

# Porfirinek liposzómához való kötődésének optikai spektroszkópiai vizsgálata

Doktori értekezés

**Veres Dániel Sándor**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



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

*A kutatás alapvázát az okfejtés, a mérés  
és a számolás fonalaiból szőtt álmok  
képezik.*

*(Szent-Györgyi Albert)*

## Tartalomjegyzék

<b>TARTALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>1</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK ÉS JELÖLÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>3</b>
<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>5</b>
<i>1.1. A FOTODINAMIKUS TERÁPIA ÉS FOTODINAMIKUS DETEKTÁLÁS ORVOSI FELHASZNÁLÁSI LEHETŐSÉGEI .....</i>	<i>5</i>
1.1.1. A PDT és PDD előzményei .....	6
1.1.2. A PDT orvosi indikációi .....	6
<i>1.2. A PDT ÉS PDD MECHANIZMUSA .....</i>	<i>7</i>
<i>1.3. PDT ÉS PDD MODELL .....</i>	<i>10</i>
1.3.1. Porfirinek, mint fényérzékenyítők .....	11
1.3.2. Liposzómák, mint membránmodellek .....	13
<i>1.4. FÉNYÉRZÉKENYÍTŐ–MEMBRÁNMODELL RENDSZEREK VIZSGÁLATA OPTIKAI MÓDSZEREKKEL .....</i>	<i>14</i>
1.4.1. A Rayleigh-fényszórás .....	14
1.4.2. A fény abszorpciója, a molekulák energianívó-rendszere .....	15
1.4.3. Fluoreszcencia spektroszkópia .....	17
1.4.4. Homogén és inhomogén vonalkiszélesedés .....	19
1.4.5. Energiaszelektív optikai spektroszkópiai módszerek .....	23
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MÓDSZEREK .....</b>	<b>26</b>
<i>3.1. MINTAKÉSZÍTÉS .....</i>	<i>26</i>
3.1.1. Felhasznált anyagok .....	26
3.1.2. Liposzómák előállítása .....	27
3.1.3. Liposzóma–porfirin minta előállítása .....	28
3.1.3.1. Liposzóma–porfirin minta a kötődési paraméterek meghatározására ...	29
3.1.3.2. Liposzóma–porfirin minta az alacsony hőmérsékletű mérésekben .....	29
<i>3.2. MÉRÉSI MÓDSZEREK .....</i>	<i>30</i>
3.2.1. Fényszórásmérés .....	30
3.2.2. Abszorpciós spektrofotometria .....	31
3.2.3. Szobahőmérsékletű fluoreszcencia spektroszkópia, kötődési paraméterek meghatározása .....	31
3.2.4. Alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia mérések .....	33
3.2.4.1. FLN mérések néhány jellegzetessége .....	34
<b>4. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>41</b>
<i>4.1. DINAMIKUSFÉNYSZÓRÁS-MÉRÉSEKBŐL NYERT INFORMÁCIÓK .....</i>	<i>41</i>
4.1.1. A minták épségének ellenőrzése dinamikusfényeszórás-méréssel .....	41
4.1.2. Liposzómák lipidtartalmának és a minták liposzómakoncentrációjának becslése .....	44
<i>4.2. KÖTÖDÉSI PARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA .....</i>	<i>44</i>
4.2.1. Az MPE kötődési paramétereinek meghatározása .....	46
4.2.2. Az MPCl kötődési paramétereinek meghatározása .....	50

4.2.2. Az MPCl kötődési paramétereinek meghatározása.....	51
4.3. ALACSONY HŐMÉRSÉKLETŰ FLUORESZCENCIA MÉRÉSEK.....	53
4.3.1. A modellrendszer FLN technikával való vizsgálhatóságának feltételei.....	53
4.3.2. Az inhomogén eloszlásfüggvény (IDF) meghatározása.....	56
4.3.3. Az különböző luminométerek összehasonlítása, a „kvázi-FLN” technika...	59
4.3.4. Az inhomogén eloszlásfüggvények és illesztésük.....	62
<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>64</b>
5.1. A KÖTŐDÉSRE VONATKOZÓ SZOBAHŐMÉRSÉKLETŰ FLUORESZCENCIA MÉRÉSEK INFORMÁCIÓTARTALMA .....	64
5.2. AZ IDF-RE ILLESZTETT GAUSS-GÖRBÉK INFORMÁCIÓTARTALMA.....	65
5.3. AZ N KÖTŐDÉSI PARAMÉTER ÉS A KÖTŐHELYRE JELLEMZŐ GÖRBE ALATTI TERÜLET ÖSSZEVETÉSE.....	66
5.4. AZ MP KÖTŐHELYEK MOLEKULÁRIS SZINTŰ ÉRTELMEZÉSE .....	66
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>70</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>72</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>73</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>74</b>
<b>10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....</b>	<b>81</b>
<b>11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>82</b>

## Rövidítések és jelölések jegyzéke

Rövidítés, jelölés	Feloldás angolul	Feloldás magyarul
CDF	<i>cumulative distribution function</i>	kumulatív eloszlásfüggvény
DALA	<i>delta-aminolevulinic acid</i>	delta-aminolevulinát
DLS	<i>dynamic light scattering</i>	dinamikus fényszórás
DMF	<i>dimethylformamide</i>	dimetilformamid
DMPC	<i>dimyristoyl-phosphatidylcholine</i>	dimirisztoil-foszfatidilkolin
DPPC	<i>dipalmitoyl-phosphatidylcholine</i>	dipalmitoil-foszfatidilkolin
DSPC	<i>distearoyl-phosphatidylcholine</i>	disztearoil-foszfatidilkolin
DSPC HT	<i>distearoyl-phosphatidylcholine at higher teperature</i>	disztearoil-foszfatidilkolin magasabb hőmérsékleten
FLN	<i>fluorescence „line narrowing”</i>	energiaszelektív gerjesztésű fluoreszcencia
IC	<i>internal conversion</i>	belső konverzió
IDF	<i>inhomogeneous distribution function</i>	inhomogén eloszlásfüggvény
ISC	<i>intersystem crossing</i>	rendszerek közötti átmenet
$K_b$	<i>binding constant</i>	kötődési állandó
$K_d$	<i>dissociation constant</i>	disszociációs állandó
$\lambda$	<i>wavelength</i>	hullámhossz
[L]	<i>concentration of the lipids</i>	lipidkoncentráció
MLV	<i>multilamellar vesicle</i>	többrétegű liposzóma
MP	<i>mesoporphyrin IX</i>	mezoporfirin IX
[MP]	<i>concentration of the mesoporphyrins</i>	mezoporfirinkoncentráció
$MP_b$	<i>bounded mesopophyrin</i>	„kötött” állapotú mezoporfirin
MPCl	<i>mesoporphyrin IX dihydrochloride</i>	mezoporfirin IX dihidroklorid
MPE	<i>mesoporphyrin IX dimethyl ester</i>	mezoporfirin IX dimetil észter
$\nu$	<i>wavenumber</i>	hullámszám
OD	<i>optical density</i>	optikai denzitás
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	foszfátpuffer
PDD	<i>photodynamic detection</i>	fotodinamikus detektálás
PDT	<i>photodynamic therapy</i>	fotodinamikus terápia
PS	<i>photosensitizer</i>	fényérzékenyítő
PW	<i>phonon wing</i>	fonon szárny
SDF	<i>spectral density function</i>	spektrális sűrűségfüggvény

$S_{el}$ ( $el=1,2,\dots$ )	<i>singlet state</i>	szingulett állapot
SHB	<i>spectral „hole burning”</i>	spektrális „lyukégetés”
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i>	kis egyrétegű liposzóma
$T_{el}$ ( $el=1,2,\dots$ )	<i>triplet state</i>	triplett állapot
$T_m$	<i>main transition temperature</i>	fő fázisátalakulási hőmérséklet
$T_p$	<i>pretransition temperature</i>	elő-fázisátalakulási hőmérséklet
UH	<i>ultrasonic</i>	ultrahang
ZPL	<i>zero-phonon line</i>	zérófonon-vonal

## 1. Bevezetés

A korszerű orvosi gyakorlatban egyre szélesebb körben alkalmazzák a fotokémiai hatáson alapuló eljárásokat, amelyek során az arra alkalmas molekula a fényt elnyelve hozhatja létre a megfelelő biológiai hatást.

A *fotobiológiai eredmény* kialakulásának feltétele mind a *fény elnyelése (fény abszorpciója)*, mind a *fotokémiai reakció*, amelyek így döntő jelentőségűek. Az első esemény egy fotofizikai folyamat, amelyben a megfelelő hullámhosszúságú fény megvilágít egy, a fény abszorpciójára képes molekulát vagy atomot. Így létrejöhet az abszorpció, amelynek következménye a nagyobb energiájú gerjesztett állapot. Ez vezethet a terápia szempontjából legfontosabb fotokémiai reakcióhoz, illetve a diagnosztikus szempontból lényeges *fénykibocsátáshoz (fényemisszióhoz)*.

Számos betegség kezelésében használhatjuk ki ezt a folyamatot, ezért alapjainak megismerése kulcsfontosságú lehet a hatékony terápia kidolgozásához. Ezáltal igény merül fel arra, hogy ezeket a mechanizmusokat molekuláris szinten megismerjük, amiben gazdag információtartalmuk miatt fontos szerepet kapnak az abszorbeáló és emittáló molekulák *optikai spektroszkópiai* vizsgálatai.

### 1.1. A fotodinamikus terápia és fotodinamikus detektálás orvosi felhasználási lehetőségei

A fotokémiai reakcióknak két nagy típusát különíthetjük el: a *direkt* és *indirekt reakciót*. Az előbbi során maga a fényt abszorbeáló molekula alakul át, illetve új kötések kialakításában vesz részt. Ilyen folyamat például a vízben rosszul oldódó bilirubin átalakítása kék fény segítségével hidrofil lumirubinná, amely az újszülöttkori sárgaság kezelésében használható. A másik típus az *indirekt reakció* – ezt a folyamatot a tudomány *fotoszenzibilizációnak, fényérzékenyítésnek* nevezi. Ennek során az abszorbens molekula – azaz a fényérzékenyítő (PS) – elektron vagy energia átadásában játszik szerepet – a biológiailag fontos változás tehát más molekulában játszódik le. Ez az alapja például a század elején már használt eozin oldat hatásának, amelyet pityriasis

versicolor kezelésére alkalmaztak. Ezeket az indirekt reakciókat használják ki a *fotodinamikus, vagy más néven fotodinámiás terápiában* (PDT) is.

A PDT alapja *fény és fényérzékenyítő anyag* együttes használata *oxigéndús környezetben*. *Fotodinamikus hatáson* legtöbbször valamilyen sejtpusztító folyamatot értünk, de nem szabad elfelejtenünk a diagnosztikus lehetőségekről sem – ezt *fotodinamikus detektálásnak (PDD)* nevezi a szakirodalom. A PDT legelterjedtebb a daganatok kezelésében, amelynek során megfelelő PS anyagot és megfelelő hullámhosszúságú lézert fényt együttesen alkalmazva a tumoros sejtek pusztulását érhetjük el.

### **1.1.1. A PDT és PDD előzményei**

A terápia története a XIX. században kezdődött in vitro módszerekkel. 1901-ben *Niels Finsen* felfedezte a fény jótékony hatását a himlő pusztulák és a tuberkulózis kezelésében, majd *Herman von Tappeiner* és *Albert Jesionek* 1903-ban már eozint alkalmazott lokálisan bőrdaganatok kezelésében – az általuk észlelt jelenséget hívták először *fotodinamikus hatásnak*. 1913-ban *Friedrich Meyer-Betz* alkalmazott először porfirint emberen fotodinamikus terápia céljából (hematoporfirint saját kezén). Az első igazolt daganatterápiás humán in vivo PDT kezeléssel 1977-ben születtek közlemények *Thomas Dougherty* úttörő tevékenysége révén. Az első III-as fázisú klinikai vizsgálatokra azonban csak 1987-ben került sor. A *Photofrint*, mint az első fotodinamikus terápiás hatóanyagot, 1999-ben engedélyezték Kanadában [1-3].

### **1.1.2. A PDT orvosi indikációi**

Napjainkban számos szakterület egyre szélesebb körben alkalmazza a PDT-t és a PDD-t. Bőrgyógyászati indikációja lehet például: basalioma, vascularis malformatiók, psoriasis, cutan T-sejtes lymphoma, bőrmetasztázisok, Kaposi-sarcoma, keratoacanthoma, lichen planus, acnés góccok és egyéb nem pigmentált bőrdaganatok [4-6]. Egyes PS-ek esetében pigmentált tumorok – például melanoma – kezelhetősége is felmerült. Az urológiai gyakorlatban prostatahyperplasia és -carcinoma, illetve hólyagtumorok esetén, a szemészetben pedig főleg maculadegeneratio gyógyítására



használják [7]. Fontos szerepe lehet az érlemeszesedéses plakkok eltávolításában, illetve az ismételt artériaelzáródások terápiájában is [8]. Számos esetben lehetséges megoldás a szájszövet, fül-orr-gégészeti területén a szájüregben, garatban és gégében levő nem pigmentált daganatok, főleg basalioma kezelésében [9, 10]. Ezekon kívül Barrett-oesophagus, nyelőcsőrák, hörgődaganatok, egyes gyomor-bél daganatok és rheumatoid arthritis kezelésében írták le a módszert [11-13]. A növekvő antibiotikum-rezisztencia miatt lényeges terület a baktériumok és vírusok inaktiválása, in vitro vérvérkészítmények sterilizálása is [14-16]. A PDD pedig diagnosztikus segítséget nyújt a daganatok lokalizációjában [17].

A PDT széleskörű elterjedését számos előnyének és az ezek melletti viszonylag kevés hátrányának köszönheti. *Előnyei* közé tartozik, hogy hatása specifikus, így az egészséges szövet károsodása minimális; a kezelés ismételt, mert nincs kumulatív hatása. Nem befolyásolja sem a kemoterápiát, sem a radioterápiát, sőt, az utóbbival ellentétben nem módosítja genetikai szinten a sejtet, csupán a PDT-t követő gyulladással válaszreakció lezajlását kell megvárni. A diagnosztika (PDD) és a terápia együtt végezhető. *Hátránya*, hogy maximálisan csak néhány milliméter mélyen képes a fény a szövetbe hatolni, némely esetekben ismeretlen eredetű fájdalomról számoltak be, valamint felléphet a szemet és a bőrt érintő fényérzékenység, amely miatt védőruházat szükséges a kezelést követően. A további mellékhatások a kezelés speciális lokalizációival hozhatók összefüggésbe (például köhögés, rekedtség a laryngealis tájék terápiaja esetén) [18, 19].

## 1.2. A PDT és PDD mechanizmusa

A fotodinamikus terápia során első lépésként a PS anyagot vagy a kezelt területre lokalizáltan adják, vagy szisztémásan a véráramba juttatják – akár célzottan, nanorészecskék segítségével [20]. Ennek eredményeként a beadott PS a célszövethez eljutva létrehozhatja a sejtek fotoszenzibilizációját: ennek elengedhetetlen feltétele, hogy a PS kötődjön a plazmamembránhoz, és bejusson a sejt intracelluláris terébe aktív vagy passzív transzport; endocitózis, fagocitózis útján. Ezt tekinthetjük a fotodinamikus hatás első lépésének. Ennek hatékonysága függ a sejt típusától, a PS tulajdonságaitól,

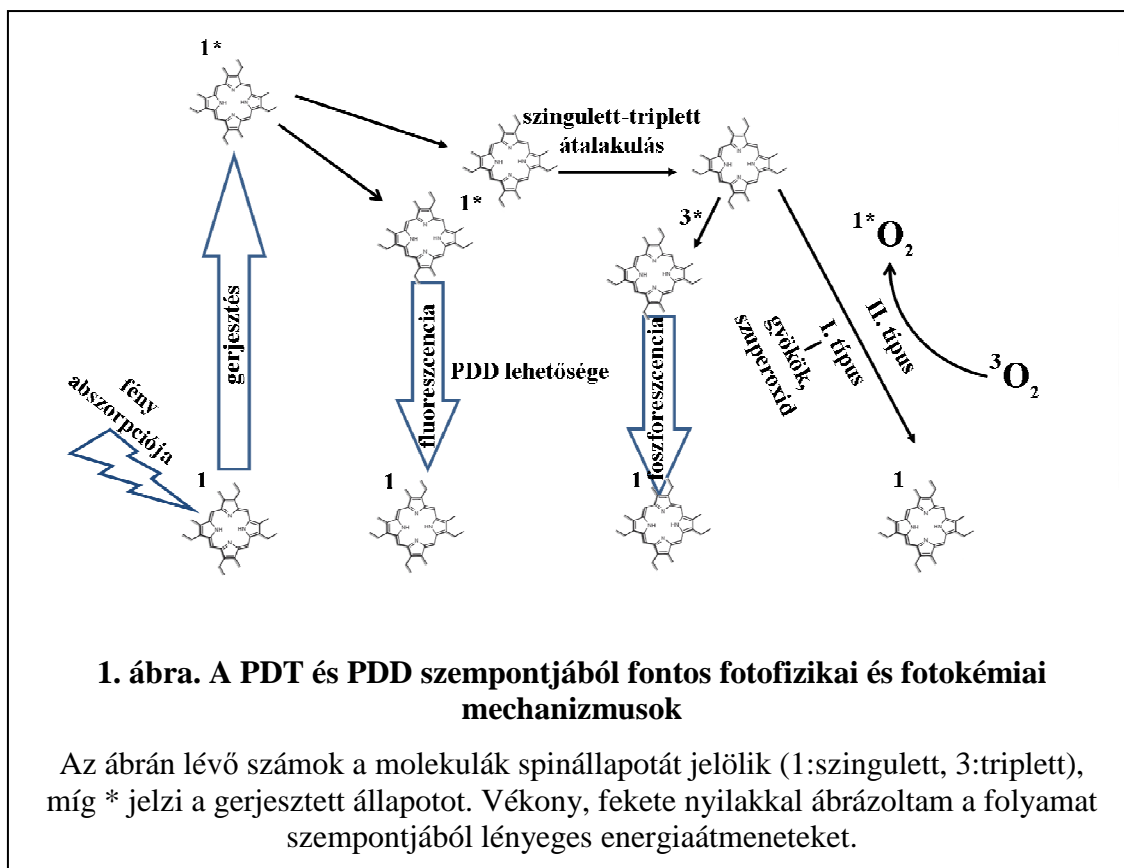
valamint a használt hordozó (például nanorészecske) jellegétől. A PS feldúsulásának és retenciójának nagymértékben specifikusnak kell lennie a célsejtre a mellékhatások csökkentése érdekében. Ez a szelektivitás lényeges a PDD során is.

A PS sejtbe juttatását követően zajlik a fotokémiai reakció első lépése: a *fényérzékenyítő gerjesztése* fényvel. Ennek feltétele a megfelelő fotonenergiájú megvilágítás, amely képes a test belsejébe hatolni a pusztítandó sejtcsoport lokalizációjának megfelelően. A testszöveteknek az endogén kromofórok (például melanin, hemoglobin) miatti fényelnyelésének és a mellékhatások csökkentésének szempontjából is megfelelő optikai ablak miatt a PDT-ben alkalmazott fényforrások hullámhossza 600–800 nm között van [21]. Ennek megfelelően az alkalmazott PS-eknek ebben a hullámhossztartományban kell nagy abszorpciós képességgel rendelkeznie.

A PDT és PDD egyes jelenségeinek leírásakor figyelembe kell vennünk a PS molekula *spinjét* is. A spinállapothoz tartozó mágneses momentum orientációinak száma egy külső mágneses térhez viszonyítva lehet 1 (*szingulett állapot*) vagy 3 (*triplett állapot*). Szingulett állapot esetén a molekula összes elektronjának eredő spinquantumszáma 0 – ekkor minden elektronenergia-szint antiparalel spinű elektronnal van betöltve, illetve a gerjesztett és a hozzárendelhető alapállapotú elektronok antiparalel spinűek. Triplet állapotban egy olyan elektronpár létezik, ahol a spinek párhuzamosak, és az eredő spinquantumszám 1.

A gerjesztett állapotból a PS visszatér az alapállapotba, ami többféle jelenséghez vezethet. Ezek közül kiemelném a fényemissziót – amely a PDD során kaphat szerepet –, valamint a terápia szempontjából legfontosabb fotokémiai reakciókat – ezeket mutatja az 1. ábra. A PS-ek alapállapotukban szingulettek, így a fotonabszorpciót követően a PS gerjesztett állapota is szingulett lesz döntően. Ebből az állapotból több lehetséges átmenet történhet. Ez lehet (vibrációs relaxációt követően) rövid, nanoszekundum életidejű állapotból fotonszámváltozással járó folyamat, azaz *fluoreszcencia*, amely a PDD lehetőségét teremti meg. Egy másik lehetőség a szingulett gerjesztett és alapállapot között végbemenő sugárzás nélküli belső konverzió – amely során kis valószínűséggel lehetséges a *fotokémiai reakció*, de nagyjából hő

keletkezik. A harmadik lehetőség a *szingulett-triplett átalakulás* (rendszerek közötti átmenet, intersystem crossing), amikor spinátfordulással – az adott PS-re jellemző hatásfokkal – a molekula triplett gerjesztett állapotba juthat. A *triplett-szingulett relaxáció* triplett állapotának élettartama hosszabb, így nagyobb valószínűséggel történhet meg ilyen esetben a *fotokémiai reakció*. (Az alapállapotba való visszatéréskor az energiavesztés azonban megvalósulhat hő, illetve *foszforeszcencia* formájában is.)



A lezajló fotokémiai reakciók *indirekt* reakciók. Ennek két típusát különíthetjük el: az *elektron-* (I. típusú), illetve az *energiatranszporttal* (II. típusú) járó folyamatokat. A fontos *biológiai makromolekulák* (fehérjék, DNS, membránok lipidjei stb.) közvetlenül vagy közvetve, reaktív oxigénszármazékok útján károsodhatnak. Az I. típusnál a *szuperoxid* és egyéb *reaktív oxigéngyökök* képződése a lényeges, míg a II. típusnál a legnagyobb szerepet a *szingulett oxigén* keletkezése kapja a PDT területén (lásd az 1. ábrán). A sejtpusztítás szempontjából legtöbbször a szingulett oxigén termelődésének mennyisége és élettartama a legjelentősebb, amelyhez szükséges a PS triplett állapotának nagy kvantumhatásfokú képződése [21-24]. A szingulett oxigén

élettartama néhányszor tíz mikroszekundumos, ami tized mikrométeres hatótávolságot jelent a membránban – így fényérzékenyítés mélysége, lokalizációja a membránon belül lényeges a szingulett oxigén membránkárosító hatásának effektivitásában. [25, 26].

A PDT során a sejt szintű pusztulás egyaránt lehet apoptózis és nekrozis – függően attól, hogy a fényérzékenyítés milyen sejtorganelumban zajlik (plazmamembrán, mitokondriummembrán, sejtmag stb.) és hogy milyen makromolekulák (membránlipidek, fehérjék, nukleinsavak) károsodnak közvetve vagy reaktív oxigénszármazékok útján. Ma már ismert, hogy a fotodinamikus terápia szövetszintű daganatellenes hatása több jelenség eredménye. Az egyik az eddigiekben leírt közvetlen vagy közvetett makromolekula-károsodás miatti *cytotoxicitás*. Ezt erősíti, hogy nem csak a daganatsejtek, hanem az azt ellátó *érhálózat* is károsodik, az érzékelés gátlódik, és ezzel hypoxiát okoz. Harmadik fő mechanizmusként pedig a kiváltott *immunválaszt* kell megemlítenünk. Természetesen ezek a folyamatok egymást befolyásolják, erősítik [27, 28].

