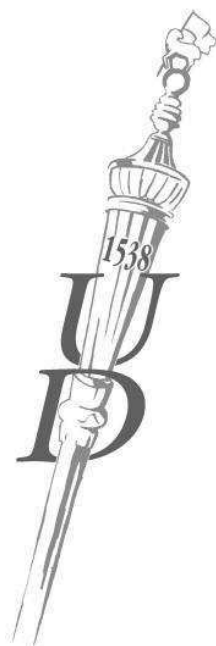


EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Béta-ciklodextrin származékok és paklitaxellel
képzett komplexeik vizsgálata Caco-2 sejtvonalon**

Szászné dr. Réti-Nagy Katalin

Témavezető: Dr. Fenyvesi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016.

Tartalomjegyzék

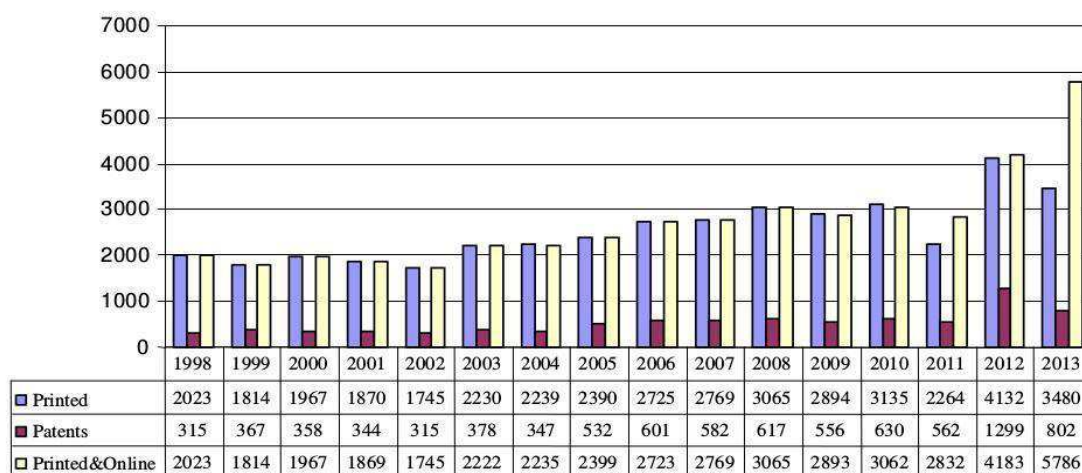
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A ciklodextrinek múltjából.....	7
2.2. A ciklodextrinek jelene	7
2.3. A β -ciklodextrinek toxicitása és abszorpciós sajátosságai	8
2.4. Komplexképzés hatóanyagokkal	10
2.5. Ciklodextrinek szerepe a gyógyszerfelszívódás fokozásában	13
2.6. Célkitűzések	17
3. Anyagok és módszerek	18
3.1. Felhasznált anyagok	18
3.2. A FITC-RAMEB vizsgálatai	19
3.2.1. Permeabilitási vizsgálatok	19
3.2.2. A FITC-RAMEB felvételének kinetikai vizsgálata	20
3.2.3. A FITC-RAMEB leadásának kinetikai vizsgálata	20
3.2.4. Fluoreszcens mikroszkópia	20
3.2.5. Áramlási citometria	21
3.2.5.1. A FR felvételének vizsgálata	21
3.2.5.2. Endocitotikus útvonal igazolása	22
3.3. A FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és a FITC-BCDpolimer ciklodextrin származékok vizsgálatai.....	22
3.3.1. Permeabilitási vizsgálatok	22
3.3.2. Fluoreszcens mikroszkópia	22
3.3.3. Áramlási citometria	23
3.4. A Flutax-ciklodextrin komplexek vizsgálatai	23
3.4.1. A komplexek előállítása	23
3.4.2. Fluoreszcens mikroszkópia	23
3.4.3. Komplexek felvételének vizsgálata	24
3.5. Statisztikai analízis.....	24
4. Eredmények	25
4.1. LogP értékek meghatározása	25
4.2. A FITC-RAMEB vizsgálatainak eredményei	25
4.2.1. Permeabilitási vizsgálatok eredményei	25
4.2.2. A FITC-RAMEB felvételének kinetikája.....	28
4.2.3. A FITC-RAMEB leadásának kinetikája	29

4.2.4. Fluoreszcens mikroszkópia	30
4.2.5. Áramlási citometriás eredmények.....	32
4.2.5.1. A FITC-RAMEB felvételének vizsgálati eredményei.....	32
4.2.5.2. Endocitotikus útvonal igazolása	34
4.3. A FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és a FITC-BCDpolimer ciklodextrin származékok vizsgálatainak eredményei.....	37
4.3.1. Permeabilitási vizsgálatok eredményei	37
4.3.2. Fluoreszcens mikroszkópia	38
4.3.3. Áramlási citometriás eredmények.....	40
4.4. A Flutax-ciklodextrin komplexek vizsgálatainak eredményei	41
4.4.1. Fluoreszcens mikroszkópia	41
4.4.2. Komplexek felvételének vizsgálati eredményei.....	43
5. Diskusszió	44
6/A. Összefoglalás	51
6/B. Summary	52
7/A. Irodalomjegyzék.....	53
7/B. A jelölt saját közleményeinek ellenőrzött jegyzéke	58
8. Tárgyszavak.....	60
9. Köszönetnyilvánítás.....	61

1. Bevezetés

Napjainkban a gyógyszerfejlesztés számos új kihívással szembesül. Az újonnan szintetizált hatóanyagok általában lipofil sajátságúak és sok közülük nagyon rosszul szívódik fel a gyomor-bélrendszerből. Az originális hatóanyagok mellett egyre nagyobb teret hódítanak a generikus és a szupergenerikus készítmények, melyeknek hatásosságát biztosítani kell. A fenti kihívások megoldására korszerű segédanyagokra és technológiákra van szükség. Többek között ez adott lendületet új segédanyagok, különösképpen a ciklodextrinek használatának és még ma is felfelé ívelő karrierjének.

A ciklodextrinek alkalmazása, valamint a témakörben fellelhető tudományos publikációk száma fokozatosan növekszik (az elmúlt néhány évben már körül-belül 3000 új nyomtatott publikáció jelenik meg évente (1. ábra). Egyre több új eredmény és felhasználási mód ismerhető meg, az új szabadalmak száma évente 600 körül mozog (Jicsinszky & Fenyvesi 2014). A különféle iparágak is egyre szélesebb körben és nagyobb mennyiségben alkalmazzák a ciklodextrineket. Világszerte több mint fél tucat cég foglalkozik ciklodextrin gyártással. Évente több mint 10000 tonna ciklodextrint termelnek, és míg 1973 körül 1 kg β -ciklodextrin ára 2000 USD volt, manapság 1 kg β -ciklodextrin ára csupán néhány USD (Szejtli 2004).



1. ábra - A ciklodextrinekkel kapcsolatos publikációk és szabadalmak száma az elmúlt 15 évben (Jicsinszky & Fenyvesi 2014)

Ahogy már fentebb is említettem, a ciklodextrineket sokféle iparág felhasználja, így például a gyógyszer-, élelmiszer-, növényvédőszer-, diagnosztikum-, kozmetikai-, robbanószer-, műanyagipar és jelentős szerepük van a biotechnológiában is. Ezek a molekulák sajátságos adottságaiknak köszönhetően használhatóak például stabilizálásra, oldékonyság növelésre, biológiai hasznosíthatóság növelésére, formulázásra,

szagtalanításra, kellemetlen ízek és irritáló hatások csökkentésére (Szejtli 1990). Vegyünk néhány konkrét példát a ciklodextrinek alkalmazására. Magyarországon Allidex néven kapható a fokhagymaolaj/ β -ciklodextrin komplexe, mely a vér koleszterinszintjét csökkenti, emellett narancshéjolaj és citromhéjolaj/ β -ciklodextrin tartalmú porcukor (stabilis por alakú aromaanyag/ciklodextrin zárványkomplex) is megtalálható a hazai forgalomban. Belgiumban és Franciaországban nagy mennyiségben gyártanak csökkentett koleszterintartalmú vaj és tejtermékeket. A vajat meleg β -ciklodextrin szuszpenzióval elkeverik, ami kivonja a koleszterint a vajból, így a centrifugálás után a lipid fázisban a koleszterinnek mindössze 10%-a marad. Az Egyesült Államokban hasonló elv alapján a tojás sárgájából vonják ki a koleszterint. (Szejtli 1998)

A kozmetikai iparban is sokféle alkalmazási módot találhatunk. A teafaolajban található terpének fényre és oxigénre érzékenyek, ezek jelenlétében bőrirritáló p-cimén keletkezik. Ciklodextrinnel komplexálva a teafaolaj stabilizálható úgy, hogy a gyulladáscsökkentő és az antimikrobiális hatása is megmarad. A bőrtisztításra használt szalicilsav vízzoldékonysága nagymértékben nő ciklodextrin komplex formájában, emellett az esetleges irritatív hatások csökkennek, de antibakteriális és keratolitikus hatásai növekedhetnek. A ciklodextrinek önmagukban is használhatóak a bőrünk tisztítására, mivel képesek megnövelni a bőr által szekretált anyagok oldékonyságát, illetve segítenek eltávolítani a fölösleges zsírréteget a bőrfelszínről. (Buschmann & Schollmeyer 2002)

A β -ciklodextrin角度t a sejtszitológiai kutatásokban is alkalmazzák sejtmembránból történő koleszterin kivonásra (Kilsdonk és mtsai. 1995) és a koleszterin sejtfunkciókban betöltött szerepének a vizsgálatakor (Mahammad és mtsai. 2014).

Néhány ciklodextrin cikkelye már régóta megtalálható az egyes gyógyszerkönyvekben (mint szolubilizáló és felszívódást fokozó segédanyagokat), ám nemrég a hidroxipropil- β -ciklodextrin (HPBCD) önálló gyógyszerként is felfedezésre került, mint a ritka C-típusú Niemann-Pick betegség gyógyszere (Matsuo és mtsai. 2013; Ottinger és mtsai. 2014). Ebből kiindulva további széles körű kutatások folynak a ciklodextrinek esetleges terápiás felhasználásával kapcsolatban központi idegrendszeri érintő betegségek esetén (Vecsernyés és mtsai. 2014). Emellett a 2015-ös év új eredménye a ciklodextrin kutatás területén, hogy a HPBCD leukémia ellenes hatásokkal rendelkezik, mivel többek között szelektíven felborítja a leukémiás sejtek koleszterin-háztartását (Yokoo és mtsai. 2015).

Az ilyen széles körben alkalmazott segédanyagok (és hatóanyagok) esetén nagyon fontos, hogy minél több kutatási eredmény álljon rendelkezésre, különösen az élő sejtekkel, szervezetekkel kapcsolatos interakciójukról és biztonságosságukról. Fontos ismerni, hogy az

alkalmazott segédanyag (jelen esetben a ciklodextrin) milyen módon vagy módokon fejti ki a kívánt hatását (pl. rosszul permeáló hatóanyag felszívódásának fokozása), van-e esetleg valamilyen nem kívánatos mellékhatása. Minél több kutatás minél több aspektusból vizsgálja az adott anyagokat, annál jobban fel lehet térképezni a még egyelőre ismeretlen területeket. Kutatásunkkal a ciklodextrinek biztonságos alkalmazásához és a nyitott kérdések megválaszolásához járultunk hozzá.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A ciklodextrinek múltjából

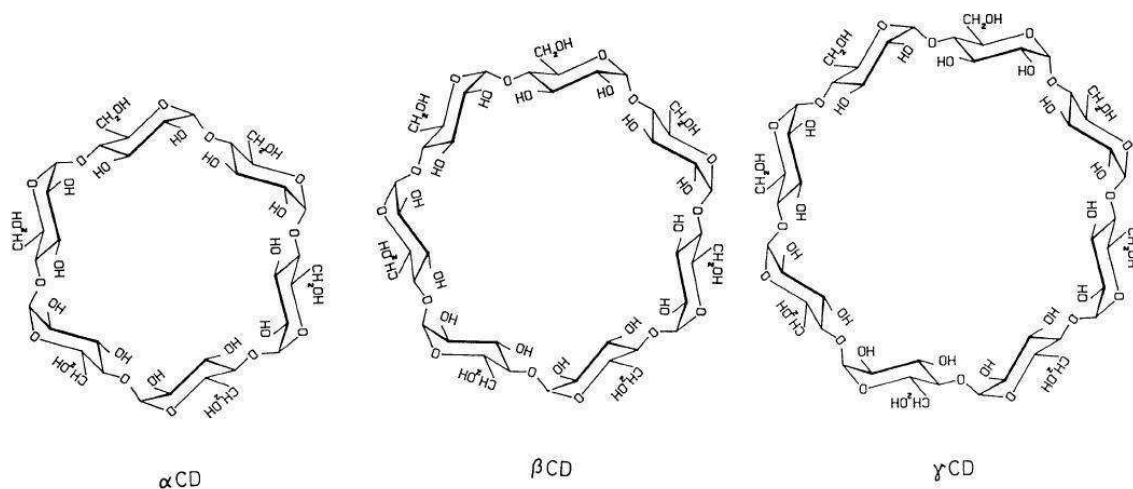
Lépjünk egy keveset vissza az időben, hogy lássuk, honnan indult a ciklodextrinek kutatása. A legelső publikáció 1891-ben jelent meg, Villiers nevéhez kötődik. A francia kutató megfigyelte, hogy a keményítő fermentálódása során egy ismeretlen kristályos anyag keletkezik, melyet „cellosine”-nak nevezett el (feltételezte, hogy ez valamiféle cellulóz származék). 15 évvel később Franz Schardinger izolálta a *Bacillus macerans* nevű mikroorganizmust, ami keményítő tartalmú táptalajon növesztve kétféle kristályos anyagot termel. Mivel ez a két anyag hasonlított a már ismert dextrinekhez, Schardinger α -, és β -dextrineknek nevezte el őket. Ezt követően 45 év múlva történt jelentős előrelépés, amikor Freudenberg és munkatársai megfejtették ennek a két dextrinnek a ciklikus szerkezetét az 1930-as évek második felében. Saját és más kutatók (Karrer, Miekeley, stb.) megfigyeléseire alapozva megállapították, hogy a kristályos Schardinger-dextrinek maltóz-egységekből épülnek fel és kizárólag α -1,4-glikozidos kötések tartalmazzák. Ők írták le először, hogy hogyan lehet homogén és tiszta frakciókat elkülöníteni. A γ -ciklodextrinet csak több mint 10 év múlva fedezték fel. (Szejtli 2004)

Az 1950-es években két kutatócsoport (French és Cramer vezetésével) kezdett el intenzíven foglalkozni a ciklodextrinek enzimatisz előállításával, izolálásával és karakterizálásával. French és csoportja felfedezték, hogy vannak még nagyobb méretű ciklodextrinek is, míg a Cramer-féle csoport a komplexképző tulajdonságok felderítésére koncentrált. Az első szabadalom (1953) Freudenberg, Cramer és Plieninger nevéhez fűződik, melyben lefedték a ciklodextrinek gyógyszerformulálási szempontból legfontosabb felhasználási területeit, mint az oxidációra érzékeny hatóanyagok védelme, oldékonyság növelés és illó anyagok megkötése ciklodextrinbe való komplexálás által. (Szejtli 2004)

2.2. A ciklodextrinek jelene

A ciklodextrinet tehát részlegesen előhidrolizált keményítőből (amely nem más, mint aciklikus dextrinek keveréke) állíthatjuk elő ciklodextrin-glikozil transzferáz enzim segítségével. Az így keletkezett molekulák a nem redukáló ciklikus oligoszacharidok csoportjába tartoznak. A ciklodextrinek homogén kristályos anyagként állíthatóak elő, tisztaságuk meghaladhatja a 99,5%-ot (Szejtli 1990). A ciklodextrinet kémiai szerkezetük szerint három csoportra oszthatjuk: az α -ciklodextrinek 6-, a β -ciklodextrinek 7-, a γ -ciklodextrinek 8 glükopiranoz egységből állnak (2. ábra), α -(1 $\rightarrow$ 4) interglikozidos kötést

tartalmaznak. A ciklodextrinokban valamennyi glükopiranoz egység C-1 konformációt vesz fel, ebből adódóan a molekulák belső ürege apoláros, míg a külső rész inkább poláros, azaz vízben jól oldódó.



2. ábra - A ciklodextrinek szerkezete (Szejtli 2004)

A ciklodextrin gyűrűk szubsztituálásával nagyon sokféle származék állítható elő és már több mint 1500 a publikált ciklodextrin-származékok száma. Piaci szempontból fontos, hogy az előállítás egyszerű és olcsó legyen, ne legyen toxikus és maradjon meg a gyűrű komplexképző sajátsága. Ipari méretben metilezett- (DIMEB, RAMEB), hidroxialkilezett- (HPBCD), szulfobutilezett- (SBE-CD), acetilezett- (acetyl- γ CD) és elágazó (glükozil-, maltozil β CD) ciklodextrinokat állítanak elő (Otta 2014).

A β -ciklodextrin molekulákon 21 db olyan szabad hidroxilcsoport van, ahol különféle szubsztituensekkel láthatjuk el a gyűrűket. A szubsztituálás gyakran random módon történik, ezért ebben az esetben egy átlagos szubsztitúciós fokkal (degree of substitution, DS) jellemezzük a molekulákat. Példaként említhető a hidroxipropil- β -ciklodextrin, amely esetén a DS tág határok között változhat, és csak ritkán állítanak elő homogénen szubsztituált termékeket.

2.3. A β -ciklodextrinek toxicitása és abszorpcióssajátságai

A ciklodextrinek segédanyagként történő alkalmazását a komplexképzési tulajdonságain túl nagymértékben meghatározza biztonságosságuk és a felszívódási sajátosságaik. Toxikus hatásaik hátterében az áll, hogy a szervezetben élettanilag fontos lipofil sajátságú molekulákat is komplexálnak, így például az α -ciklodextrinek elsősorban lipideket, míg a β -ciklodextrinek koleszterint. Ennek ismeretében fontos kérdés az egyes

származékok affinitása az endogén molekulákhoz illetve ennek függvényében toxicitási sajátságaik ismerete.

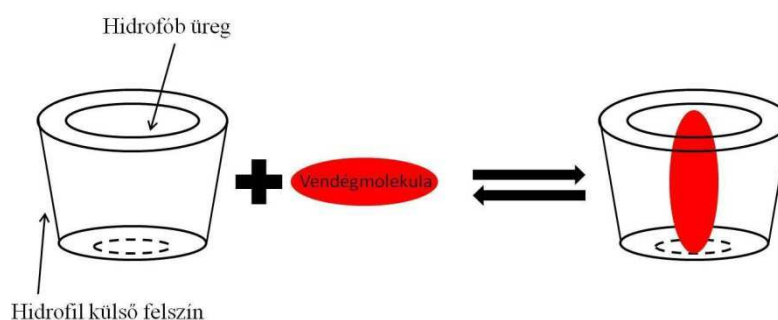
Számos különféle ok miatt (pl. ár, beszerezhetőség, a gyűrű méretei, stb.) a β -ciklodextrinek a leginkább elterjedtek. A legismertebb származékok között találjuk a metil- β -ciklodextrint és a 2-hidroxipropil- β -ciklodextrint, melyeknek közös tulajdonságai, hogy heterogének, amorf szerkezetűek (nem kristályosíthatóak) és nagyon jól oldódnak vízben. Fontos emellett, hogy nem képeznek a koleszterinnel kristályos komplexet, szemben a β -ciklodextrinnel, mely parenterálisan beadva oldhatatlan koleszterin-komplexet képez. Ez a komplex kicsapódva toxikus hatású a vesékre. A metil- β -ciklodextrin sokkal inkább hidrofób, mint a β -ciklodextrin, ezért sokkal stabilabb, de vizes közegben oldékony komplexet képez a koleszterinnel. Óriási hátránya, hogy parenterálisan adva koncentrációtól függő módon hemolízist is okozhat, mivel kivonja a koleszterint a vörösvértestek membránjából. A heptakisz-(2,6-di-O-metil)- β -ciklodextrin (DIMEB) már egy kristályos anyag, és a jelenleg ismert legjobb szolubilizálószer. Hátránya, hogy jelenleg még drága az előállítása (és meglehetősen környezetszennyező is), emellett szintén könnyen hemolízist okoz. Ezért a legtöbb esetben helyette a random-metilezett- β -ciklodextrint (RAMEB) használják, ami kevésbé jó oldékonyság növelő, de sokkal olcsóbb az előállítása (Szejtli 1997). A ciklodextrin származékok kiválasztásánál nagyon fontos szerepet játszik az is, hogy az adott származék a lehető legkisebb mértékben legyen toxikus. Ebből a szempontból legkedvezőbb a 2-hidroxipropil- β -ciklodextrin (HPBCD), illetve egy újabb származék, a szulfobutiléter- β -ciklodextrin (SBE-CD). Ez utóbbi kedvező oldékonyság növelő és toxicitási tulajdonságait nem régen kezdték el kihasználni, de már több Magyarországon is forgalmazott gyógyszerkészítmény is tartalmazza (Stella & He 2008; Sebestyén és mtsai. 2013; Fenyvesi 2015). 2008-as vizsgálatok szerint a HPBCD és a SBE-CD embereknek is biztonságosan adagolható (orálisan vagy intravénásan), nincsenek toxikus mellékhatásaik sem a vesében, sem más szervben (Stella & He 2008).

