végzett normál szervezoslási vizsgálatok során egyik injektált radiokolloid esetén sem láttunk egyik mérési időpont (5, 15, 30 perc, illetve 1, 2, 8 és 22 óra) gamma-kamerás felvételein sem jelentős pajzsmirigy, nyálmirigy vagy gyomor-nyálkahártya aktivitást. Ez mindenképp utalt arra a fontos tényre, hogy mindhárom készítmény *in vivo* környezetben is megtartja a  $^{99m}\text{Tc}$ -ot, jó maradt a jelzettségi hatásfoka, illetve ez a tény máris utalt a részecskeméret-stabilitásukra is. A jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 nanorészecskék szervezoslási eredményei között csupán kismértékű különbségeket találtunk, leginkább a RES-szervekben való dúsulást láttunk, a májban az első 30 percen az injektált aktivitások 68,4% és 73,9% közötti hányadát mértük. Ezzel szemben legnagyobb részecskeméretű  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 mikrorészecskék biodistribúciós adatai jelentősen különböztek a másik kettő készítményétől, a tüdőben az injektált aktivitás 61,2% és 78,6% közötti hányada volt detektálható az injektálás utáni első 2 órában. Mindezek az eredmények azt igazolták a három készítmény intravénás alkalmazása

utáni in vivo részecskeméret-stabilitását, és szoros korrelációt mutattak korábban publikált, velük összevethető részecskeméret-eloszlású humán szérum albumin készítmények biodisztribúciós eredményeivel, farmakokinetikai jellegével [Arshady 2001, Mirzaei és mtsai 2003, Reddy és mtsai 2005, Iliuma és mtsai 1982, Whateley and Steele 1985]. Az eredmények alátámasztották, hogy a nano- és mikrorészecskék intravénás alkalmazása során az alapvetően különböző farmakokinetikai tulajdonságokat és lefolyást (az eltérő tüdő és májfelvételeket) okozó részecskeméret határ 600 nm és 1200 nm között van patkány esetén, ha HSA hordozót alkalmazunk. A legfontosabb tanulságok tehát a következők voltak:

1. Az  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$  és  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$  készítmények in vitro és az egészséges Wistar patkányokon végzett normál szervezoslási vizsgálatok igazolták mindhárom méretű doxorubicint hordozó kolloid készítmény esetén azok részecskeméretének, a doxorubicin-megkötő képességének és az  $^{99m}\text{Tc}$ -megkötő képességének (jelzettségi határfokának) az in vitro és in vivo stabilitását.
2. A két kisebb ( $^{99m}\text{Tc-DoxHSA180}$ ,  $^{99m}\text{Tc-DoxHSA430}$ ) és a nagyobb részecskeméretű ( $^{99m}\text{Tc-DoxHSA1800}$ ) készítmény eltérő szervezoslási eredményei igazolták azt is, 1000 nm alatti és feletti részecskeméreteknél köszönhető markánsan különböző farmakokinetikai lefolyások más, tervezhető későbbi célzott terápiás módszereket tesznek lehetővé, akár intravénás, akár intratumorális alkalmazást tervezve.
3. Az eredmények a fentiekén túl rámutattak arra is, hogy a technéciumos jelzési módszer SPECT kamerát felhasználva hatékony, szemléletes és viszonylag alacsony költségű eljárás lehet a jövőben is HSA alapú hatóanyag-hordozó készítmények biológiai nyomonkövetésében.

#### **5.4. A jelzett $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$ nanorészecskék előállításának és első SPECT és SPECT/CT vizsgálatainak értékelése**

Az értekezésben bemutatott  $^{99m}\text{Tc-BBS-NP}$  egy  $^{99m}\text{Tc}$ -vel jelzett, folát-receptort célzó (targetáló) nanorészecskék, önrendeződéssel létrejövő polielektrolit komplex, amely

kitozán és poli-gamma-glutaminsav biopolimerekből áll. A specifikus célbajuttatás érdekében a  $\gamma$ -PGA molekulához folsavat kapcsoltunk. A korábbi UV-VIS adszorpciós spektroszkópiai vizsgálatok azt mutatták, hogy átlagosan 7 db. folsav molekula kötődött egy  $\gamma$ -PGA molekulához [Keresztessy és mtsai 2009]. Az egy nanorészecskére jutó folsav molekulák számának becslése szerint egyetlen, ideálisan átlagos részecskeméretű nanorészecskére hozzávetőleg 300 folsav molekula kötődhet.

A folátos nanorészecskéket egyszerű és könnyen reprodukálható ón-kloridos  $^{99m}\text{Tc}$ -redukciós technikával elsőként jeleztük meg  $^{99m}\text{Tc}$ -mal izotóppal. A  $^{99m}\text{Tc}$  pontos kötődési helyét a nanorészecskéken ezen nyomjelzési kísérletek során nem részleteztük külön, azonban a nanorészecskék preparálása, anyagösszetétele alapján pontosan tudható volt, hogy nagy számú amino- és karboxil-csoportokat tartalmaznak, így korábbi leírások alapján [Wei és mtsai 2008] nagy biztonsággal kijelenthető volt, hogy  $^{99m}\text{Tc}$  a glutamát-peptid karboxil-csoportjain keresztül kötődik a nanorészecskékhez. A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP készítmény jelzettségi határfokát vékonyréteg kromatográfiával (ez a 24 órás nyomonkövetés során 97% fölötti volt), a részecskeméret eloszlását a jelzés után DLS-módszerrel ellenőriztük (az átlagos részecskeméret az injektáláskor 124 nm volt).

A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék fluoreszcens jelzése után konfokális mikroszkópos vizsgálattal igazoltuk, hogy a részecskék a folát-receptort overexpresszáló hepatocelluláris karcinóma (Hepatocarcinoma Debreceniensis, HeDe) sejtek felszínére kapcsolódnak, majd a tumorsejtek internalizálják őket.

A jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorendszer első in vivo, biológiai kipróbálását és alkalmazását tumor-transzplantált kísérleti patkányok felhasználásával mutattuk be, a SPECT és SPECT/CT kamerákon. Az ún. “*vesetok-próba*” (“subrenal capsule assay – SRCA”) egy jól használható módszer az in vivo kemoselektivitási vizsgálatokhoz [Trencsényi és mtsai 2009], ezt a tesztet, tumor-transzplantációs vizsgálatot használtuk a nanorészecskék vizsgálatára, a kísérleti Fischer 344 patkányok vesetokja alá sebészetiileg beültetett HeDe-tumor-sejtvonal segítségével. A korábbi vizsgálatok [Trencsényi és mtsai 2009] igazolták a kapcsolatot a vesetok nyirokkeringése és a mellkasi paratimikális nyirokcsomók között, ezek az eredmények azt mutatták, hogy a vesetok alá behelyezett tumorsejtek áttéteket képeznek a mellkasi paratimikális

nyirokcsomókban, ezt a módszer stabil metasztatikus állatmodellnek bizonyult [Bánfalvi 2012]. A vese-szcintigráfia régóta használt radiofarmakonja a klinikai gyakorlatban  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA, ezért esett a választásunk ennek a készítménynek a felhasználására a relatív vesefunkciók és a vesék morfológiai kontrollvizsgálataiban.