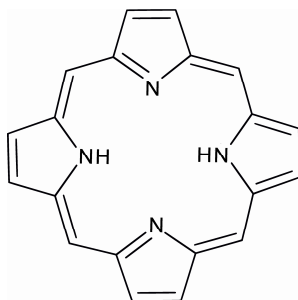
Mint az eddigiekből látszik, a fotodinamikus hatást, a terápia és detektálás sikerességét több tényező is befolyásolja, amelyek megismerése lényeges lehet. Ezek közé tartoznak a PS-ek fotofizikai tulajdonságai, sejtmembránhoz való kötődése és így sejtfelvételi hatásfoka és lokális koncentrációja, valamint a sejten belüli, illetve a membránon belüli elhelyezkedése.

### **1.3. PDT és PDD modell**

A biológiai rendszerek, folyamatok általában túl összetettek ahhoz, hogy az élő szervezetben a molekuláris történéseket, mechanizmusokat egymástól elkülönítve tudjunk megfigyelni. Ezért elkerülhetetlen, hogy ezek vizsgálatára egyszerűsített modellrendszereket használjunk. A következőkben egy fényérzékenyítő–membrán modellt írok le.

### 1.3.1. Porfirinek, mint fényérzékenyítők

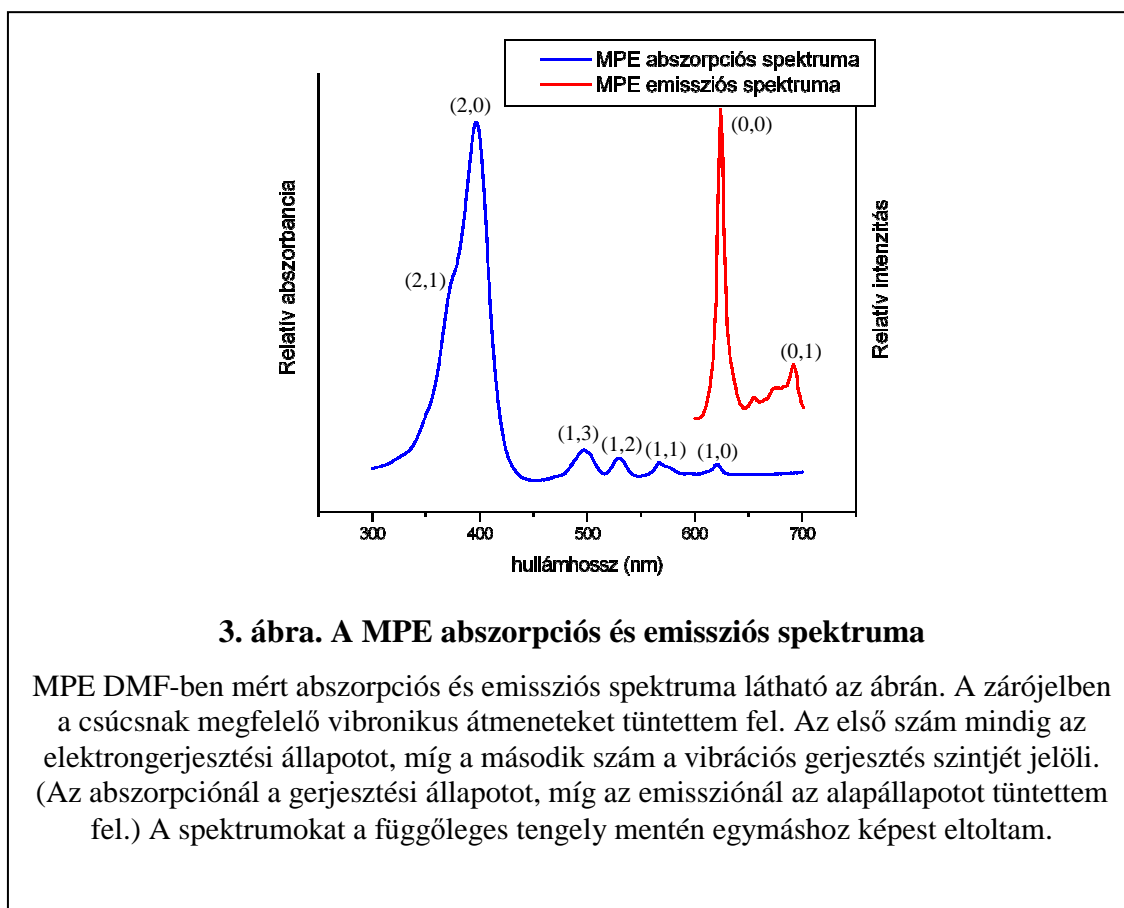
A klinikai gyakorlatban ma a legtöbbet használt PS molekulák *aromás tetrapireol származékok*: porfirinszármazékok – például a hematoporfirin keverék Photofrin és az endogén porfirinek –, chlorinok, purpurinok, benzoporfirinek, ftalocianinok és fenoforbidok [3, 29]. Ezek közül is a legelterjedtebbek a *porfirinszármazékok*, illetve az indukált protoporfirin IX. Az utóbbinak a célsejtben való fokozott termelését a hem szintézis prekursorának, a delta-aminolevulinátnak (DALA), illetve metilészterének beadásával érik el. Bár a DALA-val és származékaival végzett klinikai kísérletek már az 1980-as években megkezdődtek, a mai napig számos kérdés merül fel hatásmechanizmusát és klinikai felhasználását illetően [30]. A hematoporfirinhez és a protoporfirin IX-hez igen hasonló szerkezetű, de jobb optikai jeladó tulajdonságú a *mezoporfirin IX*.



**2. ábra. A porfirinváz szerkezete**

A porfirinváz (2. ábra) alapvető tulajdonsága a *sík szerkezet* és az *aromás jelleg*. A kiterjedt konjugált elektronrendszer – ahol a konjugációban 18  $\pi$  elektron vesz részt – eredményezi a porfirinek jó abszorpciós képességét a 600–800 nm-es tartományban, valamint megteremti a lehetőségét a magas kvantumhatásfokú fluoreszcenciának, illetve szinglett-triplett rendszerek közötti átmenetnek.

A porfirinek *abszorpciós spektrumát* a látható fénytartományban általában két nagy sáv sorozat jellemzi: egy nagyobb moláris extinkciós együtthatójú (jellemzően  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) 390–420 nm között levő úgynevezett *Soret-sáv*, és a nagyobb hullámhossznál jelentkező *Q sávok*, amik sokkal kisebb extinkciós együtthatóval rendelkeznek (lásd a 3. ábrán). Ez utóbbiak között találjuk a 600–800 nm közötti, fotodinamikus terápia szempontjából lényeges abszorpciós sávot. (A Soret tartomány sávjai és a különböző Q sávok is eltérő vibronikus átmenetek eredményei. Az ábrán a zárójelben található első szám mindig az elektrongerjesztési állapotot, míg a második szám a vibrációs gerjesztés szintjét mutatja – a későbbiekben is ezt a jelölésrendszert használom.) A diagnosztikus és a molekuláris kutatási szempontból egyaránt fontos *fluoreszcencia emissziós spektrumok* a különböző porfirineknél nagyobb eltérést mutatnak, de általában két jellemző sávot láthatunk: egy nagyobb intenzitásút 600–700 nm között, és egy kisebbet 650–750 nm között.



**3. ábra. A MPE abszorpciós és emissziós spektruma**

MPE DMF-ben mért abszorpciós és emissziós spektruma látható az ábrán. A zárójelben a csúcsnak megfelelő vibronikus átmeneteket tüntettem fel. Az első szám mindig az elektrongerjesztési állapotot, míg a második szám a vibrációs gerjesztés szintjét jelöli. (Az abszorpciónál a gerjesztési állapotot, míg az emissziónál az alapállapotot tüntettem fel.) A spektrumokat a függőleges tengely mentén egymáshoz képest eltoltam.

### 1.3.2. Liposzómák, mint membránmodellek

A PDD és PDT területén még számos megválaszolendő kérdés merül fel. Ezek vizsgálatára széles körben alkalmazzák a liposzómákat, amik a sejtmembránok egyszerű modelljének tekinthetők [22, 26, 31, 32]. A fotoszenzibilizáló anyagok fotofizikai és fotokémiai tulajdonságai a különböző közegekben eltérőek: a liposzómák segítségével a lipidkörnyezetben bekövetkező változásokat vizsgálhatjuk [21, 33]. A legtöbb esetben ezen modellmembránok fő lipidösszetevője foszfolipid, amely *amfifil* tulajdonságot mutat. A lipidek hidrofil részét („fejcsoport”) a glicerín váz egyik szénatomjához negatív töltésű foszfátcsoponton keresztül kapcsolódó, néhány szénatomból álló, töltéssel rendelkező atomcsoport adja. A hidrofób részt a glicerínhez észterkötéssel kapcsolódó hosszabb zsírsavoldallánc alkotja. Emellett igen lényeges, hogy az adott liposzómáknak, mint lipidmembrán-környezeteknek, milyen a rendezettsége. Ezt döntően a lipidösszetétel határozza meg. Adott lipidösszetétel esetén a lipidkörnyezet rendezettségét a hőmérséklet szabja meg. Azt a hőmérsékletet, ahol az oldalláncok közötti kölcsönhatás erőssége és a transz-gauche izomerizáció aránya hirtelen megváltozik, *fő fázisátalakulási hőmérsékletnek* ( $T_m$ ) nevezzük. E hőmérséklet alatt a liposzóma szerkezete rigidebb, gélyszerű struktúrát, míg e fölött mobilisebb, folyadékkristály jellegűt mutat. A liposzómák állhatnak egy vagy több lipiddetektorból – dolgozatomban az előbbi nevezem egyrétegűnek (unilamellárisnak), utóbbit pedig többrétegűnek (multilamellárisnak).

Több publikációban ismertették, hogy a PS sejtmembránhoz való kötődése és a sejtbe való felvétele a legtöbb esetben jól korrelál a PS liposzómához való kötődésének erősségével [34, 35]. Ez a korreláció nem áll fenn a régebben használt octanol-víz megoszlási hányadosra [34, 35]. A liposzóma modelleket használják a különböző PS-ek szingulettoxigén-termelő képességének vizsgálatára is. Bizonyított az a tény is, hogy a fotodinamikus hatást, a termelő reaktív oxigénszarmazékok mennyiségét befolyásolja az, hogy a PS mennyire mélyen hatol a membránba [36, 37]. Adott PS eltérő elhelyezkedését a modellmembránban eddig csak közvetve, fluoreszcensen jelölt, vagy spinjelölt lipidek segítségével mérték. A lipidek előzőek szerinti jelölésének hátránya, hogy perturbálják a membránt, azaz megváltoztatják a vizsgálandó mintát. Munkám során ezért ezektől eltérően – és újdonságként – olyan módszert használtam, ahol közvetlenül a vizsgálandó PS fluoreszcencia jelét mértem a kötőhelyek

elhelyezkedésének vizsgálatára. Különböző porfirinek eltérő mélységi elhelyezkedésére hőmérsékletváltoztatásra bekövetkező anizotrópiaváltozás alapján is következtettek már [36, 38-41].

#### **1.4. Fényérzékenyítő–membránmodell rendszerek vizsgálata optikai módszerekkel**

A molekulák és fény kölcsönhatásakor létrejövő fény szóródása és abszorpciója, valamint az abszorpciót követő fényemisszió számos információval szolgál az adott biológiai rendszerről.

Kísérleti szempontból a PS-ek egyik nagy előnye, hogy szerkezetük révén jó fényabszorpciós és fényemissziós tulajdonságokkal rendelkeznek – ezen molekulákat nevezzük *kromofóroknak* –, amelyek optikai spektroszkópiai módszerekkel jól tanulmányozhatóak. A molekuláris szintű változások, amelyek vagy magában a kromofórban vagy a vele kapcsolatban levő környezetben zajlanak le, megváltoztatják a molekula *elektron, vibrációs és rotációs energiaátmeneteit*, tehát a mérhető optikai jelet. Így kaphatunk információt a kromofórról, az azt körülvevő környezetről, valamint a lejátszódó reakciókról.

##### **1.4.1. A Rayleigh-fényszórás**

A megvilágító fény elektromos tere a fény hullámhosszánál jóval kisebb részecskék elektromos töltéseit – elektronjait – az elektromos tér változásának megfelelő rezgésre kényszeríti. Ezek a mozgó töltések bocsátják ki az elektromágneses sugárzást – a szórt fényt. Ha a gerjesztés nem rezonáns, akkor a kölcsönhatásban a besugárzott és visszasugárzott fényteljesítmény lényegében megegyezik – ezt a jelenséget rugalmas szórásnak nevezzük. Amennyiben koherens és monokromatikus fényvel megvilágított igen kis térrészben a részecskék is kisméretűek, akkor egymáshoz nagyon közel is elhelyezkedhetnek, így a részecskesokaság az elektromos tér hatására együtt, közel azonos fázisban sugároz. A részecskék mozgásának következménye, hogy a közöttük lévő távolságok időben változnak, ezért változnak a fázisviszonyok is, ami az interferencia miatt a detektált szórt fény intenzitásának, illetve az elektromos



térerősségvektor nagyságának a változásához vezet, amit *autokorrelációval* vizsgálhatunk. Az autokorrelációs görbe lecsengése annál gyorsabb, minél nagyobb sebességű a részecskék Brown-mozgása. A detektált jel változékonysága tehát a részecskék mozgékonyaságától függ, amit a diffúziós együtthatóval jellemezhetünk. A hőmérséklet, a közeg viszkozitása és a diffúziós állandó ismeretében a Stokes-Einstein-egyenlet alapján meghatározható a részecskék (esetünkben például a liposzómák) *hidrodinamikai sugara*.

#### **1.4.2. A fény abszorpciója, a molekulák energianívó-rendszere**

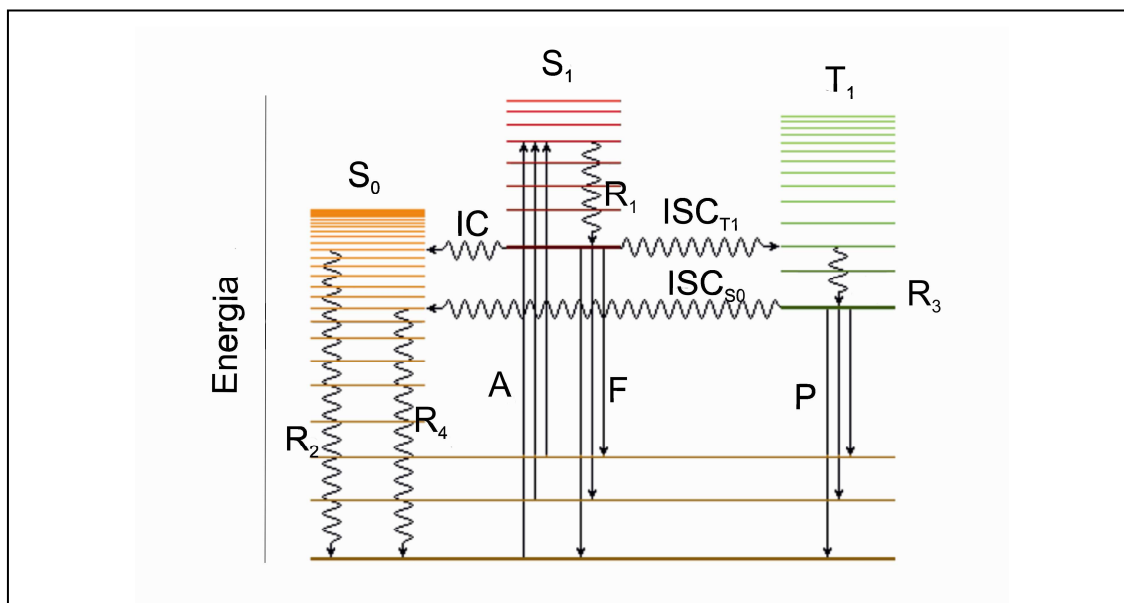
Ha a megvilágító fény elektromos tere olyan frekvenciájú, hogy a részecskék elektronjait rezonánsan rezgeti meg, akkor a besugárzott és visszasugárzott energia nem egyenlő – az anyag a sugárzás egy részét elnyeli, más szóval abszorbeálja. A fényabszorpció és az ezt követő folyamatok pontosabb leírása kvantummechanikai szemléletmód alapján lehetséges.

A molekulák spektroszkópiailag megjeleníthető kvantált energiája az elektronburok kvantumállapotának megfelelő elektronenergiából, az atomoknak a molekulán belüli rezgéséből eredő rezgési energiából és a molekula forgásából származó forgási energiából tevődik össze. Az optikai spektroszkópia esetében az elektronenergia és a vibrációsenergia-átmeneteket vizsgáljuk. Ezen folyamatok értelmezéséhez a *Jablonski-féle energiadiagram* nyújt segítséget, amelyet a 4. ábrán tüntettem fel. Fontos megjegyezni, hogy mindegyik energiaátmenet a molekulára jellemző valószínűséggel (hatásfokkal) történhet meg.

A Jablonski-diagram alapján akkor lehetséges rezonancia – tehát a fény *abszorpciója* –, ha az alapállapotú elektronnal pontosan akkora energiát közlünk, amely megfelel valamely magasabb kötött állapot energiaszintje és az adott alapszint energiája közti különbségnek (a Jablonski-diagram A-val jelzett energiaátmenetei). Tekintve, hogy az energiaszintek rendszere és az átmenetek valószínűsége a molekulára jellemző, a molekula abszorpciós spektruma – azaz az elnyelt energiának a megvilágítási energia adagok szerinti eloszlása – mind mennyiségi, mind minőségi információval szolgál.

A fény abszorpciójának következtében a rendszer *gerjesztett* állapotba – magasabb energiaszintre – kerül. Ezt a többletenergiát adja le különböző kölcsönhatások révén és kerül vissza az alapállapotba.

A 4. ábrán azt az egyszerűsített esetet tüntettem fel, ahol a szingulett alapállapotú ( $S_0$ ) molekula az abszorpció hatására az első gerjesztett szingulett állapotba ( $S_1$ ) kerül, de nemcsak gerjesztett elektron-, hanem gerjesztett vibrációs állapotba is jut.



**4. ábra. Jablonski-féle energiadiagram**

A: abszorpció, F: fluoreszcencia, P: foszforeszcencia, IC: belső konverzió (internal conversion), ISC: triplett↔szingulett átmenet (intersystem crossing), R: vibrációs relaxáció,  $S_0$  szingulett alapállapot,  $S_1$  és  $T_1$ : első szingulett, illetve triplett gerjesztett állapotok. Egyenessel azokat a folyamatokat jelöltem, amelyekben fotonszámváltozás van, hullámos vonallal pedig azokat, amelyekben nincs fotonszámváltozás (fényemisszió, vagy fényabszorpció).

A szingulett gerjesztett állapotból több, egymással versenyző átmenet lehetséges: *vibrációs relaxáció* (R), *belső konverzió* (IC), *rendszerek közötti átmenet* (ISC), illetve *fluoreszcencia* (F). A vibrációs relaxáció során a molekula többnyire a többi molekulával való ütközések során veszi el vibrációs energiáját. A belső konverzió izoenergetikus, ebben az esetben a molekula átmegy az  $S_0$  alapállapot egy vibrációsan magasabb fokban gerjesztett állapotába, ahonnét vibrációs relaxáció (R) révén kerül az alapállapot vibrációsan gerjesztetlen, illetve alacsonyabb fokban gerjesztett állapotába. Az  $S_1$  szingulett állapotból izoenergetikus rendszerek közötti átmenet segítségével jöhet

létre a triplétt, vibrációsan is gerjesztett állapot. Mind az IC, mind az ISC megvalósulhat relaxáció után is. A gerjesztett triplétt energiaszintről izoenergetikus  $ISC_{S_0}$ , vagy a vibrációs relaxációt követő *foszforeszcencia* (P, fotonszámváltozással járó folyamat) révén juthatunk az  $S_0$  energiaszintekre. A fluoreszcencia fényemisszióval (másképp: fotonszámváltozással) járó folyamat, amely kizárólag olyan állapotból lehetséges, ahol a molekula vibrációsan nem gerjesztett (Kasha-szabály), ezért általában vibrációs relaxációt követően történik. Megjegyzendő, hogy kisebb valószínűséggel, de lehetséges az  $S_0 \rightarrow S_1$  irányú izoenergetikus belső konverzió, illetve a  $T_1 \rightarrow S_1$  irányú rendszerek közötti átmenet is – ezek késleltetett fluoreszcenciához is vezethetnek.

Tekintve, hogy az  $S_1$  vibrációsan nem gerjesztett energiaszintjének és az  $S_0$  különböző vibrációs energiaszintjeinek különbsége a molekulára jellemző, ezért a fény emissziós spektruma is minőségi információval szolgálhat.

A biológiai rendszerek vizsgálata esetén lényeges, hogy a vizsgálandó kromofór milyen környezetben van, ugyanis ez megváltoztathatja mind az abszorpciós, mind az emissziós spektrumot. A környezeten nem csak az oldószert, hanem az oldatban levő egyéb oldott molekulákat (például fehérjéket, lipideket), valamint a vizsgált molekuláinkkal kölcsönható, ugyanolyan típusú, de gerjesztetlen molekulákat is értjük. A legfontosabb környezeti tényezők közé sorolhatók a környezet törésmutatója, viszkozitása, dielektromos állandója, polaritása, hőmérséklete [42, 43].

### 1.4.3. Fluoreszcencia spektroszkópia

A fluoreszcencia spektroszkópia előnye az abszorpciós spektroszkópiával szemben, hogy általában nagyobb érzékenységgű, valamint kevésbé követeli meg a minta átlátszóságát.

A fluoreszcencia spektroszkópiai módszereket alapvetően két csoportba sorolhatjuk: az *időfelbontásos fluoreszcencia vizsgálatok* (*time resolved fluorescence*), illetve a stacionárius mérési módszerek (*időben állandó spektrumok – steady-state measurements*). Ettől független felosztásai is lehetségesek a különböző technikáknak, amelyek közül kiemelném a *fluoreszcencia kioltási* módszereket, a *Förster típusú rezonancia-energiátadást*, valamint a *polarizációs fluoreszcencia spektroszkópiát*,

ugyanis a lipidmembrán–fényérzékenyítő rendszerekben ezeket a módszereket használják a leggyakrabban [36, 37, 39-41].

Az időfelbontásos fluoreszcencia mérésekor a gerjesztett állapot élettartamát mérjük. A rövid időtartamú gerjesztő fényimpulzust követően a kiváltott fluoreszcencia intenzitásának időbeli lecsengését figyeljük meg.

Az időben állandó fluoreszcencia spektrumoknak kétféle típusát különíthetjük el a mérési technika szerint: az *emissziós spektrum* mérésekor a gerjesztő fény hullámhosszát egy adott, (a lehetőségeknek megfelelően) szűk tartományban állandó értéken tartva a gerjesztés által kiváltott emisszió intenzitásának hullámhossz szerinti eloszlását vizsgáljuk, míg a *gerjesztési spektrum* esetén az emittált fény egy adott, szűk hullámhossztartományban vett intenzitásának változását mérjük a gerjesztő fény különböző hullámhosszainak függvényében. Ez utóbbit a klasszikus fluoreszcencia-irodalomban gyakran nem sorolják a fluoreszcencia jellemzők közé, ugyanis ez oldatokban lényegében megegyezik az abszorpciós spektrummal. Összetettebb biológiai rendszerek esetén azonban ez nem igaz, valamint a gerjesztési fluoreszcencia spektrumnak méréstechnikai szempontból is jobb az adottságai, mint az abszorpciós spektrumnak [44].

