

Porfirinek liposzómához való kötődésének optikai spektroszkópiai vizsgálata

Doktori tézisek

Veres Dániel Sándor

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



Témavezető: Dr. Herényi Levente egyetemi docens, Ph.D..

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy László egyetemi docens, Ph.D.,
Dr. Müllner Nándor egyetemi docens, Ph.D..

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Monos Emil professor emeritus, MTA doktora.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Solymosi Katalin egyetemi adjunktus, Ph.D.,
Dr. Vásárhelyi Barna tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2012

Bevezetés

Bár a fényérzékenyítés jelensége már több évszázada ismert, azonban az elmúlt években újabb virágzását éli a tudományterület az újabb terápiás lehetőségei miatt. Ezek közül is a legjelentősebb a klinikai gyakorlatban a porfirin típusú fényérzékenyítővel végzett fotodinamikus terápia (PDT). A PDT-t elsősorban sejtek pusztítására fejlesztették ki, ennek okán nagyjából tumorterápiára használják, azonban számos esetben nem daganatos betegségek kezelésére is alkalmazzák. A PDT során egy nem toxikus festéket – a fényérzékenyítőt (PS) – látható fényvel gerjesztjük, aminek hatására az nem sugárzásos átmenetek útján triplett állapotba kerül. Ebben az állapotban a PS nagy valószínűséggel reagál az oxigénnel, amelynek eredményeként reaktív oxigénszármazékok keletkeznek, így a folyamat a sejt pusztulásához vezet. Ezen kívül a PS-t jellemző fluoreszcenciája révén diagnosztikai céllal felhasználhatjuk daganatok helyének megállapítására is (ezt hívják fotodinamikus detektálásnak – PDD-nek). A fotodinamikus reakciókat felhasználhatjuk továbbá vírusok és egyéb mikroorganizmusok inaktiválására is.

A létrejövő fotodinamikus hatás szempontjából lényeges a célszövetben a PS sejtekhez való kötődése és sejtekbe való felvétele, valamint a keletkező szinglett oxigén mennyisége. A szinglett oxigén rövid élettartama és kis diffúziós távolsága miatt az elsődleges reakciók a PS közelében zajlanak le. Ezért kulcsfontosságú a PS sejtekhez való kötődésének erőssége és a sejten belüli elhelyezkedése. Ezt az elhelyezkedést befolyásolja mind a PS típusa, mind a PS lehetséges környezete.

A ma használt fényérzékenyítők többsége porfirinszármazék. Hidrofób, illetve amfifil tulajdonságuk miatt a sejt különböző membránjaihoz kötnek. Ezért lényeges a porfirinek sejtekhez való kötődésének, illetve a sejt membránstruktúráiban való eloszlásának a vizsgálata. Ezen információk alapján becsülhető a kiváltott fotodinamikus reakció hatékonysága, valamint az, hogy az adott PS mennyire lehet megfelelő a fotodinamikus terápia és detektálás szempontjából.

Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására széles körben alkalmazzák a liposzómákat, amik a sejtmembránok egyszerű modelljének tekinthetők. Számos tanulmányban fluoreszcens technikákat használtak a porfirin molekulák eloszlásának és a porfirin-környezet kölcsönhatásának vizsgálatára. Kutatták a PS-ek elhelyezkedését a lipidek szénláncai mentén is, és kimutatták, hogy a fotodinamikus hatást befolyásolja az, hogy a PS mennyire mélyen hatol a membránba.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy a PS, mint kromofór, és a membrán közötti kölcsönhatásokról gazdag információt nyújtanak a fényérzékenyítők optikai spektroszkópiai vizsgálatai. A hagyományos spektrumokban a hőmérséklet okozta homogén vonalkiszélesedésen túl a környezetben (esetünkben a membránban) meglévő kicsiny fluktuációk a kromofór környezeti inhomogenitásához vezetnek, amely a spektrális vonalak kiszélesedését okozza. A site-szelektív fluoreszcencia spektroszkópiák (mint például a fluorescence line narrowing – FLN) nagy felbontású módszerek, amelyek segítségével vizsgálható az inhomogén vonalkiszélesedés.

Célkitűzések

Munkám során különböző porfirin–liposzóma rendszereket – mint fényérzékenyítő–lipidmembrán modelleket – vizsgáltam optikai spektroszkópia módszerekkel. Kétfajta mezoporfirin – mezoporfirin IX dimetil észter (MPE) és mezoporfirin IX dihidroklorid (MPCl) – kötődésének erősségét és eloszlását tanulmányoztam háromféle – dimirisztoil-, dipalmitoil-, disztearoil-foszfatidilkolin (DMPC, DPPC, DSPC) – egykomponensű kis unilamelláris vezikula esetében (SUV). A következő célokat tűztem ki munkám során:

1. A mérésekhez megfelelően stabil, homogén és aggregátummentes modellrendszer létrehozása, amely alkalmazható az (alacsony hőmérsékletű) site-szelektív (FLN) mérésekhez is.
 2. A kötődési paraméterek meghatározása és összehasonlítása a különböző MP-SUV modellekben.
 3. A lehetséges eltérő kötőhelyek kimutatása hagyományos (szobahőmérsékletű) fluoreszcencia spektroszkópiai módszerrel.
 4. Annak a bemutatása, hogy az FLN technika alkalmazható fényérzékenyítő–lipidmembrán rendszer vizsgálatára.
- II.3. A „kvázi-FLN” technika alkalmazhatóságának vizsgálata.
- II.4. Az eltérő lipid-mikrokörnyezetek – kötőhelyek – kimutatása.
- II.5. AZ IDF-ek alapján molekuláris szintű értelmezés adása az eltérő kötőhelyek membránbeli elhelyezkedésére.