A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP mind a korai (30 perces, 2 órás), mind a kései (8 és 24 órás) gamma-kamerás felvételeken alacsony nyálmirigy, pajzsmirigy, gyomor-nyálkahártya és tüdő aktivitások voltak detektálhatók. Ez a tény arra utalt, hogy az alkalmazott jelzett nanorészecskék, méretükben is stabilak maradtak a biológiai alkalmazásuk során, illetve a  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzettségi hatásfokuk is állandó maradt. Az eredmények jól korreláltak olyan korábban leírt radiofarmakonok eredményeivel [Bergqvist és mtsai 1983], amelyek ezzel a készítménnyel összevethető részecskeméret-eloszlással rendelkeztek.

A különböző időpontokban mért aktivitás-értékek szerint a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskére viszonylagos lassú kiürülés jellemző: 8 órával az injekció után az injektált aktivitás még mindig több, mint 71%-a volt mérhető a teljes-test ROI analízis segítségével. Az összes mérési pontnál látszott, hogy a RES-szervek halmozzák az injektált aktivitás legnagyobb hányadát (a máj az injekció után 8 órával is az I.D. 33,19%-t akkumulálta). A ROI-vizsgálat kimutatta, hogy 8 órával az injekció után a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék csupán kevesebb, mint egyharmada ürült ki a szervezetből, 24 órával utána pedig hozzávetőlegesen a felük.

A nanorészecskék koncentrációja a tumoros bal vesében ugyanakkor egyértelműen nagyobb volt minden vizsgált időpontban (24 órával az injekció után a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék 8,54%-a volt itt kimutatható), mint a kontralaterális oldalon (1,30% és 1,56% közötti értékek voltak mérhetőek). Emellett készítmény a  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA kontroll-radiofarmakonhoz képest is jobb szelektivitást mutatott a vizsgált tumoros területeken, a  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA esetében az injektált aktivitás maximum 3,68%-át lehetett a tumoros bal vesében detektálni. Az injekció utáni 6. órában készült nanoSPECT/CT képeken sokkal könnyebben és egyértelműbben beazonosítható tumoros bal vesét láthattunk, a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecske jól körülírható specifikus tumor-halmozásával, igazolva ezzel a kisebb pontosságú, de nagyobb mennyiségben és több időpontban elvégzett SPECT kamerás vizsgálatok eredményeit.

A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskéket spontán eredetű, immunhisztokémiai vizsgálattal igazolt folát receptort kifejező szájüregi tumorban szenvedő kutyának a SPECT vizsgálatában is alkalmaztuk. A készítmény injektálását követő 2. órás vizsgálatban a teljes injektált aktivitás 3,11%-át lehetett a szájüregi daganatban kimutatni, az ekkor a kutya koponya régiójáról elvégzett háromdimenziós SPECT vizsgálatok során pontosan körülírható tumorfelvételt figyeltünk meg.

Összességében a biológiai alkalmazások eredményei a jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorendszer folát-receptorokra való egyértelmű specifikus kötődésére utaltak. Az eredmények tükrében tehát az alábbiakat állapíthatjuk meg:

1. A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorészecskék a  $^{99m}\text{Tc}$ -mal történő jelzés során állandó, stabil részecskeméret-eloszlást mutatnak, illetve a jelzettségi hatások is megfelelőek (97% fölöttinek) és stabilnak mutatkoztak.
2. A jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorendszert a folát-receptort kifejező HeDe tumor-sejtvonalak jó hatásokkal veszik fel.
3. A specifikus, megnövelt halmozódást a folát-receptort kifejező HeDe-tumor-transzplantált kísérleti Fischer 344 patkányok és egy spontán eredetű szájüregi tumorban szenvedő kutya (SPECT és fúziós nanoSPECT/CT) vizsgálataiban is igazoltuk.
4. Az eredmények a fentiekén túl rámutattak arra is, hogy a gamma-kamerás módszer hatékony, szemléletes és viszonylag alacsony költségű eljárás lehet a jövőben is hatóanyag-hordozók biológiai nyomonkövetésében, ún. teranosztikumok [Sumer, Gao 2008] fejlesztésében.

## 6. Következtetések

Az értekezésben új diagnosztikai radiofarmakon-jelölt készítmények előállítását mutattunk be, és kolloid radiofarmakonok és hatóanyag-hordozók példáin keresztül igazoltuk a megfelelő és stabil részecskeméret-eloszlás jelentőségét. Bemutattuk spontán beteg társállatok (kutyák) összehasonlító kórtani vizsgálatát egy humán célra kifejlesztett radiofarmakon és az új radiofarmakon-jelölt készítmény első alkalommal történő klinikai alkalmazásával. Ezek mellett a bemutatott példákon keresztül igazoltuk, hogy a nukleáris medicina képalkotó módszerei fontos segítői az új típusú, nanotechnológiával készült gyógyszerek (teranosztikumok, célzott hatóanyag-bevitelben alkalmazott hordozó részecskék) fejlesztésének azok biológiai nyomonkövetésében.

A bemutatott új eredmények a következők voltak:

### 1. Előállítás, radioaktív jelzés

- A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP készítmény előállítása: egy új típusú, önrendeződéssel létrejövő, folát receptort kifejező tumor típusokat targetáló nanorendszer, nanorészecske termék első ízben történő,  $^{99m}\text{Tc}$  izotóppal történő radioaktív jelzését valósítottuk meg és mutattuk be.
- A  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények előállítása: az értekezésben bemutattuk humán szérum albumin (HSA) alapú, doxorubicint hordozó nanorészecskék és mikrorészecskék előállítását több részecskeméretű változatban, majd ezeket sikeresen jeleztük  $^{99m}\text{Tc}$  izotóppal.
- A Senti-Scint<sup>®</sup> HSA nanokolloid  $^{99m}\text{Tc}$  izotóppal történő jelzése.

### 2. Jellemzés, in vitro nyomonkövetés

- Nagy teljesítményű folyadékromatográfiás (HPLC) módszerrel igazoltuk, hogy a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények doxorubin-megkötési hatásfoka 48 órával a preparálás után is 95% fölötti volt.

- Vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) módszerrel igazoltuk, hogy a  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> radiokolloid a biológiai alkalmazás előtt megfelelő jelzettségi határfokú (95% fölötti). TLC módszerrel igazoltuk, hogy a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP, a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180, a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és a  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények első ízben történő  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzése sikeres volt, és 24 órás jelzettségi-határfok nyomonkövetéssel igazoltuk, hogy a készítmények izotópmegkötése minden esetben állandó, 97% fölötti volt.
- Dinamikus fényszórás fotometriával (DLS) meghatároztuk a Senti-Scint<sup>®</sup>,  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények részecskeméretét. Igazoltuk, hogy a készítmények részecskeméret-eloszlásában a jelzési procedúra nem okoz jelentős változást, a doxorubicint hordozó HSA kolloidok esetében pedig 1 hetes in vitro nyomonkövetéssel igazoltuk, hogy az idő függvényében sincs jelentős változás a részecskeméret-eloszlásukban.
- A  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítmények transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatával alátámasztottuk a DLS módszerrel végzett részecskeméret-mérési eredményeket, igazoltuk, hogy mindhárom jelzett készítmény gömbszerű részecskékből áll, és a legnagyobb ( $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800) minta nem tartalmaz olyan méretű aggregátumokat, amelyeket a DLS módszerrel nem mutathatók ki.
- A  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP fluoreszcens jelzése után hepatocelluláris karcinóma (Hepatocarcinoma Debreceniensis, HeDe) sejtvonalak konfokális mikroszkópos vizsgálataival igazoltuk a nanorészecskék sejtkötődését a folát-receptort kifejező tumor-sejteken.