Tágabb értelemben minden olyan folyamatot, amelynek során a gerjesztett állapotú kromofór (mint donor) mérhető fluoreszcenciájának élettartamát, illetve intenzitását egy másik molekula, illetve funkciós csoport (akceptor) csökkenti úgy, hogy a gerjesztési energia nem fényemisszió útján, hanem egyéb nemsugárzásos átmenetben adódik le, fluoreszcencia kioltásnak (*quenching*) nevezünk. A folyamat során az energiaátadás történhet reabszorpció, ütközés, komplexképződés, illetve rezonáns átadás útján. A Förster típusú rezonancia-energiaátadás során a gerjesztett állapotú donor energiája egy részét átadja sugárzás nélküli dipól-dipól kölcsönhatás révén egy arra alkalmas, fluoreszcenciára képes akzeptornak. Így a gerjesztett donor energiájának egy része az akceptor emissziójában jelenik meg. Az energiaátadás és kioltás hatásfoka – és ezek révén a donor fluoreszcencia élettartama, illetve intenzitása – függ a donor-akceptor távolságtól. Ismert pozíciójú akceptor (például jelölt lipid) esetén ennek alapján megbecsülhető a donor lokalizációja.

A polarizációs (más néven anizotrópia) fluoreszcencia módszereknél polarizált megvilágításnál detektáljuk a fluoreszcencia polarizált komponensét. Az adott irányban mért síkban poláros emisszió függ a kromofór rotációs diffúziójától, amit befolyásol a kromofór környezetének viszkozitása. Membránkörnyezet vizsgálatakor a leggyakrabban a viszkozitás reciprokát, azaz a fluiditást használjuk a kromofór környezetének jellemzésére. A liposzómákban a membrán különböző mélységeiben eltérő a fluiditás hőmérséklettől való függése, így a kromofór hőmérsékletfüggő polarizációs fluoreszcencia méréseiből durva közelítést adhatunk a kromofór lokalizációjára.

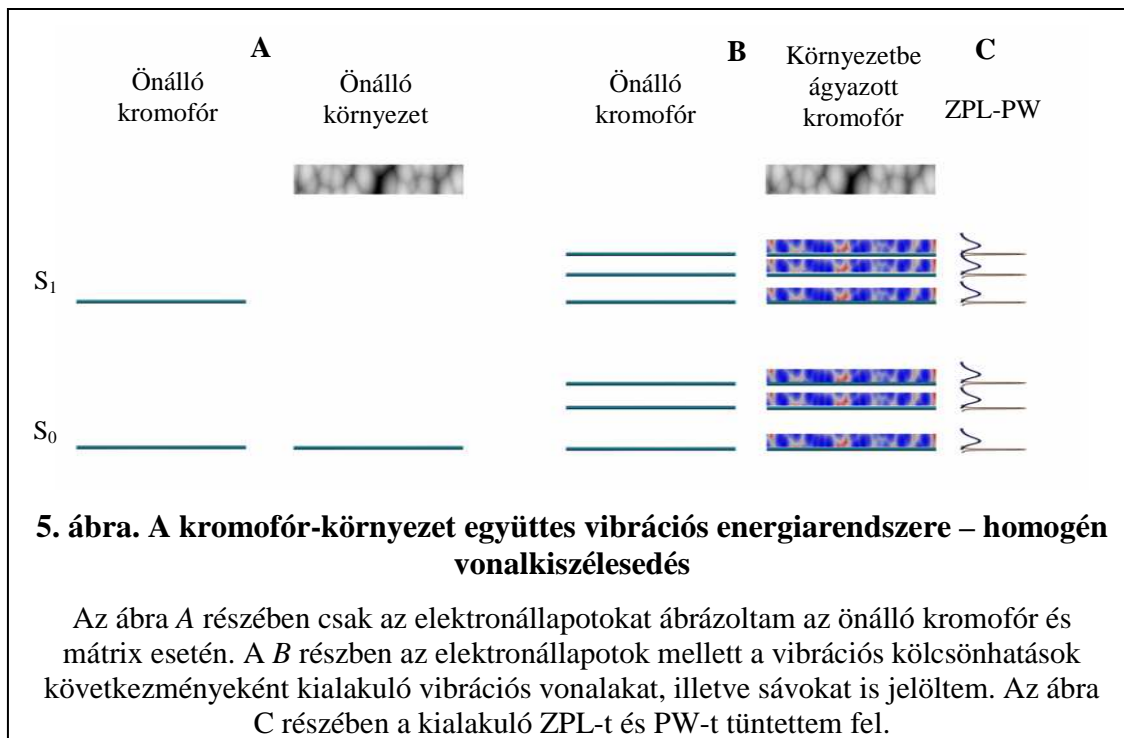
A különböző módokon felhasznált stacionárius fluoreszcencia spektrumok nagymértékben függenek attól, hogy mekkora a gerjesztési, illetve az emissziós, szűknek nevezett hullámhossztartomány. Megjegyezném, hogy a spektroszkópiában, valószínűleg a mérési eszközök tulajdonságai miatt, az általánosan használatos paraméter a hullámhossz (nm-ben kifejezve). Azonban számos esetben a mért adatok megfelelő értelmezése miatt érdemes egy, a fotonenergiával egyenesen arányos egységet bevezetni, ami leggyakrabban a hullámhossz reciprokával megadható *hullámszám* (szokásos mértékegysége  $\text{cm}^{-1}$ ).

A Jablonski-diagram fentebb vázolt formája csak abban az esetben igaz, ha az adott kromofórt önmagában, minden külső tényezőtől elszigetelve vizsgáljuk. Ekkor az emissziós spektruma vonalakkól áll. Az oldószerben (környezetben) lévő biológiai molekulák fluoreszcencia spektrumai azonban a hagyományos körülmények között viszonylag széles sávokból állnak ( $100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ ). Így ebből a vibrációs energiaszintek szerkezetéről és így a kromofór-környezet finomabb kapcsolatáról csak korlátozottan kaphatunk információt. Ezért szükséges, hogy csökkentsük a sávok szélességét, azaz növeljük a felbontást.

#### **1.4.4. Homogén és inhomogén vonalkiszéledés**

A vonalkiszéledésnek két típusát különíthetjük el: a *homogén*, illetve az *inhomogén* vonalkiszéledést. Az elnevezés a kromofór környezetre utal. A környezetet homogénnek nevezzük akkor, ha az az egyes molekulákra nézve azonos,

míg inhomogénnek akkor, ha a kromofórok környezete eltérő. A spektrumvonalak kiszélesedésének energetikai oka az, hogy a kromofór és környezete egymással elektromágneses csatolásban van.



Vizsgáljuk először azt a rendszert, ahol a környezet homogén. A kromofór és környezete között lényeges különbség, hogy a kromofór koncentrációja jóval kisebb, mint a környezet molekuláinak koncentrációja. Ezért a kromofórok egymással való kölcsönhatása elhanyagolható, míg a környezet molekuláira ez nem igaz. A környezetet érő gerjesztés a kölcsönhatások miatt egyszerre számos molekulát érint, így a környezet elektronátmeneti nívórendszere sávos jellegű lesz, míg a kromofóré vonalas. Ezt ábrázoltam az 5. ábra A részén. (Megjegyzendő, hogy a környezet elektrongerjesztése jóval nagyobb energián lehetséges csak, így külön vizsgálható a kromofór-környezet rendszer olyan energiatartományban, ahol az abszorpciót lényegében a kromofór határozza meg, nem a környezet).

A környezetbe ágyazott kromofór vibrációs nívórendszerét két kölcsönhatás határozza meg: az *elektron-vibrációs* csatolás, ahol a kromofór elektronjai a saját molekulán belüli rezgésekhez csatoltak, valamint az *elektron-fonon* csatolás, ahol a kromofór elektronjai a környezet rezgéseire csatoltak. Míg az előbbi vonalas vibrációs

szerkezetet eredményez, addig ez utóbbi miatt újabb vibrációs sávok jelennek meg. A kettő együtt adja az eredő vibrációs sávot, ahogyan ezt az 5. ábra *B* része mutatja.

Ezeknek megfelelően, ha a kromofórok homogén (tökéletesen rendezett) környezetben vannak, a mérhető spektrumvonalakat elméletben két részre bonthatjuk: egy keskeny *zérófonon-vonalra* (zero-phonon line, ZPL), amely az elektron-vibrációs átmenetre jellemző, és egy fonon szárnyra (phonon wing, PW), amely az elektron-fonon kapcsolatból származik. Ezt tüntettem fel az 5. ábra *C* részében. Az elnevezések arra utalnak, hogy a ZPL esetén nincs fononszámváltozás, míg a PW esetében csatolt rezgések keletkeznek, vagy szűnnek meg, azaz fononszámváltozással jár a folyamat. A ZPL alakja Lorentz görbe, szélessége a Heisenberg határozatlansági reláció szerint számolható, és a gerjesztett állapot (beleértve a különböző relaxációs utakat) élettartamával fordítottan arányos. A hőmérsékletet 0 K-ről emelve a sugárzás nélküli átmenetek száma nő, így a ZPL szélessége is nő [45]. A PW alakja Poisson-eloszlással közelíthető, és az elektron-fonon csatolás miatt erősen függ a hőmérséklettől. A ZPL relatív intenzitása a *Debye–Waller faktorral* egyenlő:

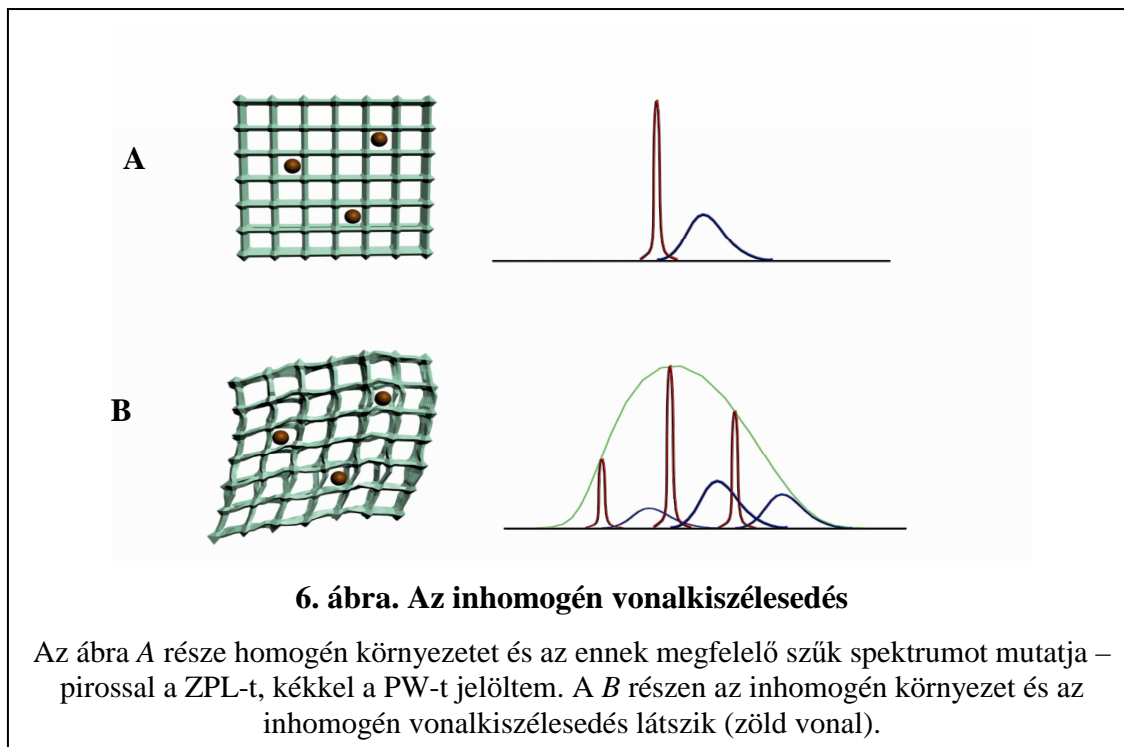
$$\alpha = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PW}},$$

ahol  $I_{ZPL}$  és  $I_{PW}$  a megfelelő intenzitásokat jelölik.

A teljes vonalintenzitás ( $I_{ZPL}$  és  $I_{PW}$ ) állandó, míg az előzőek miatt a Debye–Waller faktor a hőmérséklet emelésével erősen csökken [46]. Ennek a következménye, hogy míg alacsony hőmérsékleten ( $T < 30$  K) a ZPL és PW elkülöníthető (a hőmérséklettől függő mértékben), addig a szobahőmérsékletű minta esetén a PW dominál és a spektrumban egy felbonthatatlan, néhány száz  $\text{cm}^{-1}$  szélességű sáv jelenik meg. Ezt nevezük homogén vonalkiszéledésnek.

Az előzőekben olyan rendszereket vizsgáltunk, ahol a környezet homogén, tökéletesen rendezett. Ez azonban sohasem teljesül. Nevezük most a kissé eltérő környezeteket a környezet konformációinak. Ezek alapján mondhatjuk, hogy a környezeti konformációk különbözőek, eloszlással jellemezhetők. Az egyes kromofórok tehát gerjesztéskor különböző környezetben vannak, és így az elektronátmeneti energiák is módosulnak, a környezettől függő inhomogén eloszlást mutatnak. A 6. ábra *A* része a homogén környezetet és az átmeneti energiáknak megfelelő elméleti spektrumot

mutatja, míg az ábra *B* része az inhomogén környezetet és annak spektrumbeli hatását szemlélteti: a meglehetősen széles inhomogén vonalkiszéledést. (Természetesen hasonló hatást vált ki, ha a kromofórnak van több konformációja a gerjesztéskor.)



A kissé eltérő környezetek tehát megváltoztatják a kromofór spektrumát, azonban ezeket csak abban az esetben tudjuk elkülöníteni, ha az adott környezeti konformációjú kromofórokat külön-külön – a módosult nívórendszer miatt energiaszelektíven – gerjesztjük. Továbbá figyelembe kell azt is vennünk, hogy nem 0 K hőmérsékleten az inhomogén környezet is folyamatosan változik: a hőmérséklettől függően időben fluktuál.

Összefoglalva tehát azt mondhatjuk, hogy a spektrális felbontás javítását, a kissé eltérő környezetek elkülönítését úgy érhetjük csak el, ha a hőmérséklet csökkentésével mérsékeljük a homogén kiszéledést, az inhomogén kiszéledést pedig szelektív gerjesztéssel oldjuk fel, amellet, hogy az időbeli fluktuációkat kiküszöböljük. Ezek a megfontolások vezettek az *energiaszelektív optikai spektroszkópai módszerekhez*.



#### 1.4.5. Energiaszelektív optikai spektroszkópai módszerek

Az energiszelektív optikai spektroszkópai módszerek alapja a *kriogenikus hőmérséklet* és a *keskeny sáv szélességű (monokromatikus) gerjesztés*. Az alacsony hőmérséklet kettős célt szolgál: egyrészt csökkenti a homogén vonalkiszéledést, másrészt a szobahőmérsékletű inhomogén konformációeloszlás egy adott pillanatát fagyasztja be [46]. Az ekkor alkalmazott megfelelő monokromatikus gerjesztéssel (általában lézerrel) létrehozható a kissé különböző környezetben levő kromofór alsokaságok szelektív gerjesztése.

Energiaszelektív spektroszkópai módszert először Szabo alkalmazott 1970-ben rubinkristályon. Szerves molekulákat tartalmazó rendszereken 1971-től végeztek ilyen kísérleteket Personov és munkatársai, akik bizonyították, hogy lézeres gerjesztés mellett a vibrációs átmenetek felbonthatók.<sup>1</sup>

Ezt követően a nagy felbontású energiaszelektív spektroszkópiáknak 2 fő válfaja terjedt el: a *spektrális „lyukégetés” (spectral „hole burning”, SHB)* és az *energiaszelektív gerjesztésű fluoreszcencia* (a nemzetközi irodalomban a *luminescence*, illetve a *fluorescence „line narrowing”* kifejezéseket – röviden FLN – is használják).

Az SHB módszernél gerjesztési, illetve abszorpciós spektrumokat határoznak meg alacsony hőmérsékleten nagy felbontással. A mérési eljárás során első lépésként nagy intenzitású gerjesztéssel mérik az abszorpciós spektrumot. Ezt követően a gerjesztési spektrumot két-három nagyságrenddel kisebb lézerteljesítmény mellett újramérve, a korábbi elnyelés helyén az eredeti spektrumhoz viszonyítva abszorpciós hiány – „lyuk” keletkezik. A módszerrel olyan kromofórok vizsgálhatók, amelyekben gerjesztés hatására tartósan megváltozik az elektronnívók betöltöttsége – aminek oka fotokémiai vagy fotofizikai átalakulás lehet. Emellett a spektrumon mérhető az újonnan megjelent fototermék hatása is, természetesen az eredetitől eltérő energiákon. A módszer alkalmas a gerjesztési folyamatot perturbáló hatások (hőmérséklet, nyomás, elektromos, illetve mágneses térerősség) vizsgálatára is [45, 47].

---

<sup>1</sup> Ekkor nevezték el a módszert „site”-szelektívnek. A „site” szó utal arra, hogy a különböző környezetben levő kromofórok lehet elkülöníteni a különböző elektron-vibrációs energiaátmenetek alapján.

Az FLN spektroszkópia esetében a nagyfelbontású emissziós spektrumok meghatározása szelektív gerjesztés mellett történik alacsony hőmérsékleten. A gerjesztési hullámhosszat változtatva (mindig az adott környezetű kromofórt kiválasztva) rögzítjük az emissziós spektrumokat, így felbontva az elektron-vibrációs energiaátmeneteket. Ez alapján határozhatjuk meg a szobahőmérsékletű spektrumok alapján nem elkülöníthető kromofórszerkezeteket, és észlelhetjük az eltérő kromofórkörnyezeti konformációkat. A mérési eljárás során az emissziós spektrumban mutatkozó ZPL csúcsoknak a gerjesztési frekvenciaváltozásnak megfelelő eltolódását és intenzitásváltozását követjük nyomon. Ezek alapján határozzuk meg az úgynevezett inhomogén eloszlásfüggvényt, amely leírja a kromofór inhomogén környezetét.

Az FLN spektroszkópiát többféle kérdéskör vizsgálatára használják a kémia, biológia területén [48]. Ezek közé tartozik kromofórok, fluoreszcens metabolitok azonosítása [49, 50], DNS adduktumok kimutatása [51], illetve a legtöbb esetben kromopeptidek (ahol a kromofór környezete fehérje) konformációs vizsgálata [52], mint például a klorofill és a fotoszintézisben résztvevő fehérjék kutatása [53, 54], illetve enzimek különböző hatásokra bekövetkező konformációváltozása [55-57].

## 2. Célkitűzések

Munkám során a következő célokat tűztem ki:

I. *Az egymástól kissé eltérő mezoporfirin IX származékok (MP) különböző lipidösszetevőjű kis unilamelláris liposzómákhoz (SUV) való kötődésének vizsgálata szobahőmérsékleten.* Ezen belül célom volt:

- I.1. A mérésekhez megfelelően stabil, homogén és aggregátummentes modellrendszer létrehozása.
- I.2. A kötődési paraméterek meghatározása és összehasonlítása a különböző MP-SUV modellekben.
- I.3. A lehetséges eltérő kötőhelyek kimutatása.

II. *Az MP-SUV modellek FLN vizsgálata.* Ezen belül célom volt:

- II.1. Az I.1-ben már említett, de a speciális feltételeket is biztosítani tudó modellrendszer létrehozása.
- II.2. Bemutatni, 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 eltérő kötőhelyek membránbeli elhelyezkedésének azonosítása.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Mintakészítés

##### 3.1.1. Felhasznált anyagok

*Foszfátpuffer (PBS):* 1 liter vízhez 2,86 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (12\text{H}_2\text{O})$ -t, 0,27 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -et és 8,00 g NaCl-ot mértem be. Az oldathoz ioncserélt csapvizet használtam. Feloldás után az oldat pH-ját 7,4-re állítottam be szobahőmérsékleten. Az így kapott puffer 10 mM-os foszfátoldat. A törzsoldatot 4 °C-on tároltam. A további felhasználáshoz az oldatot 0,22  $\mu\text{m}$ -es szűrővel szűrtem.

*Foszfolipidek:* a liposzóma készítésnek megfelelő kiralitású (L- $\alpha$ ), különböző szénlánc hosszúságú telített foszfokolinokat használtam (Sigma, 99% tisztaságú): a 14 szénatomos zsírsavdallancú 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfátidil-kolint (röviden *dimirisztoil-foszfátidilkolit*, *DMPC*,  $M = 677,93$  g/mol), a 16 szénatomos 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfátidil-kolint (röviden *dipalmitoil-foszfátidilkolin*, *DPPC*,  $M = 734,04$  g/mol) és a 18 szénatomos 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfátidil-kolint (*disztearoil-foszfátidilkolin DSPC*,  $M = 790,15$  g/mol).

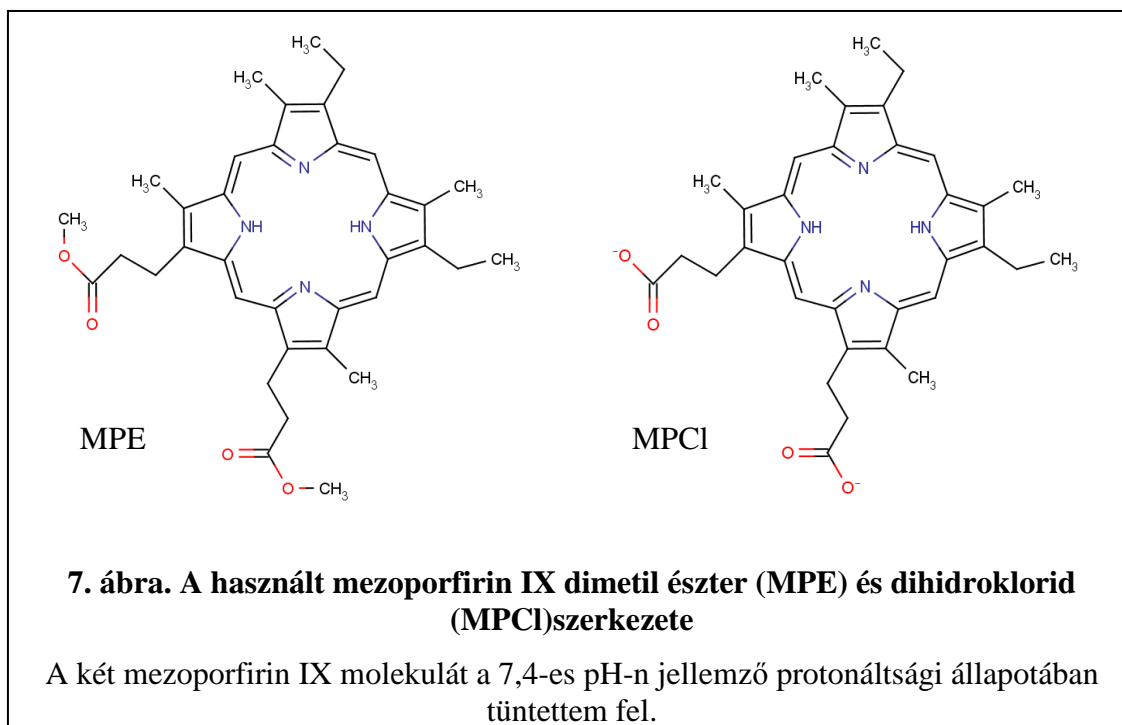
*Glicerín* (glicerol, 1,2,3-propántriol): >99,5%, spektroszkópai tisztaságú.

*Mezoporfirin IX dimetil észter (MPE):* a törzsoldat készítésekor 1 mg dimetil 8,13-bis(etil)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirin-2,18-dipropionátot (Frontier Scientific Inc.) ( $M = 594,75$  g/mol) oldottam fel 1 ml DMF-ben. A törzsoldat koncentrációja így körülbelül 1,7 mM.