Anyagok és módszerek

MP-liposzóma minta készítése. A mezoporfirin IX dimetil észter (MPE) és a mezoporfirin IX dihidroklorid (MPCl) kb. 2 mM-os törzsoldatát DMF-ben oldva készítettem el. Az adott lipideket – dimirisztoil-, vagy dipalmitoil-, vagy disztearoil-foszfatidilkolint (DMPC, DPPC, DSPC) – kloroformban oldottam fel, majd ezt fokozatosan elpárologtattam. Ezt követte a kialakult lipidfilm hidrálása foszfátpufferrel (PBS, 7,4-es pH) az adott lipid fő fázisátalakulási (lipid-gél) hőmérsékleténél (T_m : DMPC: 24 °C; DPPC: 42 °C; DSPC: 55 °C) néhány fokkal magasabb hőmérsékleten. Az így kialakult egykomponensű, többrétegű liposzómákból (MLV) kis egyrétegű liposzómákat (SUV) készítettem ultrahangos és extrudációs módszerrel. A végső lipidkoncentráció kb. 15 mM volt. A porfirint szobahőmérsékleten ($RT \approx 22$ °C) adtam a liposzómákhoz.

A kötődési paraméterek számításához használt minták. A mintasorozat készítésekor a liposzóma koncentrációját $[L]$ adott tartományban változtattam, míg a mezoporfirin koncentrációja $[MP]$ (és a DMF-é) a mintákban állandó volt. Ezt követően 30 percig inkubáltam a mintát – ez alatt kialakul a rendszer dinamikus egyensúlya, amit az támaszt alá, hogy a spektrumokban nem történik változás 30 perces inkubációt követően.

A site-szelektív (FLN) mérésekhez használt minták. A frissen elkészített liposzóma törzsoldathoz adtam hozzá a MP törzsoldatot. A keverés és inkubációs idő (kb. 45 perc) után glicerint adtam hozzá 40% (v/v) végső arányban. A glicerin krioprotektív szerepe mellett biztosítja a minta átlátszóságát is az alacsony hőmérsékletű méréseknél. A mintában az MP végső koncentrációja kb. 20 μ M, a lipidkoncentráció kb. 7 mM volt. A spektroszkópiai méréshez a MP-liposzóma oldatot közvetlenül a minta összeállítása után alacsony hőmérsékletre (10 K) hűtöttem. A minták összeállításának minden fázisa, valamint a mérések után megmértem a liposzómák méreteloszlását dinamikusfényszórás-méréssel (DLS). Így ellenőrizhettem a liposzómák homogenitását, stabilitását, illetve az aggregátumok jelenlétét.

Dinamikusfényszórás-mérés (DLS). A fényszórás méréséhez használt berendezésben egy goniométer, egy szilárdtest lézer (457 nm), és egy érzékeny fénydetektor kapott helyet. A kiértékelő szoftver segítségével kapott autokorrelációs görbékből egy maximum entrópia módszer alapú illesztőszoftver segítségével kaptam meg az autokorrelációt alkotó komponensek relatív gyakoriságát. A liposzómák méret szerinti relatív gyakorisági eloszlását r^{-2} szerinti súlyozásával számítottam, ahol r a liposzóma hidrodinamikai sugara.

Szobahőmérsékletű fluoreszcencia spektroszkópia. A fluoreszcencia emissziós mérésekhez egy 0,5 nm spektrális felbontású luminométert használtam. A mintákat 22 °C-ra beállított szabályozható hőmérsékletű mintatartóban rögzítettem. A gerjesztést a Soret-sáv maximumánál (397 nm) végeztem, az emissziós spektrumokat pedig a 600–640 nm-es tartományban 0,5 nm-es lépésközzel rögzítettem.

FLN spektroszkópia. A módszer alapjait a következőkben foglalnám össze. A szobahőmérsékletéről gyorsan kriogenikus hőmérsékletre lehűtött mintákon mérjük a fluoreszcencia emissziós spektrumokat, ezzel elérve, hogy a szobahőmérsékletű mintákban levő eloszlások befagynak. Így a szobahőmérsékletű minta egy „pillanatképét” vizsgálhatjuk. A „site” a kromofór (közel fluktuációk nélküli) adott molekuláris környezetét jelenti, ugyanakkor ennek a környezetnek megfelelő elektronátmeneti energiát is jelöli (amit az adott hullámhosszal jellemezünk). Keskeny sáv szélességű gerjesztést használva a megfelelő molekulákat egyszerre, de szelektíven gerjeszthetjük. Ez a (a megfelelő átmenet energiájú) kromofór-alpopuláció egy adott környezetben van – egy adott „site”-hoz tartozik. A szelektív gerjesztés következtében a fluoreszcencia emissziós spektrumban a rezonáns gerjesztés miatt keskeny vonalakat kapunk, amelyek ráülnek a rezonancián kívüli gerjesztésből (fonon csatolásból) származó szélesebb sávokra. A keskeny vonalak fluoreszcencia intenzitása arányos az adott frekvencián (ν) szelektíven gerjesztett molekulák számával (N). Az $N(\nu)$ függvény alapján kapjuk meg az úgynevezett inhomogén eloszlásfüggvényt (IDF), amely jellemzi az inhomogén környezetet.