### 3. Biológiai alkalmazás, in vivo nyomonkövetés

- A jelzett  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800 készítményeket egészséges Wistar-patkány állatmodelleken vizsgáltuk, a kísérletekkel igazoltuk, hogy a jelzett készítmények in vivo környezetben megfelelő jelzettségi határfokot és megfelelően állandó a részecskeméret-





hogy az új,  $^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett nanorendszer alkalmas lesz később akár emberi, folát-receptort kifejező tumorok jó szelektivitással történő azonosítására is.

- A  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> HSA nanokolloiddal 128 emlődaganatos női betegek klinikai őrszem nyirokcsomó (SLN) vizsgálatát végeztük el a limfoszcintigráfiai (gamma-kamerás), gamma-szondás és kékfestéses SLN-detektálási módszerek együttes alkalmazásával. Igazoltuk, hogy egy vagy két darab őrszem nyirokcsomó azonosítása megbízhatóan elvégezhető a betegek döntő többségénél úgy, hogy az SLN vizsgálatokra 175 nm-es átlagos részecskeméretű nanokolloidot alkalmaztunk.
- Ismert daganatos betegségben szenvedő kutyák őrszem nyirokcsomó (SLN) vizsgálatát végeztük el  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> HSA nanokolloiddal: a limfoszcintigráfiai (gamma-kamerás), gamma-szondás és kékfestéses SLN-detektálási módszerek együttes alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy az érintett nyirokcsomók 97%-át lehetett intraoperatív gamma-szondával azonosítani, 89%-a tisztán kivehető és azonosítható volt a gamma-kamerás felvételeken, míg a kékfestéses módszer az esetek 77%-ában volt eredményes. AZ eredményekkel igazoltuk, hogy a humán célra kifejlesztett nanokolloid a kutyák SLN-azonosításában ugyanolyan eredményességgel alkalmazható, mint a humán vizsgálatokban. Az eredményekkel ezen felül igazoltuk azt is, hogy a spontán eredetű tumorban szenvedő kutyák pontos, és jól alkalmazható állatmodelljei lehetnek az őrszem nyirokcsomóval kapcsolatos kutatásoknak.

## 7. Összefoglalás

A nukleáris medicinában a radiokolloidok egyik legfontosabb alkalmazási területe a primer daganatok ún. őrszem nyirokcsomókra történő áttétképződésének kimutatása. Az értekezésben 128 emlődaganatban szenvedő páciens limfoszcintigráfiai eredményeit hasonlítjuk össze intraoperatív gammadetektálási és kékfestéses módszerrel történő nyirokcsomó-azonosítási vizsgálatok adataival, illetve 24 spontán tumoros kutya eredményeivel. Az injektált  $^{99m}\text{Tc}$ -mal jelzett Senti-Scint<sup>®</sup> nanokolloid a korábban alkalmazott készítményeknél viszonylag nagyobb méretű, 100 és 600 nm közötti HSA részecskékből állt. Az értekezésben emellett a doxorubicin különböző részecskeméretű, HSA alapú nano- és mikrorészecskébe való megkötését is bemutattuk. A részecskéket a preparálás után  $^{99m}\text{Tc}$ -mal jeleztük, majd nyomonkísértük három ( $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA180,  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA430 és  $^{99m}\text{Tc}$ -DoxHSA1800) készítmény doxorubicin-megkötő hatásfokát, részecskeméret-állandóságát és radiokémiai stabilitását. A hatóanyag-hordozók alkalmazásával ilyen módon különböző, célzottabb terápiás módszerek érhetők el, amellett, hogy lehetőség nyílik a doxorubicin mellékhatásait, kardiotoxicitását is csökkenteni. A dolgozatban új, folát-receptort célzó, önrendeződéssel létrejövő,  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett nanorészecskék első alkalommal történő SPECT és SPECT/CT alkalmazását is bemutatjuk. Kísérleteink során a  $^{99m}\text{Tc}$ -BBS-NP nanorendszert elsőként jeleztük meg  $^{99m}\text{Tc}$ -mal, majd folát receptort kifejező tumormodelleken vizsgáltuk a specifikus tumor-halmozódását. Bizonyítottuk, hogy a kontrasztanyag egyértelműen magasabb halmozást mutat a célzott daganatokban, a részecskék tehát alkalmasnak bizonyulnak folát-receptort kifejező tumorok érzékeny és szelektív azonosítására. Az eredményekkel összességében igazoltuk, hogy a megfelelő részecskeméret megválasztásának és megalkotásának kulcsfontosságú jelentősége van a diagnosztikai vagy terápiás célzatú nano- vagy mikrorészecskék, teranosztikumok tervezésében. Emellett humán vizsgálatokkal párhuzamos, azokat modellező spontán beteg állatok vizsgálatainak keresztül igazoltuk a társállatok onkológiai kutatásokban való alkalmazásának összehasonlító kórtani jelentőségét mind már meglévő diagnosztikai módszerek (az őrszem nyirokcsomó kutatása), mind teljesen új eljárások fejlesztésénél. Az eredményekkel mindezeket felül igazoltuk, hogy a nukleáris medicina képalkotó módszerei fontos segítői új típusú, nanotechnológiával készült gyógyszerek (teranosztikumok, célzott hatóanyag-bevitelben alkalmazott hordozók) fejlesztésének is.

## 8. Summary

Detection of metastatic involvement of sentinel lymph nodes is one of the most common applications of colloid based radiotracers in nuclear medicine imaging. The first part of the dissertation is focusing on lymphoscintigraphical investigations. Lymphoscintigraphical findings of 128 breast cancer patients were compared with the results of intraoperative surgical gamma detection probe and blue dye mapping, and with results of 24 dogs having spontaneously occurred tumour, respectively. The injected radiocolloid was the  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled HSA-based Senti-Scint<sup>®</sup> nanocolloid product in the size range between 100 and 600 nm.

The thesis also presents different application of HSA based colloids. In the presented investigations doxorubicin was loaded into different sized HSA based nanoparticles and microparticles and then particulate systems were labelled with  $^{99m}\text{Tc}$ . Physicochemical, colloidal and radiochemical stability of radiocolloids was examined with biological tests to determine the size-dependent pharmacokinetic values. Investigations verified that the stable but different particle sizes make drug carrier HSA nanoparticles possible to carry out different drug targeting together with a probably lower cardiotoxicity.

The next part of the dissertation presents the first SPECT and SPECT/CT try-out of a new folate-targeted, self-assembled nanoparticle product. The novel nanosystem was radiolabelled with  $^{99m}\text{Tc}$ , and then we examined the stability of the compound, and the possibility of applying it as a new potential imaging agent for imaging folate-receptor-overexpressing tumours. Investigations verified that the new targeted contrast agent shows higher tumour uptake, therefore the new targeted nanoparticles are able to detect folate-receptor-overexpressing tumours with appropriate sensitivity and selectivity.