*Mezoporfirin IX dihidroklorid (MPCl):* a törzsoldat készítésekor 1 mg 8,13-bis(etil)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirin-2,18-dipropionát dihidrokloridot ( $M = 639,62$  g/mol) (Frontier Scientific Inc.) oldottam fel 1 ml DMF-ben. A törzsoldat koncentrációja így körülbelül 1,6 mM.

Mindkét MP esetben a pontos koncentrációt abszorpciós spektrofotométerrel határoztam meg a moláris dekadikus extinkciós együttható alapján. A törzsoldatot 4 °C-on tároltam, fénytől védve – elkerülve így a fény miatti lebomlást.

A kétféle MP szerkezetét a 7. ábra mutatja.



*N-N*-dimetilformamid (DMF): >99,8%, spektroszkópai tisztaságú.

### 3.1.2. Liposzómák előállítása

Az adott foszfolipidből 10 mg-ot mértem ki, maximálisan tized mg hibával. Ehhez szerves oldószerként 200  $\mu$ l kloroformot adtam, majd ezt fokozatosan elpárologtattam, figyelve arra, hogy az edény falán egyenletesen alakuljon ki a lipidfilm. A párologtatást első lépésben nitrogénnel, majd vákuumos szárítással (kb. 20 Pa nyomáson, 15 percig) végeztem, ezt követően legalább egy napig exsikkátorban tároltam. Ezt követte a film hidrálása az adott lipid fő fázisátalakulási hőmérsékleténél (DMPC: 24 °C; DPPC: 42 °C; DSPC: 55 °C) néhány fokkal magasabb hőmérsékleten, tízszer 100  $\mu$ l, vagyis összességében 1 ml PBS oldattal. Az így kialakult egykomponensű, többrétegű liposzómákból (MLV) kis egyrétegű liposzómákat (SUV) készítettem ultrahangos és extrudációs módszerrel. A kétféle módszer eredményeképpen kapott liposzómák átlagos átmérője más lehet, de lipidkörnyezetként azonos tulajdonságúnak tekinthetők az eltérő módon, de azonos foszfolipidből készült liposzómák [58, 59].

Az *ultrahangos módszer* (UH) esetén az MLV-ket ultrahang (SANYO MSE Soniprep 150 W) segítségével 2-szer 10 percig 5 perces szünettel rázattam (23 kHz-en, 8  $\mu\text{m}$  amplitudóval) a lipid  $T_m$ -je alatti hőmérsékleten. Ezt követően a szennyeződéseket (például a Ti részecskéket az ultrahangfej kopása miatt) és az MLV-maradékot centrifugálással (Beckman J2-21 centrifugával, 20 perces, 13000 1/perc fordulatszámmal) távolítottam el.

Az *extrudációs módszer* esetén az MLV-ket Avanti micro extruder segítségével (Avanti Polar Lipids INC) polikarbonát membránon (nucleopore track-etch membrane, Whatman) keresztül nyomtam át, a membránpórust szakaszosan csökkentve (rendre 0,4; 0,1; 0,05; 0,01  $\mu\text{m}$ -es) számos alkalommal (rendre 11-szer; 11-szer; 11-szer és 41-szer). A folyamat során a hőmérséklet az adott lipid  $T_m$ -je alatt volt.

Az így kapott liposzóma-törzsolatok lipidkoncentrációja (a bemért foszfolipid tömege alapján becsülve) körülbelül 13–15 mM (oldallánc hosszától függően). Liposzómák esetében érdekes lehet a *liposzóma lipidtartalmának* és így a *liposzómakoncentrációnak* a becslése is. Ehhez az egyik legbővebb információt az Encapsula NanoSciences LLC ([www.liposomes.org/2009/01/number-of-lipid-molecules-per-liposome.html](http://www.liposomes.org/2009/01/number-of-lipid-molecules-per-liposome.html)) szolgáltatja. Ez alapján egy liposzóma lipidtartalmát ( $N_{lipid}$ ) a következőkből becsülhetjük:

$$(3.1) N_{lipid} = \frac{4 \cdot \pi \cdot \left[ \left( \frac{d}{2} \right)^2 + \left( \frac{d}{2} - h \right)^2 \right]}{a},$$

ahol  $d$  a liposzóma átmérője,  $h$  a kettősréteg vastagsága és  $a$  a lipid „feji részének” felülete (esetünkben 0,6–0,7  $\text{nm}^2$ ).

Megemlítem, hogy a 4.1.2. fejezet számításai alapján kiderül, hogy az extrudációs technikával előállított különböző lipidösszetevőjű liposzómák lipidtartalma közel azonos, míg az ultrahang segítségével előállítottaké eltérő.

### 3.1.3. Liposzóma–porfirin minta előállítása

A PBS-t és DMF-t egyaránt tartalmazó minták esetében a PBS:DMF oldószeres térfogataránya mindig 9:1 volt (ennek következtében a DMF koncentráció azonos a mintákban). A liposzóma–porfirin minta összeállítása 22 °C-on történt. Kivétel ez alól

az alacsony hőmérsékleten mért *DSPC HT* jelű minta, ahol vízfürdő segítségével a mintakészítés 45 °C-on történt. Az eljárások során először a liposzóma-törzsoldatot PBS-ben, illetve a MP-törzsoldatot DMF-ben a kellő koncentrációra hígítottam, majd ezt követően adtam a PBS oldószerű oldathoz a DMF-et tartalmazót – így elkerülhető a liposzóma-károsodás a túl nagy DMF koncentráció miatt, illetve az MP aggregáció a vízfázisban. Ezt követően óvatos keverés mellett minden esetben legalább 30 percig inkubáltam a mintát – ez alatt kialakul a rendszer dinamikus egyensúlya, amit az támaszt alá, hogy sem az abszorpció, sem az emissziós spektrumokban nem történik változás 30 perces inkubációt követően.

### **3.1.3.1. Liposzóma–porfirin minta a kötődési paraméterek meghatározására**

A mintasorozatok összeállítása az előzőekben leírtaknak megfelelően történt. A liposzóma koncentrációját 0 és 0,4 mM tartományban változtattam. Ezekben a mérésekben extrudációval előállított liposzómákat használtam. Az MP koncentrációja a mintákban állandó volt (MPE esetében  $1,67 \cdot 10^{-7}$  M, míg MPC1-t tartalmazó mintákban  $1,5 \cdot 10^{-7}$  M).

### **3.1.3.2. Liposzóma–porfirin minta az alacsony hőmérsékletű mérésekben**

Az ultrahangos technikával frissen elkészített liposzóma törzsoldathoz adtam hozzá a DMF-fel négyszeresére hígított MP törzsoldatot 9:1 arányban. 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 kapott viszkózus mintát további alapos keveréssel homogenizáltam kb. 45 percen keresztül. Ezt követően a mintát azonnal a 70 K-re hűtött kriosztátba helyeztem. A mintában az MP végső koncentrációja kb. 20  $\mu$ M, a lipidkoncentráció kb. 7 mM.

## 3.2. Mérési módszerek

### 3.2.1. Fényszórásmérés

A fényszórás méréséhez használt – a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben készült – berendezés egy goniométert (ALV GmbH, Langen, Germany), egy diódalézer által gerjesztett szilárdtest lézert (58-BLS-301, Melles Griot) – amely 457 nm-es, változtatható, de maximálisan 150 mW teljesítményű fényt biztosított – és egy fénydetektort (H7155 PMT module, Hamamatsu) tartalmazott. A szórt fény intenzitását a megvilágításhoz képest 90°-ban mértem.

A dinamikusfényszórás-méréshez a szintén a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben kifejlesztett „*correl*” program segítségével kaptam meg az autokorrelációs görbéket. Megjegyzendő, hogy az autokorrelációs görbe lecsengése a részecskék diffúziós együtthatóján kívül függ a műszer geometriai elrendezésétől és a használt fényforrásnak a mintában mérhető hullámhosszától. A geometriai paramétert polisztirol gömbök segítségével végzett kalibrációval vette figyelembe a program. Az általam használt oldatok törésmutatóját és a diffúziós együtthatót befolyásoló viszkozitást, valamint a hőmérsékletet az autokorrelációs függvények illesztésekor vettem figyelembe.

A „*correl*” által szolgáltatott autokorrelációs függvényekből a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben kifejlesztett, maximum entrópia módszer alapú „*MEM*” illesztőszoftver segítségével kaptam meg az autokorrelációt alkotó komponensek relatív gyakoriságát a hidrodinamikai sugár függvényében, ami gömbszerű részecskék esetében a tárolt tömeg eloszlásfüggvényét mutatja. Az üregesnek tekinthető liposzómák esetében a tömeg közelítőleg a felülettel, így jó közelítéssel a gömbszerű részecske sugarának négyzetével arányos. Így a liposzómák méret (hidrodinamikai sugár) szerinti relatív gyakorisági eloszlását a kapott tömegeloszlás görbe  $r^{-2}$  szerinti súlyozásával számítottam, ahol  $r$  a *liposzóma hidrodinamikai sugara* [60].

A csak liposzómát tartalmazó törzsoldatokat 6-szoros hígítás (PBS-sel) után mértem meg – így kisebb zaj és rövidebb mérési idő mellett határozható meg a hidrodinamikai sugár.

A DMF-t, illetve glicerint tartalmazó minták esetében további hígítást nem alkalmaztam, hogy ne befolyásoljam a mérendő rendszert.



Az MP 9:1 arányú PBS:DMF (liposzóma nélküli) oldatában az MP koncentrációjától függő aggregációt a szórt fény intenzitásának változása alapján a 1,5 nM–35 µM koncentrációtartományban vizsgáltam. Referenciaként 0,22 µm-es szűrővel szűrt desztillált víz fényszórás-intenzitását használtam.

Az adott százalékban glicerint is tartalmazó vizes oldatok törésmutatóját és viszkozitását az irodalomban található adatok alapján számítottam [61, 62]. A DMF-et tartalmazó vizes oldatok viszkozitását *Höppler-féle golyós viszkoziméterrel* határoztam meg. Ennek eredménye: a 10 térfogatszázalékos DMF oldat viszkozitása 22 °C-on  $1,13 \pm 0,01$  mPa·s. (Hibaként a szórást tüntettem fel, 10 elemű minta esetén.)

### 3.2.2. Abszorpciós spektrofotometria

Az *abszorpciós mérésekhez* kétutas spektrofotométert használtam (Cary 4E UV-VIS spectrophotometer, Varian). A műszer lineáris a 0,1–3 optikai denzitás (röviden OD, másnéven extinkció vagy abszorbancia) tartományban. A mérések során mindig – nemcsak a különböző összetevőket tartalmazó MP oldatok összehasonlításakor – teljes spektrumot rögzítettem a 300–700 nm-es tartományban 1 nm-es lépésközzel.

Az MP oldatok *koncentráció-meghatározását* az OD és a dekadikus moláris extinkciós együttható alapján a *Lambert–Beer törvény* segítségével végeztem. Az MPCl extinkciós együtthatója DMF-ben ismert ( $397 \text{ nm-en } 1,55 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) [63], az MPE együtthatója pedig saját mérések alapján a mérési hibán belül ugyanennyinek adódott. (Több törzsoldatot készítve, azokat eltérő koncentrációra hígítva mértem az OD-t a bemért tömeg alapján számolt koncentráció függvényében. Erre a görbére illesztett egyenes meredekségéből határoztam meg a dekadikus extinkciós együttható értékét.)

### 3.2.3. Szobahőmérsékletű fluoreszcencia spektroszkópia, kötődési paraméterek meghatározása

A szobahőmérsékletű fluoreszcencia emissziós mérésekhez egy Fluorolog-3 típusú (FL3-22-es modell, Jobin Yvon S.A. HORIBA), a gerjesztési és emissziós oldalon egyaránt kettős monokromátorral rendelkező eszközt használtam. A fényforrás egy 450 W-os Xe lámpa (Osram XBO) volt. A detektálást a gerjesztési irányhoz képest 90°-ban fotonszámláló üzemmódban használt fotoelektron-sokszorozó (Hamamatsu

R928P) végezte. A gerjesztő fény időbeli fluktuációit, hullámhosszfüggő intenzitását beépített referenciadióda jele alapján korrigáltam. Az emissziós oldal hullámhosszfüggő korrekcióját a műszer korrekciós fájlja alapján végeztem. (A későbbiekben erre a műszerre mint L2b hivatkozom.)

A kötődési paraméterek meghatározásakor a mintákat 22 °C-ra beállított szabályozható hőmérsékletű mintatartóban rögzítettem. A mintákat 397 nm-en ( $25189 \text{ cm}^{-1}$ ) gerjesztettem, az emissziós spektrumokat 600 és 640 nm ( $16667\text{--}15625 \text{ cm}^{-1}$ ) között, 0,5 nm-es lépésközzel vettem fel.

A kromofórok kötődési paramétereinek meghatározására elterjedt megoldás a titrálósos spektroszkópia. Jelen esetben a liposzómába kötött MP emissziós jelét mértem úgy, hogy változtattam a minta lipidkoncentrációját, de az MP koncentrációja mindig azonos volt. A lehetséges metodikai hibák elkerülése érdekében [64, 65] az egyszerűsített kötődési paraméterszámítások helyett a reverzibilis egyensúlyi folyamatra felírt tömeghatás törvényéből indultam ki:

$$(3.2) \quad n \cdot [L]_f \cdot [MP]_f = K_d \cdot [MP]_b,$$

ahol  $n$  megadja egy lipidmolekulára eső lehetséges „porfirinkötőhelyek” számát,  $[L]_f$  a szabad lipidek koncentrációja,  $[MP]_f$  a szabad,  $[MP]_b$  a kötött porfirinek száma,  $K_d$  pedig a disszociációs állandó. Az ismeretlen szabad lipid- és porfirinkoncentrációk a mért minta lipidkoncentrációja ( $[L]$ ), illetve porfirinkoncentrációja ( $[MP]$ ) segítségével,  $n$ -et és  $[MP]_b$ -t felhasználásával kifejezhetők:

$$(3.3) \quad [L]_f = [L] - [L]_b = [L] - \frac{[MP]_b}{n}, \quad (\text{ahol } [L]_b \text{ a kötött lipidek koncentrációja}),$$

$$(3.4) \quad [MP]_f = [MP] - [MP]_b.$$

A (3.2) képletbe visszahelyettesítve nyerjük:

$$(3.5) \quad n \cdot \left( [L] - \frac{[MP]_b}{n} \right) \cdot ([MP] - [MP]_b) = K_d \cdot [MP]_b.$$

Egyszerűsítve és rendezve az egyenletet  $[MP]_b$ -re:

$$(3.6) \quad [MP]_b^2 + [MP]_b \cdot (-n \cdot [L] - [MP] - K_d) + n \cdot [L] \cdot [MP] = 0.$$

Az  $[MP]_b$ -t kifejezve a másodfokú egyenlet megoldóképlete alapján:

$$(3.7) [MP]_b = \frac{1}{2} \left\{ n \cdot [L] + [MP] + K_d \pm \sqrt{(n \cdot [L] + [MP] + K_d)^2 - 4 \cdot n \cdot [L] \cdot [MP]} \right\}.$$

Mivel  $[MP]_b < [MP]$ , ezért csak a következő gyök lehet megoldás:

$$(3.8) [MP]_b = \frac{1}{2} \left\{ n \cdot [L] + [MP] + K_d - \sqrt{(n \cdot [L] + [MP] + K_d)^2 - 4 \cdot n \cdot [L] \cdot [MP]} \right\}.$$

Ha feltételezzük azt, hogy a kötött porfirinek függetlenek egymástól – legalábbis abszorpciós és emissziós valószínűségeiket tekintve –, akkor a kötött MP-ből származó mért fluoreszcencia intenzitás egyenesen arányos  $[MP]_b$ -vel. Így ismert MP koncentráció mellett ismert lipidkoncentráció függvényében mért  $[MP]_b$ -nek megfelelő fluoreszcencia jel görbéjének illesztésével megkaphatjuk a kötődést jellemző paramétereket ( $n$ , illetve  $K_d$ ). Az irodalomban gyakrabban használják a kötődési állandót ( $K_b$ ) a disszociációs állandó helyett. Ezt a  $K_b = n/K_d$  összefüggés alapján számíthatjuk.

A görbék illesztését *Origin 7* szofver (OriginLab Corporation) *non-linear curve fit* funkciójának segítségével végeztem.

### 3.2.4. Alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia mérések

FLN méréseket 3 különböző eszköz segítségével végeztem. A továbbiakban L1-gyel jelölt nagy felbontású spektrométerben a gerjesztő fényforrás egy Rodamin (6G) 590-et (Exciton Co.) tartalmazó hangolható festéklézer (Coherent 899-01, Coherent Inc.), amelyet egy folytonos üzemmódú argon-ion lézer pumpált (Coherent Innova 307). Az emittált fény hullámhossz szerinti felbontását monokromátor (Jobin-Yvon THR 1000) végezte. A fluoreszcens fényt a gerjesztési irányhoz képest 90°-ban egy hűthető, fotonzámláló üzemmódban használt fotoelektron-sokszorozó (Hamamatsu R943-02) detektálta. Az L1 spektrométer gerjesztésbeli korrekcióját a fényforrás hullámhossztól függő teljesítményének mérésével végeztem.

Az L2a jelzéssel hivatkozok a CD900 luminométerre (Edinburgh Analytical), amelyben a gerjesztésért egy 75 W-os Xe lámpa volt felelős. A detektálását a gerjesztési irányhoz képest 90°-ban egy fotonzámláló üzemmódban használt fotoelektron-sokszorozó (Hamamatsu R955) végezte. A gerjesztő és az emittált fény spektrális korrekcióját a gyártó által rendelkezésre bocsátott korrekciós fájlok segítségével végeztem.

Az L2b luminométer megegyezik a szobahőmérsékletű méréseknél (a 3.2.3. pontban) ismertetett eszközzel.

Az L1-es rendszer spektrális felbontása a gerjesztési oldalon 0,1 nm, emissziós oldalon 0,4 nm, az L2a, L2b rendszerek 0,5 nm-es felbontásúak mindkét oldalon.

A mintát mindhárom esetben ugyanabban a zárt rendszerű, hőmérsékletvezérelt, héliumos kriosztátban helyeztem el (Cryophysics).

A mérés szempontjából kulcsfontosságú az alacsony hőmérséklet hirtelen elérése, hogy a szobahőmérsékletű minta egy adott pillanatát rögzítsük. Ezért az elkészült, glicerint is tartalmazó, kb. 100  $\mu$ l mennyiségű liposzóma-mezoporfirin mintát közvetlenül az előzőleg 70 K hőmérsékletre hűtött kriosztátba helyeztem. A behelyezés közben nitrogéngázt áramoltattam a nyitott kriosztátban, hogy elkerüljem a légköri pára lecsapódását az ablakokon. A behelyezés folyamán a mintatartó hőmérséklete legfeljebb 100 K-re emelkedett. A minta behelyezése után a kriosztátot lezárva csökkentettem tovább a hőmérsékletet  $10 \pm 1$  K értékre. A mérés során a kriosztát ezt az értéket tartotta. A spektroszkópai mérés után a kriosztát hőmérsékletét fokozatosan emeltem a szobahőmérsékletre, majd a mintát kivettem, és ellenőriztem a minta épségét dinamikusfényszórás-méréssel.

Az előzetes mérések után a különböző liposzóma-MP minták mindegyikénél az emissziós spektrumsorozatokat 600 és 640 nm ( $16667$ – $15625$   $\text{cm}^{-1}$ ) között, 0,5 nm-es lépésközzel vettem fel, a gerjesztési hullámhosszat 1 nm-enként 555 és 585 nm ( $18018$ – $17094$   $\text{cm}^{-1}$ ) között változtatva.

#### **3.2.4.1. FLN mérések néhány jellegzetessége**

Az FLN spektrumok méréséhez, értékeléséhez, megértéséhez néhány jellegzetességét figyelembe kell vennünk.

1. A szakirodalomban található eddigi FLN mérések eredményei a következő feltételezéseket támasztják alá [45, 46, 48-54, 66]:

- a) Alacsony hőmérsékleten a vizsgált molekulák fluktuációi befagyottnak tekinthetők, gyors hűtés esetén a szobahőmérsékletű minta adott pillanata fagy be.
- b) Alacsony hőmérséklet hatására a homogén vonalkiszélesedés lecsökken.

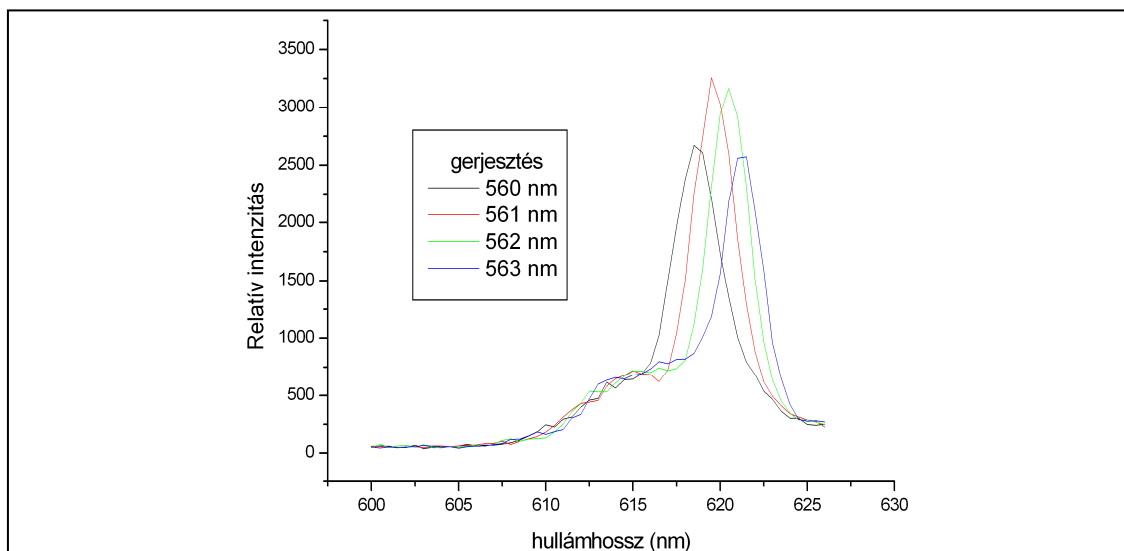
c) Alacsony hőmérsékleten a molekulák gerjesztés előtt mind az elektron-, mind a vibrációs állapotok tekintetében alapállapotúak.

d) Az inhomogén környezet csak az elektronátmeneti energiákat perturbálja, a vibrációs átmeneteket nem.

e) Különböző kromofóroknál az ugyanazon nívók közötti abszorpció, illetve emissziós valószínűségek állandók – függetlenül a környezeti konformációtól.

f) Az inhomogén eloszlás sűrűségfüggvénye egy vagy egynéhány Gauss függvénnyel jól leírható.