Bebizonyosodott, hogy a különböző ciklodextrin származékok citotoxicitása és hemolitikus aktivitása a koleszterin kivonó kapacitásuktól függ, amelyet a molekulaszervezet befolyásol: például a metil csoportok számának növelésével nő a koleszterinkivonó képesség, az ionos csoportok esetleges jelenléte pedig csökkenti azt, valamint a hidroxipropil csoport jelenléte nagyon alacsony toxicitás értékeket eredményez β -ciklodextrin esetén (Kiss és mtsai. 2010). Endotheliális sejtvonalon (HUVEC) vizsgálva a β -ciklodextrin származékok koleszterin kivonó kapacitását azt tapasztalták, hogy 1 óra inkubációs idő után, 1 mM-os koncentrációjú (nem citotoxikus) ciklodextrin oldat esetében 7-féle β -ciklodextrin származék közül a RAMEB vonta ki a legtöbb koleszterint a sejtekből (kb. 28%-ot). (Castagne és mtsai. 2009)

A ciklodextrinek kémiai szerkezete, hidrogén donorainak és akceptorainak száma, a relatíve nagy molekulatömege (> 1000 Da) és a hidrofilitása mind arra enged következtetni, hogy ezek a molekulák nem képesek permeálni a biológiai membránokba és a felszívódásuk igen csekély mértékű (Lipinski és mtsai. 2001), csak a lipofil származékok azok, melyek bizonyos mértékben képesek abszorbeálódni a gasztrointesztinális traktuson keresztül (Loftsson és mtsai. 2005). Általánosságban úgy vélik, hogy csak a ciklodextrin komplexből felszabadult hatóanyag molekula képes a felszívódásra. Így e folyamat szerint a ciklodextrin elszállítja a hatóanyagot a sejtmembrán felszínéhez, ahol az penetrál a lipofil membránba és a ciklodextrin pedig az extracelluláris térben marad (Loftsson és mtsai. 2005). Érdekesség, hogy egyes *in vivo* tanulmányok szerint patkányokban relatíve nagy mennyiségű hidroxipropil- β -ciklodextrin és dimetil- β -ciklodextrin abszorbeálódik a rektumon keresztül, majd választódik ki a vizeletbe, ezzel azt sejtetve, hogy nem csak a szabad hatóanyag, hanem a ciklodextrin komplex is képes lehet felszívódni a rektális nyálkahártyán keresztül (Matsuda & Arima 1999).

2.4. Komplexképzés hatóanyagokkal

A ciklodextrinek sajátos szerkezetéből következik azon egyedülálló tulajdonságuk, hogy molekuláris kapszulaként viselkednek, azaz képesek más anyagok molekuláit magukba zárni. Ezeket a más molekulákkal kitöltött ciklodextrin gyűrűket nevezzük zárványkomplexeknek, amelyekben két molekula megfelelő funkciós csoportjai között van der Waals és hidrofób kölcsönhatások lépnek fel (Rekharsky és mtsai. 1997; Anjana és mtsai. 2013), így megfelelő körülmények között a komplex könnyen disszociálhat (3. ábra).



3. ábra - A ciklodextrin komplex kialakulása 1:1 sztöchiometriájú komplex esetén.

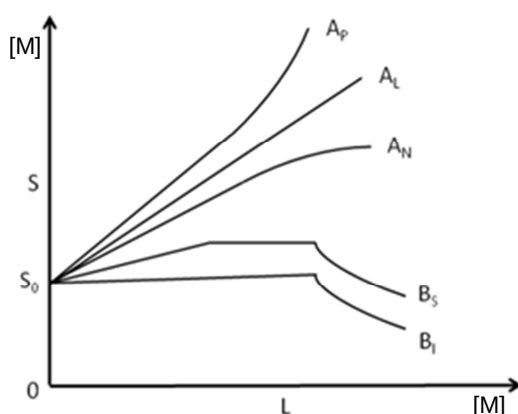
Az így létrejövő komplexekben a vendég molekula képes részlegesen vagy teljesen elhelyezkedni a ciklodextrin molekula üregében, ugyanakkor a komplexképzési folyamat nem változtatja meg a ciklodextrin szerkezetét és konformációját.

A komplexképzés csak olyan molekulákkal valósulhat meg, melyek mérete összemérhető a ciklodextrin üregének méretével és a komplexképzés jelentős mértékben

függ a vendég molekula polaritásától is (Dang és mtsai. 1998). A ciklodextrin molekula belső üregénél nagyobb vendég molekula esetén is kimutattak komplex képződést, ebben az esetben azonban a vendég molekula bizonyos funkciós csoportjai, vagy oldallánca helyezkedett el az üregben (Berthault és mtsai. 1995). Mindemellett a ciklodextrinek szubsztituáltsága is befolyásolja annak komplexképző kapacitását (Cserhádi & Forgács 1998).

A két molekula legvalószínűbb kölcsönhatása esetén a vendég molekula legkevésbé poláros része, funkciós csoportja helyezkedik el a ciklodextrin apoláros üregében, ugyanakkor a poláros részek (esetleg töltéssel rendelkezők) az üregen kívüli oldószer molekuláival alakítanak ki kölcsönhatásokat. A folyamat során kovalens kötés nem jön létre és a komplexált molekulák egyensúlyban vannak az oldatban lévő szabad molekulákkal.

A szabad molekulák fizikokémiai tulajdonságai eltérnek a komplexált molekulákétól, ennek megfelelően elméletileg a komplexképzés minden olyan módszerrel vizsgálható, amellyel a fizikokémiai sajátságok mérhetők (Mura & Paola 2014). Az egyik legismertebb módszer az oldékonyság növelés mérésén alapul. Higuchi és Connor módszere szerint (Higuchi & C. 1965) a ciklodextrin komplexek szubsztrát oldékonyság növelésre kifejtett hatása fázis-oldékonysági diagramokkal ábrázolható (4. ábra) (Loftsson és mtsai. 2005; Loftsson és mtsai. 2004).

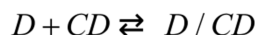


4. ábra - Fázis-oldékonysági diagramok. A ciklodextrin (ligand, L) koncentráció növekedésének függvényében az oldott anyag (szubsztrát, S) koncentrációja „A”-típusú görbék esetén nő. 1:1 vendégmolekula:ciklodextrin sztöchiometria esetén AL-típusú, 1:2 sztöchiometriájú komplex esetén AP-típusú görbét kapunk. AN-típusú görbéknel a komplexált anyag oldékonysága bizonyos koncentráció fölött csökken. B-típusú görbék esetén a ciklodextrin nem, vagy csekély mértékben növeli a szubsztrát oldékonyságát. S_0 a vendégmolekula oldékonysága a vizes közegben ciklodextrin nélkül.

Ezek alapján „A” típusú görbét kapunk, ha a szubsztrát (hatóanyag) oldékonysága a ligand (ciklodextrin) koncentráció függvényében nő. Leggyakrabban 1:1 sztöchiometriájú komplexek keletkeznek, ebben az esetben „AL” típusú, 1:2 (vendégmolekula:ciklodextrin)

sztochiometria esetén „AP” típusú görbék láthatók. Az „AN” típusú profilokat nehéz megmagyarázni, egyik lehetséges oka a kialakult komplexek oldékonyságának csökkenése (Loftsson és mtsai. 2005; Del Valle 2004).

1:1 sztochiometriájú komplex esetén az egyensúly az alábbi egyenlettel írható le:



Melyből a stabilitási konstans ($K_{1:1}$) az AL típusú görbét felhasználva a következők szerint számítható:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Meredekség}}{S_0 \times (1 - \text{Meredekség})}$$

Ahol S_0 a vendégmolekula oldékonysága a vizes közegben ciklodextrin nélkül.

A komplexálási hatékonyság (CE) S_0 kihagyásával számolható a meredekség alapján:

$$CE = \frac{[D / CD]}{[CD]} = S_0 \times K_{1:1} = \frac{\text{Meredekség}}{1 - \text{Meredekség}}$$

Az egyenletből látható, hogy a nehezen meghatározható, alacsony vízoldékonyságú hatóanyagok esetén a gyakorlatban a CE értéke alkalmasabb lehet a komplexek összehasonlítására, mint a stabilitási konstans, mivel az S_0 értékkel nem kell számolni (Loftsson és mtsai. 2005).

A leggyakrabban alkalmazott komplexálási technikák (Chordiya Mayur & Senthilkumaran 2012):

- **örlés:** A vendégmolekulát egyszerűen együtt őrlik a ciklodextrinnel.
- **szilárd diszperzió képzése:** A hatóanyagot etanolban, a ciklodextrint vízben oldják, majd a két oldatot elegyítik és egyensúly eléréséig keverik, majd vákuumban elpárologtatják az oldószeranyagot.
- **neutralizációs módszer:** A hatóanyagot és a ciklodextrint 0,1 N NaOH oldatban oldják külön-külön, majd elegyítik a két oldatot és fél órán át kevertetik. Ezután a pH folyamatos mérése mellett 0,1 N HCl oldatot csepegtetnek az oldathoz pH 7,5-ig, ahol a keletkezett komplex kicsapódik. A komplexet szűrik, és mossák, amíg teljesen klorid-mentes lesz, majd 250 °C-on 24 órán át szárítják.
- **gyúrással technológia:** A ciklodextrinből kis mennyiségű víz hozzáadásával pasztát készítenek, majd ehhez adják a vendégmolekulát önmagában vagy kevés etanolban oldva. Alapos gyúrással/örléssel után az oldószeranyagot elpárologtatják és por formájú komplex keletkezik.

- **kicsapásos módszer:** A hatóanyagot és a ciklodextrint vízben diszpergálják, majd a diszperziót addig melegítik, míg koncentrált, viszkózus és áttetsző folyadékot kapnak. Ezt követően hagyják, hogy az oldatból kicsapódjon a komplex, amelyet leszűrnek és megszáritanak.
- **porlasztva szárítás:** Megfelelő oldószerben oldják a hatóanyagot és a ciklodextrint, majd egyensúly eléréséig keverik az oldatot. Ezt követően az oldószert porlasztva szárítással távolítják el.
- **fagyasztva szárítás:** Megfelelő oldószerben oldják a hatóanyagot és a ciklodextrint, majd egyensúly eléréséig keverik az oldatot. Ezt követően az oldószert fagyasztva szárítással távolítják el.
- **olvasztásos technológia:** Komplex készíthető a vendégmolekula megolvasztásával is. Az olvadékot össze kell keverni a finom szemcséjű ciklodextrinnel. Egyes esetekben a vendégmolekula olvadékát nagy feleslegben kell alkalmazni. Lehűlés után ezt a felesleget el kell távolítani.

2.5. Ciklodextrinek szerepe a gyógyszerfelszívódás fokozásában

Az elmúlt évek új kismolekulájú hatóanyagai többnyire rosszul oldódnak vizes közegben és/vagy kevésbé képesek felszívódni a biológiai membránokon keresztül. Éppen ezért különféle segédanyagok kifejlesztése és alkalmazása vált szükségessé. Elterjedten használnak tenzideket, melyek kiváló szolubilizálószeresek, illetve képesek a felszívó hám permeabilitását is fokozni. Ugyancsak kiválóan alkalmasak lipofil hatóanyagok vízzoldékonyságának javítására az olyan komplexképzők, mint a ciklodextrinek, melyek pont előnyös komplexképző tulajdonságaik miatt váltak széles körben elterjedt segédanyaggá. Emellett nagy szerepük van a hatóanyagok irritáló hatásának a csökkentésében is (főleg például szemészeti, nazális, dermális, rektális készítményekben). Jól ismert a Magyarországon is forgalomban lévő Voltaren Ophtha CD nevű szemcsepp, mely hidroxipropil- γ -ciklodextrint tartalmaz segédanyagként, vagy az Abilify injekciót is említhetjük, mely SBECD tartalmú.

Orális gyógyszerbevitel esetén azonnali gyógyszerfelszabadulás érhető el, ha rossz vízzoldékonyságú hatóanyagokat hidrofил ciklodextrin származékokkal (HPBCD, maltozilBCD vagy SBECD) komplexálnak. Ezáltal növelhető az orális biohasznosulás, hiszen a hatóanyag-ciklodextrin komplex oldott állapotban lesz a GI traktusban. A karboximetil-etil- β -ciklodextrint (CMEBCD) késleltetett (retard) gyógyszerleadás biztosítására fejlesztették ki. A CMEBCD oldékonysága (és ezáltal a vele képzett komplexek oldékonysága is) pH függő, így a komplexből erősen savas pH esetén a hatóanyag felszívódása jóval lassabb, mint kevésbé

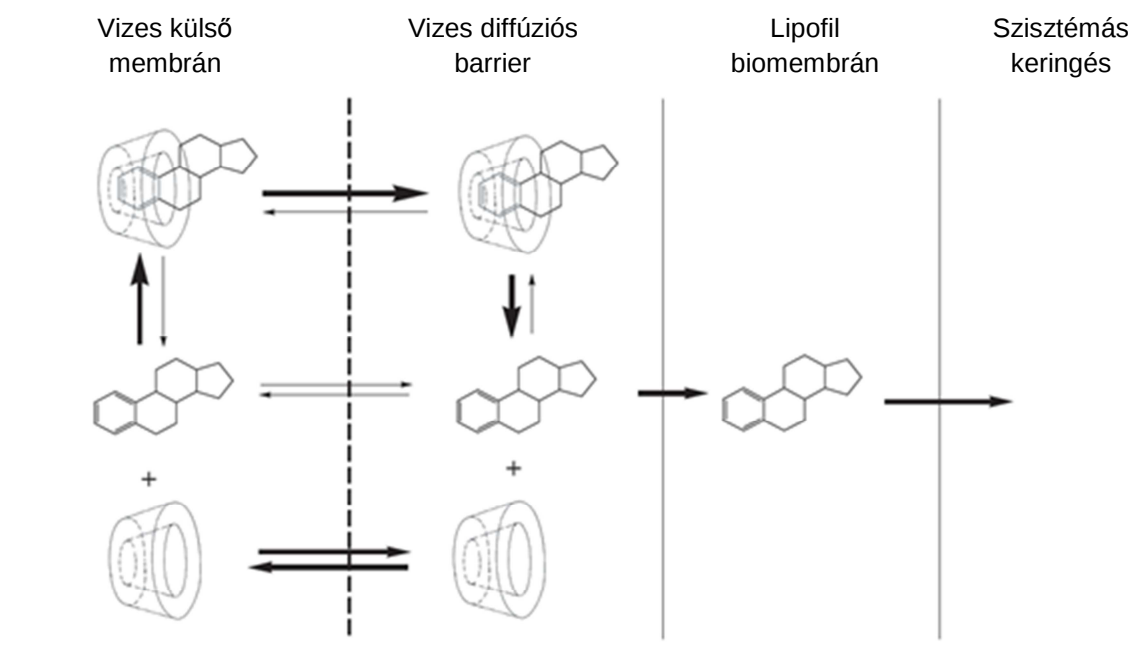
savas pH esetében (így elérhető, hogy a hatóanyag ne a gyomorban, hanem főleg a vékonybélben szívódjon fel). (Chordiya Mayur & Senthilkumaran 2012)

A ciklodextrinek stabilizáló szerepére jó példa, hogy oligonukleotid hordozóként is alkalmazhatóak. Komplex formájában nő az oligonukleotidok sejtbe történő felvételének mértéke és késleltethető a lebomlásuk (azáltal, hogy így ellenállóbbak az endonukleázokkal szemben). Példaként említhető az oligonukleotid-adamantán konjugátum HPBCD-hez kapcsolva. Emellett a ciklodextrinek képesek az oligonukleotid terápia olyan mellékhatásait csökkenteni, mint az immunstimuláció vagy vérlemezke szám csökkenés (Chordiya Mayur & Senthilkumaran 2012). Általánosan elfogadott, hogy a ciklodextrinek megfelelő komplexstabilitás mellett fokozzák a hatóanyagok felszívódását, biológiai barrieren történő átjutását így biohasznosíthatóságukat. Ennek magyarázatára többféle folyamatot leírtak.

Az első mechanizmus a lipofil hatóanyagok oldékonyság növelésén alapul, ami a ciklodextrin-vendégmolekula közötti kölcsönhatás eredménye.

A második mechanizmus a felszívó hámon kifejtett hatás. *In vivo* kísérleti eredmények arra mutatnak, hogy csak jelentéktelen mennyiségű hidofil ciklodextrin molekula penetrál a lipofil biológiai membránokba, mint például a bőr és a gasztrointesztinális nyálkahártya. Csak a szabad gyógyszermolekula képes átjutni a lipofil membránokon, így a fölös mennyiségű ciklodextrin viszont (több mint a szolubilizáláshoz szükséges) csökkenti a gyógyszermolekula penetrációját a membránon keresztül. De van egy kivétel: a lipofil ciklodextrinek (mint a random-metilezett- β -ciklodextrin) bizonyos esetekben csökkentik a barrier funkciót, ezáltal növelik a gyógyszermolekula transzportját a biológiai membránokon keresztül, mint amilyen az orrnyálkahártya (Loftsson és mtsai. 2007). A koleszterinben gazdag membránrészek szétszakadása megváltoztatja a "tight junction"-ök integritását, a sejtréteg barrier funkcióját (Lambert és mtsai. 2005; Deli 2009).

A harmadik folyamat a felszívó hámok barrier funkciójához hozzájáruló és az azokat borító víréteggel magyarázható. A viszkózus nyálkahártyák egy relatíve vastag (ami több mint 100 μm is lehet), nem mozgó víréteget kötnek meg a felszínükön (UWL-t, unstirred water layer - keveretlen víréteg), például a gasztrointesztinális traktusban és a légzőrendszerben (Loftsson és mtsai. 2007; Lennernäs 1998). Egyes vizsgálatok arra utalnak, hogy a ciklodextrinek úgy növelik a permeációt, hogy átszállítják a gyógyszermolekulákat ezen a vizes barrieren a biológiai membrán lipofil felszínéhez, ahol a gyógyszermolekulák a komplexből a lipofil membránba vándorolnak (5. ábra).



5. ábra - A ciklodextrinek elszállítják a komplexált hatóanyagot a lipofil biológiai membránhoz a vizes barrieren (más néven keveretlen vírétegen) keresztül (Loftsson és mtsai. 2005)

Ám a hidofil ciklodextrinek csak akkor képesek növelni a gyógyszer-transzportot, ha az UWL ellenállása a donor oldalon nagyjából megegyezik vagy nagyobb, mint a membrán barrier ellenállása (Loftsson és mtsai. 2007; Másson és mtsai. 1999). A felszívódás növeléséhez szükséges egy minimális komplexáló képesség, ám a túlzott mértékű komplexáció csökkenti a gyógyszermolekulák felvételét a biológiai membránon keresztül ezáltal csökken a hasznosíthatósága (Brewster és mtsai. 2007).

A negyedik mechanizmusként megemlíthető az aktív transzporterek gátlása. A vékonybél hámsejtjeinek membránjában számos aktív transzporter található meg (pl.: P-glikoprotein), melyek a hatóanyagokat a bél lumene irányába pumpálva csökkentik azok felszívódását. A metilált β -ciklodextrinek a sejtek membránjának koleszterintartalmát csökkentve gátolják a transzporterek működését (Fenyvesi és mtsai. 2008; Garrigues és mtsai. 2002; Arima és mtsai. 2004; Bacso és mtsai. 2004). Állatkísérletekben a dimetil- β -ciklodextrin növelte a tacrolimus biohasznosíthatóságát, melyhez az oldékonyság növelés mellett a P-glikoprotein gátlása is hozzájárult (Arima és mtsai. 2001). Emellett francia kutatók bebizonyították, hogy a random-metilezett- β -ciklodextrin megnövelheti a doxorubicin transzportját a vér-agy gáton keresztül azáltal, hogy kivonja a koleszterint az agyi kapillárisok endothel sejtjeinek membránjából, ami csökkenti a P-glikoprotein aktivitást (Tilloy és mtsai. 2006). Ezek a hatások is felelősek lehetnek azért, hogy a ciklodextrinek képesek más hatóanyag molekulák permeabilitását és felszívódását fokozni a bélrendszerben, Másrésről viszont a membrán koleszterinszint csökkenése magas ciklodextrin koncentráció mellett

gátolja az endocitotikus folyamatokat (Zuhorn és mtsai. 2002; O' Neill és mtsai. 2011) és fokozza az exocitózist (Chen és mtsai. 2010).

