

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**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.

BÉTA-CIKLODEXTRIN SZÁRMAZÉKOK ÉS HATÓANYAGGAL KÉPZETT KOMPLEXEIK VIZSGÁLATA CACO-2 SEJTVONALON

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Szászné dr. Réti-Nagy Katalin
okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Regdon Géza, PhD
Dr. Antal István, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem GYTK, Hatástani Tanszék könyvtára (Elméleti Tömb V. emelet)
2016. december 1. 12 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Kvell Krisztián, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Antal István, PhD
Dr. Kvell Krisztián, PhD
Dr. Regdon Géza, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2016. december 1. 13 óra

Tartalomjegyzék

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései	4
1.1. Rövid bevezető	4
1.2. A ciklodextrinekről.....	4
1.3. Célkitűzések.....	7
2. Az értekezés új tudományos eredményei	8
3. Összefoglalás.....	12
4. Irodalomjegyzék.....	13
5. A jelöltnek az értekezés témájában született publikációi.....	17

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

1.1. Rövid bevezető

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). Egyre több új eredmény és felhasználási mód ismerhető meg, az új szabadalmak száma évente 600 körül mozog (Jicsinszky & Fenyvesi 2014).

A ciklodextrinek 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).

A β -ciklodextrinek a sejtbiológiai kutatásokban is alkalmazzák sejtmembránból történő koleszterin kivonásra (Kilsdonk és mtsai. 1995) és a koleszterin sejtfunkciókban betöltött szerepének a vizsgálatok (Mahammad és mtsai. 2014).

Néhány ciklodextrin cikkelye már régóta megtalálható az egyes gyógyszerkönyvekben (mint szolubilizáló és felszívódást fokozó segédanyagok), ám nemrégén 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 idegrendszeret 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 fejt 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.

1.2. A ciklodextrinekről

A ciklodextrinek részlegesen előhidrolizált keményítőtöbblől (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 (Szejtli 1990). A ciklodextrinek kémiai szerkezetük szerint három csoportra oszthatjuk: az α -ciklodextrinek 6-, a β -ciklodextrinek 7-, a γ -ciklodextrinek 8 glükopiranoz egységből állnak (Szejtli 2004). A ciklodextrinekben 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.

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 sajátága. Ipari méretben metilezett- (DIMEB, RAMEB), hidroxialkilezett- (HPBCD), szulfobutilezett- (SBE-CD), acetilezett- (acetil- γ CD) és elágazó (glükozil-, maltozil β CD) ciklodextrineket állítanak elő (Otta 2014).

A ciklodextrinek segédanyagként történő alkalmazását a komplexképzési tulajdonságain túl nagymértékben meghatározza biztonságosságuk. Toxikus hatásaik hátterében az áll, hogy a szervezetben élettanilag fontos lipofil sajátosságú 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 sajátágaik ismerete.

Számos különféle ok miatt (pl. ár, beszerezhetőség, a gyűrű méretei, stb.) a β -ciklodextrinek a leginkább elterjedtek. Ezekben a molekulákon 21 db olyan szabad hidroxilcsoport van, ahol különféle szubsztituensekkel sokféle, eltérő tulajdonságokkal rendelkező származékot képezhetünk. A legismertebb származékok között találjuk a metil- β -ciklodextrint és a 2-hidroxipropil- β -ciklodextrint (HPBCD), 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).

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. 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.

Általánosan elfogadott, hogy a ciklodextrinek megfelelő komplexstabilitás mellett fokozzák a hatóanyagok felszívódását, biológiai barrieréken 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 hidrophil ciklodextrin molekula penetrál a lipofil biológiai membránokba, mint például a bőr és a gasztrointesztinális nyálkahártya. Csak a szabad gyógyszer-molekula képes átjutni a lipofil membránokon, így a főlös mennyiségű ciklodextrin viszont (több mint a szolubilizáláshoz szükséges) csökkenti a gyógyszer-molekula penetrációját a membránon keresztül (Loftsson és mtsai. 2007). De van egy kivétel: a lipofil ciklodextrinek (mint a random-metilézett- β -ciklodextrin) bizonyos esetekben csökkentik a barrier funkciót, ezáltal növelik a gyógyszer-molekula transzportját a biológiai membránokon keresztül, mint amilyen az ornyálkahártya (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 vízréteggel magyarázható. A viszkózus nyálkahártyák egy relatíve vastag (ami több mint 100 μm is lehet), nem mozgó vízréteget kötnek meg a felszínükön (UWL-t, unstirred water layer - keveretlen vízréteg), például a gasztrointesztinális traktusban és a légzőrendszerben (Lennernäs 1998; Loftsson és mtsai. 2007). Egyes vizsgálatok arra utalnak, hogy a ciklodextrinek úgy növelik a permeációt, hogy átszállítják a gyógyszer-molekulákat ezen a vizes barrieren a biológiai membrán lipofil felszínéhez, ahol a gyógyszer-molekulák a komplexből a lipofil membránba vándorolnak (Loftsson és mtsai. 2005). Ám a hidrophil 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; Mászon és mtsai. 1999). A felszívódás növeléséhez szükséges egy minimális komplexáló képesség, ám a túlzott mértékű komplexáció csökkenti a gyógyszer-molekulák 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). Ezek a hatások is felelősek lehetnek azért, hogy a ciklodextrinek képesek más hatóanyag molekulák permeabilitását és felszívódását fokozni a bélrendszerben, Másrésztől 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. A ciklodextrinek kémiai szerkezete, hidrogén donorainak és akceptorainak száma, a relatíve nagy molekulatömege (> 1000 Da) és a hidrophilitása 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 ezen 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).