Az FLN méréseket három különböző eszköz segítségével végeztem (L1 és L2a, L2b). Az L1-es rendszer spektrális felbontása a gerjesztési és emissziós oldalon egyaránt 0,1 nm. Ebben nagy felbontású spektrométerben a gerjesztő fényforrás egy hangolható festéklézer volt, amelyet egy folytonos üzemmódú argon-ion lézer pumpált. A kapott IDF-ek viszonylag szélesek voltak, valamint a festéklézer kromofórja csak egy adott tartományban gerjeszthető, ezért próbáltam ki az L2 luminométereket, amelyeknek a spektrális felbontása mindkét oldalon 0,5 nm. A kisebb felbontás miatt a módszert „kvázi-FLN”-nek neveztem. Az L2-es luminométerek alkalmazhatóságát az L1 és L2a luminométerrel mért IDF-ek összehasonlítása alapján ítélt meg. A méréseket zárt rendszerű, hőmérsékletvezérelt héliumos kriosztátban 10 ± 1 K-en végeztem. A minták mindegyikénél az emissziós spektrumsorozatokat 600 és 640 nm között, 0,1 nm, illetve 0,5 nm-es lépésközzel vettem fel, a gerjesztési hullámhosszat 1 nm-enként 555 és 585 nm között változtatva. A rögzített spektrumokból határoztam meg az inhomogén eloszlásfüggvényeket (IDF-eket).

Eredmények

A minták stabilitásának, homogenitásának, optikai spektroszkópia mérésekhez való felhasználhatóságának vizsgálata. A liposzómák hidrodinamikai sugár szerinti gyakorisági eloszlása lognormál eloszlást követ. A minta átlagos liposzómanagyságát a sugár szerinti eloszlás módusával jellemeztem. A felhasznált minták eloszlása homogén – egy csúcsú – volt. Az UH technikával készült liposzómák átlagos nagysága. DMPC esetén 12 nm, DPPC-nél 18 nm, míg DSPC-nél 22 nm volt átlagosan. Az extrudációs módszerrel készült liposzómáknál ez közel azonos volt (24 nm). Az UH technikával készített mintákban a sugáreloszlás módusza az adott lipidösszetételre jellemző átlagos liposzómamérettől legfeljebb 1,5 nm-re tért el, míg az extrudált mintáknál ez az eltérés maximum 2,5 nm. Az eloszlások félértékszélessége az ultrahanggal készített liposzómák esetén 4,5–11,5 nm, míg az extrudáltaknál 4–8 nm között mozgott. A mérések során a liposzómákhoz adott DMF-ben oldott porfirin a liposzóma-eloszlásban – a megnövekvő viszkozitással való korrekció után – nem okozott számottevő eltérést még a porfirint tartalmazó minta szobahőmérsékletű mérése után sem (a módusz és a görbe félértékszélessége legfeljebb 2, illetve 4,5 nm-rel nőtt). Az alacsony hőmérsékletű mérésekhez a mintához *glicerint* is kellett adni. Ennek hatására a liposzómaeloszlás jellege továbbra sem változott, a módusza legfeljebb még 1 nm-rel, míg a félértékszélessége legfeljebb 2 nm-rel tért el. A kriogenikus mérés, majd utána a felmelegítés hatására sem változott meg az eloszlás.

A kriogenikus hőmérsékletre hűtött különböző térfogatszázaléknyi glicerint tartalmazó minták átlátszóságát vizsgálva (saját szemmel) arra jutottam, hogy a legalább 35% (v/v) glicerint tartalmazó minták voltak átlátszóak. Lényeges kérdés azonban az is, hogy a glicerin hozzáadása megváltoztatja-e az MP kötődését a liposzómába. Erre szobahőmérsékletű fluoreszcencia spektrumok felvétele alapján következtettem. Az ugyanolyan MP (és DMF) koncentrációjú MP–SUV és MP–SUV–glicerin minta spektruma nem tér el egymástól, ezzel szemben a liposzómát nem, de 40% glicerint tartalmazó minta spektruma eltér ezektől.