Results showed that the properly selected and designed particle size distribution of the used radiocolloid has key importance in the detection of sentinel lymph node and in the preparation of new diagnostic and therapeutic particulate systems and theranostics. Besides, we were able to demonstrate the importance of companion animal models in the research of new and already used methods (e.g. SLN detection) of comparative oncology and pathology, as we used spontaneously diseased animal, as parallel to the human cases. Moreover, results validated that nuclear medicine methods could be important parts of the development of new nanotechnology based pharmaceuticals (such as novel theranostics and drug delivery systems).

## 9. Irodalomjegyzék

Agashe HB, Babbar AK, Jain S, Sharma RK, Mishra AK, Asthana A, Garg M, Dutta T, Jain NK. (2007) Investigations on biodistribution of technetium-99m-labeled carbohydrate-coated poly(propylene imine) dendrimers. *Nanomedicine: N.B.M*, 3, 120–127.

Akagi T, Kaneko T, Kida T, Akashi M. (2005) Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly( $\gamma$ -glutamic acid) with L-phenylalanine as a protein carrier. *J. Control. Release*: 108, 226-236.

Alazraki NP, Styblo T, Grant SF, Cohen C, Larsen T, Aarsvold JN. (1999) Breast cancer sentinel lymph node lymphoscintigraphy: comparison of subdermal and peritumoral injections. *J Nucl Med*, 40, 59.

Alazraki NP, Eshima D, Eshima LA, Herda SC, Murray DR, Vansant JP, Taylor AT. (1997) Lymphoscintigraphy, the sentinel node concept and the intraoperative gamma probe in melanoma, breast cancer and other potential cancers. *Semin Nucl Med*, 27,55–67.

Altiparmak B, Lambrecht FY, Bayrak E, Durkan K. (2010) Design and synthesis of  $^{99m}\text{Tc}$ -citro-folate for use as a tumor-targeted radiopharmaceutical. *Int. J. Pharm*, 400, 8–14.

Ames SE, Krag DN, Brady MS. (1998) Radiolocalization of the sentinel node in Merkel cell carcinoma: a clinical analysis of seven cases. *J Surg Oncol*, 67: 251–254.

Arshady R. *Microspheres, Microcapsules & Liposomes*, Citus Books, London, 2001. 156-158.

Assaad E, Wang YJ, Zhu XX, Mircea Alexandru Mateescu MA. (2011) Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration. *Carbohydr. Polym*, 84, 1399–1407.

Awasthi VD, Garcia D, Goins BA, Phillips WT. (2003) Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *Int. J. Pharm.*, 253, 121–132.

Balogh L, Andócs G, Máthé D, Thuróczy J, Perge E, Erdélyi I, Bodó K, Polyák A, Jánoki GyA. (2001) Detection and identification of sentinel lymph node in canine oncological patients. *European Journal of Nuclear Medicine*, 28/8, 1193 (abstract).

Banfalvi G. (2012) Role of parathymic lymph nodes in metastatic tumor development. *Cancer Metastasis Rev*, 31, 89-97.

Barraud L, Merle P, Soma E, Lefrancois L, Guerret S, Chevallier M, Dubernet C, Couvreur P, Trepo C and Vitvitski L. (2005) Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *J. Hepatol*, 42, 736–743.

Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. (2004) Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 57(1), 35-52.

Bergqvist L, Strand SE, Persson BRR. (1983) Particle sizing and biokinetics of interstitial lymphoscintigraphic agents. *Semin Nucl Med*, 13, 9–19.

Bircher A. (2006) Blue dyes in medicine – a confusing terminology. *Contact Dermatitis*, 54, 231–232

Cabanas RM. (1977) An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*, 39(2), 456–466.

Cabanas RM. (2000) The concept of the sentinel lymph node. *Recent Results Cancer Res*, 157: 109–120.

Chen X, Li L, Liu F, Liu B. (2006) Synthesis and biological evaluation of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 16, 5503-5506.

Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG and Shin DM. (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*, 14: 1310–1316.

Configliacchi E, Razzano G, Rizzo V and Vigevani A. (1996) HPLC methods for the determination of bound and free doxorubicin, and of bound and free galactosamine, in methacrylamide polymer-drug conjugates. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 15:123–129.

Cox CE, Pendas S, Cox JM, Joseph E, Shons AR, Yeatman T, Ku NN, Lyman GH, Berman C, Haddad C, Reintgen DS. (1998) Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. *Ann Surg*, 227: 645–653.

Cuvier C, Roblot-Treupel L, Millot JM, Lizard G, Chevillard S, Manfait M, Couvreur P and Poupon MF. (1992) Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance. *Biochem. Pharmacol*, 44: 509–517.

De Cicco C, Cremonesi M, Luini A, Bartolomei M, Grana C, Prisco G, Galimberti V, Calza P, Viale G, Veronesi U, Paganelli G. (1998) Lymphoscintigraphy and radioguided biopsy of the sentinel axillary node in breast cancer. *J Nucl Med*, 39:2080–2084.

De Hullu JA, Doting E, Piers DA, Hollema H, Aalders JG, Schraffordt Koops H, Boonstra H, von der Zee AGJ. (1998) Sentinel node identification with technetium-99m-labelled nonocolloid in squamous cell cancer of the vulva. *J Nucl Med*, 39: 1381–1385.

Dinauer N, Balthasar S, Weber C, Kreuter J, Langer K and von Briesen H. (2005) Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. *Biomaterials*, 29: 5898–5906.

Dodane V, Vilivalam VD. (1998) Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1, 246-253.

Dreis S, Rothweiler F, Michaelis M, Cinatl J.Jr, Kreuter J and Langer K. (2007) Preparation, characterization and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles HSA. *Int. J. Pharm.* 341: 207-214.

Eatock M, Church N, Harris R, Angerson W, McArdle C, French R and Twelves C. (1999) Activity of doxorubicin covalently bound to a novel human serum albumin microcapsule. *Invest. New Drugs*, 17: 111–120.

Elnakat H, Ratnam M. (2004) Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*: 56, 1067–1084.

Ergun EL, Ercan MT, Asansu A, Unsal IS. (1998) Evaluation of <sup>99</sup>Tcm-HIG as a lymphoscintigraphic agent in rabbits. *Nucl Med Commun*, 19: 665–670.

Eshima D, Fauconnier T, Eshima L, Thornback JR. (2000) Radiopharmaceuticals for lymphoscintigraphy: including dosimetry and radiation considerations. *Semin Nucl Med*, 30:25–32.

European Pharmacopoeia 6.0. EU, 2007. P1029-1030.

Feng Q, Zeng G, Yang P, Wang C, Cai J. (2005) Self-assembly and characterization of polyelectrolyte complex films of hyaluronic acid/chitosan. *Colloid. Surface, A*. 257–258, 85–88.

Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. (2008) A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J. Control. Release*, 126, 187–204.

Garcia-Bennett A, Nees M, Fadeel B. (2011) In search of the Holy Grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therap. *Biochem. Pharmac*, 81, 976–984.

Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, Khanna C. (2009) The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *PLoS medicine*, 6(10): e1000161.