Habár a ciklodextrinek legtöbbször nem képesek a sejtmembránon keresztül diffundálni, 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 organellek 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 transzfekeziós 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).

1.3. Célkitűzések

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 transzfekeziós jelensége ismert a Caco-2 bélhámsejtek esetében (Artursson és mtsai. 2001). Szintén nem állt rendelkezésre információ a ciklodextrinek Caco-2 egysejtrétegen vizsgált permeabilitásáról.

A jelen kutatómunka első célja az volt, hogy megvizsgáljuk a fluoreszcensen jelölt random metil- β -ciklodextrin (FITC-RAMEB) permeabilitását Caco-2 sejtrétegen. A RAMEB a biológiai kutatásokban egyik leggyakrabban alkalmazott ciklodextrin, így elsőként ezt a származékot teszteltük feltevésünk igazolására. Miután előzetes eredményeink szerint a ciklodextrin bejut a sejtek citoplazmájába, tovább vizsgáltunk, hogy kiderítsük a sejtbe történő felvétel módját.

További célunk volt vizsgálatainkat kiterjeszteni más β -ciklodextrin származékokra is és tesztelni, hogy a FITC-HPBCD, a Rho-RAMEB és a FITC-BCDpolimer esetén is érvényes ez a jelenség. Végezetül meg kívántuk vizsgálni a ciklodextrinek viselkedését fluoreszcensen jelölt paklitaxel származékkal (Flutax-1) képzett komplex formájában is.

2. Az értekezés új tudományos eredményei

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 tanulmányoztuk. 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 -ciklodextrinéké 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 ciklodextrinre vonatkozó alacsony intesztinális abszorpciós adatokkal. Az átjutási sebességet kifejező látszólagos permeabilitási koefficiens (P_{app}) értékek az FR csoport (0,05 mM FITC-RAMEB) esetén $3,35 \pm 1,29 \times 10^{-8}$ cm/s, a FRR csoport (0,05 mM FITC-RAMEB + 5 mM RAMEB) esetén pedig $4,23 \pm 1,46 \times 10^{-8}$ cm/s. Ezek az adatok nagyságrendileg megegyeznek a szubsztituátlan 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 transzepitheliális elektromos ellenállás (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 kezelése 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 halmozódást az idő függvényében is, **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 ($2,28 \pm 0,346 \times 10^{-8}$ 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 majdnem átjárhatatlan barrier a ciklodextrinek számára, a sejtek képesek ezeket a molekulákat oldott állapotban felvenni a citoplazmájukba az egyszerű diffúziótól eltérő módon. Calu-3 sejteken végzett tanulmányok 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 sejttípusok 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. Eredményeink szerint **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 találhatóak 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 endocitózist 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 sejtmembránra (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 sejt felszínre (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 sejttípusokon 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-hidroxiopropil- 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 (Flutax-1) 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 hidrophil 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 hidrophil marad, mint a HPBCD és a RAMEB. Mindez

megegerősíti, 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.**

3. 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 vízdékonny 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 ciklodextrinokkal befolyásolt gyógyszerfelszívódás mechanizmusa további vizsgálatokat érdemes végezni.

4. Irodalomjegyzék

- 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.
- 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.
- Brewster, M.E. és mtsai., 2007. Effect of the unstirred water layer on permeability enhancement by hydrophilic cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics*, 342(1-2), o.250–253.
- Chen, F.W., Li, C. & Ioannou, Y.A., 2010. Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PloS one*, 5(11), o.e15054.
- Conner, S.D. & Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), o.37–44.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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., 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.

- 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.

5. A jelöltnek az értekezés témájában született publikációi



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

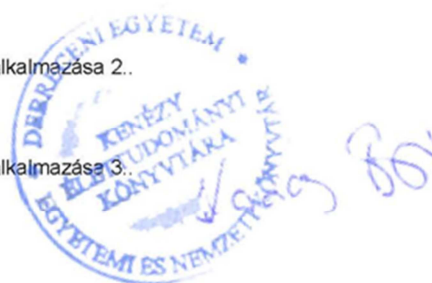
Jelölt: Réti-Nagy Katalin
Neptun kód: EUDIDO
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036779

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.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



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.