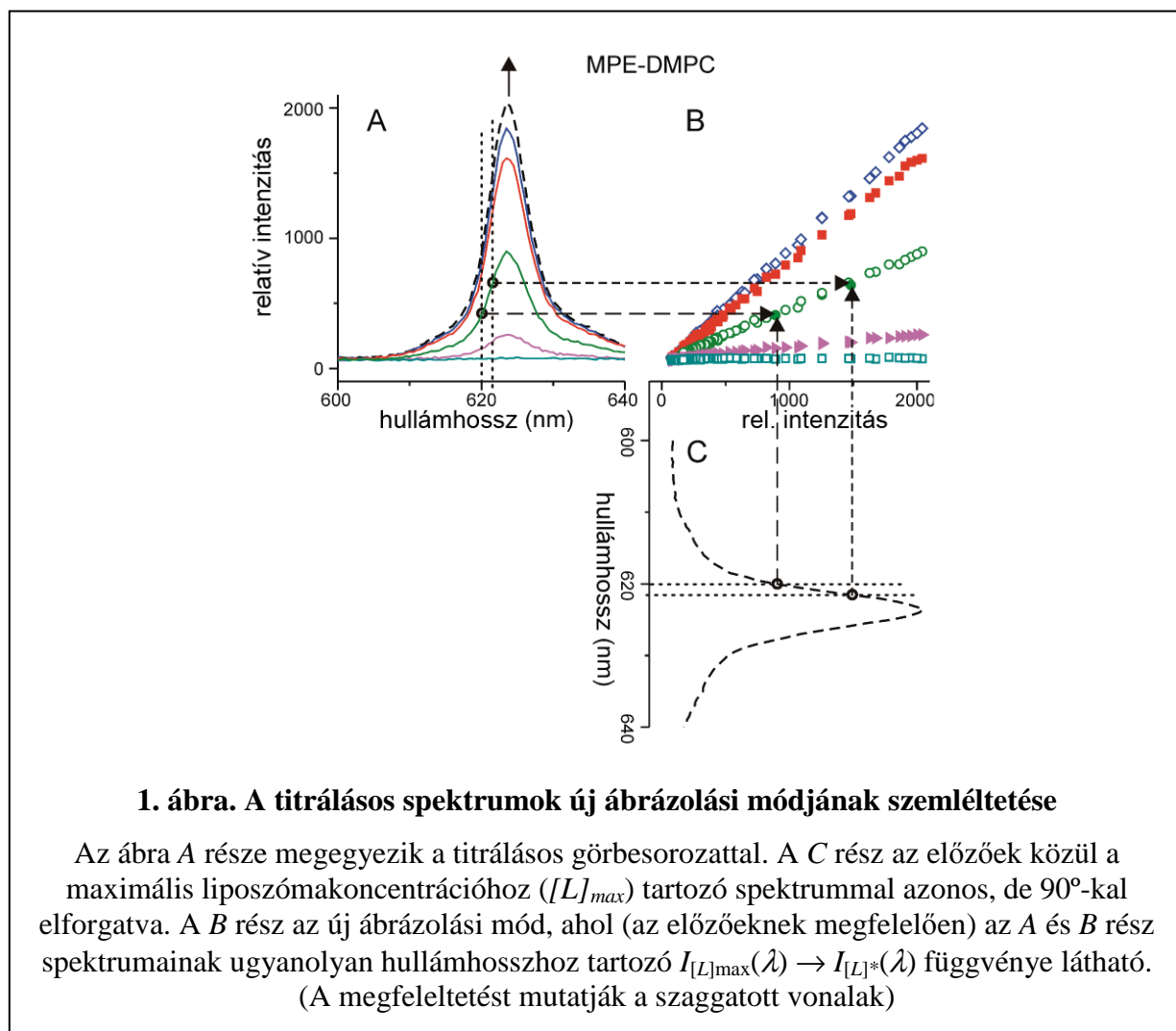
A szobahőmérsékletű méréseknél olyan kis koncentrációban adtam porfirint a mintákhoz, hogy a liposzómát nem tartalmazó mintában sem volt detektálható (DLS-sel) a PBS pufferhez képest nagyobb fényszórás. Az FLN méréseket különböző (a telítési koncentráció alatt és felett kevéssel) porfirinkoncentrációval, de azonos lipidkoncentrációval elvégezve azt találtam, hogy a kötődött porfirinnek megfelelő felbontott spektrumban nincs változás, míg a feltehetően kisebb aggregátumokat tartalmazó, nem kötődött porfirinnek

megfelelő, FLN-nel fel nem bontható spektrumszakaszban eltérést kaptam (ami azonban az FLN mérést nem zavarja).

A kötődési paraméterek meghatározása, a lehetséges eltérő kötőhelyek kimutatása szobahőmérsékletű fluoreszcencia spektroszkópiai módszerrel. A porfirinek kötődési paramétereinek meghatározására a reverzibilis egyensúlyi folyamatra felírt tömeghatás törvényéből indultam ki, amelyből a következő, a kötődési görbe illesztésénél felhasznált egyenlethez jutottam:

$$[MP]_b = \frac{1}{2} \left\{ n \cdot [L] + [MP] + K_d - \sqrt{(n \cdot [L] + [MP] + K_d)^2 - 4 \cdot n \cdot [L] \cdot [MP]} \right\},$$