Guibal E, Von Offenberg Sweeney N, Zikan MC, Vincent T, Tobin JM. (2001) Competitive sorption of platinum and palladium on chitosan derivatives. *Int. J. Biol. Macromol*, 28, 401-408.



Guo W, Jing H, Yang W, Guo Z, Feng S, Zhang X. (2011) Radiolabeling of folic acid-modified chitosan with  $^{99m}\text{Tc}$  as potential agents for folate-receptor-mediated targeting. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 21, 6446–6450.

Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, Antropov AS, Kivman GY and Kreuter J. (1999) Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.*: 16: 1564–1569.

Hahn KA, Bravo L, Adams WH, and Frazier DL. (1994) Naturally occurring tumors in dogs as comparative models for research. *In Vivo*, 8 (1): 133–143.

Hajdu I, Bodnár M, Filipcsei G, Hartmann JF, Daróczi L, Zrínyi M, Borbély J. (2008) Nanoparticles prepared by self-assembly of Chitosan and poly- $\gamma$ -glutamic acid. *Colloid Polym. Sci*, 286, 343–350.

Hajdu I, Bodnar M, Trencsenyi G, Marian T, Vamosi G, Kollar J, Borbely J. (2013) Cancer cell targeting and imaging with biopolymer-based nanodevices. *Int. J. Pharm.*: 441, 234-241.

Hansen K, Khanna C. (2004) Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. *Eur. J. Cancer*, 40(6): 858-880.

Harris JR and Reiber A. (2007) Influence of saline and pH on collagen type I fibrillogenesis in vitro: Fibril polymorphism and colloidal gold labeling. *Micron*, 38: 513-521.

Hodges CC, Fossum TW, Komkov A, Hightower D. (1992) Lymphoscintigraphy in healthy dogs and dogs with experimentally created thoracic duct abnormalities. *Am J Vet Res*, 53: 1048–1053.

Hórvölgyi Zoltán: A nanotechnológia kolloidkémiai alapjai, Egyetemi tankönyv, BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Budapest 2011. P9

Hsieh CY, Tsai SP, Wang DM, Chang YN, Hsieh HJ. (2005) Preparation of  $\gamma$ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials*, 26, 5617-5623.

Iliuma L, Davis SS, Wilson CG, Thomas NW, Frier M and Hardy JG. (1982) Blood clearance and organ deposition of intravenously administered colloidal particles. The effects of particle size, nature and shape. *International J of Pharmaceutics*, 12: 135-146.

Inbaraj BS, Chiu CP, Ho GH, Yang J, Chen BH. (2006) Removal of cationic dyes from aqueous solution using an anionic poly- $\gamma$ -glutamic acid-based adsorbent. *J. Hazard. Mater*, B137, 226-223.

Jánoki GyA, Bodó K, Balogh L, Andócs G, Sinkovics I and Pélei G. (2000) Evaluation of new colloid developed for sentinel node detection and imaging. *Eur J Nucl Med*: 27/8: 985 (abstract).

Jain KK. *The Handbook of Nanomedicine*. Humana Press, Basel, 2008. P1-4

Ji DY, Kuo TF, Wu HD, Yang JC, Lee SY. (2012) A novel injectable chitosan/polyglutamate polyelectrolyte complex hydrogel with hydroxyapatite for soft-tissue augmentation. *Carbohydr. Polym*, 89, 1123-1130.

Jing H, Guo Z, Guo W, Yang W, Xu P, Zhang X. (2012) Synthesis and characterization of folic acid modified water-soluble chitosan derivatives for folate-receptor-mediated targeting. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 22, 3418–3424.

Kamb A, Wee S, Lengauer C. (2007) Why is cancer drug discovery so difficult? *Nature reviews Drug discovery*, 6(2):115-120.

Ke CY, Mathias CJ, Green MA. (2004) Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 56, 1143– 1160.

Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. (1998) Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiologic reviews*, 20(2):204-217.

Keresztessy Z, Bodnár M, Ber E, Hajdu I, Zhang M, Hartmann JF, Minko T, Borbély J. Self-assembling chitosan/poly- $\gamma$ -glutamic acid nanoparticles for targeted drug delivery. (2009) *Colloid Polym. Sci*, 287, 759-765.

Keshtgar MRS, Ell PJ. (1999) Sentinel lymph node detection and imaging. *Eur J Nucl Med*, 26:57–67.

Khanna C, Prehn J, Hayden D, Cassaday RD, Caylor J, Jacob S, Bose SM, Hong SH, Hewitt SM, Helman LJ. (2002) A randomized controlled trial of octreotide pamoate long-acting release and carboplatin versus carboplatin alone in dogs with naturally occurring osteosarcoma: evaluation of insulin-like growth factor suppression and chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 8: 2406–2412.

Khor E, Lim LY. (2003) Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13), 2339-2349.

Knapp DW, Waters DJ. (1997) Naturally occurring cancer in pet dogs: Important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol Med Today*, 3 (1): 8–11.

Knapp DW, Glickman NW, DeNicola DB, Bonney PL, Lin TL, Glickman LT. (2000) Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 5(2):47-59.

Komarek P, Kleisner I, Komarkova I, Konopkova M. (2005) Accumulation of radiolabelled low molecular peptides and proteins in experimental inflammation. *Int. J. Pharm*, 291, 119–125.

Krag D, Weaver D, Ashikagat T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, Feldman S, Kusminsky R, Gadd M, Kuhn J, Harlow S, Beitsch P. (1998) The sentinel node in breast cancer – a multicenter validation study. *N Engl J Med*, 339: 941–946.

Kurita K. (1998) Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polym. Degrad. Stab*, 59, 117-120.

Langer K, Balthasar S, Vogel V, Dinauer N, H. von Briesen and Schubert D. (2003) Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*: 257: 169–180.

Leamon CP, Reddy JA. (2004) Folate-targeted chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 56, 1127-1141.

Leo E, Vandelli MA, Cameroni R and Forni F. (1997) Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. *Int. J. Pharm.*: 155: 75–82.

Leo E, Cameroni R and Forni F. (1999) Dynamic dialysis for the drug release evaluation from doxorubicin-gelatin nanoparticle conjugates, *Int. J. Pharm*, 180: 23–30.

Lin WC, Yu DG, Yang MC. (2006) Blood compatibility of novel poly( $\gamma$ -glutamic acid)/polyvinyl alcohol hydrogels. *Colloid Surf, B* 47, 43-49.

Lu J, Pang Y, Xie F, Guo H, Li Y, Yang Z, Wang X. (2011) Synthesis and in vitro/in vivo evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled folate conjugates for folate receptor imaging. *Nucl. Med. Biol*, 38, 557–565.

Madewell BR. (1981) Neoplasms in domestic animals: a review of experimental and spontaneous carcinogenesis. *The Yale journal of biology and medicine*, 54(2):111-125.

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y and Hori K. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Rel*, 65: 271–284.

Majeti NV, Kumar R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*: 46, 1-27.

Martin FJ. Chapter 8.2 - Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL (pegylated liposomal doxorubicin). Ed.: D.D. Lasic and D. Papahadjopoulos. *Medical Applications of Liposomes*, Elsevier 1998: 635-688

Mata, JE, Dyal LA, Slauson ME, Summerton JE, Loehr C, Tyson AR. Rodriguez-Proteau, R., Gustafson, S.B. (2007) Tumor imaging using technetium-99m bound to pH-sensitive peptides. *Nanomedicine: N.B.M*, 3, 297–305.