Utolsó hatásuk a ciklodextrinek endocitózisán alapulhat. Habár a ciklodextrinek legtöbbször nem képesek a sejtmembránon átdiffundálni, az újabb eredmények azt mutatják, hogy képesek bejutni a sejtekbe. Metil- β -ciklodextrin-dextrán konjugátumok és hidroxipropil- β -ciklodextrin alkalmazásával Niemann-Pick C típusú sejtek belsejében sikerült csökkenteni a koleszterin halmozódását az endocitotikus organellumok szintjén, és bebizonyították, hogy ezek a ciklodextrin származékok endocitózissal felvételre kerülnek a sejtekbe (Rosenbaum és mtsai. 2010). Wei és munkatársai HepG2 és SK-MEL-24 sejtekben figyelték meg a fluoreszcens mono-4-(N-6-deoxi-6-amino- β -ciklodextrin)-7-nitrobenzofurán (NBD- β -CD) intracelluláris halmozódását, és lehetséges útvonalként az endocitózist jelölték meg (Wei és mtsai. 2011). Caco-2 bélhámsejtekbe eredményesen juttattak be DNS-t amfifil kationos ciklodextrin transzfekciós komplex formájában, amely komplex felvétele makropinocitózis útján valósult meg (O' Neill és mtsai. 2011). A fluoreszcens metil- β -ciklodextrin clathrin-függő endocitózist pedig HeLa méhnyakrák sejteken demonstrálták (Plazzo és mtsai. 2012).

A rossz vízoldékonyságú és felszívódású hatóanyagok közül a paklitaxelről ismert, hogy jól komplexálható β -ciklodextrinektbe. Ebből kifolyólag választottuk kísérleteinkhez modell hatóanyagként. A paklitaxel egy természetes eredetű taxán vázas diterpén származék, rákellenes hatásai miatt használják a gyógyászatban. Fő indikációs területei - a hazai forgalomban lévő készítmények előíratai alapján - a petefészek karcinoma, emlőkarcinoma, előrehaladott stádiumú nem kissejtes tüdőkarcinoma, AIDS-hez társuló Kaposi-szarkóma.

Ezek az eredmények tehát előrevetítik annak a lehetőségét, hogy a ciklodextrin molekulák nem csak az általuk komplexált hatóanyag oldékonyságát növelik és felszívódását fokozzák a bélrendszerben, hanem maguk is képesek a bélhámsejtekbe bejutni endocitózis segítségével.

Ez a folyamat, és a ciklodextrinek sorsa még nem vizsgált bélhámsejteken, holott a transzcitózis jelensége ismert a Caco-2 bélhámsejtek esetében (Artursson és mtsai. 2001). Szintén nem állt rendelkezésre információ a ciklodextrinek Caco-2 egysejtrétegen vizsgált permeabilitásáról.

2.6. Célkitűzések

A jelen kutatómunka első célja az volt, hogy megvizsgáljuk a fluoreszcensen jelölt random metil- β -ciklodextrin (FITC-RAMEB) permeabilitását Caco-2 egysejtrétegen. Miután előzetes eredményeink szerint a ciklodextrin bejut a sejtek citoplazmájába, tovább vizsgálódtunk, hogy kiderítsük a sejtbe történő felvétel módját.

A vizsgálatokat kiterjesztettük más β -ciklodextrin származékokra is és teszteltük, hogy a FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és a FITC-BCDpolimer esetén is érvényes ez a jelenség. Végezetül megvizsgáltuk a ciklodextrinek viselkedését fluoreszcensen jelölt paklitaxel származékkal (Flutax-1) képzett komplex formájában is.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

Az összes alább felsorolt ciklodextrin származék a CycloLab Kft. terméke (Budapest, Magyarország):

- random metil- β -ciklodextrin (RAMEB, DS~12),
- (2-hidroxipropil)- β -ciklodextrin (HPBCD, DS~4.5),
- vízdékony β -ciklodextrin polimer (BCDpolimer, epiklórhidrinrel térhálósított),
- 6-dezoxi-6-[(5/6)-rodaminiltioureido]-RAMEB (RhoRAMEB, DS=1 az RBITC, DS=12 a metilcsoport esetén),
- 6-dezoxi-6-[(5/6)-fluoreszceiniltioureido]-RAMEB (FITC-RAMEB, DS=1 a FITC, DS=12 a metilcsoport esetén),
- 6-dezoxi-6-[(5/6)-fluoreszceiniltioureido]-HPBCD (FITC-HPBCD, DS=1 a FITC, DS=3 a hidroxipropil-csoport esetén)
- fluoreszceinnel jelölt vízdékony BCD polimer (FITC-BCDpolimer, epiklórhidrinrel térhálósított).

A fluoreszcensen jelölt származékok esetén a fluorofór (5/6 izomer keverék) izotiocianát csoport segítségével van a ciklodextrin gyűrű primer hidroxil csoportjához kapcsolva. Minden ciklodextrin gyűrű egy fluoreszcens egységet tartalmaz, kivéve a FITC-BCDpolimer-t, ahol a fluorofórral jelölt gyűrűk aránya ~ 1 tömegszázalék. A FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és jelöletlen változataik logP értékei MarvinSketch 6.1.2 szoftver segítségével lettek meghatározva.

A Flutax-1-et (fluoreszcens paklitaxel származék, a továbbiakban Flutax) a Tocris Bioscience-től (Egyesült Királyság), a CellMask® Deep Red plazmamembrán festéket és a CellLight® Early Endosomes-RFP BacMam 2.0 reagenst az Invitrogen-től (Budapest, Magyarország), a Triton X-100 reagenst (TX-100) a Roche Diagnostics GmbH-től (Mannheim, Németország) szereztük be. Minden egyéb reagens a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) terméke.

Az általunk használt Caco-2 sejtvonal a Sejtkultúrák Európai Gyűjteményéből (ECACC UK, European Collection of Cell Cultures) származik. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférájú inkubátorban tartottuk fenn rendszeres passzálás segítségével. Az alkalmazott médium a DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), amelyet kiegészítettünk 10% inaktivált borjú szérummal, 1% nem esszenciális aminosavval és 1% penicillin-streptomycin oldattal. A kísérletekben alkalmazott sejtek passzázs-száma 25 és 40 közötti volt.

3.2. A FITC-RAMEB vizsgálatai

3.2.1. Permeabilitási vizsgálatok

A permeabilitási vizsgálatokhoz a Caco-2 sejteket Transwell® inzertek (Corning Costar, NY, USA) polikarbonát filtereire helyeztük (pórusátmérő: 0,4 µm, a membrán felszíne: 1,12 cm²), inzertenként 200.000 db sejtet. Az egysejtrétegek a sejtek szélesztésétől számított 20-35 napon belül voltak használhatóak a vizsgálathoz. A funkcióképes epitél réteg kialakulását a transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) érték növekedésével követtük nyomon, melyet Millicell-ERS ellenállásmérő (Millipore, USA) segítségével mértünk meg. Az inzertek attól kezdve váltak használhatóvá, amikor elérték az 1000 Ωcm²-es ellenállás értéket. A TEER értékeket a transzportkísérlet végén is lemértük, hogy ellenőrizzük az egysejtréteg épségét, és követhessük a ciklodextrines kezelés hatását.

Először a FITC-RAMEB permeabilitását vizsgáltuk. Kétféle kezelő oldatot készítettünk: 50 µM-os FITC-RAMEB (FR oldat), illetve 50 µM-os FITC-RAMEB + 5 mM-os RAMEB (FRR oldat). Az oldószer mindkét esetben Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) volt. A sejtrétegeket kétszer mostuk, majd fél órát előinkubáltuk 37°C-on HBSS-ben. Ezt követően a kezelő oldatokkal apikális oldalon való inkubálás következett (2 óra 37°C-on). Mintát vettünk az apikális oldalról a 0. és a 120. percben, bazális oldalról pedig a 60. és a 120. percben (a kivett térfogatot a 0. és a 60. percben pótoltuk a megfelelő oldattal: apikálisan a kezelőoldat, bazálisan HBSS). A kezelés után az intracellulárisan felhalmozódott jelölt ciklodextrin mennyiségének meghatározásához az egysejtrétegeket ötször mostuk hideg HBSS-sel, majd lizáltuk a sejteket 1%-os Triton X-100 oldat segítségével. A minták fluoreszcencia intenzitását FLUOstar Optima microplate leolvasó (BMG LABTECH, Offenburg, Németország) segítségével mértük le. A gerjesztési hullámhossz 492 nm, az emissziós hullámhossz 520 nm. A gép számítógépes szoftvere korrigálta a mért értékeket a vak minták mért értékeivel, és a kalibrációs görbe alapján kiszámította az egyes minták FITC-RAMEB koncentrációját is.

A látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) a következő képlet segítségével határoztuk meg:

$$P_{app} = dQ/dt(1/C_oA)$$

P_{app} : látszólagos permeabilitási koefficiens (cm/s)

dQ/dt : időegység alatt átjutott anyagmennyiség (mol/s)

C_o : az egyes vegyületek kezdeti koncentrációja az apikális kamrában (mol/ml)

A : a membrán felülete (cm²)

3.2.2. A FITC-RAMEB felvételének kinetikai vizsgálata

A Caco-2 sejteket fekete 96-lyukú plate-be növesztettük (10^4 sejt / lyuk, 7 napig). A kezelés előtt a sejtrétegeket kétszer mostuk HBSS-sel, majd 37°C-on inkubáltuk őket FR vagy FRR oldattal 5-, 10-, 30-, 60- vagy 120 percig. Jégben hűtött HBSS-sel történt 4-szeri mosás után a sejteket 3%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk (37°C, 15 perc). A minták fluoreszcencia intenzitását FLUOstar Optima microplate leolvasóval mértük. A mérést követően DAPI (4',6-diaminido-2-fenilindol dihidroklorid) sejtmagfestéket adtunk a mintákhoz 300 nM-os koncentrációban. 15 perc után mértük a DAPI intenzitását (excitáció: 355 nm, emisszió: 485 nm). A mért DAPI értékek segítségével normalizáltuk a mért FITC-RAMEB értékeket.

3.2.3. A FITC-RAMEB leadásának kinetikai vizsgálata

Ezeknek a vizsgálatoknak a protokollja az első felében megegyezik a permeabilitási vizsgálatok protokolljával, kivéve a kezelő oldatot: itt csak FITC-RAMEB oldatot vizsgáltunk, és azt is 10-szeres koncentrációban (0,5 mM). A 120 perces inkubálást követően az inzerteket 5-ször mostuk jégben hűtött HBSS-sel, majd két csoportra osztottuk őket. Az első (kontroll) csoportot a permeabilitási vizsgálatoknál leírtakhoz hasonlóan lizáltuk, majd a lizátumok fluoreszcencia intenzitását lemértük, másik csoportot tovább inkubáltuk HBSS-ben 37°C-on újabb 120 percig. Ez alatt az idő alatt mind az apikális, mind a bazális oldalról mintákat vettünk a 10.-, 30.-, 60.- és 120. percekben.

3.2.4. Fluoreszcens mikroszkópia

A FITC-RAMEB endocitózist differenciálatlan és differenciált Caco-2 sejteken is elvégeztük. Differenciálatlan Caco-2 sejtek vizsgálatához 12 lyukú műanyag plate-ekbe 1-1 kis kör alakú 10 mm átmérőjű mikroszkópos üveg fedőlemezt helyeztünk lyukanként, majd ezekre szélesztettük rá a sejteket (80.000 sejt / 2 ml sűrűségben). A kísérletek egy részénél 24 óra múlva a sejteken lévő tenyésztő médiumhoz adtuk a CellLight® Early Endosomes-RFP *BacMam 2.0* reagenst (30 részecske/sejt mennyiségben), majd további 48 órát inkubáltuk a sejteket.

A differenciált sejtek vizsgálatához a sejteket a permeabilitási vizsgálatokhoz hasonlóan Transwell® inzertekre (Corning Costar, NY, USA) helyeztük (pórusátmérő: 0,4 μ m, a membrán felszíne: 1,12 cm²), inzertenként 200.000 db sejtet. Az egysejtrétegek a sejtek kitételétől számított 20-35 napon belül voltak használhatóak a vizsgálathoz.

A használatra kész sejteket kétszer HBSS pufferrel mostuk, majd csak 50 μ M-os koncentrációban FITC-RAMEB-et (FR) vagy 5 mM-os koncentrációban RAMEB-et is (FRR) tartalmazó oldatban inkubáltuk a sejteket 37°C-on 30 percig. A ciklodextrines kezelést követően a sejteket nyolcszor mostuk jéghideg HBSS pufferrel.

Ezek után a sejtalkotók jelölése következett. A sejteket 5 percig 37°C-on inkubáltuk 1 μ g/ml koncentrációjú CellMask Deep Red oldatban, megfestve ezzel a sejtmembránt. Majd kétszer HBSS pufferrel mostuk a sejteket. Azért, hogy az egysejtrétegeket fixáljuk a fedőlemezekre, 15 percig 37°C-on inkubáltuk őket 3 %-os paraformaldehid-oldatban. A sejtmagot DAPI festékkel festettük meg, ehhez a fixált sejteket 300 nM-os koncentrációjú DAPI-oldatban 15 percig 37°C-on inkubáltuk (az oldat 6-os pH-jú pufferrel készült).

Végül a fedőlemezeket, illetve az inzertből kivágott membránon lévő sejtrétegeket 1-1 csepp fedőlemez rögzítő ragasztóval tárgylemezekre ragasztottuk, és a konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (LSM 510 Zeiss, Jena, Németország) megvizsgáltuk. A spektrális átvilágítás kiküszöbölésére a minták gerjesztéséhez háromféle lézerfényt használtunk egymást követően, "multi-track" módban: UV: Argon-ion lézer UV 351.1 nm, 363.8 nm (ezeket szimultán használtuk); kék: Argon-ion lézer 488 nm; vörös: He-Ne lézer 633 nm). Az emittált fényt a fenti sorrendnek megfelelően: 420 nm, 505 nm és 650 nm-en detektáltuk egymást követően három csatornán META detektorral.

3.2.5. Áramlási citometria

3.2.5.1. A FR felvételének vizsgálata

A sejtenyésző flakában növesztett sejteket tripszint és EDTA-t tartalmazó oldattal feltripszineztek, majd a sejteket kétszer megmostuk HBSS pufferoldattal. Megszámoltuk a sejteket és ezek után a sejtkoncentrációt állítottuk be (1 millió/ml végkoncentráció a kezelés alatt).

A sejtszuspenziót FRR oldattal kezeltük 37°C-on 30 percig, a kezeletlen kontrollt ciklodextrin mentes HBSS-ben inkubáltuk. A kezelés után a mintákat lecentrifugáltuk 4°C-on, a felülúszót leöntöttük. 1,25 mg/ml koncentrációjú tripánkék oldatot és 40 μ g/ml koncentrációjú propidium-jodid oldatot tettünk a sejtekre, és a mérésig a mintákat jégen tartottuk. A tripánkék elfedi a sejtek felszínéhez tapadt FITC-RAMEB fluoreszcenciáját, a propidium-jodid segítségével kisselektálhattuk a nem élő sejteket.

A mérést Becton Dickinson FACScan típusú áramlási citométerrel (Mountain View, CA) végeztük. Az adatokat WinMDI 2.8 szoftver (Joseph Trotter; <http://facs.scripps.edu/software.html>) segítségével elemeztük.

3.2.5.2. Endocitotikus útvonal igazolása

A FITC-RAMEB Caco-2 sejtekbe történő endocitotikus felvételének megerősítésére szintén áramlási citometriás méréseket végeztünk. A sejteket a már fentebb leírt módon készítettük elő. A kezelést 37°C-on vagy 0°C-on végeztük 30 percig különféle koncentrációjú FITC-RAMEB (FR), Lucifer Yellow (LY) vagy calcein AM oldatokkal. A festékoldatokat a következő koncentráció tartományokban alkalmaztuk: FR esetén 0-500 µM, calcein AM esetén 0-1 µM, LY esetén pedig 0-960 µM.

A kezelést követően a sejteket 3-szor mostuk jéghideg HBSS-sel, majd a mérésig jégen tartottuk. A nem élő sejtek kisselektálása érdekében ebben az esetben is mérés előtt propidium-jodid oldatot adtuk a sejtekhez (2 µg/ml végkoncentrációban).

Végeztünk olyan kísérleteket is, ahol a kezelő oldatok hozzáadása előtt a sejteket 45 percig előkezeltük 10 µM-os rottlerin oldattal.

A méréseket öt lézeres BD FACSaria II áramlási citométerrel (BDBiosciences, San Jose, CA) végeztük. A FR és a calcein AM esetén a sejteket 488 nm-es lézerfényvel világítottuk meg, míg a LY esetén a 445 nm hullámhosszú fény volt az optimálisabb. Az emittált fényt minden esetben 502 nm-es „long pass” dikroikus tükör és 530/30 nm-es „band pass” szűrő segítségével detektáltuk. Az élő sejteket az alacsony propidium-jodid fluoreszcenciájuk alapján szelektáltuk ki (excitáció: 561 nm, emisszió: 590 nm „long pass” szűrő). Az adatokat BDIS Cellquest (Becton-Dickinson) és WinMDI 2.8 (írta: Joseph Trotter; <http://facs.scripps.edu/software.html>) szoftver segítségével értékeltük ki.

3.3. A FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és a FITC-BCDpolimer ciklodextrin származékok vizsgálatai

3.3.1. Permeabilitási vizsgálatok

További fluoreszcens ciklodextrin származékok látszólagos permeabilitási koefficiensének meghatározásához a fentebb (3.2.1.) bemutatott protokoll szerint további kísérleteket végeztük FITC-HPBCD-vel, FITC-BCDpolimer-rel és ismét a FITC-RAMEB-bel. Ezeknél a kísérleteknél a jelölt származékokat önmagukban, 50 µM-os koncentrációban alkalmaztuk.

3.3.2. Fluoreszcens mikroszkópia

A FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és a FITC-BCDpolimer Caco-2 sejtbe történő bejutásának vizsgálatához 100.000 sejtet szélesztettünk ki fedőlemezenként, és 4 nap után

végeztük a kísérletet. A kezelőoldatok 50 μ M koncentrációjúak voltak és 30 percen keresztül inkubáltuk velük a sejteket 37 °C-on. A kezelést követően a sejteket jéghideg HBSS pufferrel mostuk négyszer, majd 3 %-os paraformaldehiddel fixáltuk. A sejtmagok festése ez esetben 1 μ M-os bisbenzimide oldattal történt. Ebben az esetben Zeiss Axio Scope A1 típusú fluoreszcens mikroszkóppal végeztük a vizsgálatot.

3.3.3. Áramlási citometria

A FITC-HPBCD, FITC-RAMEB, FITC-BCDpolimer és a Rho-RAMEB áramlási citometriás vizsgálatát a 3.2.5.2. részben leírt protokoll alapján végeztük. A kezelőoldatok itt az egyes CD-származékok 50 μ M-os oldatai voltak, a rottlerines méréseket pedig csak a FITC-HPBCD és a Rho-RAMEB esetében végeztünk.

3.4. A Flutax-ciklodextrin komplexek vizsgálatai

3.4.1. A komplexek előállítása

A Flutax-ot és a vizsgált ciklodextrin származékokat (HPBCD, RAMEB, BCDpolimer és Rho-RAMEB) külön-külön oldottuk fel dimetil-szulfoxidban (DMSO), majd a megfelelő oldatokat elegyítettük egymással úgy, hogy a két monomer ciklodextrin esetén a Flutax:CD molarány 1:1, a polimer esetén pedig 1:1/45 (mivel számításaink szerint egy polimer molekula körül-belül 45 gyűrűt tartalmaz).

Az így elkészült mintákat (készült csak Flutax-ot tartalmazó minta is) lefagyasztottuk, majd liofilezéses eljárással eltávolítottuk belőlük az oldószert. További felhasználásig a kész mintákat -20 °C-on tároltuk.

3.4.2. Fluoreszcens mikroszkópia

A Flutax-RhoRAMEB komplex bejutását a Caco-2 sejtekbe konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A protokoll az előző bekezdésben leírtakhoz hasonló, kivéve hogy itt megfestettük a sejtmembránt CellMask Deep Red oldattal (1 μ g/ml) és a mintákat Zeiss LSM510 típusú konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Plan-Apochromat 63x (NA 1.4) olajimmerziós objektív). A felvételek elkészítéséhez az 1. táblázatban feltüntetett lézereket és emissziós sávokat alkalmaztuk (line-by-line alternating illumination, azaz “multi-track” mód).

1. táblázat - A fluoreszcens festékek gerjesztéséhez és detektálásához alkalmazott lézerek és emissziós tartományok

Fluoreszcens festék	Excitáció	Emisszió
FITC	488 nm Ar-ion lézer	505-550 nm
Rhodamine	543 nm He-Ne lézer	560-615 nm
CellMask Deep Red	633 nm He-Ne lézer	> 650 nm

3.4.3. Komplexek felvételének vizsgálata

Ehhez a kísérlethez a Caco-2 sejteket 96 lyukú fekete plate-be szélesztettük (30.000 sejt/lyuk). Az egy hét alatt kialakult egysejtrétegeket kétszer mostuk HBSS pufferoldattal, majd 30 percig kezeltük (37°C-on) a liofilezett Flutax-CD komplexek HBSS-sel készült 50 µM-os oldatával. Ezt követően a sejtrétegeket 4-szer mostuk jéghideg HBSS-sel, majd 1 %-os Triton X-100 oldattal lizáltuk.