2. Az FLN spektrumok mérésénél kétféle gerjesztésről beszélhetünk: *rezonáns*, illetve *rezonancián kívüli gerjesztés*. Rezonáns a gerjesztés, ha a ZPL-t gerjesztjük. Ekkor pontosan azok a kromofórok gerjesztődnek, amelyekre teljesül a rezonanciafeltétel:  $h \cdot f = \varepsilon_{(1,k)} - \varepsilon_{(0,0)}$  – tehát a gerjesztő fény energiája megegyezik az első gerjesztett állapot valamely vibrációs energiaszintjének ( $k=0,1,2,\dots$ ) és a (gerjesztetlen) alapállapot energiájának különbségével. Ebben az esetben lesz a gerjesztés szelektív, az adott kromofór–környezet komplexre specifikus. Rezonancián kívüli gerjesztés esetében csak a PW-t gerjesztjük. A széles (az inhomogén eloszlásban



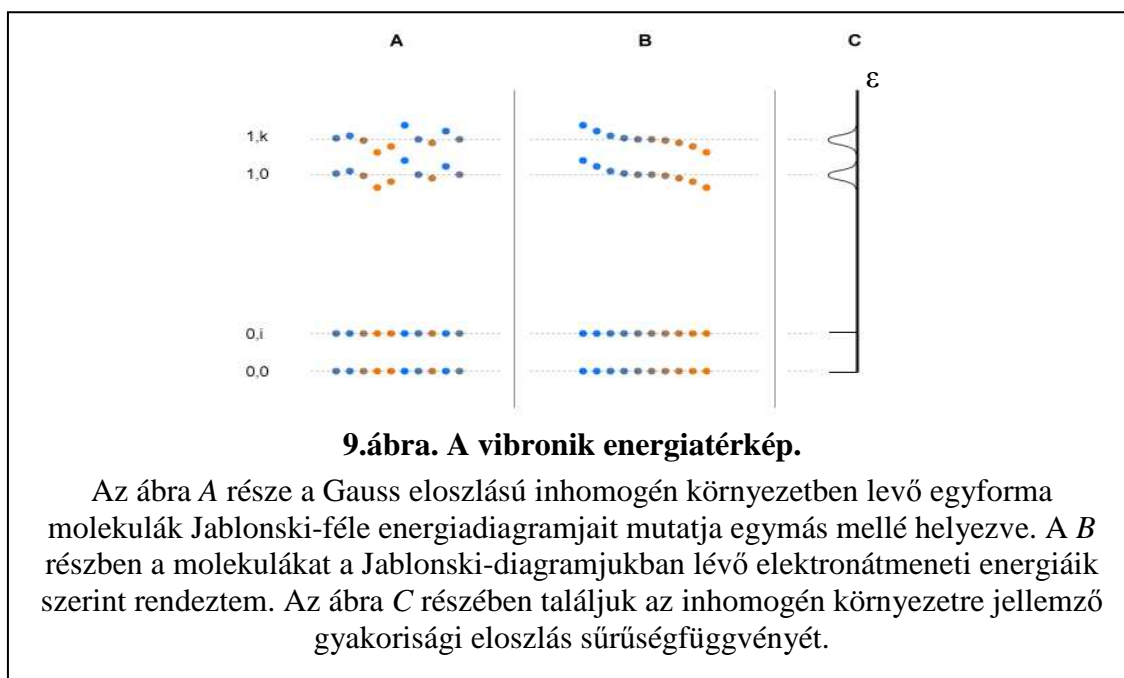
**8. ábra. A ZPL-t, illetve a PW-t ért gerjesztés következményei a spektrumban**

Különböző gerjesztési energiákon meghatározott FLN spektrumok (különböző színek jelölik ezeket az eltérő spektrumokat). A ZPL-t ért gerjesztés miatt az emissziós spektrumban megjelenő vonalak helyzete a gerjesztési energiával megegyező módon tolik. A rezonancián kívüli gerjesztés jelenléte miatt a ZPL-ek szuperonálnak a széles PW-ből származó sávra.

több ZPL-t átfedő) PW-t ért gerjesztés esetében az elektron-fonon csatolás miatt számos, de többnyire az összes kromofór gerjesztődik.

A kétféle gerjesztésnek eltérő a következménye a spektrumban. A rezonancián kívüli gerjesztés a fent említettek miatt lényegében hasonló a szobahőmérsékleti spektrumhoz: egy széles sávot eredményez és független a gerjesztési hullámhossztól. Ettől eltérően a ZPL-t ért szelektív gerjesztések esetén – amikor mindig más alpopulációk érintettek a kromofór sokaságból – az emissziós spektrumban megjelenő vonalak helyzete a gerjesztési energiával megegyező módon tolódik. Ez látható a 8. ábrán. A rezonancián kívüli gerjesztés jelenléte miatt a rezonáns gerjesztésből származó vonalak szuperponálódnak a széles PW-ből származó sávra – amely egy alapvonalat, háttérrel jelent a mérés szempontjából. A további módszertani elemzésben az elektron-fonon csatolás sávjait, a PW-t, illetve a rezonancián kívüli gerjesztésből származó spektrális jelet a jobb átláthatóság miatt az ábrákon nem tüntetem fel, a szövegben nem tárgyalom, tekintsük úgy, hogy a spektrumokból mint egy háttérrel levontuk (ahogyan ez a gyakorlatban is történik).

3. A rezonáns gerjesztés következtében kapott spektrumokat, valamint ennek a következményeit a *Kaposi-féle vibronik<sup>2</sup> energiatérkép* [66] révén tudjuk legkönnyebben bemutatni.



<sup>2</sup> A vibronik (vibronic) elnevezés a *vibrációs-elektronikus* (vibrational-electronic) kifejezésből származik, újabban a vibronikus kifejezést használják.

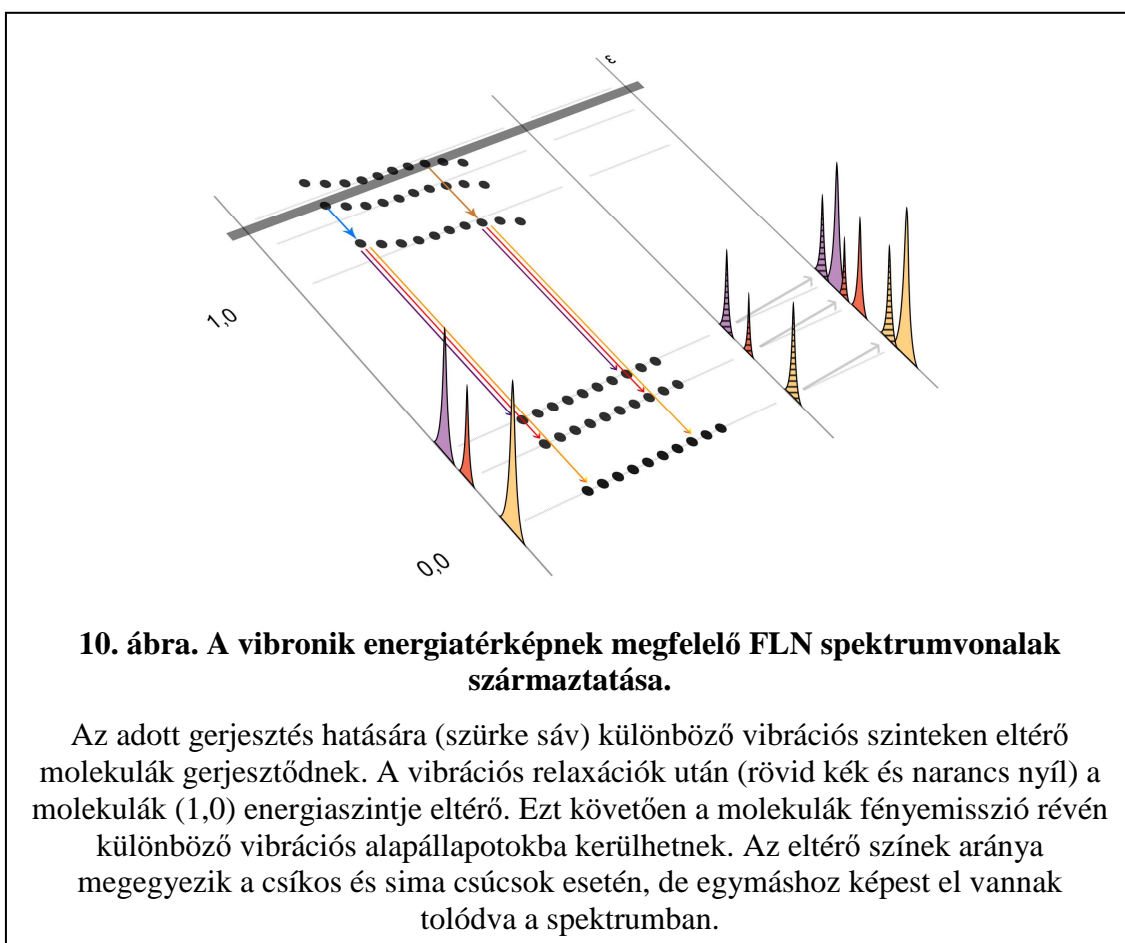
Tételezzünk fel az egyszerűbb tárgyalás kedvéért egy olyan inhomogén környezetet, amely egyetlen Gauss-görbével, 1 „site”-tal leírható eloszlású (egyenmű, de dinamikusan változó környezet – azaz homogén konformáció állítható elő a hőmérsékleti fluktuációk megszüntetésével). Továbbá tételezzük fel azt is, hogy a kromofóroknak csak egy konformációja van jelen – az inhomogenitás a környezetből származik. Jellemezzük az egyes molekulákat Jablonski-diagramjukkal. A könnyebb érthetőség kedvéért csak néhány vibrációs nívót tekintünk, valamint a könnyebb ábrázolás miatt tekintünk az összes kromofór egy reprezentatív (az inhomogenitást továbbra is Gauss eloszlással leíró) kis elemszámú mintáját – ez látható a 9. ábra A részén.

Ezt követően rendezzük gondolatban (az ábra B részén) a molekulákat a Jablonski-diagramjukban lévő elektronátmeneti energiáik szerint – ez a Kaposi-féle vibronik energiatérkép. A vibrációs nívók a sokaságban azonos módon futnak le („egymással párhuzamosaknak tekinthetők”), ugyanis a környezet a vibrációs szinteket nem perturbálja (lásd 1.d feltételezés). Az így sorbarendezett vibrációs görbék (az egyszerűség kedvéért az ábrán továbbra is csak néhány molekula nívórendszerét tüntettem fel pontokkal) mindegyike ugyanazt a környezeti inhomogenitást írja le egy *kumulatív eloszlásfüggvény* (angol elnevezésből rövidítve CDF) formájában. A gyakorlatban jobban szeretjük a sűrűségfüggvényt használni – ezt *spektrális sűrűségfüggvénynek* nevezzük (spectral density function, SDF) – ezt a 9. ábra C részében láthatjuk. Az (1,0) vibrációs szintet leíró eloszlásfüggvényt<sup>3</sup> kiemelt helyzete miatt külön névvel szokták illetni: ez az *inhomogén eloszlásfüggvény* (inhomogeneous density function, IDF<sup>4</sup>). (Az SDF-ek és IDF elkülönítésének természetesen csak akkor van jelentősége, ha az 1.d feltételezéssel nem élünk.) A kérdés az, hogy hogyan kapjuk meg ezt a környezeti inhomogenitást mutató eloszlást, azaz az ennek megfelelő elektronátmeneti energiaeloszlást az emissziós spektrumok alapján.

<sup>3</sup> A (gyakorisági) eloszlásfüggvényeknek két típusa van: kumulatív és sűrűségeloszlás-függvény. A rövidebb „eloszlásfüggvény” jelentése a különböző tudományterületeken eltér. Jelen dolgozatban ez alatt a sűrűségfüggvényt értem.

<sup>4</sup> Az IDF és SDF elkülönítésének csak akkor van jelentősége, ha nem teljesül az 1.d. feltétel (azaz a környezet a vibrációs átmeneteket is perturbálja). Az irodalomban az IDF helyett találkozhatunk a *population distribution function* (PDF) elnevezéssel is.

Vizsgáljuk meg a vibronikus diagramon egy keskeny sávú gerjesztést és az ennek hatására létrejövő spektrumvonalakat (10. ábra). A gerjesztés előtt a molekulák mind az elektron, mind a vibrációs állapotok tekintetében alapállapotúak – (0,0) állapotban vannak (lásd 1.c feltételezés). Innen a gerjesztési energiának megfelelően kerülnek valamilyen gerjesztett állapotba. A vibrációs sávok az inhomogenitás miatt átfedhetnek, így különböző gerjesztési nívón levő, különböző kromofórok ugyanazon energián gerjesztődhetnek. A Kasha-szabály értelmében az emisszió azonban minden esetben az (1,0) állapotból történik az alap elektronívó valamelyik vibrációs szintjére.



Az ábrázolásból jól látható, hogy a különböző vibrációs szinteken ugyanazzal az energiával gerjesztett kromofórok (1,0) állapotú energiája eltérő, aminek következménye, hogy a spektrumban elkülöníthetők.

A következőkben vizsgáljuk meg a kapott emissziós spektrumvonalak intenzitását. Az  $\varepsilon$  energiájú,  $\Delta\varepsilon$  sáv szélességű fényvel (1,k) nívóra gerjesztett, (1,0)  $\rightarrow(0,i)$  átmenethez tartozó emissziós vonal intenzitása:



$$(3.9) I_{(k,i)} = K \cdot I_g \cdot A_{(1,0) \rightarrow (0,i)} \cdot B_{(1,k) \leftarrow (0,0)} \cdot N_g,$$

ahol  $K$  egy konstans,  $I_g$  a gerjesztő fény intenzitása,  $A_{(1,0) \rightarrow (0,i)}$  az adott átmenetnek megfelelő emissziós,  $B_{(1,k) \leftarrow (0,0)}$  az adott átmenetnek megfelelő abszorpciós valószínűség,  $N_g$  pedig az  $\varepsilon$  energiájú,  $\Delta\varepsilon$  sávszélességű fényvel rezonánsan gerjeszthető kromofórok száma – azaz az inhomogén eloszlás sűrűségfüggvényének értéke az adott helyen. Visszatérve az 1.e feltételezésre: különböző kromofóroknál az ugyanazon nívók közötti abszorpciós, illetve emissziós valószínűségek állandók – függetlenül a környezeti konformációtól.

A vibrációs nívók „párhuzamossága” és a Kasha-szabály miatt a különböző energiájú gerjesztés hatására a különböző vibrációs szinteken lévő – különböző  $(1,k)$  –, de ugyanazon molekulapopulációból – azonos  $(0,0) \rightarrow (1,0)$  energiájú molekulákból – származó emissziós spektrumvonalak intenzitása csak az abszorpciós valószínűségek miatt tér el, tehát a vonalak amplitudóaránya konstans.

Hasonló kapcsolatot találunk az ugyanarról a gerjesztett vibrációs állapotból az alapállapot különböző vibrációs szintjeire visszatérő molekulák emissziós vonalai között – csak itt az emissziós valószínűség az eltérő (ezt láthatjuk a 10. ábrán: az eltérő színek aránya megegyezik a csíkos és sima csúcsok esetén).

A fentiekből következik, hogy ugyanazt az inhomogén környezetet írjuk le bármelyik  $(0,0) \rightarrow (1,k) \rightarrow (0,i)$  átmenet segítségével, ugyanolyan alakú SDF-t kapunk, csak konstans szorzóval eltérő (az abszorpciós átmeneti valószínűségnek megfelelő) amplitudóval. Azaz a gerjesztési frekvencia változtatására a megfelelő emissziós vonalakban bekövetkező intenzitásváltozás csak az adott  $\varepsilon$  energiájú fényvel rezonánsan gerjeszthető kromofórok számától függ, ezért bármelyik megfelelő spektrumvonalasort (amelyek a gerjesztéssel azonos módon tolódnak) végigkövetve megkapjuk az inhomogenitást leíró inhomogén eloszlásfüggvényt (IDF-t).

A görbék illesztését *Origin 7* szofver (OriginLab Corporation) *non-linear curve fit* funkciójának segítségével végeztem.

Az eltérő protonáltságból adódó kromofórok állapotainak számát *Marvin Beans* szoftver (ChemAxon Ltd.) segítségével vizsgáltam. A vizsgálandó porfirin kémiai szerkezetét a programcsomag *MarvinSketch* részének segítségével rajzoltam meg és

adtam meg a számításokhoz. Mindegyik protonálható csoport adott pH-hoz tartozó protonált állapotának valószínűségét a calculation/protonation menü pKa parancsával kaptam meg. (A program a molekula atomjainak parciális töltéseiből számol.)

Az MP-k és lipidek „méreteinek” becslését az egymással való összehasonlíthatóság miatt ugyancsak a *Marvin Beans* szoftverrel végeztem. (Az irodalomban nem találtam ugyanolyan módon meghatározott lipid és mezoporfirin geometriát.) A lipidlánc hossza így kb. 1,7–2,2 nm (a lánc hosszától függően), az MP-k pedig kb. 1,4–1,7 nm átmérőjűek (az értelmes legkisebb és legnagyobb átmérőket figyelembe véve). A lipidek feji része (a nyaki régióval együtt) kb 1,1 nm átmérőjű.

## 4. Eredmények

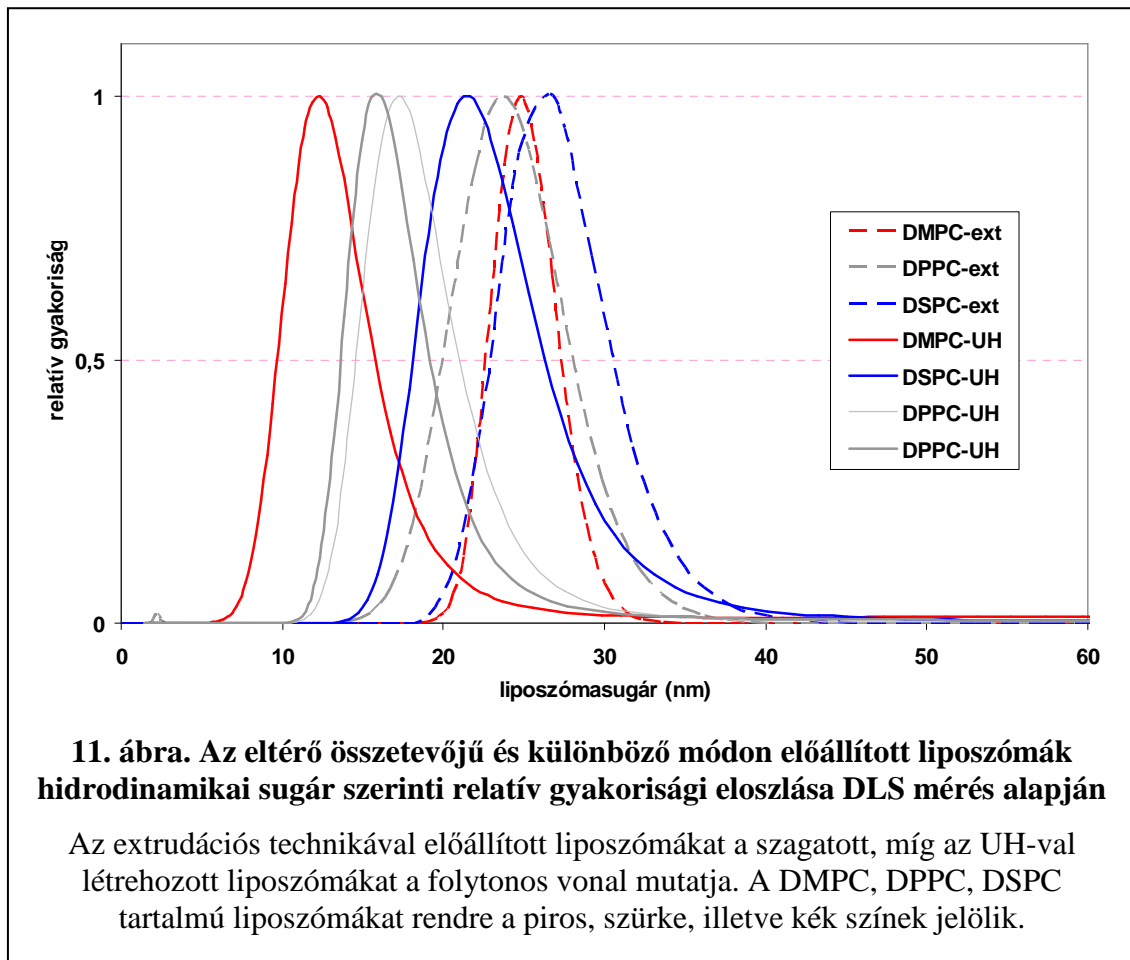
### 4.1. Dinamikufényszórás-mérésekből nyert információk

#### 4.1.1. A minták épségének ellenőrzése dinamikufényszórás-méréssel

Amint azt korábban részleteztem, a liposzómák előállítása többlépcsős folyamat, így előfordulhatnak szennyeződések, hibák a készítés során. Az ebből származó tévedések elkerülése érdekében minden preparálás után ellenőriztem a liposzómák méreteloszlását. A DMF-et tartalmazó MP, valamint a glicerin hozzáadása, az alacsony hőmérséklet, valamint maguk a mérések, vagy akár a mérés időtartama is befolyásolhatja a rendszert, azaz a liposzómák méreteloszlását. Így minden mintakészítési fázis után megvizsgáltam a modellrendszer épségét, illetve minden egyes mérés elején és végén a minta egy részének felhasználásával ellenőriztem a liposzómák azonos minőségét, a minta homogén voltát. A számos DLS mérésből származó, különböző feltételek melletti eredmény közül néhány példa látható a 11. és 12. ábrán. Az eredmények közül a következőkben leírtakat emelem ki.

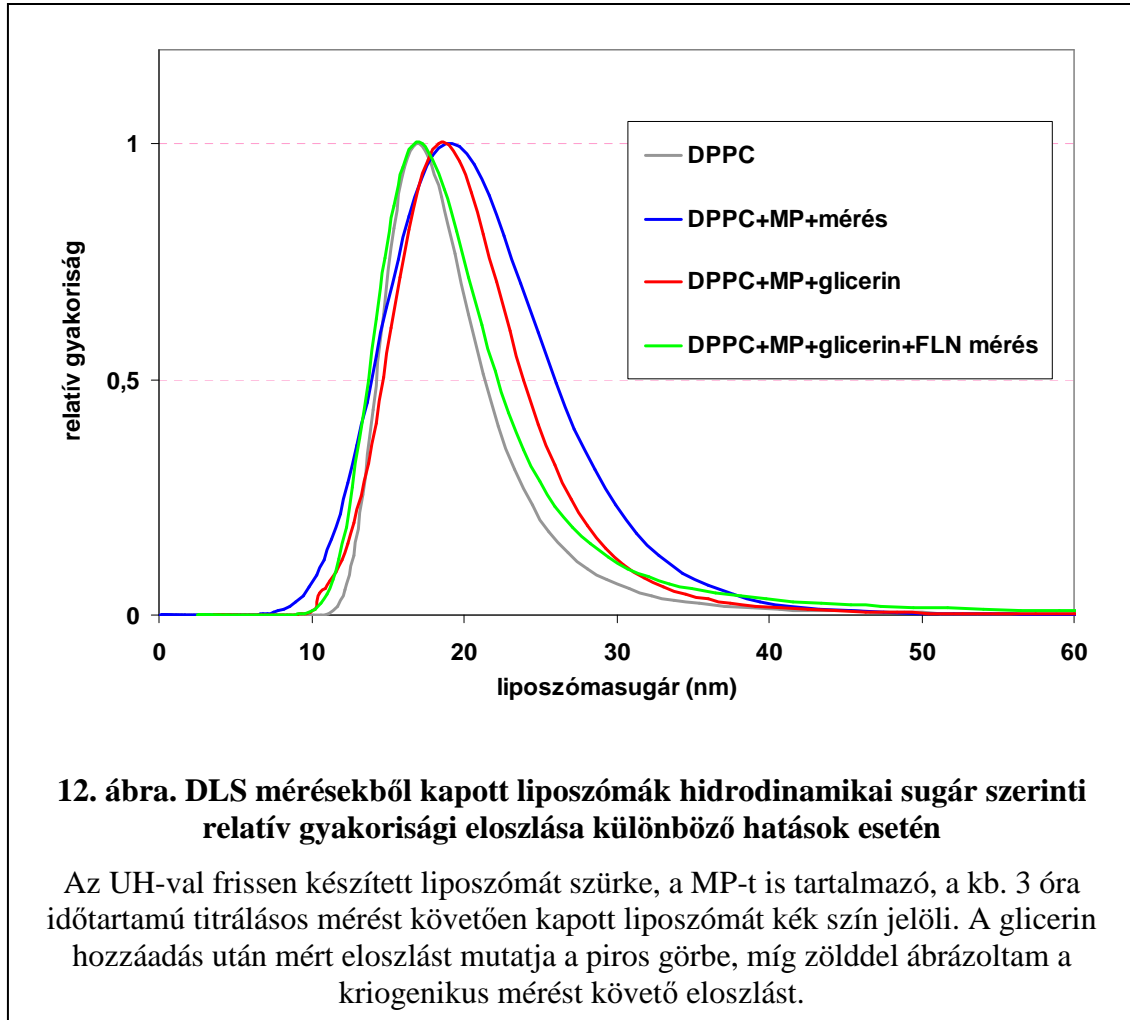
A liposzómák hidrodinamikai sugár szerinti gyakorisági eloszlása lognormál eloszlást követ. A minta átlagos liposzómanagyságát a sugár szerinti eloszlás *móduszával* jellemeztem. Azokat a mintákat tekintettem jónak és használtam a továbbiakban, amelyeknél az *eloszlás homogén* volt – az eloszlásgörbe 1 csúcsot tartalmazott a mért tartományban –, és a módusz megfelelt az adott liposzómánál elvártnak (a munkáim során összeállított néhány száz mintából rossznak ítélt liposzómaminták relatív száma öt százalék körül volt). Az UH technikával készült liposzómák átlagos mérete (sugarának módusza) a különböző lipidösszetételeknél eltért. DMPC esetén 12 nm, DPPC-nél 18 nm, míg DSPC-nél 22 nm volt átlagosan. Az extrudációs módszerrel készült liposzómáknál az átlagos sugárméret megegyezett DMPC és DPPC esetén – 24 nm –, DSPC esetén pedig 26 nm adódott. 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 *félértéksszélessége* az ultrahanggal készített liposzómák esetén 4,5–11,5 nm, míg az extrudáltaknál 4–8 nm

között mozgott. A 11. ábrán több ultrahangos DPPC preparálás eredményét is feltüntettem, szemléltetve a minták reprodukálhatóságát és minimális eltérését.