Metcalf MR, Rosenthal RC, Sellett LC, Badertscher RR. (1986) Canine ventral body wall lymphoscintigraphy. A comparison of  $^{99m}\text{Tc}$ -antimony sulfide colloid and  $^{99m}\text{Tc}$ -dextran as lymphoscintigraphic agents. *Veterinary and Radiology Ultrasound*, 27: 155–160.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G. and Gianni L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev*, 56: 185–229.

Mirzaei S, Rodrigues M, Hoffmann B, Knoll P, Riegler-Keil M, Kreuzer W, Salzer H, Köhn H, Polyak A, Janoki GA. (2003) Sentinel lymph node detection with large human serum albumin colloid particles in breast cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag*, 30, 874–878.

Mishra B, Patel BB and Tiwari S. (2010) Colloidal nanocarriers, a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6: 9-24.

Morton D, Wen D, Cochran A. (1992) Management of early stage melanoma by intraoperative lymphatic mapping and selective lymphadenectomy: an alternative to routine elective lymphadenectomy or “watch and wait”. *Surg Oncol Clin North Ann*, 1:247–259.

Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. (1992) Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*, 127: 392–399.

Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B. (2007) Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer research*, 27(1A): 155-164.

Nobs L, Buchegger F, Gurny R and Allemann E. (2004) Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J Pharm Sci*, 93: 1980–1992.

Noris AM, Haraus G, Ege N, Broxup B, Valli VEO, Leger L. (1982) Lymphoscintigraphy in canine mammary neoplasia. *Am J Vet Res*, 43: 195–199.

Ocampo-García BE, Ramírez FM, Ferro-Flores G, De León-Rodríguez LM, Santos-Cuevas CL, Morales-Avila E, de Murphy CA, Pedraza-López M, Medina LA, Camacho-López MA. (2011) <sup>99m</sup>Tc-labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl. Med. Biol*, 38, 1–11.

Onursal M, Lambrecht FY, Ozgur A. (2011) Synthesis and biological evaluation of receptor-based tumor imaging agent:  $^{99m}\text{Tc}$ -folate-glucaric acid. *Int. J. Pharm*, 416, 288-292.

Ostrander EA, Galibert F, Patterson DF. (2000) Canine genetics comes of age. *Trends in genetics: TIG*, 16(3):117-124.

Paganelli G. (1998) Sentinel node biopsy: the role of nuclear medicine in conservative surgery of breast cancer. *Eur J Nucl Med*, 25: 99–100.

Paganelli G, Chicco C, Cremonesi M, Prisco G, Calza P, Luini A, Zucali P, Veronesi U. (1998) Optimised sentinel node scintigraphy in breast cancer. *Q J Nucl Med*, 42: 49–53.

Page RL, Thrall DE. (1994) Therapeutic hyperthermia: contribution from clinical studies in dogs with spontaneous neoplasia. *In vivo*, 8(5): 851-858.

Pang LY, Argyle DJ: (2009) Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(4): 380-391.

Paoloni M, Khanna C. (2008) Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature reviews Cancer*, 8(2): 147-156.

Paragh G, Kertai P, Kovacs P, Paragh P, Fulop P, Foris G. (2003) HMGCoA reductase inhibitor Fluvastatin arrests the development of implanted hepatocarcinoma in rats. *Anticancer Res*, 23, 3949-3854.

Phillips MA, Gran ML, Peppas NA. (2010) Targeted nanodelivery of drugs and diagnostics. *Nano Today*, 5, 143-159.

Polyák A, Hajdu I, Bodnár M, Trencsényi Gy, Pöstényi Z, Haász V, Jánoki G, Jánoki GyA, Balogh L, Borbély J. (2013)  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities. *Int. J. Pharm.*, 449: 10–17

Polyak A, Palade EA, Balogh L, Postenyi Z, Haasz V, Janoki G, Janoki GyA. (2011) In vitro and biodistribution examinations of Tc-99m-labelled doxorubicin-loaded nanoparticles. *Nuclear Medicine Review*, 14,2: 1–8

Powers BE, McChesney SL, Gillette EL: Late radiation response of the canine trachea with change in dose per fraction. (1987) *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 13(11): 1673-1680.

Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W. (2003) Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromol.* 4, 1457-1465.

Rahman A, Treat J, Roh JK, Potkul LA, Alvord WG, Forst D, Woolley PV. (1990) A phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of liposome-encapsulated doxorubicin. *Journal of Clinical Oncology*, 8, 6, 1093-1100

Reddy LH, Sharma RK, Chuttani K, Mishra AK and Murthy RSR. (2005) Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *J. Contr. Rel.* 105: 185-198

Reintgen DS, Cruse CW, Bermann C, Ross M, Rapaport D, Glass F, Fenske N, Messina J. (1994) An orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg*, 220: 759.

Rogers KS, Barton CL, Landis M. (1993) Canine and feline lymph nodes. Part II. Diagnostic evaluation of lymphadenopathy. *Compendium in Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 15: 1493-1503.

Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. (2011) Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7): 380-388.

Rutgers EJTh, Muller SH, Hoefnagel CA. The use of intraoperative probes in surgical oncology. In: Murray IPC, Ell PJ, eds. *Nuclear medicine in clinical diagnosis and treatment*, 2<sup>nd</sup> edn. London: Churchill Livingstone; 1998. 1025–1036.

Sautet JY, Ruberte J, Lopez C, Gine JP, Ordonez G, Cingia A. (1992) Lymphatic system of the mammary glands in the dog: an approach to the surgical treatment of malignant mammary tumors. *Canine Practice*, 17 (2): 30–33.

Sargan DR. (2004) IDID: inherited diseases in dogs: web-based information for canine inherited disease genetics. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 15(6): 503-506.

Schmuhl R, Krieg HM, Keizer K. (2001) Adsorption of Cu(II) and Cr(VI) ions by chitosan: Kinetics and equilibrium studies. *Water SA*, 27, 1-7.

Schauer AJ, Becken W, Reisen M, Possinger K. *The Sentinel Lymph Node Concept*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005. P3-8

Sells RA., Gilmore IT, Owen RR, New RRC and Stringer RE. (1987) Reduction in doxorubicin toxicity following liposomal delivery. *Cancer Treat. Rev.*, 14, 383-387.

Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ. (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol*, 10, 37-51.

Shih IL, Van YT. (2001) The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technol*, 79, 207-225.

Silva CL, Pereira JC, Ramalho A, Pais AACC, Sousa JJS. (2008) Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *J. Membrane Sci*, 320, 268–279.

Simon R. (2008) Lost in translation: problems and pitfalls in translating laboratory observations to clinical utility. *Eur J Cancer*, 44(18): 2707-2713.

Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I and Iliskovic N. (2000) Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol. Cell Biochem*, 207: 77–86.

Starkey MP, Scase TJ, Mellersh CS, Murphy S. (2005) Dogs really are man's best friend - Canine genomics has applications in veterinary and human medicine. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 4(2): 112–128.