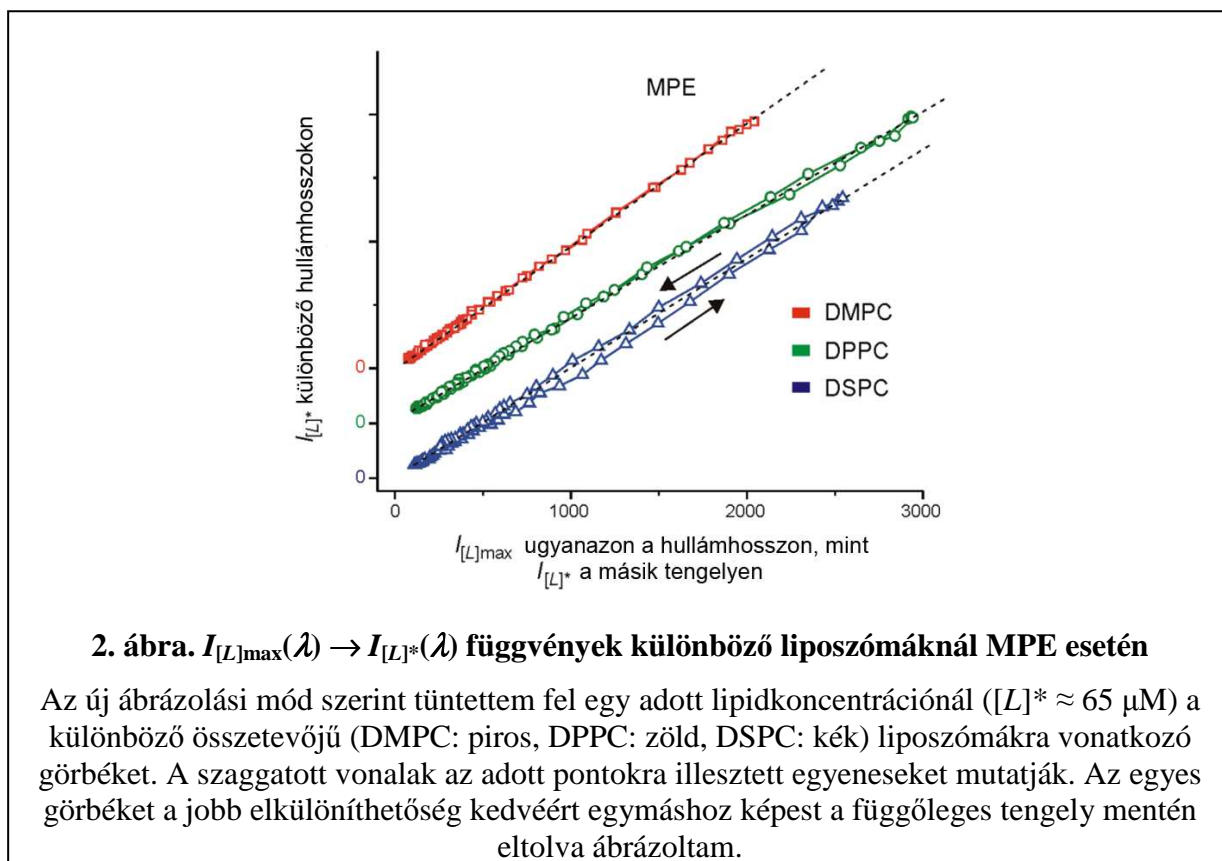
ahol n megadja egy lipidmolekulára eső lehetséges „porfirinkötőhelyek” számát $[L]$ az adott lipidkoncentráció, $[MP]$ a bemért, $[MP]_b$ a kötött porfirinek száma, K_d pedig a disszociációs állandó. Az $[MP]_b$ fluoreszcencia intenzitás alapján való becslésére egy pontosabb és nagyobb információtartalmú új kiértékelési és ábrázolási módot használtam, amely során az adott lipidkoncentrációhoz ($[L]^*$) tartozó fluoreszcencia intenzitásfüggvényeket a maximális lipidkoncentrációhoz ($[L]_{max}$) tartozó intenzitásfüggvény függvényeként használtam (1. ábra).



1. ábra. A titrálós spektrumok új ábrázolási módjának szemléltetése

Az ábra A része megegyezik a titrálós görbesorozattal. A C rész az előzőek közül a maximális liposzómakoncentrációhoz ($[L]_{max}$) tartozó spektrummal azonos, de 90°-kal elforgatva. A B rész az új ábrázolási mód, ahol (az előzőeknek megfelelően) az A és B rész spektrumainak ugyanolyan hullámhosszhoz tartozó $I_{[L]_{max}}(\lambda) \rightarrow I_{[L]^*}(\lambda)$ függvénye látható. (A megfeleltetést mutatják a szaggatott vonalak)

A **2. ábrán** jól látható, hogy ebben az ábrázolási módban a DSPC esetében az adatok egy *hurkot* képeznek, eltérve az illesztett egyenestől. (Hasonló gyanú felmerül a DPPC esetében is, de a DMPC esetén ez soha nem látszott.) Ez úgy magyarázható, hogy feltételezünk két eltérő, egymástól független „kötőhelyet” a liposzómákban. Ez természetesen kétféle kötődési állandót eredményez. Azonban ezen ábrázolás alapján sincs olyan paraméter, amivel a kötőhelyeket kvantitívan külön jellemezhetnénk, azonban a klasszikus kötődési görbe ábrázolásával még ilyen elkülönítésre sincs mód. Ezért a K_d meghatározásánál úgy jártam el, hogy a hurkoknak megfelelő egyenes meredekségét használtam fel az $[MP]_b$ becslésekor.