Mind a szobahőmérsékletű, mind az alacsony hőmérsékletű mérések esetében a liposzómákhoz *DMF-ben oldott porfirint* adtam. A DLS mérésekből kapott liposzóma-eloszlásban – a megnövekvő viszkozitással való korrekció után – nem kaptam 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. Ezekre az esetekre mutat példát a 12. ábra. Meg kell jegyezni, hogy a glicerinnel mennyisége néhány térfogatszázaléknál eltért az egyes mintákban (kis térfogatban nagy viszkozitás mellett kellett a mintát

készíteni), ami a spektrumokat nem változtatja meg, de a korrekció szempontjából lényeges viszkozitást számottevően befolyásolja. Ezért, valamint a tömény minta miatt ezekben a mérésekben nagyobb zaj mellett, nagyobb hibával kellett számolni.



Összefoglalva: a liposzómák méreteloszlása homogén maradt, az eloszlás móduszában és félértékszélességében csak igen kis változás történt a mérések során, így kijelenthetjük, hogy a liposzómák nem károsodtak és feltehetően megőrizték MP tartalmukat (ez utóbbiról további eredmények a 4.3.1-es fejezetben találhatók).

#### 4.1.2. Liposzómák lipiddtartalmának és a minták liposzómakonzentrációjának

##### becslése

A dinamikusfényszórás-mérés eredményeit és az irodalmi adatokat felhasználva [67] (a lipiddösszetételtől függően a kettősréteg vastagsága esetünkben 4–5 nm, a lipid „feji részének” felülete pedig  $0,6\text{--}0,7\text{ nm}^2$ ) a (3.1) egyenlet alapján 10 %-os hibán belül megbecsülhetjük a liposzómák átlagos lipiddtartalmát és így az oldatok liposzómakonzentrációját. Az eltérő szénlánc-hosszúságú lipiddösszetevőjű SUV-ok és a liposzómák előállítási módszere alapján csoportosított értékeket az 1. táblázatban tüntettem fel.

**1. táblázat. A liposzómák átlagos lipiddtartalmának és a liposzóma-törzsoldatok liposzómakonzentrációjának becslése a liposzóma előállítási technika és a különböző lipiddösszetevők függvényében**

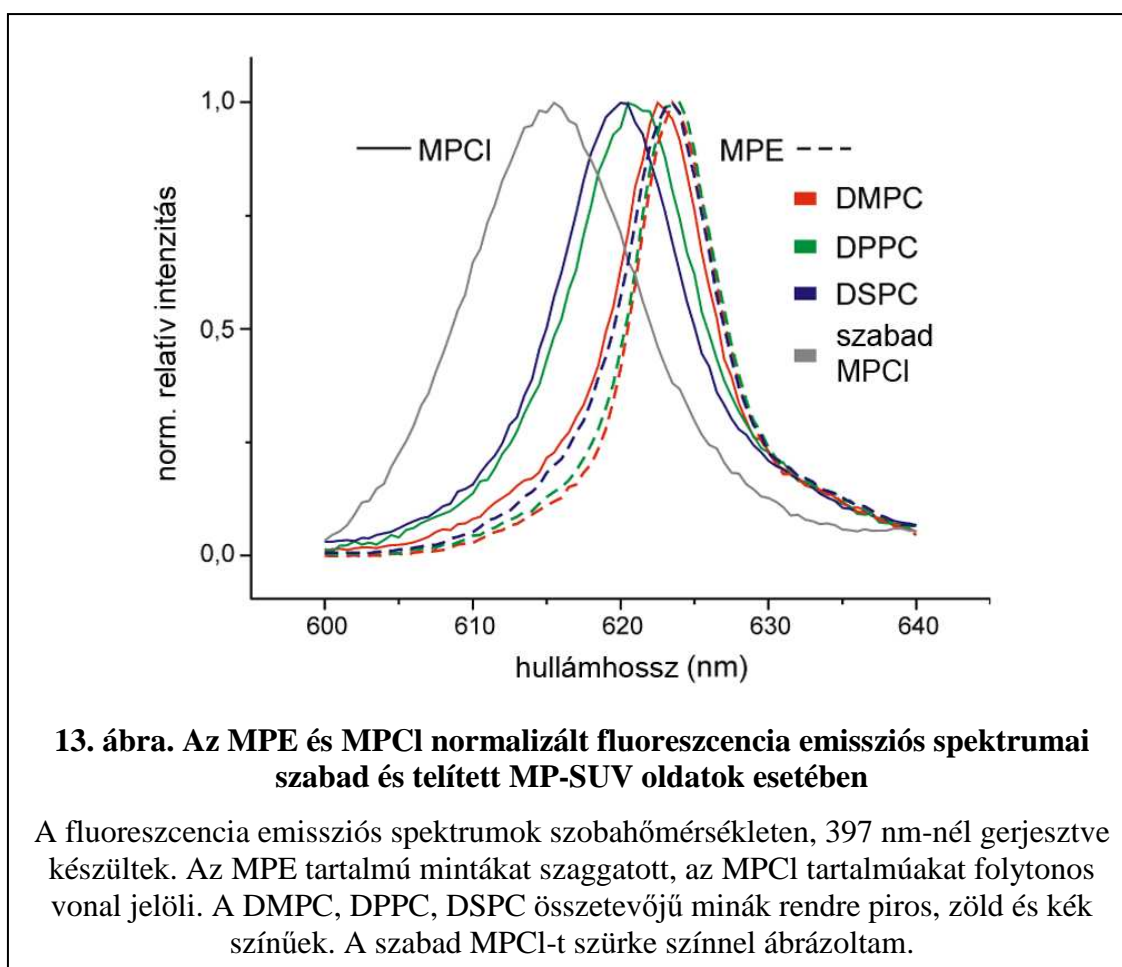
A becslés a (3.1.) egyenlet alapján a DLS mérések eredményeit felhasználva készült.

	extrudációs előállítás			ultrahangos előállítás		
	DMPC	DPPC	DSPC	DMPC	DPPC	DSPC
átlagos lipiddtartalom (lipiddmolekulaszám)	$1,9 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$
liposzóma-konzentráció ( $\mu\text{M}$ )	0,75	0,71	0,67	3,2	1,4	0,9

#### 4.2. Kötődési paraméterek meghatározása

A kötődési paramétereknek a 3.2.3. pontban leírtak szerinti számításánál feltételeztük, hogy a kötött MP molekulák egymástól függetlenek, abszorpciós, illetve emissziós valószínűségeik megegyeznek. Ennek megfelelően a mérések során olyan MP koncentrációt kellett használnom, ahol az MP feltételezhetően *monomer* formában van jelen. Az aggregátumok jelenlétét különböző MP koncentrációjú 9:1 arányú PBS:DMF (liposzóma nélküli) oldatban vizsgáltam a szórt fény intenzitásának változása alapján. Annál a koncentrációnál, amelynél a szórt fény intenzitása meghaladta a referencia oldatét (a műszer zajszintje) aggregációt tételeztem fel. Az MPE esetében ez kisebb

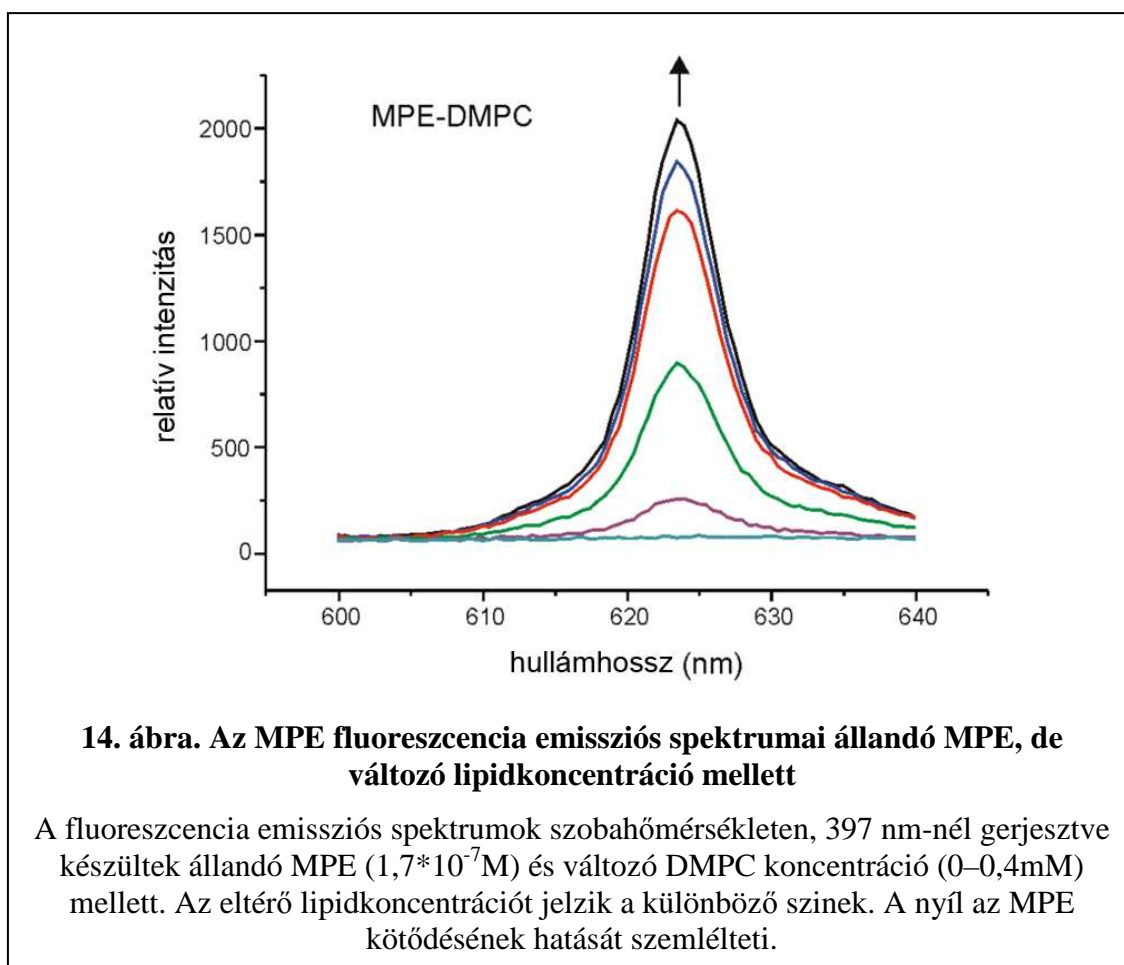
koncentrációnál következett be, mint az MPCl-nél. Annál a maximális koncentrációnál, ahol az MPE esetén aggregációt még nem tapasztaltam, egy nagyságrenddel kisebb koncentrációt használtam a kötődési paraméterek meghatározására. A kisebb porfirin aggregátumok (például dimerek) jelenléte így sem zárható ki teljesen, azonban ez csak a liposzómát nem tartalmazó mintát érintheti, hiszen az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a porfirinek liposzómába való kötődése elősegíti a monomerizációt [21]. Ezek alapján a titrálós mérések során monomer kötött porfirineket tételezhetünk fel.



A titrálós fluoreszcencia spektroszkópai mérések kiértékeléséhez első lépésként megvizsgáltam, hogy a különböző összetételű liposzómák esetén hogyan változik a spektrum az eltérő kémiai szerkezetű MP kötődése hatására. A 13. ábra mutatja az MPE és az MPCl normalizált fluoreszcencia spektrumait *szabad* (liposzóma nélküli), valamint *telített* (nagy liposzómakoncentráció – így  $[MP] \approx [MP]_b$ ) porfirinoldatok esetében. Lényeges különbség, hogy míg a szabad MPCl spektruma jól

mérhető, addig az MPE fluoreszcencia jele nem detektálható (az ábrán ezért nem tüntettem fel). A kötés hatására a különböző lipidösszetevőtől függő módon a spektrum a nagyobb hullámhosszak felé tolódott. Az MPE és az MPCl között tapasztalt eltérés miatt a spektrumok kiértékelése kissé eltérő megoldást igényel a kétféle mezoporfirin esetében.

#### 4.2.1. Az MPE kötődési paramétereinek meghatározása



Tekintettel arra, hogy a szabad MPE nem ad fluoreszcens jelet, feltételezhetjük, hogy az MPE titrálási mérése során detektált fluoreszcencia intenzitás folyamatos növekedése a kötött MPE eredménye. A 14. ábrán példaképpen az MPE-DMPC esetében különböző lipidkoncentráció mellett mért fluoreszcencia spektrumokat tüntettem fel. Amennyiben egyféle (vagy többféle, de a mérés szempontjából



megkülönböztethetetlen) kötőhelyet tételezünk fel, akkor az adott hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitásnak ( $I$ ) arányosnak kell lennie a kötött porfirin koncentrációjával ( $[MB]_b$ ), tehát felírhatjuk a következő összefüggést:

$$(4.1) \quad I(\lambda) = m(\lambda) [MP]_b,$$

ahol  $m(\lambda)$  független a lipidkoncentrációtól, csak a spektrum alakjára jellemző. A (4.1) egyenlet két különböző lipidkoncentráció ( $[L]_1$  és  $[L]_2$ ) esetén:

$$(4.2) \quad I_{[L]_1}(\lambda) = m(\lambda) [MP_1]_b,$$

$$(4.3) \quad I_{[L]_2}(\lambda) = m(\lambda) [MP_2]_b.$$

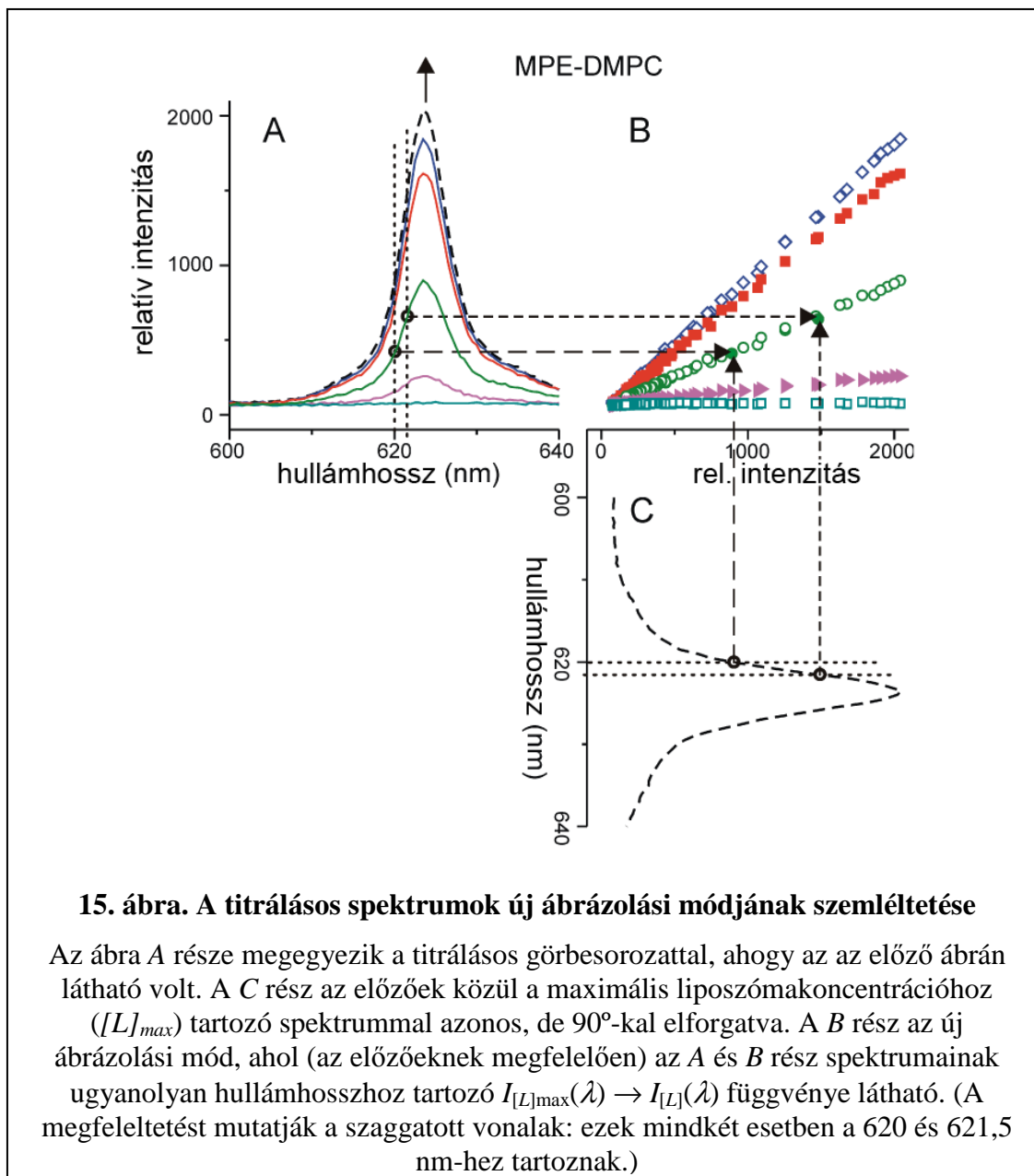
A két egyenlet hányadosát véve, és rendezve az első esetben mért fluoreszcencia intenzitásra:

$$(4.4) \quad I_{[L]_1}(\lambda) = I_{[L]_2}(\lambda) \frac{m(\lambda) [MP_1]_b}{m(\lambda) [MP_2]_b} = k_{1,2} I_{[L]_2}(\lambda),$$

ahol  $k_{1,2}$  a különböző lipidkoncentrációnál levő kötött  $[MP]$  aránya. Ha bármelyik lipidkoncentráció esetén referenciaként a maximális lipidkoncentrációhoz ( $[L]_{\max}$ ) tartozó intenzitásfüggvényt használjuk, és figyelembe vesszük a háttérrel egy  $C$  konstanssal, akkor a következő összefüggéshez jutunk:

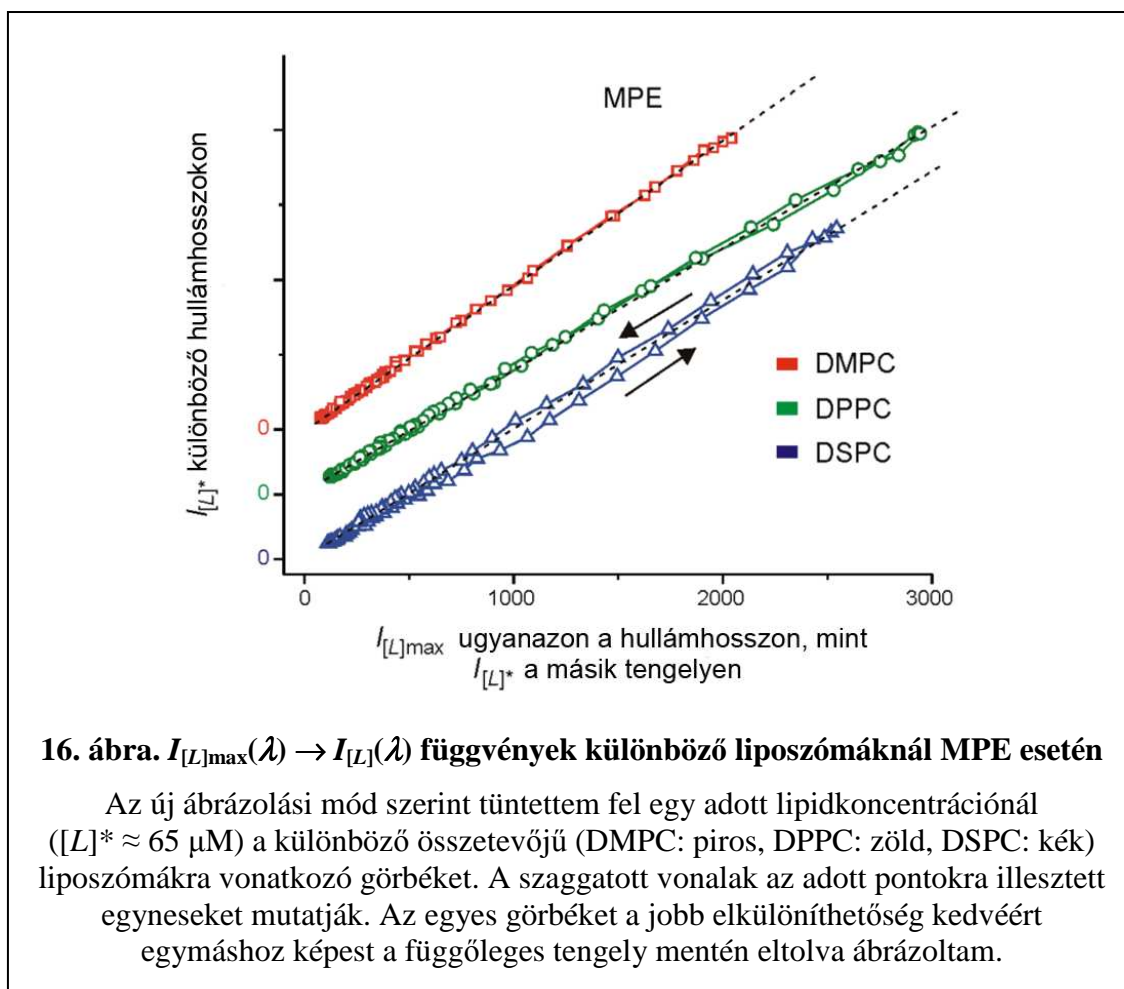
$$(4.5) \quad I_{[L]}(\lambda) = k_{[L]} I_{[L]_{\max}}(\lambda) + C,$$

ahol  $k_{[L]}$  megadja az adott  $[MP]_b$  arányát az  $[L]_{\max}$ -hoz tartozó  $[MP]_b$ -hez viszonyítva. Ezzel az átalakítással egy új ábrázolási mód is értelmet kap: egy adott lipidkoncentráció esetén a hullámhossz függvényében mérhető intenzitásokat ( $I_{[L]}(\lambda)$ ) ábrázoljuk a mindig megfelelő hullámhosszhoz tartozó maximális lipidkoncentrációnál mérhető intenzitások ( $I_{[L]_{\max}}(\lambda)$ ) függvényében. Röviden ez a  $I_{[L]_{\max}}(\lambda) \rightarrow I_{[L]}(\lambda)$  függvény, amely az eddig feltételezések szerint  $k_{[L]}$  meredekségű egyenest eredményez. A 15. ábra szemlélteti ezt az ábrázolási módot. Az ábra A része a szokásos elrendezést mutatja: különböző lipidkoncentráció mellett mért intenzitást a hullámhossz függvényében. A C ábrarész is hasonló, de 90°-kal el van forgatva a maximális lipidkoncentrációhoz tartozó spektrum. A különböző liposzómakoncentrációkhoz tartozó  $I_{[L]_{\max}}(\lambda) \rightarrow I_{[L]}(\lambda)$  egyeneseket a 15. ábra B részén tüntettem fel.