Steiniger SC, Kreuter J, Khalansky AS, Skidan IN, Bobruskin AI, Smirnova ZS, Severin SE, Uhl R, Kock M, Geiger KD and Gelperina SE. (2004) Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer*, 109: 759–767.



Steinhauser I, Spänkuch B, Strebhardt K and Langer K. (2006) Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells. *Biomaterials*, 28: 4975–4983.

Strand SE, Persson BRR. (1979) Quantitative lymphoscintigraphy I: Basic concepts for optimal uptake of radiocolloids in the parasternal lymph nodes of rabbits. *J Nucl Med*, 20: 933–937.

Sudimack J, Lee R.J. (2000) Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 41, 147–162.

Sumer B, Gao J. (2008) Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine*, 3(2): 137-170

Tafra L, Lannin DR, Swanson MS, Van Eyk JJ, Verbanac KM, Chua AN, Ng PC, Edwards MS, Halliday BE, Henry CA, Sommers LM, Carman CM, Molin MR, Yurko JE, Perry RR, Williams R. (2001) Multicenter trial of sentinel node biopsy for breast cancer using both technetium sulfur colloid and isosulfan blue dye. *Ann Surg*, 233: 51–59.

Szekrényesy Tamás: *Kolloidika I.*, Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2000. P7-14

Tafra L, Chua AN, Nagel PC, Aycock D, Swanson M, Lannin D. (1999) Filtered versus unfiltered technetium sulfur colloid in lymphatic mapping: a significant variable in a pig model. *Ann Surg Oncol*, 6: 83–87.

Takahasi K, Donovan MJ, Rogers RA, Ezekowitz AB. (1998) Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through adulthood. *Cell Tissue Res*, 292: 311-323.

Tanis PJ, van Sandick JW, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Rutgers EJ, Hoefnagel CA, Kroon BB. (2002) The hidden sentinel node in breast cancer. *Eur J Nucl Med*, 29: 305–311.

Taylor I, Baum M. Sentinel node detection and imaging. In: Keshtgar MRS, Waddington WA, Lakhani SR, Ell PJ (eds). *The sentinel node in surgical oncology*. Berlin Heidelberg: Springer–Verlag 1999. 1–13.

Theilen GH, Hills D. (1982) Comparative aspects of cancer immunotherapy: immunologic methods used for treatment of spontaneous cancer in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181(10): 1134-1141.

Treat J, Greenspan A, Forst D, Sanchez JA, Ferrans VJ, Potkul LA, Woolley PV, Rahman A. (1990) Antitumor activity of liposome-encapsulated doxorubicin in advanced breast cancer: Phase II study. *J. Nat Cancer Inst.* 82, 121, 1706-1710

Trencsenyi G, Kertai P, Somogyi C, Nagy G, Dombradi Z, Gacsi M, Banfalvi G. (2007) Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat hepatocarcinoma cells. *DNA Cell Biol.* 26(9), 649-655.

Trencsenyi G, Kertai P, Bako F, Hunyadi J, Marian T, Hargitai Z, Pocsi I, Muranyi E, Hornyak L, Banfalvi G. (2009) Renal capsule-parathyroid lymph node complex: a new in vivo metastatic model in rats. *Anticancer Res.* 29(6), 2121-2126.

Tsao CT, Chang CH, Lin YY, Wu MF, Wang JL, Han JL, Hsieh KH. (2010) Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan-c-poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel. *Carbohydr. Res.* 345, 1774–1780.

Uccini S, Sirianni MC, Vincenzi L, Topino S, Stoppacciaro A, Lesnoni La Parola I, Capuano M, Masini C, Cerimele D, Cella M, Lanzavecchia A, Allavena P, Mantovani A, Baroni CD, Ruco LP. (1997) Kaposi's sarcoma cells express the macrophage-associated antigen mannose receptor and develop in peripheral blood cultures of Kaposi's sarcoma patients. *Am J Pathol*, 150(3): 929-938.

Umerska A, Paluch KJ, Inkielewicz-Stepniak I, Santos-Martinez MJ, Corrigan OI, Medina C, Tajber L. (2012) Exploring the assembly process and properties of novel crosslinker-free hyaluronate-based polyelectrolyte complex nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 436, 75– 87.

Vail DM, MacEwen EG. (2000) Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation*, 18(8): 781-792.

Valdés Olmos R, Hoefnagel C, Nieweg O. (2001) Optimized mammary lymphoscintigraphy using larger colloid particles [reply]. *J Nucl Med*, 42:826.

Van Lancker M, Goor C, Sacre R, Lamote J, Van Belle S, De Coene N, Roelstraete A, Storme G. (1995) Patterns of axillary lymph node metastasis in breast cancer. *Am J Clin Oncol*, 18: 267–272.

Veiseh O, Gunn JW, Zhang M. (2010) Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 62, 284–304.

Vera DR, Wallace AM, Hoh CK, Mattrey RF. (2001) A synthetic macromolecule for sentinel lymph node detection: [<sup>99m</sup>Tc]DTPA-mannosyl-dextran. *J Nucl Med*, 42(6): 951-959.

Veronesi U, Rilke F, Luini A, Sacchini V, Galimberti V, Campa T, Dei Bei E, Greco M, Magni A, Merson M. (1987) Distribution of axillary node metastases by level of invasion: an analysis of 539 cases. *Cancer*, 59: 682–687.

Wagner S, Rothweiler F, Anhorn MG, Sauer D, Riemann I, Weiss EC, Katsen-Globa A, Michaelis M, Cinatl J.Jr, Schwartz D, Kreuter JH von Briesen and Langer K. (2010) Enhanced drug targeting by attachment of an anti  $\alpha v$  integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles. *Biomaterials*, 31: 2388-2398.

Wallace AM, Hoh CK, Darrah DD, Schulteis G, Vera DR. (2007) Sentinel lymph node mapping of breast cancer via intradermal administration of Lymphoseek Review Article. *Nuclear Medicine and Biology*, 34(7): 849-853

Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Kreuter J and Langer K. (2004) Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *J Drug Target*, 12: 461–471.

Wawroschek F, Vogt H, Weckermann D, Wagner T, Harzmann R. (1999) The sentinel lymph node concept in prostate cancer first results of gamma probe-guided sentinel lymph node identification. *Eur Urol*, 36(6): 595–600.

Weber C, Coester C, Kreuter J and Langer K. (2000) Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles, *Int J Pharm*, 194: 91–102.

Wei IC, Tsao N, Huang YH, Ho YS, Wu CC, Yu DF, Yang DJ. (2008) <sup>99m</sup>Tc-glycopeptide: Synthesis, biodistribution and imaging in breast tumor-bearing rodents. *Appl. Radiat. Isotopes*, 66: 320–331.

Whateley TL and Steele G. (1985) Particle size and surface charge studies of a tin colloid radiopharmaceutical for liver scintigraphy. *Eur. J. Nucl. Med.*: 10: 353.

Wilher AJ, Mijnhout S, Franssen EJJ. (1999) Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node detection. An overview. *Eur J Nucl Med*, 26: 36–42.

Wolfram Ervin: *Kolloidika I. Egyetemi jegyzet*, Tankönyvkiadó, Budapest, 1971. p14.

Wood TF, Nora DT, Morton DL, Turner RR, Rangel D, Hutchinson W, Bilchik AJ. (2002) One hundred consecutive cases of sentinel lymph node mapping in early colorectal carcinoma: detection of missed micrometastases. *J Gastrointest Surg*, 6(3): 322–329.