A sejtlizátumok Flutax tartalmának mérésére FLUOStar Optima mikroplate leolvasót (BMG LABTECH, Offenburg, Németország) használtunk. A gerjesztési hullámhossz 492 nm, az emissziós hullámhossz 520 nm volt.

3.5. Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket SigmaStat szoftverrel (3.1 verzió, SPSS) és Microsoft Excel programmal végeztük el. Az adatok normál eloszlását mindkét szoftver használata esetén Kolmogorov-Szmirnov teszttel igazoltuk. Az adatokat átlag±S.D. formában közöltük. A különböző csoportok átlagértékei közötti különbséget kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze, míg ugyanazon csoport kezelés előtt és kezelés utáni átlagértékei közötti különbséget egymintás t-próbával. Több csoport átlagértékeinek összehasonlításához ANOVA tesztet használtunk. Szignifikáns különbségnek vettük, ha a $p < 0,05$.

4. Eredmények

4.1. LogP értékek meghatározása

A MarvinSketch 6.0.2 szoftver segítségével kiszámított oktanol-víz megoszlási koefficiensek mind a jelöletlen, mind a jelölt ciklodextrinek esetében nagyon alacsonynak mutatkoztak. Mindemellett a HPBCD és a FITC-HPBCD clogP értéke sokkal alacsonyabb a RAMEB-énél és a Rho-RAMEB-énél is (2. táblázat). A szoftveres kalkulációt Dr. Balogh György (Richter Gedeon nyRt.) végezte el számunkra.

2. táblázat - Ciklodextrin származékok szoftveresen számított logP értékei

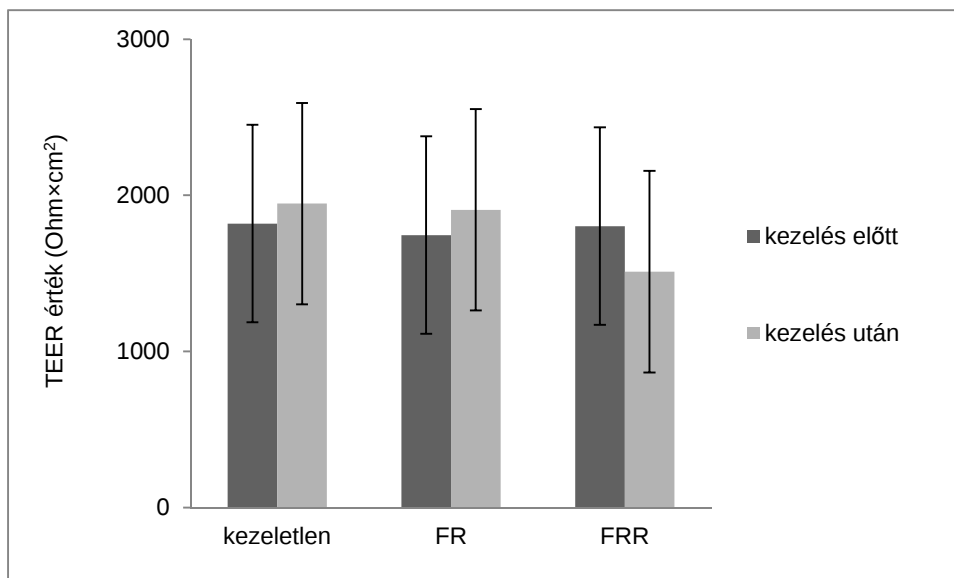
	RAMEB (DS = 14 metil)	Rho-RAMEB (DS = 1 rhodamin, DS = 12 metil)	HPBCD (DS = 3 HP)	FITC-HPBCD (DS = 1 FITC, DS = 3 HP)
c logP	-1,53	-2,57	-11,29	-7,74

4.2. A FITC-RAMEB vizsgálatainak eredményei

4.2.1. Permeabilitási vizsgálatok eredményei

A permeabilitás vizsgálata során azt vizsgáltuk, hogy az egysejtrétegre helyezett jelölt ciklodextrin 2 óra alatt képes-e bejutni a Caco-2 sejtek citoplazmájába, illetve átjutni a monolayeren keresztül a bazális kamrába. A Caco-2 felszívódási modellel kiválóan vizsgálhatóak a gyógyszerfelszívódásban részt vevő aktív és passzív folyamatok.

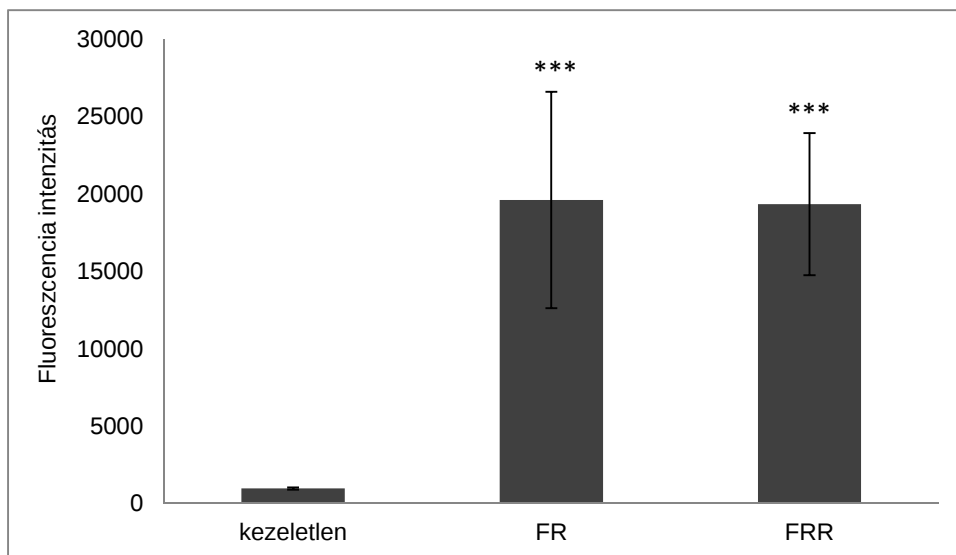
A FITC-RAMEB permeabilitását önmagában 50 μ M-os koncentrációban, és 5 mM RAMEB jelenlétében is vizsgáltuk. A kísérlet elején és végén mért TEER értékek segítségével ellenőriztük, hogy az egysejtrétegek a 2 órás vizsgálat során épek maradtak-e. Az egyes kezelési módokhoz tartozó inzertek sejtet nem tartalmazó, vakkal korrigált TEER értékeinek átlagait mutatja a 6. ábra, amelyen jól látszik, hogy az egysejtrétegek minden esetben megőrizték integritásukat, függetlenül a kezelés módjától.



6. ábra - A Caco-2 egysejtrétegeken mért transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) értékek a 120 perces permeabilitási kísérletek során. A sejtrétegeket egyedül 50 μ M FITC-RAMEB-et tartalmazó (FR), vagy 5 mM RAMEB-et is tartalmazó (FRR) oldattal kezeltük. A kezeletlen sejtrétegeket HBSS-ben inkubáltuk. Az egyes mérések átlagértékeit és szórásait ábrázoltuk ($n(\text{FR})=9$, $n(\text{FRR})=6$, $n(\text{kezeletlen})=6$). A kezelés előtti és utáni értékeket összevetve nem tapasztalható szignifikáns eltérés ($p>0,05$), mint ahogyan az egyes kezelések értékeit összehasonlítva sem ($p>0,05$).

A microplate leolvasó által mért fluoreszcencia intenzitás értékek alapján meghatároztuk az egyes minták FITC-RAMEB koncentrációját. Ezekből kiszámítottuk a jelölt ciklodextrin átjutási sebességét kifejező látszólagos permeabilitási koefficeins (P_{app}) értéket, mely az FR-kezelt csoport esetén $3,35 \pm 1,29 \times 10^{-8}$ cm/s, az FRR-kezelt csoport esetén pedig $4,23 \pm 1,46 \times 10^{-8}$ cm/s. Mind a két érték meglehetősen alacsony, emellett elmondható, hogy az 5 mM-os RAMEB kezelés nem változtatja meg szignifikánsan a FITC-RAMEB permeabilitását (a két kezelési csoport P_{app} értékei között nincs szignifikáns eltérés ($p>0,05$), $n(\text{FR})=9$, $n(\text{FRR})=6$).

A kísérlet végén az egysejtrétegeket alapos mosás után lizáltuk, majd meghatároztuk lizátumok FITC-RAMEB tartalmát is a microplate leolvasó segítségével. Az eredményeket a 7. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy a kezeletlen csoporthoz képest mindkét kezelt csoport esetén szignifikánsan magasabb a mért fluoreszcencia intenzitás, azaz a jelölt ciklodextrin mindkét esetben bejutott a sejtekbe. Azt is megállapíthatjuk továbbá, hogy a hozzáadott jelöletlen RAMEB nem befolyásolta a sejtekbe jutott FITC-RAMEB mennyiségét ($p>0,05$).

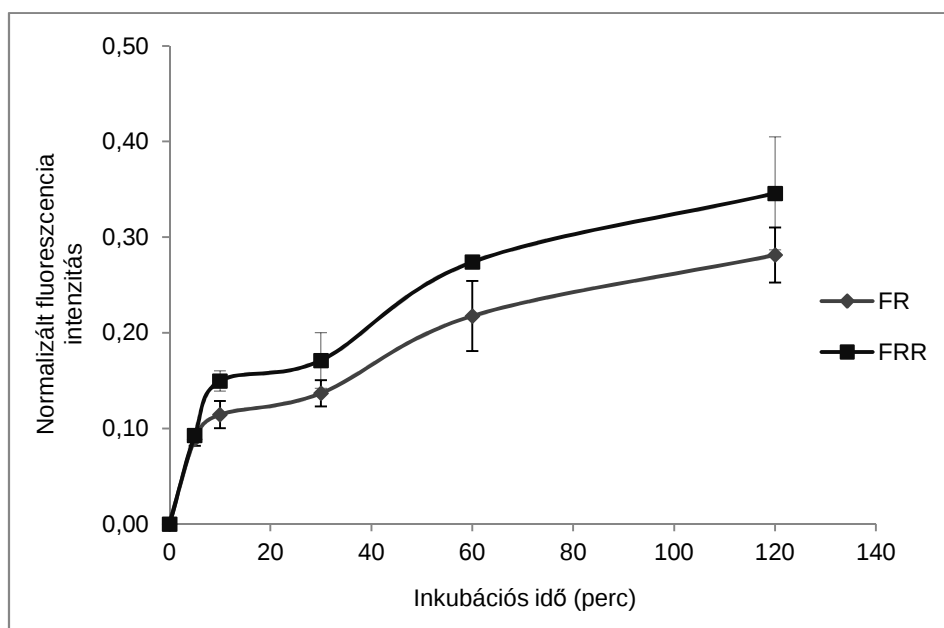


7. ábra - A 120 perces permeabilitási vizsgálatok után a sejtizátumokban mért fluoreszcencia értékek. A sejttrétegeket egyedül 50 μ M FITC-RAMEB-et tartalmazó (FR), vagy 5 mM RAMEB-et is tartalmazó (FRR) oldattal kezeltük. A kezeletlen sejttrétegeket HBSS-ben inkubáltuk. Az egyes mérések átlagértékeit és szórásait ábrázoltuk ($n(\text{FR})=7$, $n(\text{FRR})=4$, $n(\text{kezeletlen})=5$). A kontroll csoporthoz képest mindkét kezelés hatására szignifikánsan nőtt az intracellulárisan mérhető fluoreszcencia intenzitás (** $p<0,001$).

4.2.2. A FITC-RAMEB felvételének kinetikája

A FITC-RAMEB felvételének időfüggését 96-lyukú fekete plate-be növesztett Caco-2 egysejtrétegen vizsgáltuk, a mérést microplate leolvasóval végeztük. A sejtréteget FR vagy FRR oldattal kezeltük 5-, 10-, 30-, 60- vagy 120 percen keresztül.

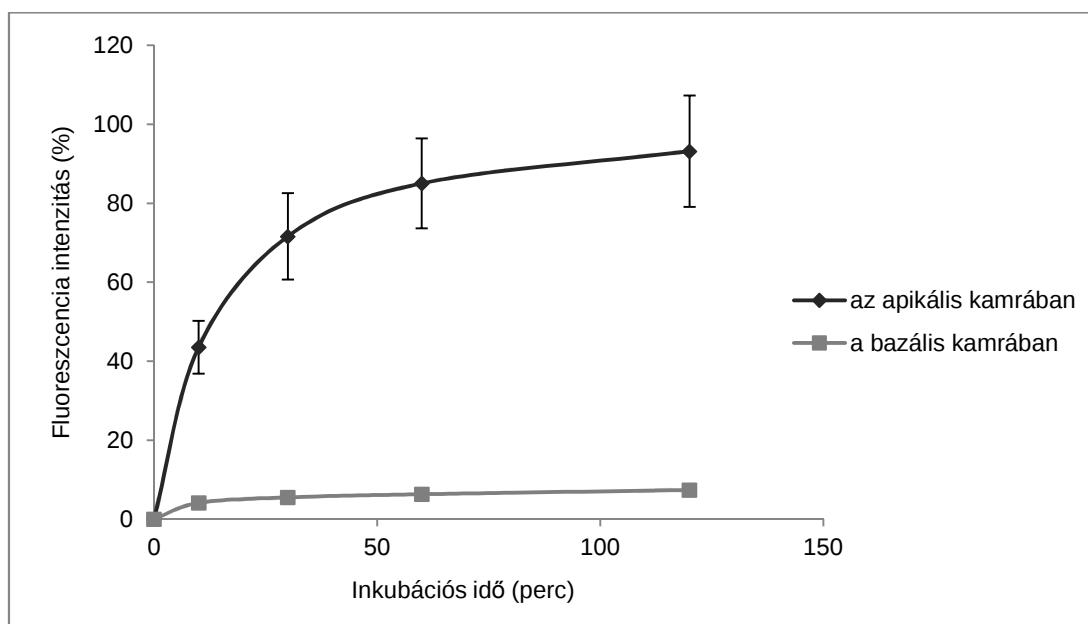
A 8. ábra két kinetikai görbéje között nem láthatunk lényeges különbséget, a FITC-RAMEB mennyisége folyamatosan nő az inkubációs idő előrehaladtával. Az első 5-10 percben nagyobb a jelölt ciklodextrin felvételi sebessége, majd valamelyest mérséklődik a hátralévő időben.



8. ábra - A fluoreszcensen jelölt RAMEB felvételi kinetikája Caco-2 egysejtrétegen. A sejtréteget egyedül 50 μM FITC-RAMEB-et tartalmazó (FR), vagy 5 mM RAMEB-et is tartalmazó (FRR) oldattal kezeltük, az inkubációt különböző időpontokban szakítottuk meg. Mosás és fixálás után a sejtrétegekben összegyűlt FITC-RAMEB mennyiségét microplate leolvasó segítségével határoztuk meg. Az esetleges sejtszámbeli eltérések okozta különbségek kiküszöbölése érdekében a sejtmagokat DAPI festékkel jelöltük, és a kapott FR fluoreszcencia értékeket a hozzájuk tartozó DAPI fluoreszcencia értékekkel normalizáltuk. A kapott eredmények átlagértékeit és szórásait ábrázoltuk ($n(\text{FR}, \text{FRR})=3$).

4.2.3. A FITC-RAMEB leadásának kinetikája

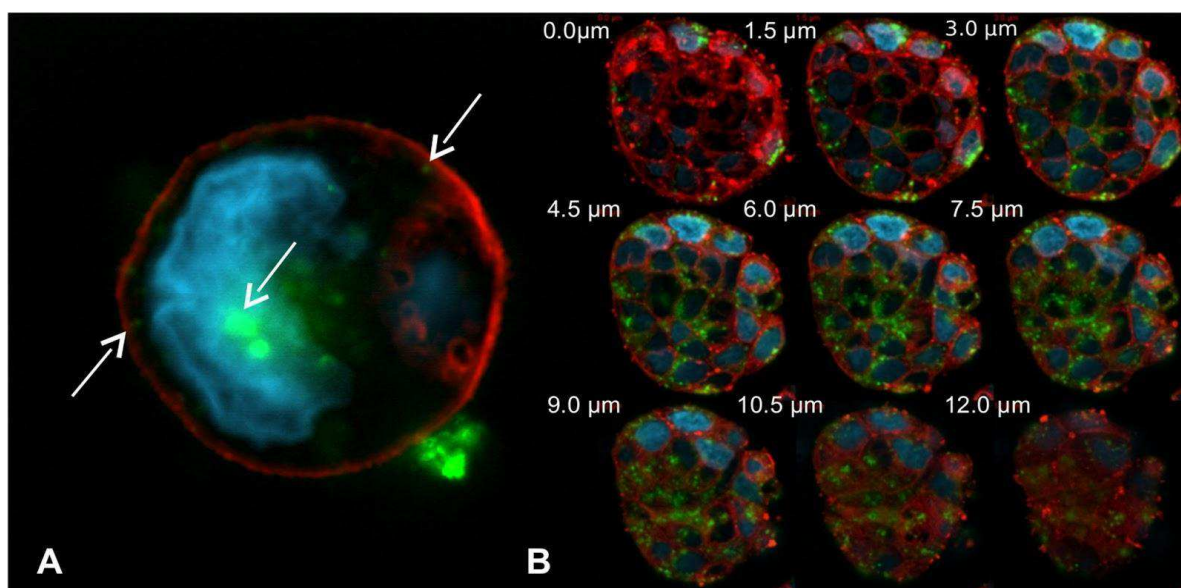
A FITC-RAMEB Caco-2 sejtekből történő leadásának kinetikai vizsgálatához a szokásosnál 10-szer töményebb, 0,5 mM-os jelölt ciklodextrin oldattal kezeltük az egysejtrétegeket (120 percig), hogy a kísérlet második felében a leadott FITC-RAMEB mennyisége mérhető legyen. A ciklodextrin gyorsan megjelent mindkét kamrában. Az első órában a felvett anyag körül-belül 85 %-a az apikális kamra irányába került leadásra, míg a bazális kamrába mindössze 7,4 % transzportálódott a két órás inkubálás során (9. ábra). A 120 perc során az egysejtrétegekben mérhető fluoreszcencia intenzitás drasztikusan lecsökkent $100,0 \pm 8,8$ %-ról $8,9 \pm 1,5$ %-ra.



9. ábra - A FITC-RAMEB Caco-2 egysejtrétegből történő leadásának kinetikája. Az inzertekre növesztett Caco-2 egysejtrétegeket 0,5 mM-os FITC-RAMEB oldattal kezeltük 120 percig, majd alapos mosást követően újabb 120 percig követtük a FITC-RAMEB leadását mind az apikális, mind a bazális kamrákból vett minták koncentrációjának meghatározásával. A kontroll csoport sejtjeit az első 120 perces inkubálást és a mosást követően lizáltuk, és a lizátumban mért fluoreszcencia intenzitások átlagát vettük viszonyítási alapnak (100%), ehhez mérten ábráztuk a tovább vizsgált csoport eredményeit. Az ábrán az egyes mérések átlagait és szórását tüntettük fel ($n=4$).

4.2.4. Fluoreszcens mikroszkópia

A konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével a fluoreszcens festékek gerjesztésének megfelelő hullámhosszúságú lézerfény segítségével tettük láthatóvá a sejtmembránt, a sejtmagot és a FITC-RAMEB-et. A háromféle hullámhosszúságú lézerrel készült képeket egymásra illesztettük. Így sejtcsoportokról és önálló sejtekről is készítettünk különböző nagyításban felvételeket (10. ábra).