A kapott kötődési paramétereket az 1. táblázatban tüntettem fel.

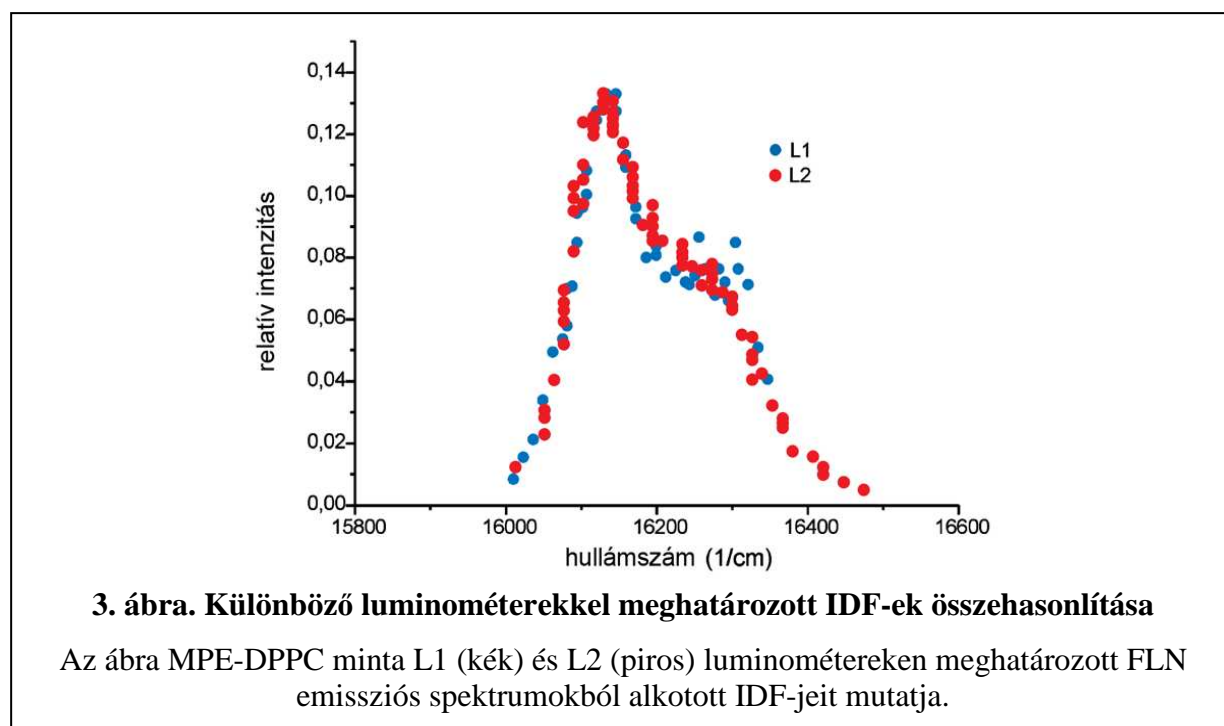
1. táblázat. A számított kötődési paraméterek

n : az egy lipidmolekulára eső lehetséges porfirinkötőhelyek száma, K_d : a disszociációs állandó, K_b : a kötődési állandó ($K_b = n/K_d$)

	DMPC [14]		DPPC [16]		DSPC [18]	
	MPE	MPCI	MPE	MPCI	MPE	MPCI
n	0,0083	0,0037	0,0044	0,0026	0,0079	0,0038
K_d (nM)	30 ± 10	52 ± 16	28 ± 7	53 ± 13	33 ± 9	15 ± 4
K_b (M^{-1})	$2,8 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$