Withrow SJ, Powers BE, Straw RC, Wilkins RM. (1991) Comparative aspects of osteosarcoma. Dog versus man. *Clinical Orthopaedics and Rel. Res*, 270: 159-168.

Workman P, Aboagy EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt, J Farningham DAH, Glennie, MJ Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British J. Cancer*, 102, 1555–1577.

Wu HD, Yang JC, Tsai T, Ji DY, Chang WJ, Chen CC, Lee SY. (2011) Development of a chitosan–polyglutamate based injectable polyelectrolyte complex scaffold. *Carbohydr. Polym.*, 85, 318–324.

Yoo HS, Oh JE, Lee KH and Park TG. (1999) Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharm. Res*, 16: 1114–1118.

Zheng Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S, Dong L, Wu L, Shen X. (2007) Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *Eur. J. Pharm. Bioph.* 67,621–631.

## 10. Saját közlemények jegyzéke

### **A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:**

**Polyak A**, Hajdu I, Bodnar M, Trencsenyi Gy, Postenyi Z, Haasz V, Janoki G, Janoki GyA, Balogh L, Borbely J. (2013) <sup>99m</sup>Tc-labeled Nanosystem as Tumor Imaging Agent for SPECT and SPECT/CT Modalities. *International Journal of Pharmaceutics* 449,1–2, p10–17 (IF2013: 3.350)

**Polyak A**, Palade EA, Balogh L, Postenyi Z, Haasz V, Janoki G, Janoki GyA. (2011) In vitro and biodistribution examinations of Tc-99m-labelled doxorubicin-loaded nanoparticles. *Nuclear Medicine Review*, 14, 2: 1–8

Mirzaei S, Rodrigues M, Hoffmann B, Knoll P, Riegler-Keil M, Kreuzer W, Salzer H, Köhn H, **Polyak A**, Jánoki GA. (2003) Sentinel lymph node detection with large human serum albumin colloid particles in breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 30:874–878 (IF2003: 3.324)

Balogh L, Thuróczy J, Andócs G, Máthé D, Chaudhari P, Perge E, Biksi I, **Polyak A**, Király R, Jánoki GyA. (2002) Sentinel lymph node detection in canine oncological patients. *Nuclear Medicine Review*, Vol. 5, No. 2.

### **A disszertációhoz szorosan nem köthető további tudományos közlemények referált folyóiratokban:**

Bálint K, Balogh L, Pöstényi Z, Kovács-Haász V, **Polyák A**, Jakab Cs, Thuróczy J, Kollár E, Müller L, Andócs G, Jánoki G, Jánoki GyA, Szász A. (2011) Kutyák malignus melanómájának diagnosztikai és terápiás kérdései. 2. rész: Saját tapasztalatok. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 7: 424-31. (IF2011: 0.201)

Chakraborty S, Das T, Banerjee S, Balogh L, Chaudhari PR, Sarma HD, **Polyak A**, Máthé D, Venkatesh M, Janoki G, Pillai MR. (2008)  $^{177}\text{Lu}$ -EDTMP: a viable bone pain palliative in skeletal metastasis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, Apr;23(2):202-13. (IF2010: 1.318)

Máthé D, Balogh L, **Polyak A**, Király R, Márián T, Pawlak D, Zaknund JJ, Pillai MRA, Jánoki GyA. (2010) Multispecies animal investigation on biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of  $^{177}\text{Lu}$ -EDTMP, a potential bone pain palliation agent. *Nuclear Medicine and Biology*, 37 215–226. (IF2010: 2.620)

Balogh L, **Polyak A**, Mathe D, Kiraly R, Thuroczy J, Terez M, Janoki Gy, Ting Y, Bucci LR and Schauss AG. (2008) Absorption, Uptake and Tissue Affinity of High-Molecular-Weight Hyaluronan after Oral Administration in Rats and Dogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (22), pp 10582–10593 (IF2008: 2.562)

Balogh L, Máthé D, Andócs G, **Polyak A**, Király R, Thuróczy J, Szilágyi J, Chaudhari P, Jánoki GyA. (2005) Veterinary nuclear medicine again commentary and remarks on: Krzemiński M et al. Veterinary nuclear medicine a review. *Nuclear Medicine Review*, Vol. 8, No. 1

Máthé D, Balogh L, **Polyák A**, Jánoki Gy. (2005) Szcintigráfias vizsgálatok gyakorlati alkalmazása kutya mastocytomában. *Kisállatpraxis* 6:(1) pp. 2-6.

Balogh L, Perge E, Thuróczy J, Máthé D, Andócs G, **Polyák A**, Szilágyi J, Tibold A, Jánoki Gy. (2005) Bilaterális emlőkarcinóma hím tengeri malacban. *Kisállatpraxis* 6:(4) pp. 152-155.

Máthé D and Chaudhari PR, Balogh L, **Polyak A**, Király R, Andócs G, Perge E, Glávits R, Jánoki GA. (2002) Preliminary studies with  $^{188}\text{Re}$ -tin colloid for radiation synovectomy: preparation, size determination, in-vivo distribution, effects and dosimetry studies. *Nuclear Medicine Review*, Vol. 5, No. 2

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Jánoki Gyözőnek, a Sugárbiológiai Kutatóintézet (OSSKI) korábbi főigazgatójának és az Izotópalkalmazási Osztály korábbi vezetőjének, hogy bevezetett a kolloid radiofarmakonok világába, lehetőséget teremtve arra, hogy tanulmányozhassam azok kolloid- és radiokémiai kérdéseit egyaránt, és hogy ezekről a tapasztalatokról – e disszertáció témájának előzményeiből – a Műegyetem Vegyészmérnöki Karán diplomamunkát is írhattam. Köszönettel tartozom Dr. Borbély János egyetemi docensnek, a Debreceni Egyetem oktatójának, hogy lehetőséget teremtett arra, hogy egy merőben új nanorendszer első alkalommal történő technéciumos jelzésében, SPECT/CT-alkalmazásában, azaz egy új radiofarmakon születésében vehettem részt, illetve köszönöm Dr. Balogh Lajosnak, hogy a kutatóintézetben biztosította a körülményeket arra, hogy az új készítmények gyógyászati alkalmazásait megfelelő biológiai modelleken próbálhassuk ki.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanárnak, hogy megtisztelt azzal, hogy az egyes témák összefogásából született értekezés témavezetését elvállalta a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományok Doktori Iskolájában. Külön köszönöm ezen kívül a Semmelweis Egyetem Nukleáris Medicina Tanszéki oktatóknak is, Dr. Szilvási István egyetemi tanárnak és a Dr. Dabasi Gabriella egyetemi docensnek, hogy e munkát az első pillanattól jó szívvvel befogadták, és az értekezés benyújtásában mindenkor, mindenben lelkiismeretesen segítségemre voltak.

Végül köszönet illtetli közvetlen kutatóintézeti munkatársaimat, Haász Veronikát és Pöstényi Zitát a disszertáció elkészítésében, és munkahelyi védésében nyújtott technikai és szakmai segítségükért, és hogy e munkákból társszerzőként is kivették a részüket.

Budapest, 2013. szeptember.