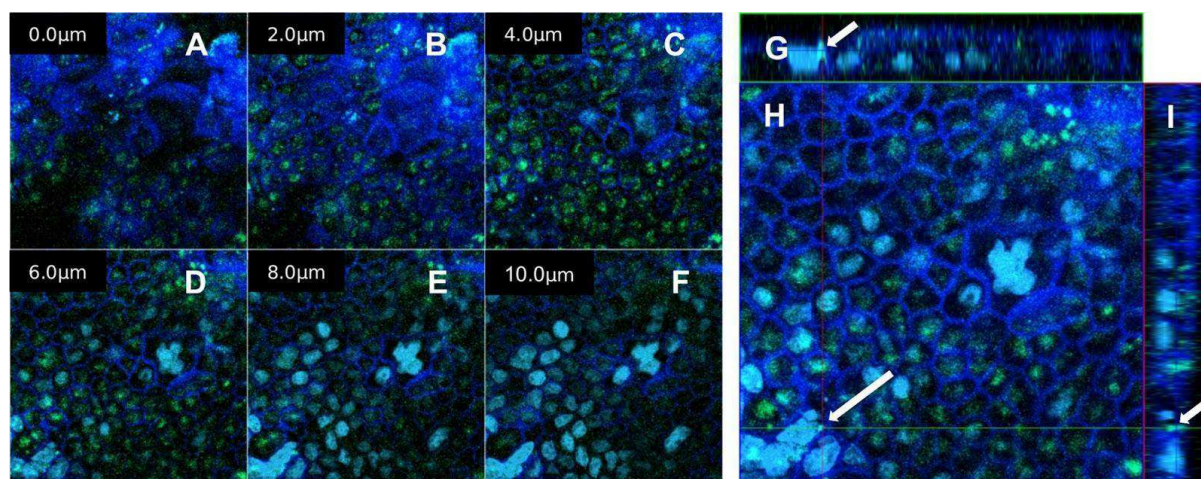


10. ábra - Differenciálatlan Caco-2 sejtekről készült konfokális mikroszkópos felvételek. A sejteket 50 μM FITC-RAMEB-et és 5 mM RAMEB-et is (FRR) tartalmazó oldattal kezeltük. Az ábra „A”-val jelölt részén a FITC-RAMEB (zöld) vezikulumok formájában található a citoplazmában a CellMask-kal jelölt sejtmembrán (piros) alatt vagy a DAPI-val jelölt sejtmag (kék) körül, melyeket néhány helyen fehér nyilakkal jelöltünk. A sejtmembránon kívül is láthatunk FITC-RAMEB aggregátumokat. Az ábra jobb oldalán (B) kilenc egymást követő optikai szeletet láthatunk egy Caco-2 sejtcsoportról. A szeletek 1,5 μm vastagságúak, és mindegyiken jól láthatóak a citoplazmában elhelyezkedő zöld FITC-RAMEB-et tartalmazó vezikulumok. A megfigyelt világos granuláris részecskék a sejtmembránon belül, de a sejtmagon kívül helyezkednek el.

Ez a módszer nem csak azt tette lehetővé, hogy egy síkban képezzük le a sejteket, hanem egymástól 1,5 μm távolságra lévő optikai szeleteket készíthettünk. Ilyen szeleteket mutat egy sejtcsoportról a 10. ábra „B” része: a bal felső szelet a valóságban a sejtcsoport alja, majd balról jobbra haladva jutunk el a legfelső szelethez (ami a képen a jobb alsó).

A 10. ábra „A” részén a kis fehér nyilak a Caco-2 sejtben felhalmozódott FITC-RAMEB helyét jelölik (a képeken a FITC-RAMEB zöld színnel fluoreszkál). Megállapíthatjuk tehát, hogy a jelölt RAMEB képes bejutni a Caco-2 sejtek sejtmembránja alá, és a citoplazmában, a sejtmagon körül felhalmozódik. Ugyanezt támasztja alá a 10. ábra „B” része is, melyen szintén látható a sejtek citoplazmájában a zölden fluoreszkáló FITC-RAMEB.

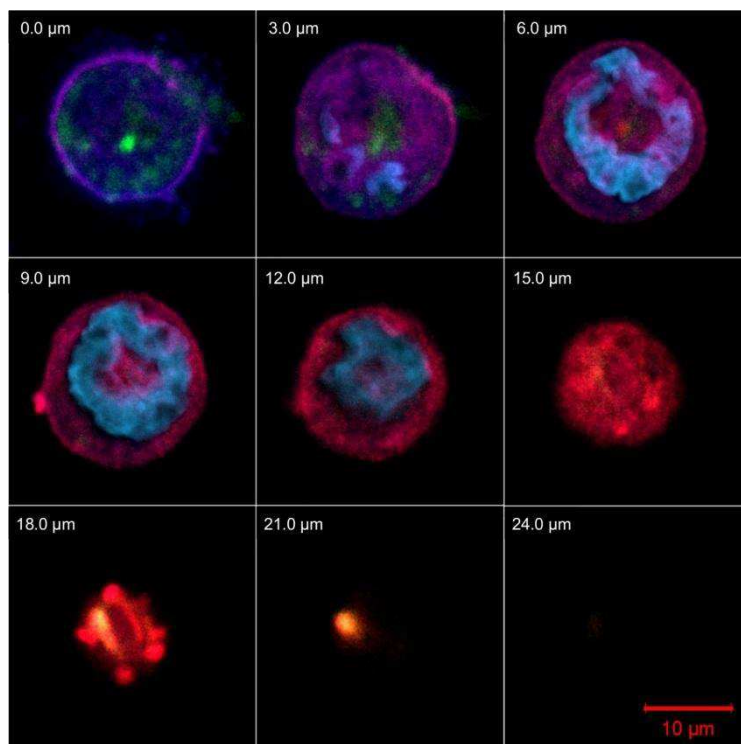
A differenciált sejtréteget a permeabilitási vizsgálatoknál is használt inzerteken hoztuk létre, majd a kezelést követően a sejtréteget az alatta lévő membránnal együtt kivágtuk és tárgylemez illetve fedőlemez közé ragasztottuk. A FITC-RAMEB ebben az esetben is bejutott a Caco-2 sejtek citoplazmájába, és ott granulumok formájában helyezkedik el (11. ábra). A konfokális mikroszkópos felvételek esetén is az tapasztalható, hogy a FITC-RAMEB bekerül a citoplazmába függetlenül attól, hogy a kezelőoldat tartalmazott-e a jelölt ciklodextrinen kívül 5 mM RAMEB-et is.



11. ábra - A ciklodextrin bejut a differenciált Caco-2 sejtekből álló nagy ellenállóképességű sejtrétegbe. A konfluens sejtréteget 50 μM -os FITC-RAMEB oldattal kezeltük, majd konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket. Tizenkét felvétel készült az egyenként 2 μm vastag optikai szeletekről, melyekből hat látható az ábra bal oldalán (A-F). A jobb oldalon a sejtréteg egy középső szelete látható felülnézetből (H), melynek szintjét az oldalsó szekciókon látható kék vonal jelöli. A felső (G) és a jobb oldali (I) képek merőlegesen készültek a zöld és a piros vonalakkal jelölt helyeken. A célkeresztet (a zöld és a piros vonal metszéspontja, a hosszú fehér nyíl jelzi) egy intenzíven világító FITC-RAMEB (zöld) granulumra (a kisebb fehér nyilak jelölik) állítottuk, ami a sejtmagok (DAPI, világoskék) szintjén helyezkedik el. Sok kisebb FITC-RAMEB tartalmú granulum is látható közvetlenül a sejtmembrán (CellMask, sötétkék) alatt.

Ezek a megfigyelések is arra engedtek következtetni, hogy a ciklodextrin molekulákat a Caco-2 bélhámsejtek endocitózissal veszik fel. Ezen hipotézisünk megerősítésére végeztük el többek között a FITC-RAMEB és a Rab5 nevű GTPáz kolokalizációs vizsgálatát. Ez utóbbi fehérje fontos alkotóeleme a korai endoszómáknak (Rink és mtsai. 2005).

A Caco-2 sejtek membránjában plazmid segítségével expresszáltattuk a vörös fluoreszcens fehérjével kapcsolt Rab5a GTPáz fúziós fehérjét (RFP-Rab5a). Ahogy a 12. ábra is mutatja, a FITC-RAMEB és az RFP-Rab5a kolokalizációja létrejött (az ábrán sárga pixelek jelölik). A felvételek segítségével számolt Pearson-féle korrelációs koefficiens értékek 0,55 és 0,78 között vannak fél órás inkubációt követően. Ez jól jelzi, hogy a ciklodextrin felvétele és a korai endoszómák kialakulása egymással kapcsolatban lévő folyamatok.



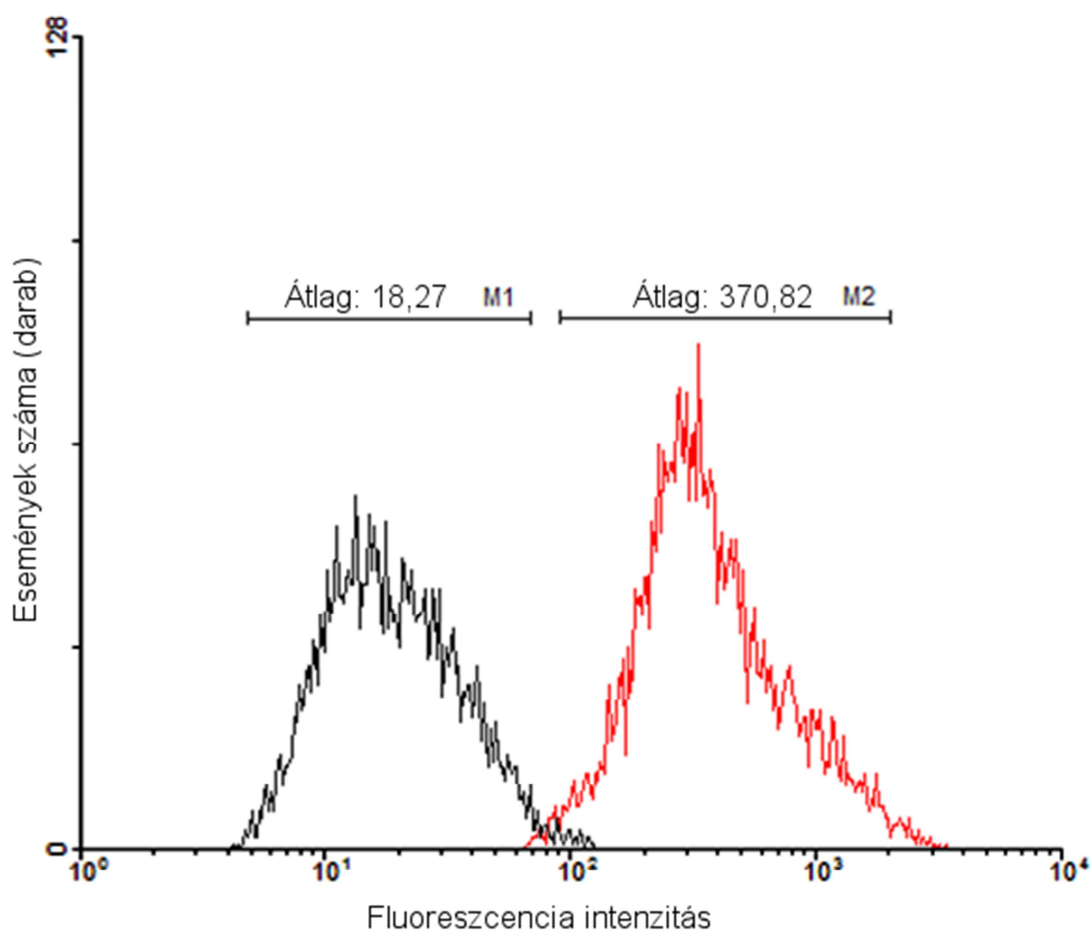
12. ábra - A FITC-RAMEB kolokalizációja Rab5 fehérjékkel. RFP-Rab5a-val transzfektált Caco-2 sejteket kezeltünk 50 μ M-os FITC-RAMEB (zöld) oldattal 30 percig. A Rab5 fehérjék (piros) plazmidon kódolt vörös fluoreszcens fehérjével (Red Fluorescent Protein) kapcsolt Rab5 fehérje (RFP-Rab5) átmeneti transzfekciójával lettek láthatóvá téve. A kolokalizációt a konfokális felvételek 18- és 21 μ m jelzésű optikai szeletein láthatjuk sárga színnel jelölve. Az ábrán kilenc egymást követő, egyenként 3 μ m vastag optikai szelet látható. A sejtmembránt CellMask (sötétkék) festékkel, a sejtmagokat DAPI festékkel (világoskék) jelöltük.

4.2.5. Áramlási citometriás eredmények

4.2.5.1. A FITC-RAMEB felvételének vizsgálati eredményei

A korábbi kísérletek során kapott eredményeket megerősítette az első áramlási citometriás mérés is. Ennek eredményként azt kaptuk, hogy a ciklodextrines kezelés körülbelül 20-szoros fluoreszcencia intenzitás növekedést eredményezett a sejtekben (13. ábra).

Mivel a sejtek felszínéhez tapadt FITC-RAMEB fluoreszcenciáját kioltottuk tripánkék festék segítségével, illetve propidium-jodiddal kisselektáltuk a nem élő sejteket, arra következtethetünk, hogy a fluoreszcencia intenzitás növekedést az élő sejtek citoplazmájában felhalmozódott FITC-RAMEB okozta.

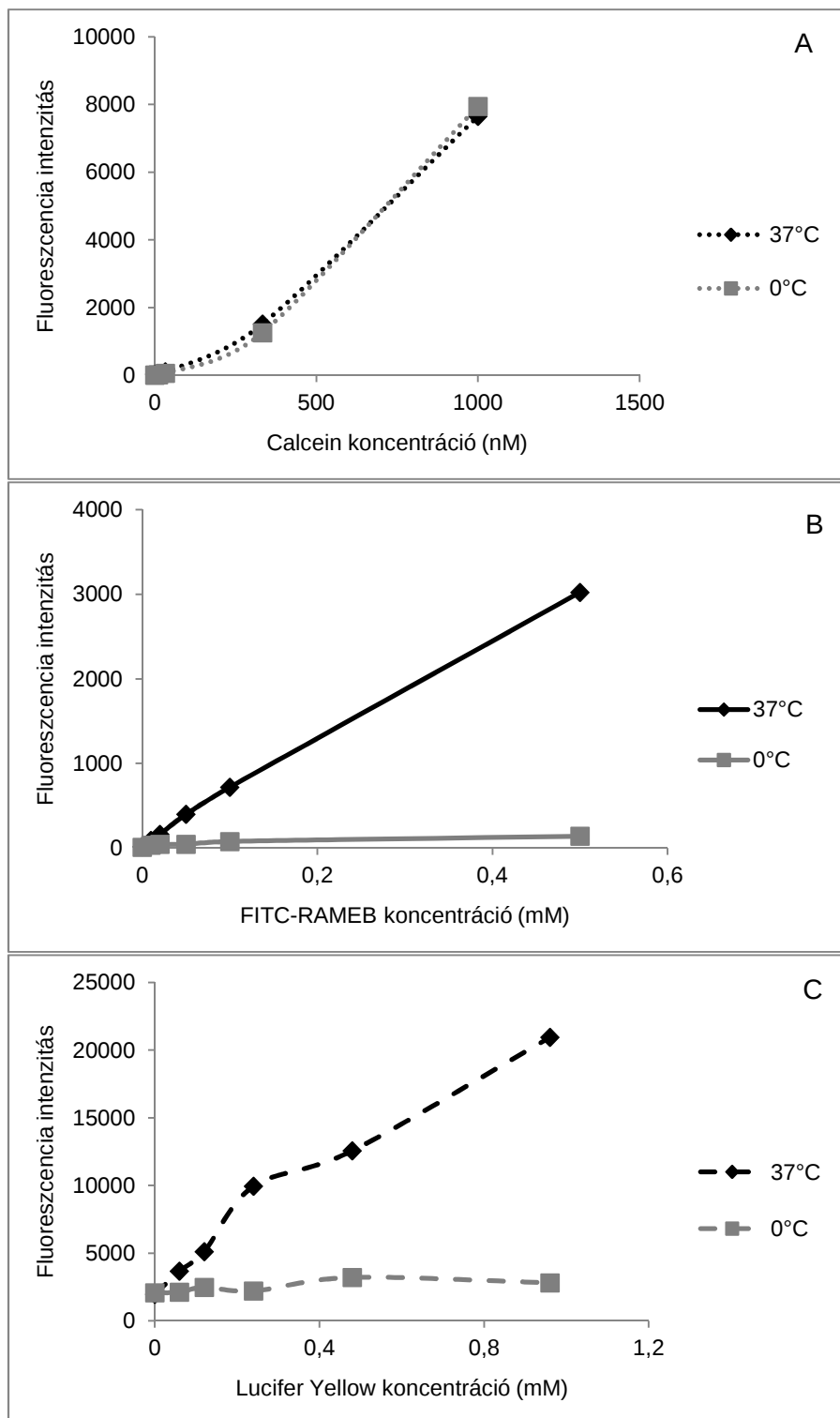


13. ábra - A FITC-RAMEB felvételének áramlási citometriás mérése. A Caco-2 sejtszuszpenziót $50\ \mu\text{M}$ FITC-RAMEB-et és $5\ \text{mM}$ RAMEB-et tartalmazó oldattal (FRR) kezeltük 37°C -on 30 percig, a kezeletlen kontrollt ciklodextrin-mentes HBSS-ben inkubáltuk. Az ábrán fekete színnel a kezeletlen sejtek mérése során kapott hisztogramot láthatjuk (M1), a piros színű hisztogram a kezelt sejteké (M2). Jól látható, hogy a kezelt sejtek a magasabb fluoreszcencia intenzitás értékeknél helyezkednek el a vízszintes tengelyen. A kapott átlagértékek között mintegy 20-szoros különbség tapasztalható.

4.2.5.2. Endocitotikus útvonal igazolása

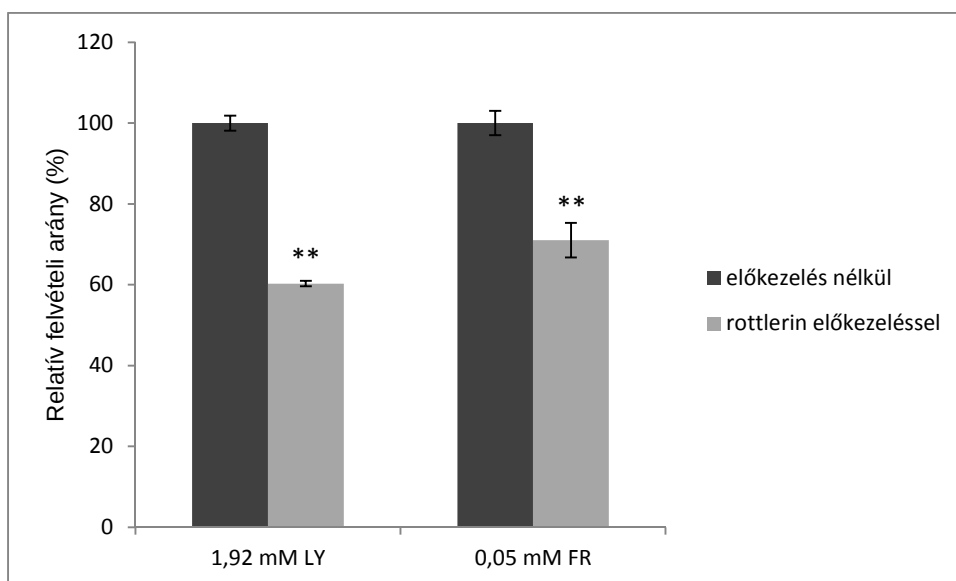
A FITC-RAMEB Caco-2 sejtekbe történő felvételét a Lucifer Yellow nevű makropinocitózis marker, illetve a calcein-AM (lipofil molekula, átdiffundál a sejtmembránon) felvételével hasonlítottuk össze mind 37°C-on, mind 0°C-on.

A vizsgált anyagok koncentrációjának függvényében felvett görbéken (14. ábra) jól látszanak a hidrofil és a lipofil anyagok sejtekbe való bejutásának fő különbségei. A calcein-AM intracelluláris halmozódása a festék koncentrációjától függ csak, az alkalmazott hőmérséklettől nem. Ellenben mind a Lucifer Yellow, mind a FITC-RAMEB esetében a sejtekbe történő bejutást jól gátolta a 0°C-ra való hűtés.



14. ábra - A calcein (A), a FITC-RAMEB (B) és a Lucifer Yellow (C) intracelluláris halmozódásának koncentrációfüggő görbéi. A sejteket 37°C-on, illetve 0°C-on kezeltük, a sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométer segítségével határoztuk meg, miután a nem élő sejteket propídium-jodid hozzáadásával kisselektáltuk. (Az ábrákon egy reprezentatív kísérlet eredményei vannak feltüntetve.)

A jelölt ciklodextrin makropinocitotikus felvételét az is megerősíti, hogy ugyancsak a Lucifer Yellow-hoz hasonlóan, a FITC-RAMEB felvételét is szignifikánsan csökkentette, ha a sejteket előkezeltük a rottlerin makropinocitózis gátlószerrel (15. ábra).