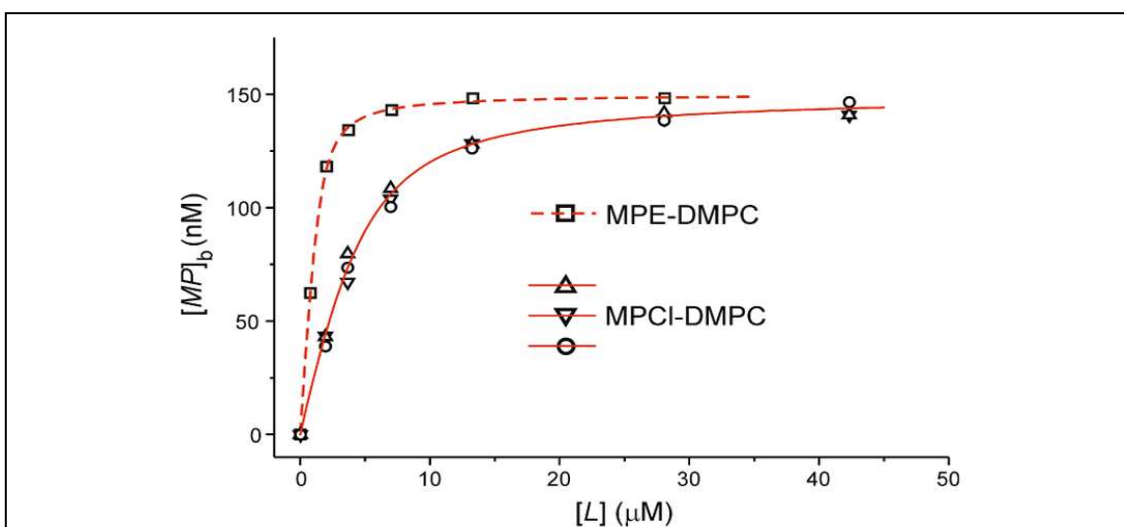
A 15. ábrán bemutatott új ábrázolási móddal tüntettem fel a 16. ábrán a különböző lipidösszetételű SUV–MPE minták jellemző görbéit és az azokra illesztett egyeneseket egy adott lipidkoncentrációnak ( $[L]^*$ ) megfelelően. Az ábrán jól látható, hogy a DSPC esetében az adatok egy *hurkot* képeznek (hiszterézisük van), eltérve az illesztett egyenestől. (Hasonló gyanú felmerül a DPPC esetében is, de a DMPC esetén ez soha nem látszott.) Ezt csak úgy magyarázhatjuk, hogy feltételezünk két eltérő, egymástól független – egymás kötését nem befolyásoló – „kötőhelyet” a liposzómákban. Ez természetesen kétféle kötési állandót eredményez. Azonban ezen

ábrázolás alapján sincs olyan paraméter, amivel a kötőhelyeket kvantitatívan külön jellemezhetnénk. (A klasszikus kötődési görbe ábrázolásakor pedig egyáltalán nem látszik a különbség, amint ez a 17. ábrán látszik.) Ezért a  $K_d$  meghatározásánál úgy jártam el, hogy a hurkoknak megfelelő átlagos értékeket számítottam.



Az új ábrázolási módot használtam arra, hogy az egyes egyenesek illesztésével a különböző lipidkoncentrációkhoz ( $[L]$ ) azok  $k_{[L]}$  értékeit rendeltem. Az így több pontból meghatározott  $k_{[L]}$  érték jobban becsli az  $[MP]_b$  értéket, mint az adott koncentrációhoz tartozó maximális fluoreszcencia-intenzitás egyetlen értéke. Az (átlagos) kötődési paraméterek meghatározását a módszereknél ismertetett (3.8)-as egyenlet illesztése alapján végezhetjük el. A kötődési görbe illesztése így a  $[L] \rightarrow k_{[L]}$  függvényre történt az  $n'$ ,  $K_d'$  és a  $[MP]$ -t helyettesítő  $k_{[\infty]}$  (teljes kötődést jellemző érték) illesztendő paraméterekkel.

A  $k_{\infty}$  ismeretében a  $k_{[L]}$  értékek visszaszámolhatók az adott liposzóma-koncentrációhoz tartozó  $[MP]_b$  értékekre, ugyanis  $k_{[\infty]}$  az ismert, bemért MP koncentrációhoz ( $[MP]$ ) tartozó érték. Ezzel kapjuk meg a  $[L] \rightarrow [MP]_b$  klasszikus kötődési görbét (17. ábra) és a végső illesztéssel az  $n$  és  $K_d$  paramétereke. Ezen adatokat a 2. táblázat mutatja. A kötődési görbe 1 kötőhelyre jellemző tipikus alakot ír le.



**17. ábra. A MPE és MPCl kötődési görbéi azonos lipidösszetételű liposzómánál (DMPC)**

A különböző kiértékelési módok eredményeképpen kapott illesztendő értékeket eltérő szimbólumokkal ábrázoltam. Az MPCl-nél a görbe alatti területből számított értékeket  $\triangle$  és  $\nabla$  (a 2 Gaussnak megfelelően), az új kiértékelésből származó pontokat  $\circ$  szimbólumok mutatják, az MPE esetén pedig a  $\square$  jel jelzi az új kiértékelési módszerből származó értékeket. Az MPE (szagatott vonal) és MPCl (folytonos vonal) illesztett kötődési görbéit jelzik a vonalak.

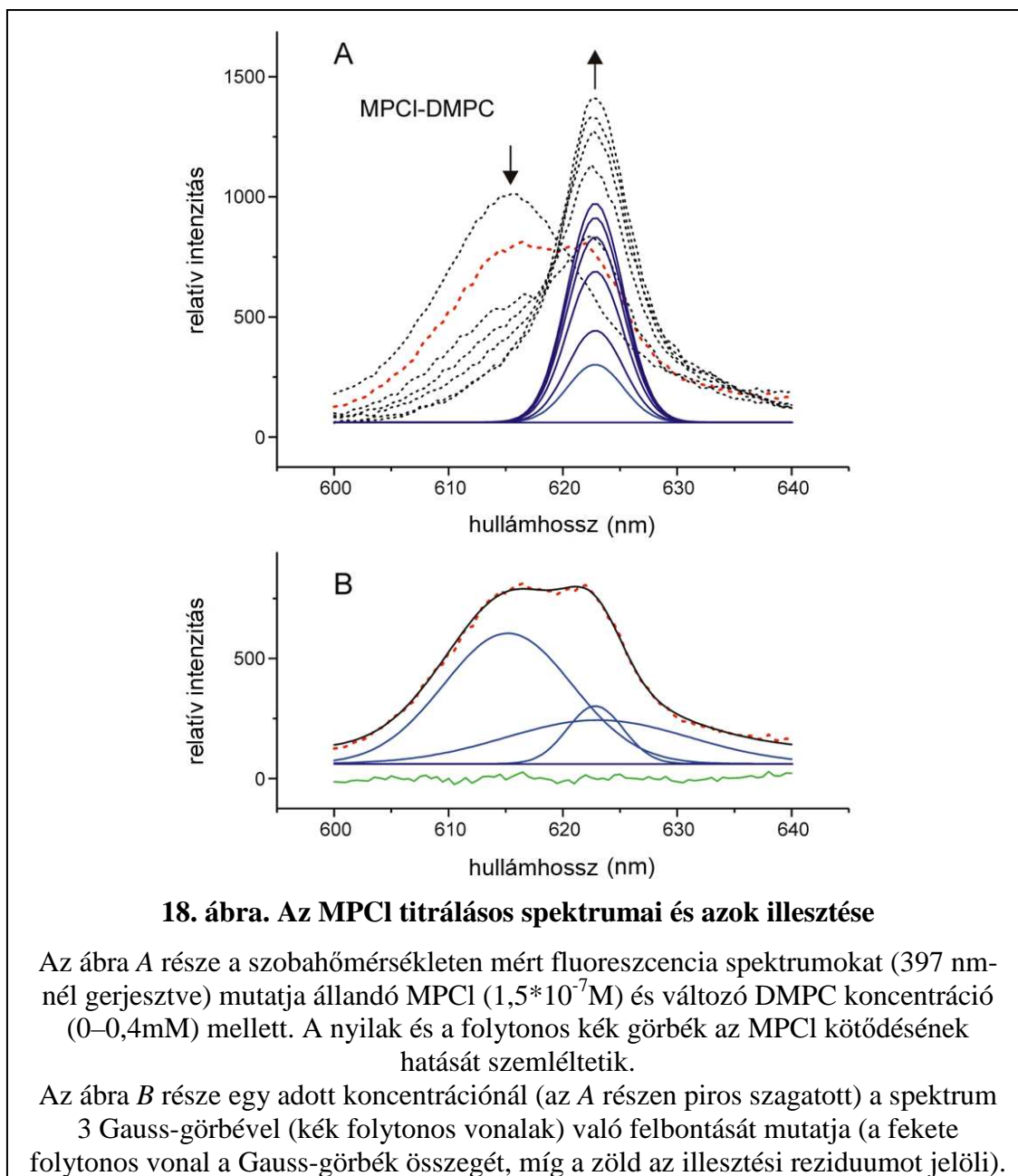
**2. táblázat. A fluoreszcencia titrálási módszer eredményeiből számított kötődési paraméterek a különböző MPE-SUV rendszerekben**

$n$ : az egy lipidmolekulára eső lehetséges porfirinkötőhelyek száma,  $1/n$ : egy porfirinmolekulára eső lehetséges lipidmolekulák száma,  $K_d$ : a disszociációs állandó,  $K_b$ : a kötődési állandó ( $K_b = n/K_d$ )

	DMPC [14]		DPPC [16]		DSPC [18]	
	MPE	MPCl	MPE	MPCl	MPE	MPCl
$n$	0,0083 $\pm 0,0026$	0,0037 $\pm 0,0012$	0,0044 $\pm 0,0008$	0,0026 $\pm 0,0005$	0,0079 $\pm 0,0013$	0,0038 $\pm 0,0006$
$1/n$	120	270	227	387	127	263
$K_d$ (nM)	$30 \pm 10$	$52 \pm 16$	$28 \pm 7$	$53 \pm 13$	$33 \pm 9$	$15 \pm 4$
$K_b$ ( $M^{-1}$ )	$2,8 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$

#### 4.2.2. Az MPCl kötődési paramétereinek meghatározása

Az MPCl-re jellemző kötődési görbék és kötődési paraméterek meghatározása nehezebb feladat, mert a szabad és kötött állapotoknak megfelelő fluoreszcencia spektrumok átfedik egymást. Ebben az esetben a kötődési görbe előállítására kétféle megoldást alkalmaztam.



Az egyik megoldás, hogy a titrálás során felvett fluoreszcencia-intenzitás görbék felbontjuk komponensekre: 2 komponens (egy keskenyebb és egy szélesebb

Gauss) a kötött MP-ből, és 1 a szabad MP-ből származik. Ennek megfelelően a spektrumokat 3 Gauss-görbével illeszttem, amelyek várható értékét és szórását rögzítettem az egyes mintasorozatokban. (Az illesztésekhez először a liposzómát nem tartalmazó oldatból határoztam meg a szabad porfirinnek megfelelő Gauss-görbe paramétereit, majd a maximális lipid koncentrációjú oldat jeléből a további jellemző értékeket.) A 18.A és B ábrán látható, hogy a lipidkoncentráció emelkedésével hogyan változik a spektrum és a kötött MP mennyisége (a keskenyebb „kötött” Gauss-görbe szerint), valamint hogyan történt az illesztés egy adott esetben. Az így felbontott spektrumokban a kötött porfirinre jellemző mindkét Gauss-görbe alatti terület arányos a  $[MP]_b$  értékkel, így mindkettőt használhatjuk mint a lipidkoncentráció függvényét a (3.8) összefüggéssel való illesztéshez. A „végtelenben vett” terület felel meg a bemért  $[MP]$ -nak – ennek alapján újraskálázható a kötődési görbe, és meghatározhatók az  $n$  és  $K_d$  értékek (lásd a 17. ábra üres háromszögeit).

A kötődési görbe megszerkesztésének másik megoldása során visszatértem az MPE esetén alkalmazott gondolatmenethez. A kötődéshez tartozó  $k_{[L]}$  értékek számításához módosítanunk kell a (4.5)-ös összefüggést úgy, hogy figyelembe vesszük, hogy a szabad porfirin (ami a kiindulási koncentráció ( $q$ ) hányada) is növeli a fluoreszcencia intenzitást. Enélkül az új ábrázolásmódban természetesen hurkokat kapunk a szabad porfirinjel miatt, de ezt kivonhatjuk az eredeti spektrumból. Ezért a módosított egyenlet a következőképpen alakul:

$$(4.6) \quad (I_{[L]}(\lambda) - C) - q(I_{szabad}(\lambda) - C) = k_{[L]} I_{[L]_{max}}(\lambda),$$

ahol  $0 \leq q \leq 1$  és  $I_{szabad}(\lambda)$  a lipidmentes MPCl oldat spektruma. Ha a szabad porfirinből származó jeltől megszabadulunk, akkor juthatunk csak az MPE-nél a 16. ábrán bemutatott egyenesekhez. Ezért a  $C$  és  $q$  értékeket úgy változtattam, hogy a pontokra a lehető legnagyobb korrelációs együtthatóval lehessen egyenest illeszteni. A kiértékelés további lépései megegyeztek az MPE esetén leírtakkal. A 17. ábra üres körei jelölik az így kapott eredményeket.

A kétféle kiértékelésből kapott pontokra együttesen illesztett kötődési görbe látható a 17. ábrán piros színnel, a kötődési paramétereit pedig a 2. táblázat tartalmazza.

### **4.3. Alacsony hőmérsékletű fluoreszcencia mérések**

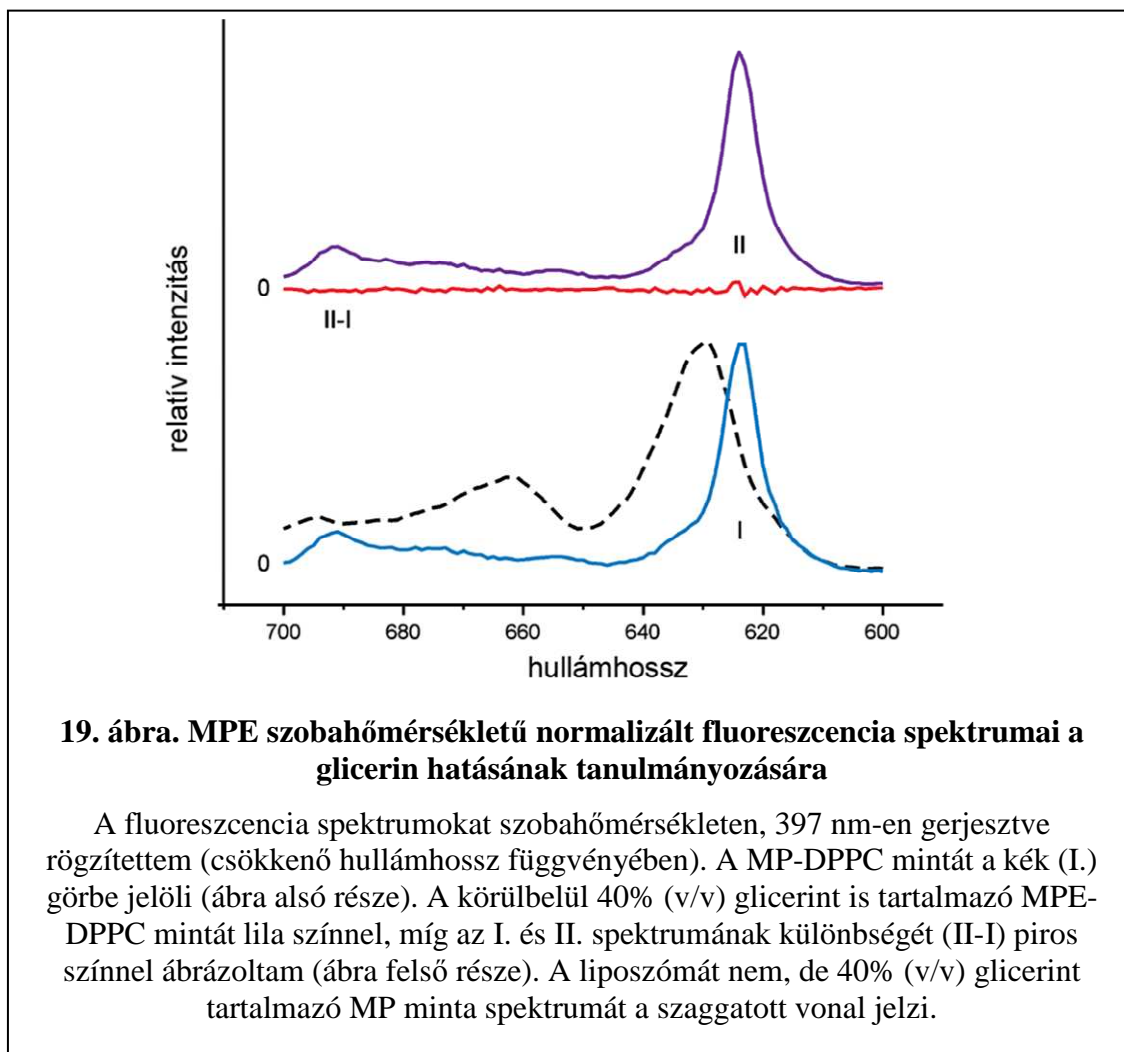
#### **4.3.1. A modellrendszer FLN technikával való vizsgálhatóságának feltételei**

Az MP liposzómába kötődésének, a kötőhelyek eloszlásának FLN-nel történő vizsgálatához néhány körülményt előzetesen meg kellett vizsgálnom. Nevezetesen a következőket: a modellrendszer nem károsodik-e az alacsony hőmérsékletű mérés következtében, illetve milyen változást okoz a rendszerben a glicerint, a kromofórnak hányféle állapotát tételezhetjük fel, és hogy egyáltalán felbontható-e a szobahőmérsékleti spektrum.

Az alacsony hőmérsékleten a rendszerben bekövetkező változásokat DLS mérések segítségével vizsgáltam – ennek eredményeit a 4.1.1. fejezet a korábbiakban tartalmazta.

A rendszer károsodásának megelőzése érdekében, és amiatt, hogy a mintának átlátszónak kell lennie a gerjesztő és emittált fény szempontjából, a glicerint hozzáadása a mintához elkerülhetetlen. Különböző térfogatszázaléknyi glicerint tartalmazó minták átlátszóságát néztem (saját szemmel) 70 K-re hűtve. A kb. legalább 35% (v/v) glicerint tartalmazó minták voltak átlátszóak. Az FLN mérésekből kapott eredmények tehát glicerintartalmú mintára érvényesek. Számunkra a lényeges kérdés azonban az, hogy a glicerint hozzáadása megváltoztatja-e az MP kötődését a liposzómába. Erre szobahőmérsékletű fluoreszcencia spektrumok felvétele alapján a következőképpen próbáltam következtetni. A 19. ábrán megfigyelhetjük, hogy az ugyanolyan MP (és DMF) koncentrációjú MP-SUV és MP-SUV-glicerint minta spektruma nem tér el egymástól, ezzel szemben a liposzómát nem, de 40% glicerint tartalmazó minta spektruma eltér ezektől.

A bemutatott eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a glicerint nem változtatja meg szignifikánsan az MP liposzómába kötődését, a liposzóma MP tartalma megmarad.

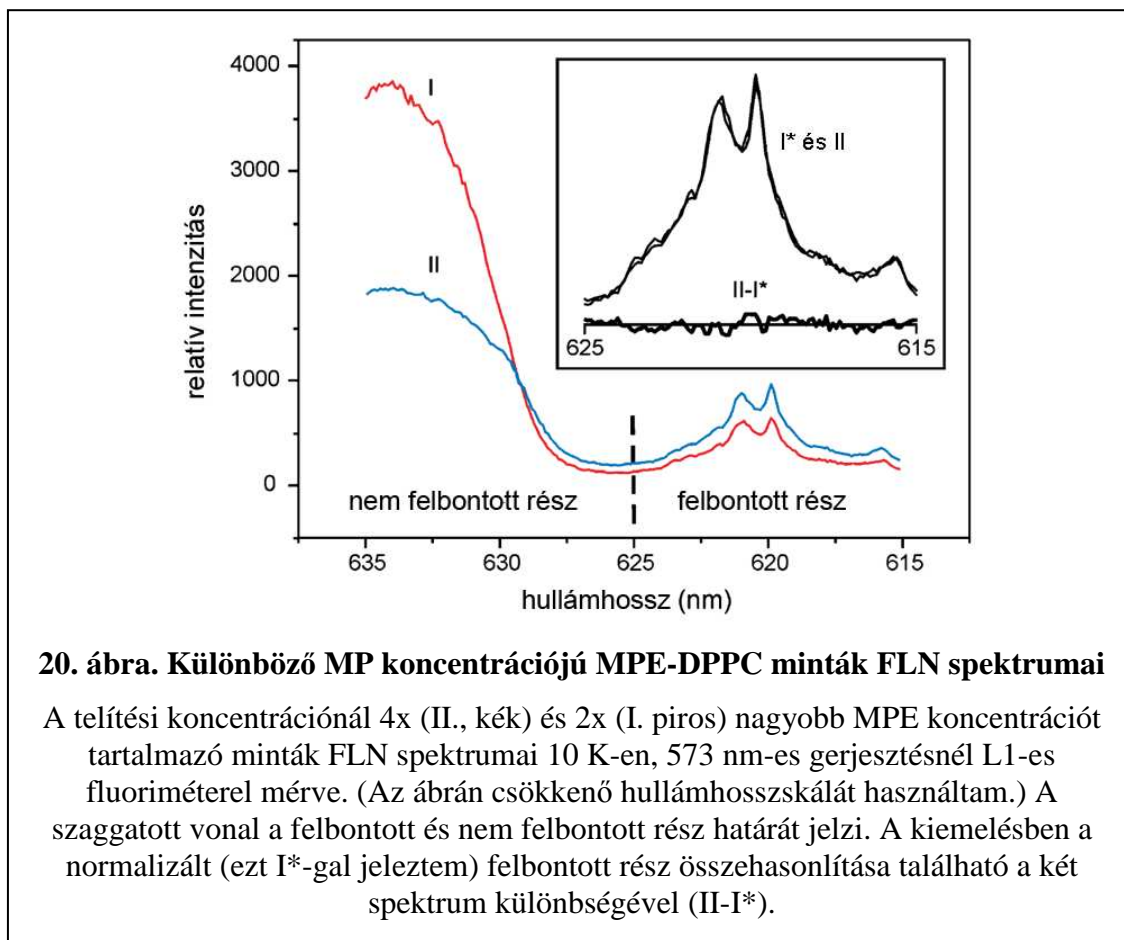


Az FLN mérések értékelésénél lényeges kérdés az, hogy a fluoreszcens jelet adó kromofórnak több állapota van-e a mintában, ugyanis a mért inhomogenitás egyaránt származhat az eltérő környezeti konformációkból és a különböző kromofórállapotokból. Esetünkben az MP-ből származó esetleges inhomogenitásnak két oka lehet: a kromofór aggregációja, valamint az MPC1-nél lehetséges eltérő protonáltsági állapotok.