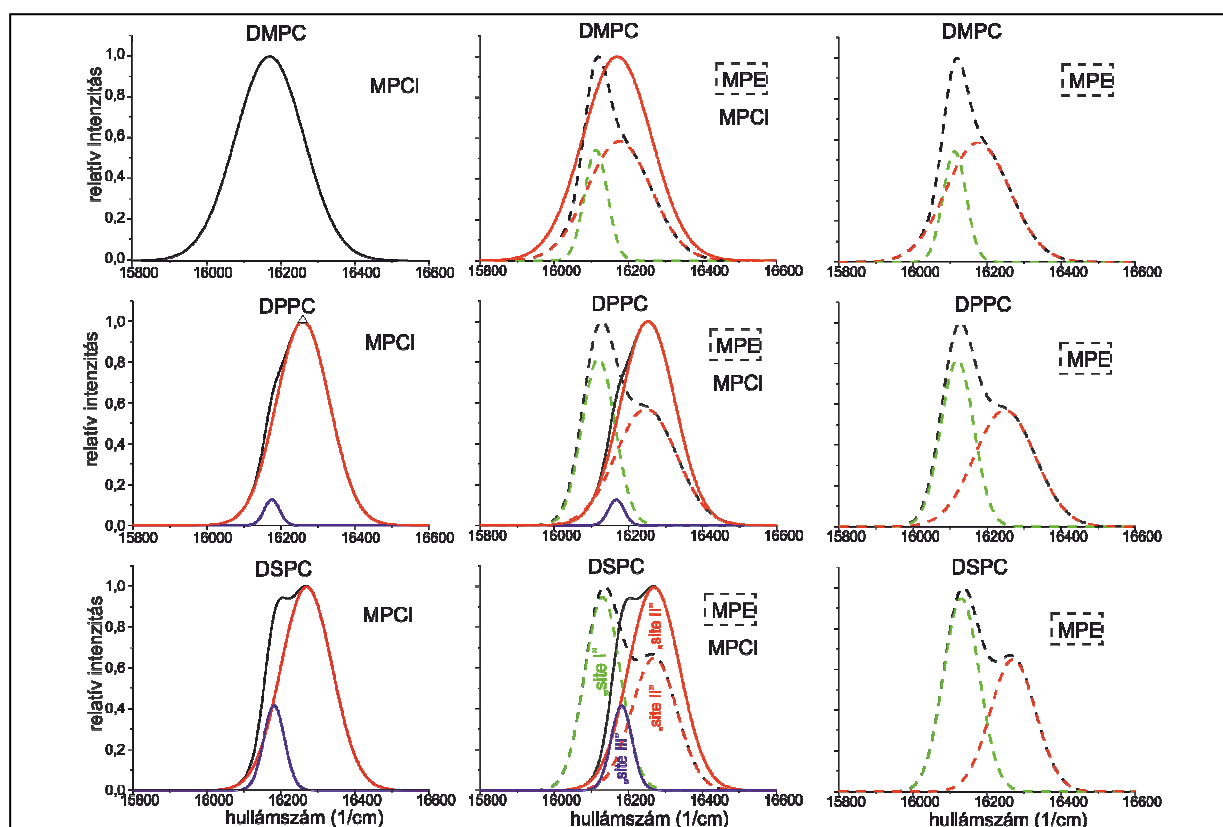
Az FLN, „kvázi-FLN” módszerek. Az IDF előállításának alapja az adott környezetnek megfelelő átmeneti energiával rendelkező molekulák relatív számának meghatározása, ami az emittált fény intenzitásával arányos. Az IDF-eket úgy állítottam elő, hogy a gerjesztési frekvenciát (energiát) egy adott tartományban változtatva a gerjesztéssel azonos mértékben tolódó megfelelő emissziós csúcsok intenzitásváltozását követtem nyomon. A különböző vibronikus átmeneteknek megfelelő emissziós csúcssorozatok ugyanazt az eloszlást írják le, de eltérő abszorpciós átmeneti valószínűségeik miatt egy konstans szorzó eltéréssel. Ezt súlyfaktorként figyelembe véve több emissziós csúcssorozat együttesével kapjuk meg az IDF-et a különböző rendszerekben.

Az MPE-DDPC mintán összehasonlítottam az L1-es és L2a luminométerekkel kapott IDF-eket. A 3. ábrán látható, hogy ezeknek az IDF-eknek az eltérése kicsi volt. (A további mintákon ezért csak az L2 luminométerekkel mértem.)



Az FLN mérések eredményeként kapott IDF-ekre illesztett Gauss-görbék jellemzik az eltérő környezeteket, „site”-okat, azaz porfirin kötőhelyeket. A különböző MP-liposzóma rendszerekben az IDF-ek az esetek többségében nem egynemű környezetet, azaz nem egy Gauss-görbével leírható eloszlást mutatnak. A kapott IDF-eket ezért több Gauss-görbe összegére bontottam. Az IDF-eket és az ezekre illesztett Gauss-görbéket mutatja a 4. ábra.

A Gauss-görbék különböző paraméterei a következő információt nyújtják. A görbék *középértékei* a nagyobb változást, azaz a térben elválasztott kötőhelyeket jellemzi, a görbe *félértékszélessége* az adott „site” mikrokörnyezeti változékonyságára utal, míg a *görbe alatti terület* az adott hely molekulapopulációjának számbeli nagyságát reprezentálja. A Gauss-görbék középértékei alapján három eltérő kötőhelyet találtam, ezeket neveztem „site I, II, III”-nak. A kötőhelyeket jellemző Gauss-görbék paraméterei, valamint az adott liposzómára jellemző fázisátalakulási hőmérséklet (ebből következően a membrán rendezettség) ismeretében következtethetünk a kötőhelyek molekuláris elhelyezkedésére.



4. ábra. Az inhomogén eloszlásfüggvények és az ezekre illesztett Gauss-görbék a kétféle MP esetén a különböző összetételű liposzómákban

Az ábra bal oldalán az MPC1, a jobb oldalon az MPE, míg középen összehasonlítás céljából mindkét MP IDF-jei és az azokra illesztett Gauss-görbék láthatók. A folytonos vonalak az MPC1, míg a szaggatottak az MPE mintákat jelölik. A fekete vonalak az IDF-eket mutatják. Az illesztett Gauss-görbék a „site”-ok szerint vannak színezve: a zöld a „site I”-nek, a piros a „site II”-nek, a kék a „site III”-nak felel meg. A középső alsó ábrán ezt feliratok is jelölik.