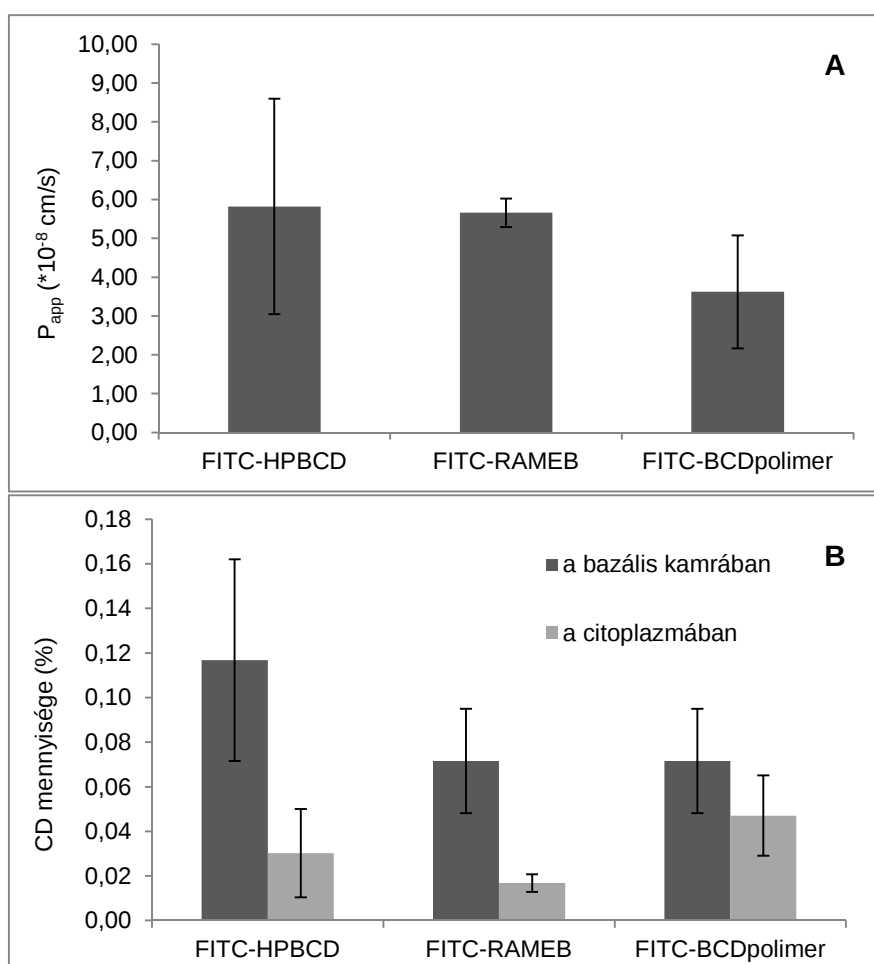


15. ábra - Rottlerinnel történő előkezelés hatása a Lucifer Yellow (LY) és a FITC-RAMEB (FR) sejtekbe történő felvételére. A Caco-2 sejteket 45 percig 10 μ M-os rottlerin oldattal kezeltük a fluoreszcens anyagok hozzáadása előtt, melyek felvételének mértékét áramlási citométerrel detektáltuk. Mindkét vizsgált anyag esetében a rottlerin szignifikánsan csökkentette a sejtekbe való bejutás mértékét ($n=3$, $p<0,01$).

4.3. A FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és a FITC-BCDpolimer ciklodextrin származékok vizsgálatainak eredményei

4.3.1. Permeabilitási vizsgálatok eredményei

A későbbiekben vizsgált származékok esetén a fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek (FITC-HPBCD, FITC-RAMEB, FITC-BCDpolimer) 50 μ M-os oldatát alkalmaztuk. A permeabilitást ebben az esetben is a látszólagos permeabilitási koeficiens értékekkel (16. ábra „A” része) jellemeztük: $5,82 \pm 2,80 \times 10^{-8}$ cm/s FITC-HPBCD esetén, $5,65 \pm 0,36 \times 10^{-8}$ cm/s FITC-RAMEB esetén és $3,62 \pm 1,45 \times 10^{-8}$ cm/s FITC-BCDpolimer esetén. Az ábrán is jól látható, hogy az egyes származékok P_{app} értékei nem térnek el szignifikánsan egymástól ($p > 0,05$).



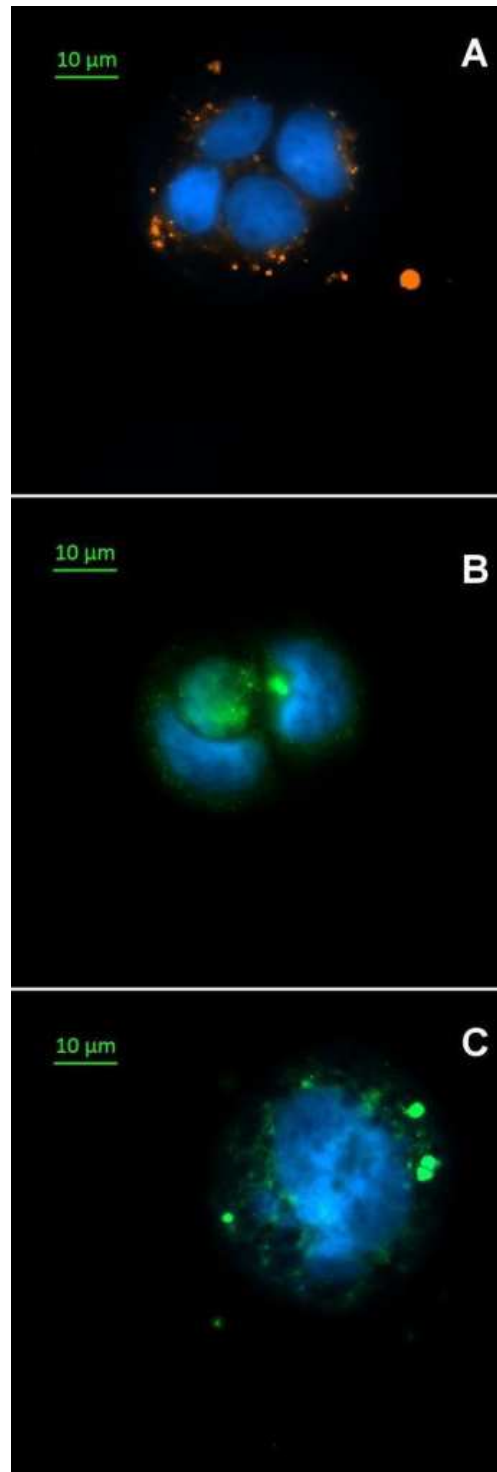
16. ábra - Fluoreszcens ciklodextrin származékok transzepiteliális permeabilitása. A Caco-2 egysejtrétegen bazolaterális irányba mérhető átjutás sebességét a 120 perces inkubálás után meghatározott látszólagos permeabilitási koeficiens (P_{app}) érték jellemzi (A). A kísérletek végén a bazális kamrában és a sejtek citoplazmájában is mérhető volt a jelölt ciklodextrinek fluoreszcenciája, melyből kiszámítottuk a kiindulási mennyiséghez viszonyított százalékos arányukat (B). Egyik esetben sem tapasztalható a származékok között szignifikáns eltérés ($p > 0,05$; $n(\text{FITC-HPBCD})=8$, $n(\text{FITC-RAMEB})=6$, $n(\text{FITC-BCDpolimer})=6$).

A TEER értékek mérése ebben az esetben is igazolta, hogy az egysejtrétegek integritása a kezelés során nem változott.

A kísérletek során mértük a sejtekben és a bazális kamrában felhalmozódott ciklodextrinek fluoreszcencia intenzitását. Az eredményeket a 16. ábra „B” részén ábrázoltuk. Látható, hogy csak igen kis mértékben jutottak be a citoplazmába és a bazális kamrába. Az egyes származékok értékei között nem található szignifikáns eltérés ($p > 0,05$).

4.3.2. Fluoreszcens mikroszkópia

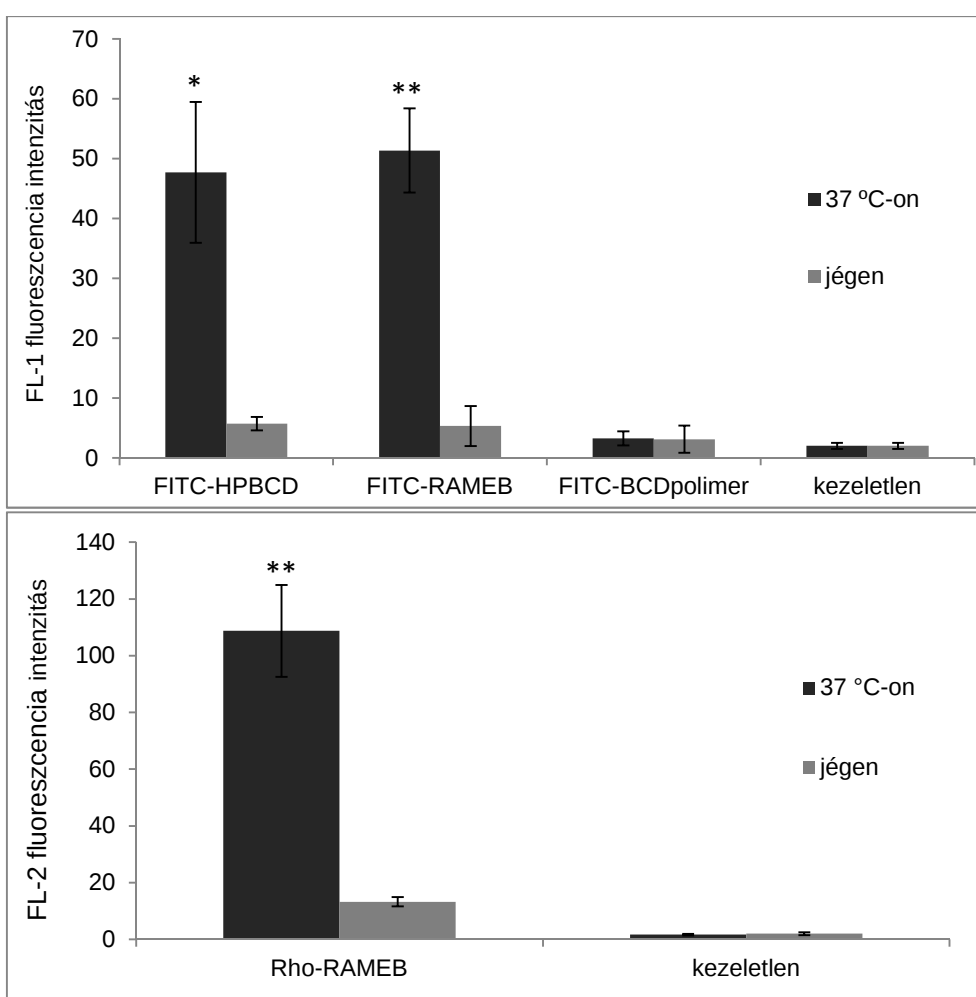
Ezzel a típusú vizsgálattal azt kívántuk demonstrálni, hogy a Rho-RAMEB, a FITC-HPBCD és a FITC-BCDpolimer is képes a Caco-2 sejtekbe bejutni. A 17. ábra jól mutatja, hogy mindhárom származék felvételre került a sejtekbe a 30 perces inkubációs idő alatt. A leghomogénebb eloszlást a FITC-HPBCD mutatja (17. ábra „B” rész), a Rho-RAMEB nagyobb endoszómákban található meg (17. ábra „A” rész), a legnagyobb vezikulákban pedig a FITC-BCDpolimer helyezkedik el (17. ábra „C” rész). Ezek a különbségek feltételezhetően az eltérő szubsztituensek és molekuláris sajátságok miatt jöttek létre.



17. ábra- Fluoreszcens mikroszkóppal készített felvételek jelölt ciklodextrin származékokat intracellulárisan tartalmazó Caco-2 sejtekről. Mindhárom felvételen azt láthatjuk, hogy a sejtekbe felvett ciklodextrin molekulák endocitotikus vezikulákban helyezkednek el a citoplazmában. A Rho-RAMEB nagy (piros) vezikulákban (A), a FITC-HPBCD kisebb (zöld) endoszómákban található meg (B), míg a FITC-BCDpolimer esetén láthatjuk a legnagyobb (zöld) endoszómákat (C). A sejtmag bisbenzimid festékkal van megjelölve (kék).

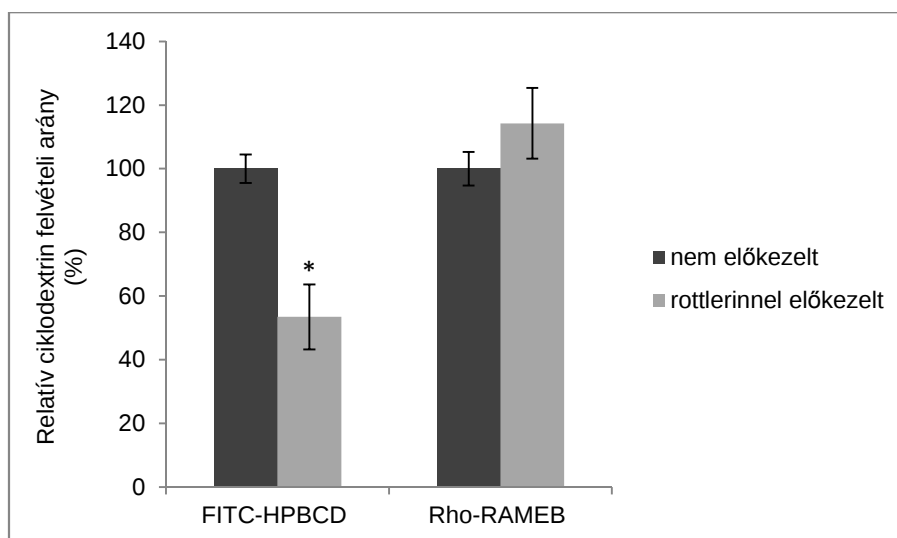
4.3.3. Áramlási citometriás eredmények

Ezen áramlási citometriás mérések során is először kiválasztottuk az élő sejtek populációját alacsony propídium-jodid fluoreszcenciájuk alapján, majd megmértük az intracellulárisan felhalmozódott jelölt ciklodextrin mennyiségét. 30 perces 37°C-on történő kezelést követően csak a monomer ciklodextrinek (FITC-HPBCD, FITC-RAMEB és Rho-RAMEB) okoztak szignifikáns fluoreszcencia intenzitás növekedést a sejtekben a kezeletlen sejtekhez viszonyítva ($p < 0,05$). Érdekes, hogy a FITC-BCDpolimer ugyanakkora koncentrációban jóval alacsonyabb fluoreszcens jelet adott (18. ábra). Meg kell azonban jegyezni, hogy a polimer esetén eltérő módon történik a jelölés, a fluorofór aránya jóval kisebb itt, mint a monomerek esetében.



18. ábra - Fluoreszcens ciklodextrin származékok Caco-2 sejtekbe történő felvételének áramlási citometriás mérése. A sejteket az egyes ciklodextrin származékok 50 μ M-os oldatával kezeltük 37°C-on vagy jégen. A monomer ciklodextrinek (FITC-HPBCD, FITC-RAMEB és Rho-RAMEB) esetén találhatunk szignifikáns különbséget a kezeletlen és a kezelt sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása között. A FITC-BCDpolimer estében nem tapasztalható ilyen növekedés. Emellett fontos kiemelni, hogy a jégen való inkubálás gátolta a monomerek felvételét. A propídium-jodidot tartalmazó sejteket kizártuk a mérésből. A kapott eredmények átlagértékeit és szórásait ábrázoltuk ($n=3$). A szignifikanciát * ($p < 0,05$), illetve ** ($p < 0,01$) jelöli.

A 10 μ M-os rottlerines előkezelés hatására szignifikánsan csökkent a FITC-HPBCD internalizációja ($p < 0,05$), ám érdekes módon ugyanez nem mondható el a Rho-RAMEB esetén (19. ábra). A FITC-BCDpolimert nem vizsgáltuk a gátlószerek kísérletekben, mert ennek a származéknak az endocitózisa nem detektálható ebben a koncentrációban sejtszuspenzió esetén.

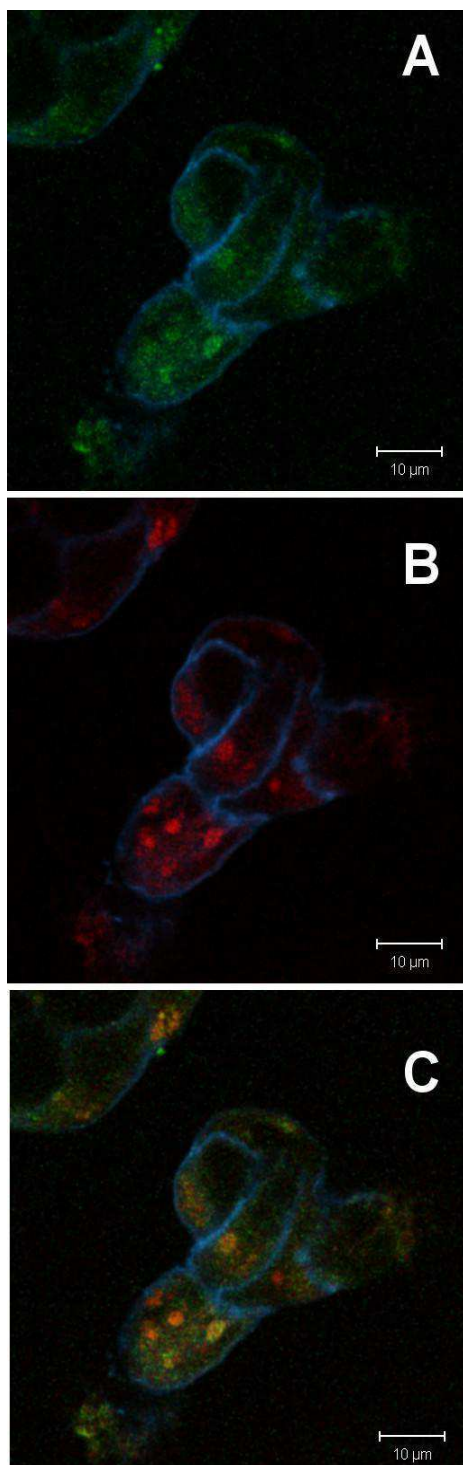


19. ábra - Fluoreszcensen jelölt ciklodextrin sejtbe történő felvételének gátlása makropinocitózis gátlószerezrel (rottlerin). A Caco-2 sejteket 10 μ M-os rottlerin oldattal kezeltük 40 percig mielőtt a jelölt ciklodextrinekes (FITC-HPBCD, Rho-RAMEB) kezelést megkezdtük volna (ez utóbbi további 30 percig tartott). A sejteket áramlási citométerrel vizsgáltuk, a propídium-jodid tartalmú (nem élő) sejteket kizártuk az elemzésből. A rottlerinnel előkezelt sejtek fluoreszcencia intenzitását hasonlítottuk százalékosan a nem előkezelt sejtekéhez. A gátlószer csak a FITC-HPBCD esetén csökkentette szignifikánsan a ciklodextrin felvételét, a Rho-RAMEB esetén nem volt hatása. A kapott adatok átlagait és szórásait ábrázoltuk ($n=5$, $*p < 0,05$).

4.4. A Flutax-ciklodextrin komplexek vizsgálatainak eredményei

4.4.1. Fluoreszcens mikroszkópia

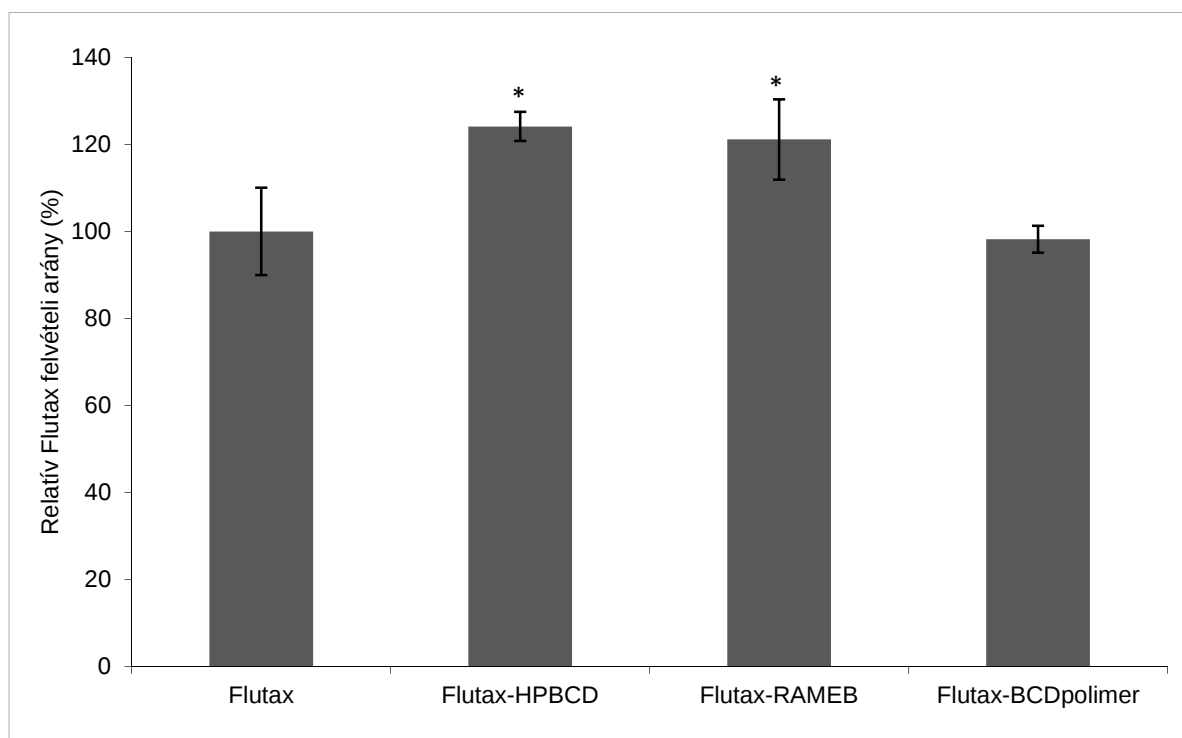
A Flutax és a Rho-RAMEB kolokalizációját az endocitotikus vezikulákban konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A 20. ábra egy olyan optikai szeletet mutat, ahol a vezikulákban mindkét molekula megtalálható. Mindemellett a ciklodextrint és a Flutax-ot is megtalálhatjuk diffúz formában a citoplazmában is.



20. ábra - Konfokális mikroszkópos felvételek a Flutax-Rho-RAMEB komplexről Caco-2 sejtekben. A sejteket 30 percig kezeltük a komplex oldatával. A citoplazma nagyon hasonló mintázatot mutat a csak Rho-RAMEB-bel kezelt sejtek esetében tapasztalhoz. Az ábra "C" részén felfedezhetünk csak Flutax-ot (zöld) és csak Rho-RAMEB-et (piros) tartalmazó vezikulákat, de vannak olyanok is, melyek mindkét molekulát egyszerre tartalmazzák (narancssárga). A sejtmembrán kék színnel van jelölve. Az ábra "A" része csak a Flutax-ról és a sejtmembránról, a "B" része csak a Rho-RAMEB-ről és a sejtmembránról készült, az ábra "C" része pedig mindhárom csatornát egyszerre mutatja.

4.4.2. Komplexek felvételének vizsgálati eredményei

A ciklodextrin-származékok felszívódást fokozó hatásának vizsgálatára liofilezással készített komplexeket vizsgáltuk (fluoreszcensen jelölt paklitaxel-származék vendégmolekula és jelöletlen ciklodextrin származékok). A 30 perces inkubálást követően a sejtlizátumok a Flutax-HPBCD és a Flutax-RAMEB komplexek esetében magasabb fluoreszcencia intenzitást adtak a Flutax kezelt sejtekhez képest. Ez a kétféle komplex mintegy 20 %-al növelte a Flutax felvételét a Caco-2 sejtekbe. A hatás mindkét esetben szignifikáns volt ($p < 0,05$). A polimer ciklodextrinnel való komplexálás nem eredményezte a Flutax felszívódásának növekedését. (21. ábra).



21. ábra - Flutax-CD komplexek felvétele Caco-2 egysejtrétegbe. A ciklodextrin monomerek voltak képesek zárványkomplex formájában növelni a Flutax felvételét a Caco-2 egysejtrétegbe. A BCDpolimer által készített komplex esetén nem volt szignifikánsan magasabb a Flutax felvételi aránya, mint az önálló Flutax kezelés esetében. Ellenben a HPBCD és a RAMEB komplexei szignifikánsan javították a Flutax bejutási arányát. A kapott eredmények átlagait és szórásait ábrázoltuk ($n=9$, $*p < 0,05$).

5. Diszkusszió

Általánosan elmondható, hogy nehéz közvetlenül a ciklodextrin-sejtmembrán kölcsönhatásokat tanulmányozni, minthogy a ciklodextrinek sorsát is nehéz lépésről-lépésre követni egy-egy biológiai rendszerben. A fluoreszcens ciklodextrin származékok kifejlesztésével olyan értékes eszköz került a kezünkbe, mellyel új nézőpontból közelíthetjük meg a ciklodextrinek sejtszintű hatásainak kérdését. Ezen fluoreszcens származékok segítségével tártak fel a közelmúltban egy példátlan jelenséget, a ciklodextrinek endocitózisát különféle sejtvonalakon.

Kutatásainkat a fluoreszcensen jelölt random-metil- β -ciklodextrin (FITC-RAMEB) származék alkalmazásával kezdtük, a Caco-2 sejtrétegen keresztüli permeabilitását és ezen sejtekbe való felvételének módját vizsgáltuk. A ciklodextrinek abszorpciójáról és orális biohasznosíthatóságáról igen csekély mennyiségű adat áll a rendelkezésünkre, Caco-2 sejtekre vonatkozó permeabilitási adatok pedig egyáltalán nincsenek a szakirodalomban. Korai tanulmányok szerint a szájon át patkányoknak adott ^{14}C -el jelölt β -ciklodextrinnek mindössze 5%-át sikerült a vérben detektálni. Ebből arra következtettek, hogy a β -ciklodextrinek nem szívódnak fel sem a gyomorból, sem a vékonybélből, és a kismértékű abszorpciót az amiláz enzimekkel magyarázták: csak a ciklodextrinekből keletkező nyílt láncú dextrinek és glükóz szívódik fel (Szejtli és mtsai. 1980). Frissebb publikációk szerint a HPBCD orális biohasznosíthatósága kevesebb mint 0,03%, a β -ciklodextrinének megközelítőleg 0,3% (Kurkov & Loftsson 2013), míg a RAMEB patkányokban mért orális biohasznosíthatósága 12% körül van (Loftsson & Brewster 2011).

A saját FITC-RAMEB-re vonatkozó permeabilitási értékeink összhangban vannak a ciklodextrinekre vonatkozó alacsony intesztinális abszorpciók adatokkal is, hiszen az átjutási sebességet kifejező látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) értékek a FR csoport esetén $3,35 \pm 1,29 \times 10^{-8}$ cm/s, a FRR csoport esetén pedig $4,23 \pm 1,46 \times 10^{-8}$ cm/s. Ezek az adatok nagyságrendileg megegyeznek a szubsztituálatlan α -, β - és γ -ciklodextrinek Calu-3 bronchialis sejteken mért permeabilitási eredményeivel (Matilainen és mtsai. 2008).

A metilált ciklodextrineket 5-10 mM-os koncentrációban alkalmazzák a sejtmembrán koleszterin tartalmának kivonására is (Kilsdonk és mtsai. 1995; Fenyvesi és mtsai. 2008), növelve ezzel a hatóanyagok penetrációját (Deli 2009). Feltételeztük, hogy az általunk alkalmazott jelölt ciklodextrin koncentráció (0,05 mM) nem befolyásolja szignifikánsan a membrán koleszterin szintet, hiszen az az általánosan alkalmazott koncentráció 1/100-ad része csupán. Éppen ezért megvizsgáltuk 5 mM hozzáadott RAMEB hatását a FITC-RAMEB permeabilitására és az egysejtrétegek TEER értékeire (ez a koncentráció érték korábbi

vizsgálatok szerint nem toxikus a Caco-2 sejtekre) (Kiss és mtsai. 2010). Nem találtunk szignifikáns eltérést sem a permeabilitásban, sem az ellenállás értékekben a FR és a FRR kezelések között ($p < 0,05$), az 5 mM-os koncentrációjú RAMEB-nek nem volt hatása az egysejtrétegek átjárhatóságára.

A permeabilitási vizsgálatok végén a sejtek citoplazmájában szignifikáns mennyiségű FITC-RAMEB hamozódott fel, melyet alapos mosással sem lehetett eltávolítani. Megvizsgáltuk ezt a hamozódást az idő függvényében is, és ahogy a 8. ábra jelzi, a jelölt ciklodextrin a kísérlet 120 perce alatt folyamatosan felvételre kerül a Caco-2 sejtekbe mindkét kezelés esetén. Az intracelluláris ciklodextrin további sorsának vizsgálatához a sejteket 0,5 mM FITC-RAMEB oldat segítségével töltöttük fel. Ez a tízszeres koncentráció tízszeresére növelte a felvett ciklodextrin mennyiségét, ám a permeabilitást nem fokozta a koncentráció emelése ($2,28 \pm 0,346 \cdot 10^{-8}$ cm/s). Az akkumulálódott ciklodextrin további útját 120 percig követtük mind apikális, mind bazolaterális irányba. Érdekes módon a FITC-RAMEB megjelent mindkét kamrában, de jelentős hányada az apikális oldalra került leadásra. Az intracellulárisan felhalmozódott ciklodextrinnek mindössze 7,4%-a érte el a bazális kamrát.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a Caco-2 egysejtréteg egy nehezen átjárható barrier a ciklodextrinek számára. Az ép sejtrétegen a vízdékony ciklodextrinek csak paracelluláris úton juthatnak át passzív diffúzió útján, de ez az útvonal a „tight junction”-ök miatt erősen korlátozott. Mindemellett a sejtek képesek ezeket a molekulákat oldott állapotban felvenni a citoplazmájukba az egyszerű diffúziótól eltérő módon. Ezt támasztják alá azok a Calu-3 sejteken végzett tanulmányok, melyek szerint a ciklodextrinek paracelluláris módon jutnak át a monolayeren, bár a transzcitotikus útvonal lehetőségét sem zárták ki (Matilainen és mtsai. 2008). Újabb publikációkból pedig arra derült fény, hogy bizonyos sejtípusok képesek a ciklodextrineket endocitózissal bekebelezni (Rosenbaum és mtsai. 2010; Wei és mtsai. 2011; Plazzo és mtsai. 2012), ezért konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a FITC-RAMEB sejten belüli elhelyezkedését. A 10. ábra és a 11. ábra igazolja, hogy a FITC-RAMEB mind a differenciálatlan, mind pedig a differenciált Caco-2 sejtek citoplazmájába képes bejutni. Mivel a jelölt ciklodextrin vezikulákban helyezkedett el a citoplazmában, ezért továbbiakban az endocitózis lehetőségét vizsgáltuk. Feltevésünket igazolta, hogy a FITC-RAMEB kolokalizációt mutatott a sejtmembránban expresszáltatott RFP-Rab5a fúziós fehérjével. A Rab5 fehérjék kulcsszereplők a korai endoszómák kialakulásakor, ám a késői endoszómákban már nem találhatók meg (Rink és mtsai. 2005). A konfokális mikroszkópos felvételeinken a FITC-RAMEB és a Rab5 fehérje a mélyebb rétegekben lévő vezikulákban már nem mutat kolokalizációt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a ciklodextrinek internalizációjának kezdete összefüggésben van az

endoszómák kialakulásával. Kollégáim által végzett további kísérletek szerint a kolokalizáció a FITC-RAMEB és a Rab5 fehérje között 2 perc inkubálás után nagyfokú és 30 perc után is még detektálható. Mindez jól jelzi az endocitotikus folyamatok állandó működését (Fenyvesi és mtsai. 2014).

Az endocitózisnak két fő típusát különböztetjük meg: a fagocitózist és a pinocitózist, vagy más néven folyadék-fázisú endocitózist (ahol a transzportálandó molekulának oldott formában kell lennie). Ez utóbbit tovább bonthatjuk a makropinocitózissra, a clatrin-mediált-, a caveolin-mediált-, a clatrin-független és a caveolin-független endocitózis altípusokra (Conner & Schmid 2003).

A Lucifer Yellow egy széles körben alkalmazott makropinocitózist jelző festékmolekula (Sarkar és mtsai. 2005; Swanson és mtsai. 1985; Sallusto és mtsai. 1995). Áramlási citometriás eredmények azt mutatják, hogy a Lucifer Yellow koncentrációfüggő módon kerül felvételre a Caco-2 sejtekbe, mely folyamat 0 °C-ra való hűtéssel gátolható (Swanson és mtsai. 1985; Sallusto és mtsai. 1995). A FITC-RAMEB felvétele hasonló módon történt: 37 °C-on a koncentráció növelésével nőtt az akkumuláció mértéke is, míg 0 °C-on a felvétel lecsökkent. Ezzel ellentétben a lipofil calcein-AM mindkét vizsgált hőmérsékleten egyformán gyorsan jutott át a sejtmembránon (Homolya és mtsai. 1993), a felvétele hűtéssel nem volt gátolható. A makropinocitózist gátló rottlerin (Sarkar és mtsai. 2005) hasonló gátló hatást gyakorolt mind a FITC-RAMEB, mind pedig a Lucifer Yellow felvételére. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a FITC-RAMEB Caco-2 sejtekbe történő felvételében szerepet játszik a makropinocitózis folyamata. Emellett magyarázatot adnak arra is, hogy miért főleg az apikális oldalra kerül vissza a citoplazmába felvett ciklodextrin. Humán epidermoid A431 sejtekben mutatták ki, hogy a makropinoszómák visszajuttatják tartalmukat a sejtfelszínre (Hewlett és mtsai. 1994). Úgy tűnik, hogy ugyanez a mechanizmus létezik Caco-2 sejtek esetében is, mivel az internalizáció makropinocitózissal megy végbe, és a felvett ciklodextrin túlnyomó többsége az apikális irányba kerül leadásra. Újabb kutatások is megerősítik a saját eredményeinket, mivel bebizonyították, hogy a Niemann-Pick C1 típusú sejtek endocitózissal veszik föl, majd exocitózissal adják le a fluoreszcensen jelölt β -ciklodextrint (Dai és mtsai. 2015).

Mindazonáltal a teljes felvett ciklodextrin mennyiség visszajuttatása legalább egy órát vesz igénybe, ami azt jelenti, hogy ez a folyamat meghosszabbítja a ciklodextrin (és/vagy ciklodextrin-hatóanyag komplex) és a makropinoszóma membránja közötti kontaktus idejét. Fontos megjegyezni, hogy más endocitotikus folyamatokat is számításba kell venni. Korábbi, más sejtípusokon elvégzett tanulmányok szerint a ciklodextrinek internalizációja folyadék-fázisú endocitózissal és clatrin-függő endocitózissal megy végbe (Rosenbaum és mtsai. 2010; Wei és mtsai. 2011; Plazzo és mtsai. 2012). Emellett a fagocitózis sem egy

elhanyagolható folyamat, ha ciklodextrinek töményebb oldatainak felvételéről van szó. Leírták, hogy magas koncentrációk esetén a natív β -ciklodextrinek (González-Gaitano és mtsai. 2002) és a fluoreszcens tetraamino-rhodaminil-hidroxipropil- β -ciklodextrin (Puskás és mtsai. 2012) nagy, nano-méretű aggregátumokat képez vízben. RAMEB esetén azonban 12 mM-os koncentráció esetén sem tapasztalták az előbbi jelenséget, mivel a ciklodextrin gyűrű hidroxil csoportjainak metil csoportokkal való szubsztituálása gátolja a molekulák aggregálódását (González-Gaitano és mtsai. 2002).

A saját kísérleteink során alkalmazott koncentrációk (0,05-5 mM) 40-240-szer alacsonyabb értékek, mint amekkora koncentrációk esetén a fenti aggregációs jelenségeket tapasztalták, így ebben az esetben a fagocitózis kizárható a lehetséges ciklodextrin-felvevő mechanizmusok közül.

Összességében a munkánk első részében beigazolódott, hogy (összhangban korábbi kutatási eredményekkel) Caco-2 sejtek esetén a vízben oldódó FITC-RAMEB felvétele folyadék-fázisú endocitózissal zajlik. Azt nehéz megjósolni, hogy ennek a folyamatnak milyen kvantitatív hatásai vannak a ciklodextrin *in vivo* felszívódásának folyamatában. Elméletileg a permeabilitási adatok alkalmasak az *in vivo* felszívódás mértékének előre jelzésére, de ezzel a modell elrendezéssel nehéz kvantifikálni a folyamatosan felvételre majd leadásra kerülő ciklodextrin mennyiségét. Emellett a bélrendszer térfogatára jutó felszívó hám felülete jóval nagyobb, mint a kísérleti elrendezésben lévő apikális oldali folyadék térfogatra jutó Caco-2 egysejtrétegek apikális felszíne, illetve a perisztaltikus mozgások szerepét is fontos figyelembe venni. Így meglehet, hogy a ciklodextrinek *in vivo* internalizációja jóval nagyobb mértékű az általunk tapasztaltnál, és még ha a molekulák nagy része vissza is jut a bél lumenébe, a folyamat hatékonyságát növeli az is, hogy folytonosan a vékonybél egészén ismételten lejátszódik.

Munkánk második részében fluoreszcensen jelölt HPBCD és BCDpolimer származékokat vizsgáltunk a már eddig is használt Caco-2 modellen, összevetve a korábban vizsgált fluoreszcensen jelölt RAMEB-bel. Ezen felül célunk volt megvizsgálni a ciklodextrineknek egy fluoreszcensen jelölt paklitaxel származékkal képzett komplexeinek felvételét Caco-2 sejtekbe.

Először a permeabilitási vizsgálatokat kiviteleztek Caco-2 egysejtrétegen, és összhangban a korábbi eredményeinkkel mindhárom vizsgált származék (FITC-HPBCD, FITC-RAMEB és FITC-BCDpolimer) esetén nagyon alacsony, szignifikánsan nem eltérő permeabilitási értékeket kaptunk. Meglepő módon mindegyik jelölt származék detektálható volt a bazális kamrában és a citoplazmában is.

Ezt megerősítették a fluoreszcens mikroszkópban 30 perc inkubálás után látott képek. A FITC-HPBCD, a FITC-BCD polimer és a Rho-RAMEB is megtalálható volt a Caco-2 sejtek citoplazmájában, eltérő méretű vezikulumok formájában.

Ettől részben eltérő eredményt hoztak az áramlási citometriás mérések, hiszen a Caco-2 sejtuszuspenzió esetén 30 perc inkubálást követően csak a monomer származékok voltak a sejtekben detektálhatóak. A felvétel gátolható volt jégen való inkubálással vagy rottlerin előkezelés alkalmazásával. Kivétel ez alól a Rho-RAMEB, melynek internalizációját nem gátolta a rottlerin. Korábbi kutatásaink (Fenyvesi és mtsai. 2014) szerint a rottlerin csökkenti a FITC-RAMEB endocitózist. Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a két eltérő módon jelölt RAMEB származék eltérő módokon kerül felvételre a Caco-2 sejtekbe. Ennek megerősítése további endocitotikus útvonalak vizsgálatát igényli.

A ciklodextrinek hidofil molekulák, alacsony oktanol-víz megoszlási koefficiens (log P) értékekkel rendelkeznek (Kurkov & Loftsson 2013; Loftsson 2015). És habár a fluoreszcens festékekkel (fluoreszcein, rhodamin) való jelölés megnöveli a molekulatömegüket és befolyással van a tulajdonságaikra, a ciklodextrinek fluoreszcens származékai is jól oldódnak vízben. A szoftveresen kalkulált log P értékek szerint mind a FITC-HPBCD, mind a Rho-RAMEB ugyanúgy hidofil marad, mint a HPBCD és a RAMEB. Mindez megerősíti, hogy a jelölt származékok sem képesek a sejtmembránon passzív diffúzióval átjutni (hasonlóan jelöletlen párjaikhoz).

Végezetül a jelölt paklitaxel-ciklodextrin komplexeket vizsgáltuk Caco-2 egysejtrétegen. Eredményeinkből kiderült, hogy a RAMEB és a HPBCD komplexei növelték szignifikánsan a Flutax felvételét a sejtrétegekbe, míg a BCDpolimer által képzett komplex esetén nem volt tapasztalható ilyen hatás. Mindez összhangban van kollégáim korábbi kutatási eredményeivel, mely szerint a RAMEB és származékai képesek fokozni a paklitaxel permeabilitását Caco-2 sejteken (Fenyvesi és mtsai. 2011).

A jelöletlen ciklodextrin származékokkal való komplexálás mellett készítettünk Flutax-Rho-RAMEB komplexet is, ahol mindkét molekula fluoreszcensen (eltérő festékkel) jelölt. Ezáltal tudtuk a komplex felvételét a sejtek szintjén tanulmányozni, vizsgálni a Rho-RAMEB és a Flutax intracelluláris kolokalizációját. Mi demonstráltuk először, hogy a fluoreszcens ciklodextrinek magas lipofilitású vendégmolekulákkal együtt endocitotikus módon felvételre kerülnek intracelluláris vezikulumokba.