Következtetések és új tudományos eredmények

Munkám során főként spektroszkópai módszerek segítségével vizsgáltam fényérzékenyítő–lipidmembrán modelleket. A mérések egy részénél felhasznált FLN technika előnye, hogy a jelet maga a vizsgálandó molekula és nem más, a rendszerhez adott jelölő szolgáltatja. A mérés során az összes molekula részt vesz a spektrum létrehozásában, így a teljes sokaságot jellemezhetjük. Az elvégzett mérések kiértékelésére és elemzésére alapozva a következő megállapításokat teszem:

1. A fluoreszcencia mérésekhez készített különböző összetételű liposzómák homogén eloszlásúak és megfelelően stabilak voltak. Ezt a homogenitást és stabilitást megtartották DMF és MP és glicerín hozzáadására, valamint a spektroszkópai mérések elvégzése után is. A glicerín tartalmú modellrendszer megtartotta mezoporfirintartalmát. Megállapítottam, hogy a vizsgált fluoreszcens jelet a porfirinek monomer formája adta. Ezért a minták alkalmasak voltak a különböző fluoreszcencia spektroszkópai módszerekkel végzett vizsgálatokra.

2. A szobahőmérsékletű fluoreszcencia mérések eredményéből a tömeghatás törvényére alapozott számítások révén mindegyik MP–SUV rendszer esetén meghatározható az (átlagos) lehetséges kötőhelyek száma, valamint a kötődés erősségét jellemző (átlagos) disszociációs, illetve (átlagos) kötődési állandó. A különböző összetételű minták összehasonlításából arra következtethetünk, hogy az MPE esetén nagyobb a lehetséges kötőhelyek száma és erősebb a kötődés a liposzómákhoz, mint az MPCI-nél.

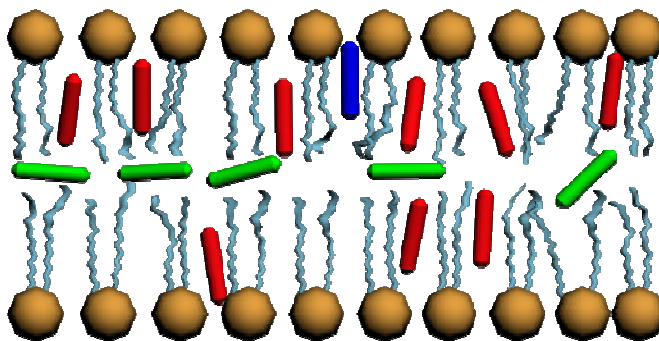
3. Egy új ábrázolási mód ($I_{[L]_{\max}}(\lambda) \rightarrow I_{[L]}(\lambda)$ függvények) segítségével az MPE–DPPC és MPE–DSPC mintákon sikerült kimutatnom eltérő kötőhelyek létezését. A kötőhelyek kvantitatív jellemzése és elkülönítése azonban ennek alapján nem lehetséges.

4. A spektrumok felbontásával és az IDF-ek megalkotásával, valamint megmutatva, hogy a mintákban az MP-knek csak egy állapota van jelen, igazoltam, hogy a kromofórt körülvevő lipidkörnyezet inhomegenitásai kimutathatók az FLN technikákkal. Ezekből arra következtethetünk, hogy az FLN módszer alkalmas lehet más kromofór–lipidmembrán rendszer vizsgálatára is.

5. Megmutattam az azonos IDF-ek alapján, hogy az egyszerűbb „kvázi-FLN” módszer is alkalmas lehet a fényérzékenyítő–membránmodell vizsgálatára.

6. A létrehozott IDF-ek és az ezekre illeszthető Gauss-görbék alapján egyértelműen kimutattam különböző kötőhelyek jelenlétét.

7. Az eltérő MP–SUV rendszerek IDF-jeire illesztett Gauss-görbék paramétereinek változása alapján azonosítani tudtam az MP-k kötőhelyeinek elhelyezkedését a membránon belül. Az MPE esetén a porfirinek részben a két lipidmolekula-réteg között helyezkednek el, részben a membránban mélyen a lipidek szénhidrátláncával párhuzamosan. Az MPCl esetén a porfirinek nagyobb része a membránban mélyen a lipidek zsírsavdalláncával párhuzamosan található, míg kis hányada a membránban a lipidek fejcsoportjánál helyezkedik el. Ezt szemléltetem az **5., sematikus ábrán**.



5. ábra. A porfirinek membránbeli elhelyezkedésének sematikus ábrája

A „site I”-nek megfelelő MP populációt zöld, a „site II”-t piros, míg a „site III”-t kék színű hengerekkel jelöltem.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Herenyi, L., **Veres, D.**, Békási, S., Voszka, I., Módos, K., Csík, G., Kaposi, A. D., Fidy, J.
Location of mesoporphyrin in liposomes determined by site-selective fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B*. 2009, 113:7716-24.

Veres, D., Böcskei-Antal, B., Voszka, I., Módos, K., Csík, G., Kaposi, A. D., Fidy, J.
Herenyi, L. Comparison of binding ability and location of two mesoporphyrin derivatives in liposomes explored with conventional and site-selective fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B*. 2012, 116: 9644-52.