A fentebb ismertetett eredményekre és a ciklodextrinek jól ismert tulajdonságaira alapozva elmondható, hogy a β -ciklodextrineknek számos hatása van az intesztinális barrier-rendszerre:

- I. lipofil molekulák vízdékonyságának növelése
- II. lipofil molekulák permeabilitásának növelése a keveretlen vízrétegen ("unstirred water layer", UWL) keresztül
- III. a sejtmembrán permeabilizálása koleszterin kivonása által, mely további hatásokat idéz elő:
 - A. a "tight junction" kapcsolatok funkciójának módosítása, mely növeli a paracelluláris permeabilitást
 - B. az efflux pumpák gátlása
- IV. szabad ciklodextrin molekulák endocitózisa
- V. ciklodextrin komplexek endocitózisa

Az első három mechanizmus széles körben tanulmányozott. Az esetek többségében az első két hatás felelős a hatóanyagok abszorpcióját fokozó hatásért. Emellett, habár néhány membrán permeabilitást limitáló tényező (mint a molekulaméret, a komplex stabilitás és az efflux pumpák jelenléte) korlátozhatja, a ciklodextrinek is sok esetben felvételre kerülhetnek a sejtekbe a komplexált molekulával együtt endocitózis által. A ciklodextrin komplexek endocitózisának kisebb a jelentősége a membránon könnyen penetráló kismolekulák esetén, ám a komplexben fellépő erős kötések felülírhatják ezt a hipotézist, hiszen így a nem disszociált komplex is bekerülhet a sejtbe. Modell-hatóanyagunk, a paklitaxel egy kevésbé vízdékonny, ám membrán-permeábilis molekula. A sejtekbe történő felvételét limitálja, hogy P-gp szubsztrát. Már jól ismert tény, hogy a paklitaxel komplexet képez β -ciklodextrinnekkel vizes oldatban és nanorészecskékben is (Agüeros és mtsai. 2009; Bouquet és mtsai. 2007; Szente és mtsai. 1999). A paklitaxel-RAMEB komplexek stabilitási állandója közepes vagy közepesen magas ($K_{1:1}=4850 \text{ M}^{-1}$) (Szente és mtsai. 2001); ezért van esély arra, hogy a sejtekbe stabil egységként kerül felvételre folyadék-fázisú endocitózissal. A zárványkomplex méretéből adódóan is provokálja saját endocitózisát. Általában a nagy molekulák, mint a fehérjék vagy az oligonukleotidok, nem tudnak penetrálni a sejtmembránon. Ebben az esetben az endocitózis a lehetséges mód a sejtek által alkotott barrieren való átjutásra. Ehhez hasonlóan a nagyméretű és hidrofil ciklodextrin-hatóanyag komplexek endocitózisa is elképzelhető. A BCDpolimer esetén tapasztaltakat

magyarázhatja, hogy a nagyfokú polimerizáció miatt kisebb az affinitása a paklitaxellel való komplexképzésre (a paklitaxel kevésbé tud hozzáférni a ciklodextrin gyűrűkhöz).

Habár a pontos mechanizmust még nem tárták fel, a ciklodextrin gyűrűk optimális hatóanyag hordozók, hiszen számos szubsztituenssel módosíthatóak a legjobb hordozórendszer kifejlesztése végett, mely az internalizációt is stimulálja különféle endocitotikus útvonalon keresztül. Jó példa, hogy egy újabb kutatási eredmény szerint a pegilált polianhidrid nanorészecskékbe töltött paklitaxel-HPBCD vagy paklitaxel-BCD komplexek ígéretes hordozók lehet a paklitaxel számára (Calleja és mtsai. 2015).

6/A. Összefoglalás

A ciklodextrineket elterjedten alkalmazzák rossz vízdékonyságú hatóanyagok oldékonyságának, biohasznosíthatóságának és stabilitásának növelésére. Eredményeinkkel elsőként igazoltuk, hogy a random metil- β -ciklodextrin, a hidroxipropil- β -ciklodextrin és a vízdékonyságú β -ciklodextrin-polimer is képes bélhámsejtekbe endocitózissal belépni. Ez a folyamat számos módon befolyásolhatja a ciklodextrinekbe komplexált hatóanyagok bélrendszerben történő transzportját és biohasznosíthatóságát. Segíthet átjutni az intesztinális barrieren, az endoszómák létrejötte pedig megnöveli a komplexek és a sejtmembrán érintkezési felületét, illetve meghosszabbítja a ciklodextrinek tartózkodási idejét az epithel sejtekben.

Ezek után elsőként mutattunk rá arra is, hogy a β -ciklodextrinek a rossz vízdékonyságú hatóanyagok biohasznosíthatóságát nem csak az oldékonyságuk növelése által fokozzák, hanem el is szállítják azt komplexált formában az enterociták citoplazmájába endocitózis segítségével. A ciklodextrinek felszívódást fokozó hatását több szimultán végbemenő folyamat is okozhatja, ezeket egyszerre kell figyelembe venni a biológiai rendszerekben. Mindazonáltal szeretnénk hangsúlyozni, hogy vannak speciális esetek, amikor az endocitotikus folyamatok is fontos szerepet játszanak.

Mivel jelen tanulmányunk rávilágított a makropinocitózis szerepére a metil- β -ciklodextrin bélhámsejtekbe való felvételében, úgy gondoljuk, hogy a ciklodextrinekkel befolyásolt gyógyszerfelszívódás mechanizmusa további vizsgálatokat érdemes végezni.

6/B. Summary

Cyclodextrins are used to increase solubility, bioavailability and stability for drugs with low water solubility. Our results demonstrate for the first time that randomly methylated- β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and β -cyclodextrin-polymer can enter into intestinal epithelial cells by endocytosis. This process can contribute to the enhancement of the intestinal delivery and bioavailability of drugs by cyclodextrins in several ways. It can help to overcome the intestinal membrane barrier, the endosome formation increases the contact surface area between the cyclodextrin-drug complexes and the cell membrane and prolongs the retention time of cyclodextrins in the epithelial cells.

Then we demonstrated for the first time that β -cyclodextrins can improve the bioavailability of drugs with poor solubility and absorption not only by solubility improvement but by transporting the complexed drug into the cytoplasm of enterocytes via endocytosis. The permeability and absorption enhancing effect of cyclodextrins might involve several mechanisms, which may act simultaneously and thus, it is difficult to examine separately in cellular systems. However, we emphasize that in some special cases also endocytotic processes should be considered.

Since this study has demonstrated the role of macropinocytosis in the uptake of methylated- β -cyclodextrin in intestinal cells, this mechanism merits further investigations in connection with drug absorption mediated by cyclodextrins.

7/A. Irodalomjegyzék

- Agüeros, M. és mtsai., 2009. Combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 38(4), o.405–413.
- Anjana, M.N., Nair, S.C. & Joseph, J., 2013. An updated review of cyclodextrins -an enabling technology for challenging pharmaceutical formulations. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5(3), o.54–58.
- Arima, H. és mtsai., 2004. Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical research*, 21(4), o.625–634.
- Arima, H. és mtsai., 2001. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 297(2), o.547–555.
- Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K., 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), o.27–43.
- Bacso, Z. és mtsai., 2004. Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 61(2), o.105–116.
- Berthault, P. és mtsai., 1995. A self inclusion complex with beta-cyclodextrin studied by NMR and molecular modeling. *Carbohydrate research*, 276, o.267–287.
- Bouquet, W. és mtsai., 2007. Paclitaxel/beta-cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion - formulation and stability. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 66(3), o.391–397.
- Brewster, M.E. és mtsai., 2007. Effect of the unstirred water layer on permeability enhancement by hydrophilic cyclodextrins. *International journal of pharmaceuticals*, 342(1-2), o.250–253.
- Buschmann, H.-J. & Schollmeyer, E., 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *Journal of cosmetic science*, 53(3), o.185–191.
- Calleja, P. és mtsai., 2015. Controlled Release, Intestinal Transport, and Oral Bioavailability of Paclitaxel Can be Considerably Increased Using Suitably Tailored Pegylated Poly(Anhydride) Nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(9), o.2877–2886.
- Castagne, D. és mtsai., 2009. Study of the cholesterol extraction capacity of β -cyclodextrin and its derivatives, relationships with their effects on endothelial cell viability and on membrane models. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 63(3), o.225–231.
- Chen, F.W., Li, C. & Ioannou, Y.A., 2010. Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PloS one*, 5(11), o.e15054.

- Chordiya Mayur, A. & Senthilkumaran, K., 2012. Cyclodextrin In Drug Delivery: A Review. *Research & Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), o.19–29.
- Conner, S.D. & Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), o.37–44.
- Cserháti, T. & Forgács, E., 1998. Use of spectral mapping technique for the evaluation of the formation of inclusion complexes between anticancer drugs and cyclodextrin derivatives. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 40(1), o.93–100.
- Dai, S. és mtsai., 2015. Rapid kinetics of β -cyclodextrin entering and exiting cells: Implication of its mechanism on reduction of cholesterol accumulation in Niemann–Pick disease type C cells. *Molecular genetics and metabolism*, 114(2), o.S35.
- Dang, X.-J. és mtsai., 1998. Inclusion of the parent molecules of some drugs with β -cyclodextrin studied by electrochemical and spectrometric methods. *Journal of electroanalytical chemistry*, 448(1), o.61–67.
- Deli, M.A., 2009. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(4), o.892–910.
- Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), o.1033–1046.
- Fenyvesi, É., 2015. EMA Review on Cyclodextrins as Excipients. *Cyclodextrin News*, 29(5).
- Fenyvesi, F. és mtsai., 2014. Fluorescently labeled methyl-beta-cyclodextrin enters intestinal epithelial Caco-2 cells by fluid-phase endocytosis. *PloS one*, 9(1), o.e84856.
- Fenyvesi, F. és mtsai., 2008. P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 34(4-5), o.236–242.
- Fenyvesi, F. és mtsai., 2011. Randomly methylated β -cyclodextrin derivatives enhance taxol permeability through human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayer. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(11), o.4734–4744.
- Garrigues, A., Escargueil, A.E. & Orlowski, S., 2002. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), o.10347–10352.
- González-Gaitano, G. és mtsai., 2002. The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44(1/4), o.101–105.
- Hewlett, L.J., Prescott, A.R. & Watts, C., 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *The Journal of cell biology*, 124(5), o.689–703.
- Higuchi, T. & C., K.A., 1965. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4, o.117–212.
- Homolya, L. és mtsai., 1993. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *The Journal of biological chemistry*, 268(29), o.21493–21496.

- Jicsinszky, L. & Fenyvesi, É., 2014. Statistical evaluation of the cyclodextrin related literature published in Cyclodextrin News in 2013. *Cyclodextrin News*, 28(1), o.1–5.
- Kilsdonk, E.P.C. és mtsai., 1995. Cellular Cholesterol Efflux Mediated by Cyclodextrins. *The Journal of biological chemistry*, 270(29), o.17250–17256.
- Kiss, T. és mtsai., 2010. Evaluation of the cytotoxicity of beta-cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40(4), o.376–380.
- Kurkov, S.V. & Loftsson, T., 2013. Cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics*, 453(1), o.167–180.
- Lambert, D., O'Neill, C.A. & Padfield, P.J., 2005. Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochemical Journal*, 387(Pt 2), o.553–560.
- Lennernäs, H., 1998. Human intestinal permeability. *Journal of pharmaceutical sciences*, 87(4), o.403–410.
- Lipinski, C.A. és mtsai., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), o.3–26.
- Loftsson, T. és mtsai., 2005. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 2(2), o.335–351.
- Loftsson, T. és mtsai., 2007. Effects of Cyclodextrins on Drug Delivery Through Biological Membranes. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(10), o.2532–2546.
- Loftsson, T., 2015. Excipient pharmacokinetics and profiling. *International journal of pharmaceutics*, 480(1-2), o.48–54.
- Loftsson, T. & Brewster, M.E., 2011. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 63(9), o.1119–1135.
- Loftsson, T., Másson, M. & Brewster, M.E., 2004. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93(5), o.1091–1099.
- Mahammad, S., Saleemulla, M. & Ingela, P., 2014. Cholesterol Depletion Using Methyl- β -cyclodextrin. In *Methods in Molecular Biology*. o. 91–102.
- Másson, M. és mtsai., 1999. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 59(1), o.107–118.
- Matilainen, L. és mtsai., 2008. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 126(1), o.10–16.
- Matsuda, H. & Arima, H., 1999. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 36(1), o.81–99.
- Matsuo, M. és mtsai., 2013. Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann–Pick Type C disease. *Molecular genetics and metabolism*, 108(1), o.76–81.

- Mura, P. & Paola, M., 2014. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 101, o.238–250.
- O' Neill, M.J. és mtsai., 2011. Mechanistic studies on the uptake and intracellular trafficking of novel cyclodextrin transfection complexes by intestinal epithelial cells. *International journal of pharmaceutics*, 413(1-2), o.174–183.
- Otta, K., 2014. Ciklodextrin téma múltja, jelene és jövője. Ciklodextrinek előállítása, tulajdonságai. *Cyclolab*. Available at: <http://cyclolab.hu/images/E-learning/bevezetes.pdf> [Elérés április 10, 2016].
- Ottinger, E.A. és mtsai., 2014. Collaborative development of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for the treatment of Niemann-Pick type C1 disease. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(3), o.330–339.
- Plazzo, A.P. és mtsai., 2012. Uptake of a fluorescent methyl- β -cyclodextrin via clathrin-dependent endocytosis. *Chemistry and physics of lipids*, 165(5), o.505–511.
- Puskás, I. és mtsai., 2012. Characterization and control of the aggregation behavior of cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 75(3-4), o.269–276.
- Rekharsky, M.V. és mtsai., 1997. Thermodynamic and Nuclear Magnetic Resonance Study of the Reactions of α - and β -Cyclodextrin with Acids, Aliphatic Amines, and Cyclic Alcohols. *The journal of physical chemistry. B*, 101(1), o.87–100.
- Rink, J. és mtsai., 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), o.735–749.
- Rosenbaum, A.I. és mtsai., 2010. Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(12), o.5477–5482.
- Sallusto, F. és mtsai., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), o.389–400.
- Sarkar, K. és mtsai., 2005. Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, 116(4), o.513–524.
- Sebestyén, Z., Szepesi, K. & Szabó, B., 2013. Pharmaceutical applications of sulfobutylether-beta-cyclodextrin. *Acta pharmaceutica Hungarica*, 83(2), o.57–67.
- Stella, V.J. & He, Q., 2008. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology*, 36(1), o.30–42.
- Swanson, J.A., Yirinec, B.D. & Silverstein, S.C., 1985. Phorbol esters and horseradish peroxidase stimulate pinocytosis and redirect the flow of pinocytosed fluid in macrophages. *The Journal of cell biology*, 100(3), o.851–859.
- Szejtli, J., 1998. Ciklodextrinek alkalmazása vegyipari termékekben és eljárásokban. *Magyar Kémikusok Lapja*, 53(6).
- Szejtli, J., 1990. Ciklodextrinek és zárványkomplexeik a biotechnológiában és a vegyiparban. *Magyar Kémikusok Lapja*, 45(34).

- Szejtli, J., 2004. Past, present and future of cyclodextrin research. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 76(10). Available at: <http://dx.doi.org/10.1351/pac200476101825>.
- Szejtli, J., 1997. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal of materials chemistry*, 7(4), o.575–587.
- Szejtli, J., Gerloczy, A. & Fonagy, A., 1980. Intestinal absorption of ¹⁴C-labelled betacyclodextrin in rats. *Arzneimittel-Forschung*, 30, o.808–810.
- Szente, L. és mtsai., 1999. Methyl-beta-cyclodextrin/paclitaxel aqueous solutions: a tool to test Cremophor-free paclitaxel. *STP Pharma Sciences*, 9(3), o.243–247.
- Szente, L., Szejtli, J. & Vikmon, A., 2001. Inclusion complexes of taxol or taxotere or taxus extract formed with cyclodextrins, its preparation and use. *US Patent*.
- Tilloy, S. és mtsai., 2006. Methylated beta-cyclodextrin as P-gp modulators for deliverance of doxorubicin across an in vitro model of blood-brain barrier. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(8), o.2154–2157.
- Vecsernyés, M. és mtsai., 2014. Cyclodextrins, blood-brain barrier, and treatment of neurological diseases. *Archives of medical research*, 45(8), o.711–729.
- Wei, H. és mtsai., 2011. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) based evidence for cell permeation by mono-4-(N-6-deoxy-6-amino- β -cyclodextrin)-7-nitrobenzofuran (NBD- β -CyD). *International journal of pharmaceutics*, 403(1-2), o.15–22.
- Yokoo, M. és mtsai., 2015. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PloS one*, 10(11), o.e0141946.
- Zuhorn, I.S., Kalicharan, R. & Hoekstra, D., 2002. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 277(20), o.18021–18028.

7/B. A jelölt saját közleményeinek ellenőrzött jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/138/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

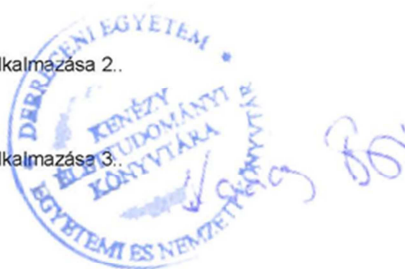
Jelölt: Réti-Nagy Katalin
Neptun kód: EUDID0
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036779

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Réti-Nagy, K.**, Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Vámosi, G., Váradi, J., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Róka, E., Vecsernyés, M., Balogh, G., Vasvári, G., Fenyvesi, F.: Endocytosis of fluorescent cyclodextrins by intestinal Caco-2 cells and its role in paclitaxel drug delivery. *Int. J. Pharm.* 496, 509-517, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.049>
IF:3.65 (2014)
2. Fenyvesi, F., **Réti-Nagy, K.**, Bacsó, Z., Gutay-Tóth, Z., Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Váradi, J., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Fluorescently Labeled Methyl-Beta-Cyclodextrin Enters Intestinal Epithelial Caco-2 Cells by Fluid-Phase Endocytosis. *PLoS One*. 9 (1), e84856, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084856>
IF:3.234

További Közlemények

3. **Szászné Réti-Nagy Katalin**, Fenyvesi F.: Ciklodextrinek alkalmazása 2.. *Gyógyszerészet*. 58, 568-570, 2014.
4. **Szászné Réti-Nagy Katalin**, Fenyvesi F.: Ciklodextrinek alkalmazása 3.. *Gyógyszerészet*. 58, 663-666, 2014.





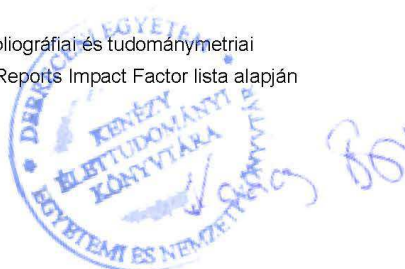
5. Szászné Réti-Nagy Katalin, Sohajda T., Forgó P., Váradi J., Vecsernyés M., Fenyvesi F.:
Ciklodextrinek alkalmazása 1..
Gyógyszerészet. 58, 468-472, 2014.
6. Ujhelyi, Z., Róka, E., Fenyvesi, F., Fehér, P., Váradi, J., **Réti-Nagy, K.**, Vecsernyés, M., Bácskay, I.:
Assessment of the hemolytic activity and cytotoxicity of different PEG-based solubilizing agents.
Pharmazie. 68, 383-384, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2013.2207>
IF:1.003
7. Fenyvesi, F., Pétervári, M., Nagy, L., Kéki, S., Zsuga, M., Bácskay, I., Kiss, T., Váradi, J., Fehér, P., Ujhelyi, Z., **Réti-Nagy, K.**, Vecsernyés, M.: Solubility increasing experiments of sylimarin with cyclodextrins.
J. Med. Aradean. 14 (2), 13-17, 2011.
8. Fehér, P., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., Váradi, J., Kiss, T., Ujhelyi, Z., **Nagy, K.**, Bácskay, I.:
Topical application of Sylibum Marianum extract.
J. Med. Aradean. 14, 5-8, 2011.
9. Ambrus, R., Pomázi, A., **Réti-Nagy, K.**, Fenyvesi, F., Vecsernyés, M., Szabó-Révész, P.:
Cytotoxicity testing of carrier-based microcomposites for DPI application.
Pharmazie. 66 (7), 549-550, 2011.
IF:1.006

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,893

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,884

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

Debrecen, 2016.06.03.



8. Tárgyszavak

β -ciklodextrin – β -cyclodextrin

endocitózis – endocytosis

β -ciklodextrin komplex – β -cyclodextrin complex

Caco-2 sejtek – Caco-2 cells

permeabilitás – permeability

sejtmembrán – cell membrane

paklitaxel – paclitaxel

hatóanyag felszívódás – drug absorption

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Fenyvesi Ferencnek** a hosszú éveken át tartó áldozatos munkáját, mellyel tudományos munkámat, pályafutásomat segítette. Hálás vagyok **Dr. Vecsernyés Miklósnak** tanszékvezetőként és korábbi témavezetőként nyújtott támogatásáért.

Köszönetet szeretnék mondani közvetlen kollégáimnak, akik alkalomadtán szintén sokat segítettek kutatómunkám kivitelezésében:

- **Dr. Bácskay Ildikó**
- **Dr. Váradi Judit**
- **Dr. Fehér Pálma**
- **Dr. Ujhelyi Zoltán**
- **Dr. Kiss Tímea**
- **dr. Róka Eszter**
- **dr. Vasvári Gábor**
- **Horányiné Körei Mária**

Köszönet illeti még az alább felsorolt kollégákat, akik segítségével jelen munkám nem lenne teljes:

- **Dr. Szabó Gábor, Dr. Bacsó Zsolt, Dr. Gutay-Tóth Zsuzsanna, Dr. Vámosi György** (DE Biofizika Intézet)
- **Dr. Sente Lajos, Dr. Fenyvesi Éva, Dr. Milo Malanga** (Cyclolab Kft.)
- **Dr. Balogh György** (Richer Gedeon nyRt.)
- **dr. Varga Renáta** (egykori TDK hallgató)