Kísérleteink elején számos különböző MP koncentrációjú mintát vizsgáltam a becsült telítési koncentráció környékén és a felett kb. 1 nagyságrend tartományban. Feltételezhetjük, hogy a telítési koncentráció felett a különböző aggregáltsági állapotú (monomer, dimer..., multimer) MP-ek eltérő arányban vannak jelen a különböző koncentrációk esetén, legalábbis a szabad (nem kötött) porfirinek esetében (mint azt



korábban is említettem, ismert, hogy a porfirinek liposzómába kötődése elősegíti a monomerizációjukat). Amennyiben a liposzómába kötött porfirinek esetében is jelen vannak a különböző aggregátumok, ez meg kell nyilvánuljon a kötött MP-nek megfelelő felbontott spektrum változásában. A 20. ábra a telítési MP koncentráció 4-szeresét (II-vel jelölt) és 2-szeresét (I-vel jelölt) tartalmazó MP–DPPC mintákat mutat. A spektrumban könnyen elkülöníthető és azonosítható a felbontatlan és felbontott spektrumrész. A nagyobb hullámhossznál levő felbontatlan szakasz a szabad porfirinek felel meg. Ennek a spektrumszakasznak az alakja a különböző arányban jelen levő MP aggregátumok miatt eltérő koncentrációknál megváltozik. A felbontott spektrumszakasz mutatja a liposzómához kötött MP-t. Az előzővel ellentétben azonban ennek a résznek az alakja ugyanolyan marad az eltérő koncentrációk esetében – mint ahogyan azt jól megfigyelhetjük az ábra kiemelt részében a megfelelő lineáris transzformációk után. Az eredmények alapján tehát azt mondhatjuk, hogy a felbontott részből származó IDF-re nincs befolyással az aggregált MP.



Az MPCl eltérő protonáltsági állapotairól a Marvin Beans program szimulációi alapján kaptam információt. Ez azt mutatta, hogy 6-os pH felett a kérdéses csoportok deprotonált állapotban vannak. Mivel a méréseket 7,4-es pH-n végeztem, ezért állíthatjuk, hogy a mintában csak az MPCl deprotonált állapotai voltak jelen.

Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a mintában jelenlevő inhomogenitás, és így az IDF komponensei, a környezeti konformációk eredménye.

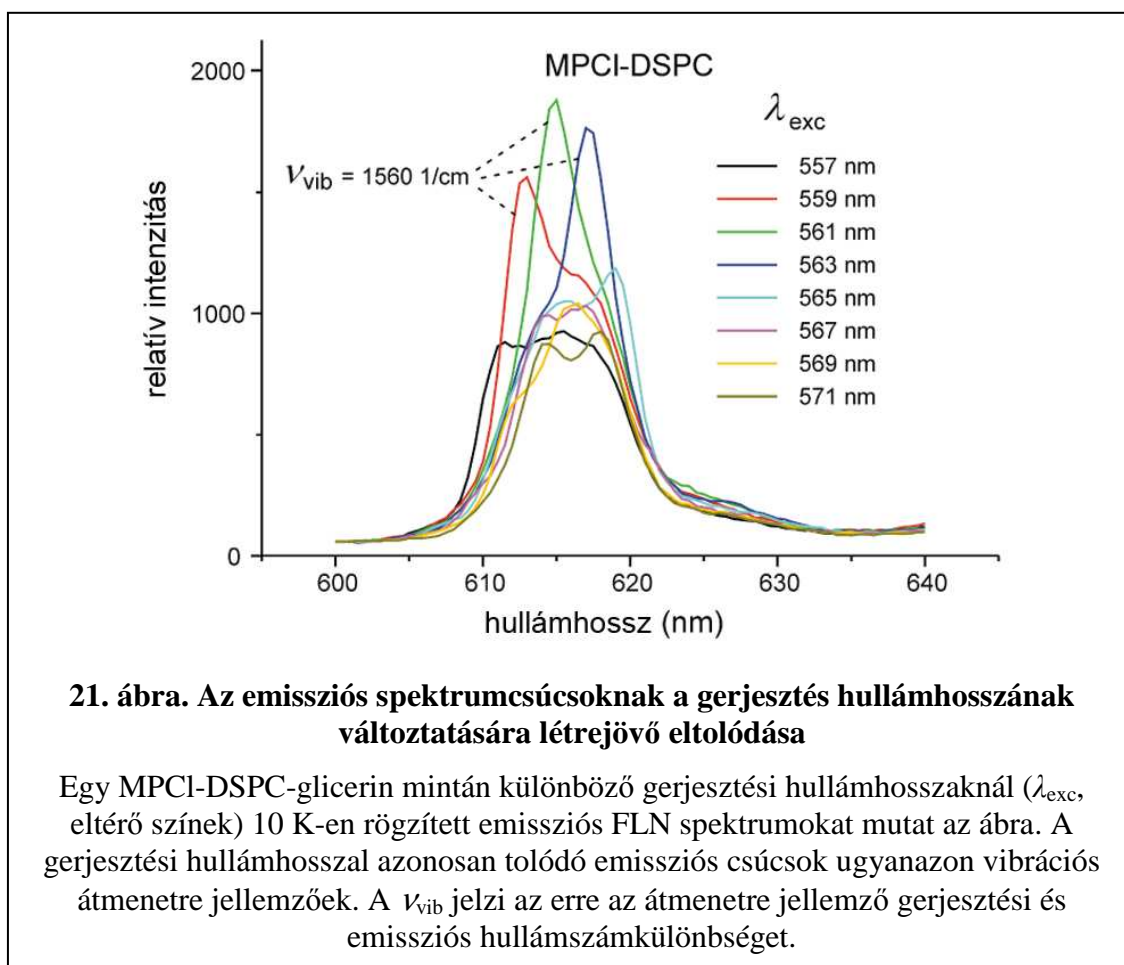
Mint az a következőkben tárgyalandó eredményekből kiderül, sikerült a szobahőmérsékleti spektrum felbontása és ebből a környezeti inhomogenitásokat jellemző IDF megalkotása.

#### **4.3.2. Az inhomogén eloszlásfüggvény (IDF) meghatározása**

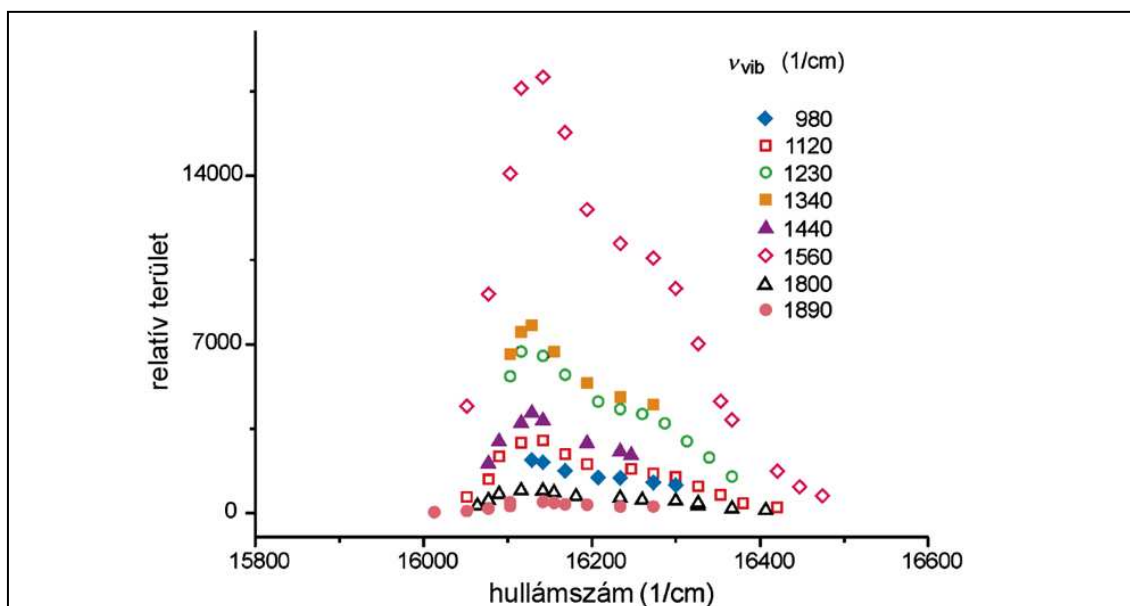
Porfirin-liposzóma rendszeren FLN méréseket még nem végeztek, ezért kevés kezdeti információval rendelkezem. Első lépésként tehát meghatároztam azt a gerjesztési és emissziós hullámhossztartományt, ahol a spektrum felbontását és az IDF mérését elvégezhetem. A szükséges előzetes méréseket a nagyobb felbontású L1-es luminométerrel végeztem el.

A szelektív – azaz csak egy adott energiaátmenettel rendelkező molekulapopulációt érintő – gerjesztés a leglényegesebb a megfelelő gerjesztési hullámhossztartomány kiválasztásánál. Ezen kívül természetesen a lehető legjobb jel/zaj viszony elérése a cél. A szelektív gerjesztés spektrális jele, hogy a spektrumban észlelt rezonáns vonalak (ZPL-ek), vagyis az *emissziós csúcsok*, a gerjesztési frekvencia változtatásával egyenes arányban tolódnak el. Az emissziós és gerjesztési tartomány szélességét úgy kell megválasztani, hogy az legalább akkora legyen, hogy lefedje a vibrációs inhomogenitás energiatartományát – azaz a teljes IDF meghatározható legyen. Az emissziós spektrumban ezt a tartományt tudjuk felbontani – ebben a tartományban kapunk keskeny fluoreszcenciacsúcsokat. A gerjesztés szempontjából pedig ebben a tartományban tudjuk végigkövetni egy jellemző csúcs „megjelenését” és „eltűnését”. Számos gerjesztési és emissziós spektrumsorozat rögzítése után az optimálisnak az adódott, amikor a gerjesztési hullámhossztartományt 555–585 nm-nek (18018–17094  $\text{cm}^{-1}$ ), a megfelelő emissziós tartományt pedig 600–640 nm-nek (16667–15625  $\text{cm}^{-1}$ ) választottam meg.

Az IDF előállításának alapja az adott környezetnek megfelelő átmeneti energiával rendelkező molekulák relatív számának meghatározása. A (3.9) összefüggés alapján tudjuk, hogy ez az emittált fény intenzitásával arányos. A módszerekben leírtaknak megfelelően úgy kaphatjuk meg az IDF-t, hogy a gerjesztési frekvenciát (energiát) egy adott tartományban változtatva a gerjesztéssel azonos mértékben tolódó megfelelő emissziós csúcsok intenzitását követjük nyomon (ezt az eltolódást láthatjuk a 21. ábrán). A különböző  $(I,k) \rightarrow (0,i)$  átmeneteknek megfelelő emissziós csúcssorozatok ugyanazt az eloszlást írják le, de eltérő abszorpciós átmeneti valószínűségeik miatt egy konstans szorzó eltéréssel (22. ábra). Végül több emissziós csúcssorozat együttesével kapjuk meg az IDF-et (23. ábra). Az egyes csúcssorozat csúcsait a megfelelő vibrációs átmenetre jellemző  $\nu_{\text{vib},n} = \nu_n - \nu_{\text{exc}}$  hullámszámmal jellemezhetjük (hiszen ugyanannak az átmenetnek az eredményei), ahol  $\nu_{\text{exc}}$  a gerjesztési,  $\nu_n$  pedig az ehhez tartozó emissziós hullámszám.

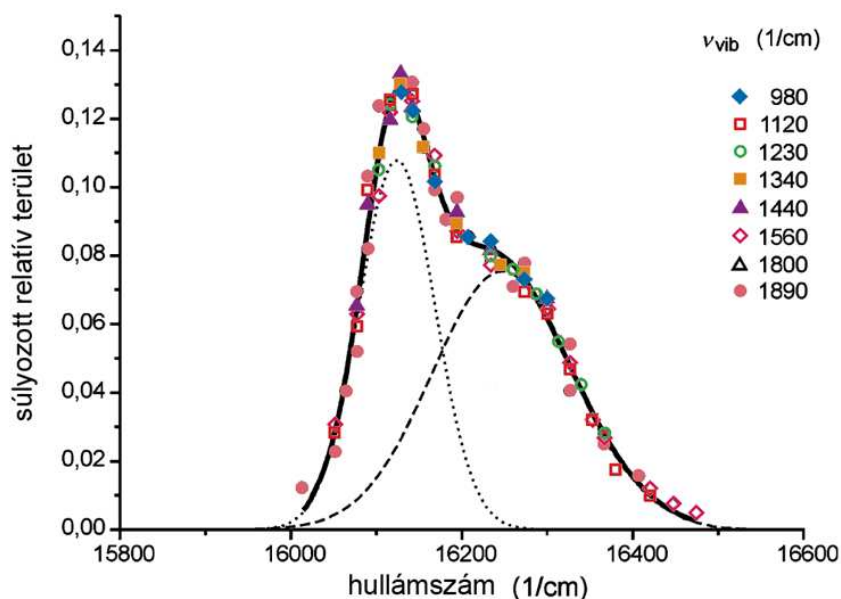


A kiértékelést a gyakorlatban (a különböző luminométereknél egységesen) a következőképpen végeztem. Először minden spektrumon *hullámhossz-energia konverziót* hajtottam végre. Majd a háttér (a műszer zaja és a PW) számításához minden spektrumot emissziós csúcsainak száma +1 (a háttér) Gauss-görbével illeszttem, rögzítetlen paraméterek mellett. (10 K-en, és a használt spektrális felbontások mellett mind a ZPL, mind a PW alakját Gauss-görbével közelíthetjük.) Az így kapott háttérrel az egyes spektrumokból levontam. Ezt követően az előző illesztésből származó ugyanazon  $\nu_{\text{vib}}$  hullámszámú csúcsokhoz tartozó Gauss-görbék szélességét átlagoltam és rögzítettem. Ezekkel a rögzített szórású Gauss-görbékkel illeszttem újra a csúcsoknak megfelelően a spektrumokat. Az így illesztett emissziós csúcsokat két rögzítetlen változóval jellemeztem: a csúcs helye ( $\nu_n$ ), valamint a csúcs alatti terület ( $I_n$ ), ez utóbbi a teljes intenzitással arányos. Az azonos  $\nu_{\text{vib}}$  hullámszámú csúcsokból így képeztem a  $\nu_n \rightarrow I_n$  függvényeket. Ezeket mutatja a 22. ábra. A függvényeket görbe alatti területük reciprokával súlyoztam. Az eredményül kapott pontthalmaz a mért inhomogén eloszlásgörbe (IDF), amit a 23. ábra mutat.



**22. ábra. A különböző  $\nu_{\text{vib}}$  hullámszámú csúcsokhoz tartozó  $\nu_n \rightarrow I_n$  eloszlásfüggvények**

Az egyes vibrációs átmenetekhez tartozó  $\nu_n \rightarrow I_n$  eloszlásfüggvények (különböző színnel és szimbólummal jeleztem az ábrán) a gerjesztési hullámszám változására bekövetkező emissziós hullámszám- és relatív intenzitásváltozás következményei. Az azonos  $\nu_{\text{vib}}$  hullámszámú értékeket azonos színnel és szimbólummal jeleztem.



**23. ábra. Az inhomogén eloszlásfüggvény és a rá illeszthető Gauss-görbék**

A színes szimbólumok a különböző vibrációs átmenetekhez (különböző szín és szimbólum) tartozó  $v_n \rightarrow I_n$  normalizált eloszlásfüggvényeit (az egyes eloszlásfüggvények ugyanazzal a színnel és szimbólummal vannak jelölve) mutatják. Ezen pontok összességére illesztett görbe az IDF (folytonos fekete vonal). A szaggatott vonalak az IDF-re illesztett Gauss-görbékét ábrázolják.

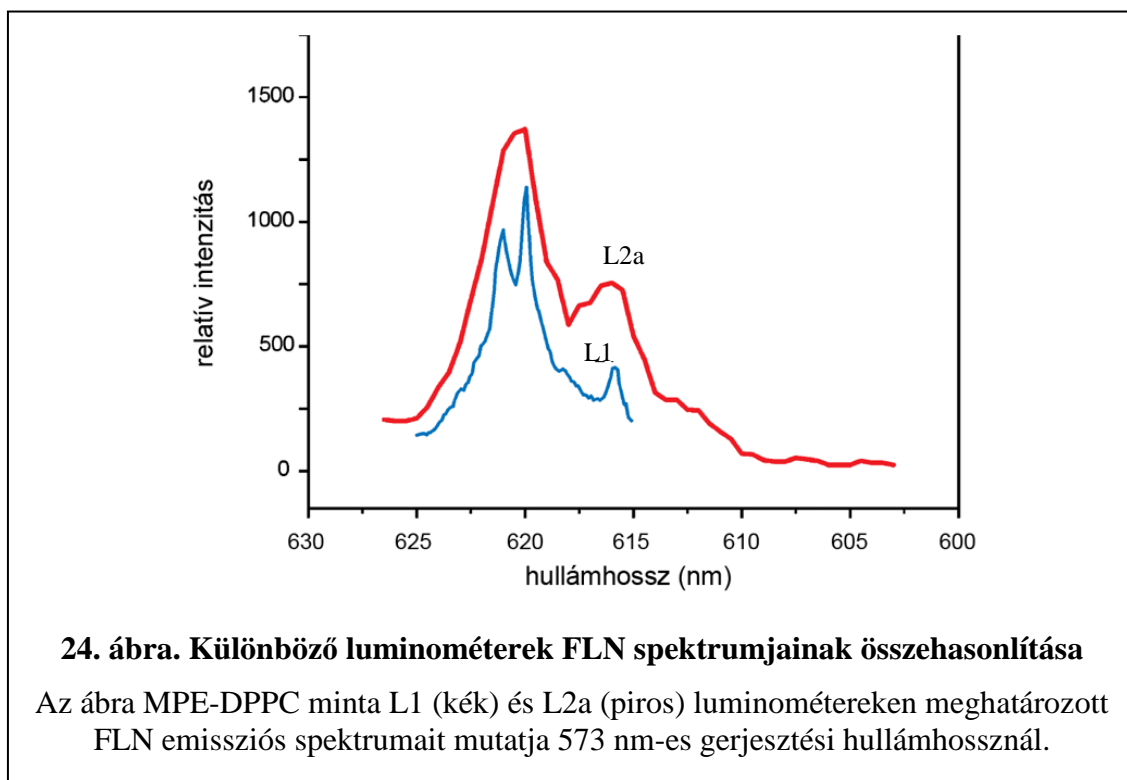
#### 4.3.3. Az különböző luminométerek összehasonlítása, a „kvázi-FLN” technika

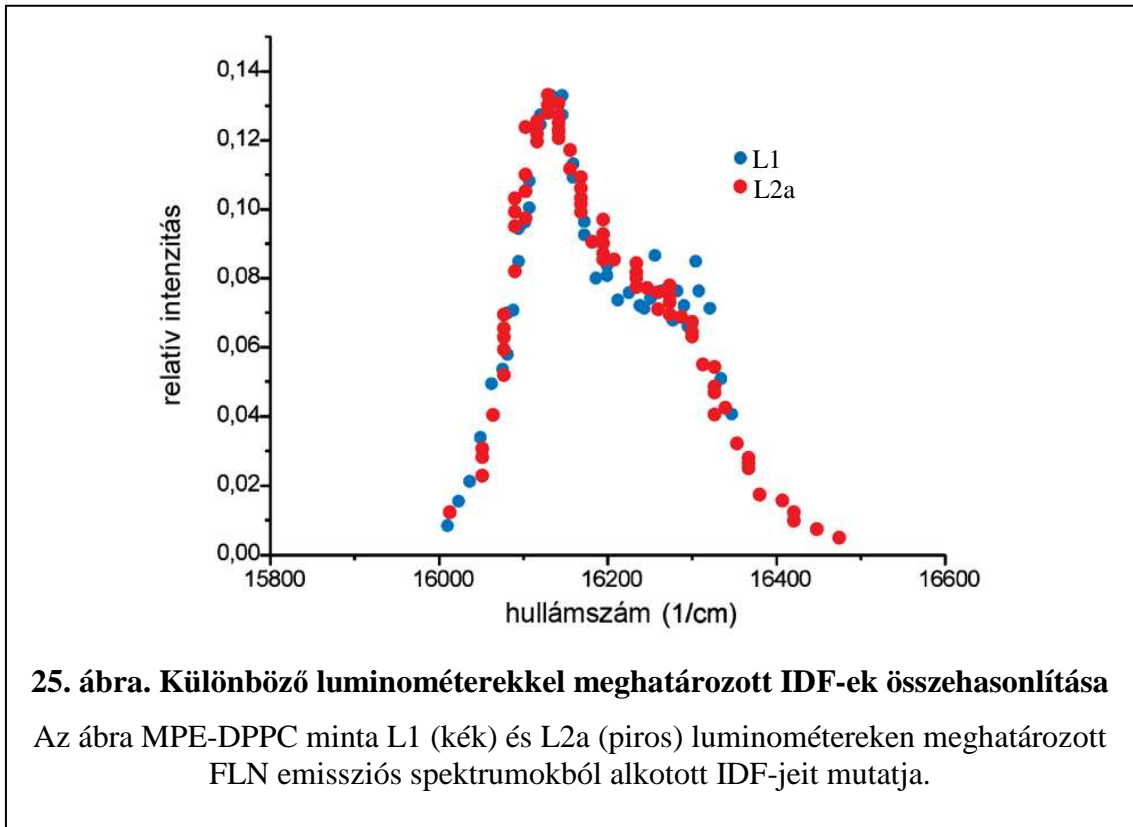
Bár az L2 (a és b) luminométerek spektrális felbontása kisebb, mint az L1-é – ezért használhatjuk erre a technikára a „kvázi-FLN” elnevezést –, azonban az IDF meghatározására ez a technika is alkalmas.

A „kvázi-FLN” méréseknek több előnye is van. Az egyik leglényegesebb, hogy kiküszöböli a festéklézernek (és így az L1-nek) azt a hátrányát, hogy a festék csak egy adott tartományban gerjeszthető. Emellett a festéklézer további hátránya, hogy emittált fényének intenzitása erősen függ a gerjesztés frekvenciájától – így az intenzitás számítása bonyolultabb korrekciós megoldásokat igényel. Az L2 berendezésekkel kapott szélesebb csúcsoknak előnye is van: a fényintenzitás additív tulajdonsága miatt nagyobb fluoreszcenciajelet kapunk, így jobb lesz a jel-zaj arány is. Így ha megbizonyosodunk arról, hogy az L2 eszközök használatával nem veszítünk lényeges információkat a rendszerről, akkor érdemes azokat használnunk. A luminométerek

összehasonlítását MPE-DPPC mintán végeztem el az L1-es és L2a berendezésekkel úgy, hogy mindkét eszközzel meghatároztam az IDF-et. Ennek eredménye látható a 25. ábrán. (Az L2a és L2b spektrális paraméterei méréseink során megegyeztek, így az összehasonlításuk külön-külön felesleges.) Az eredmények azt igazolták, hogy a két eltérő módszer közel azonos értékű információt szolgáltat modellrendszerünkről, ugyanis a spektrumokból számolt inhomogén eloszlásfüggvényekre illeszthető két Gauss-görbe paraméterei az illesztési hibán belül azonosnak adódtak.

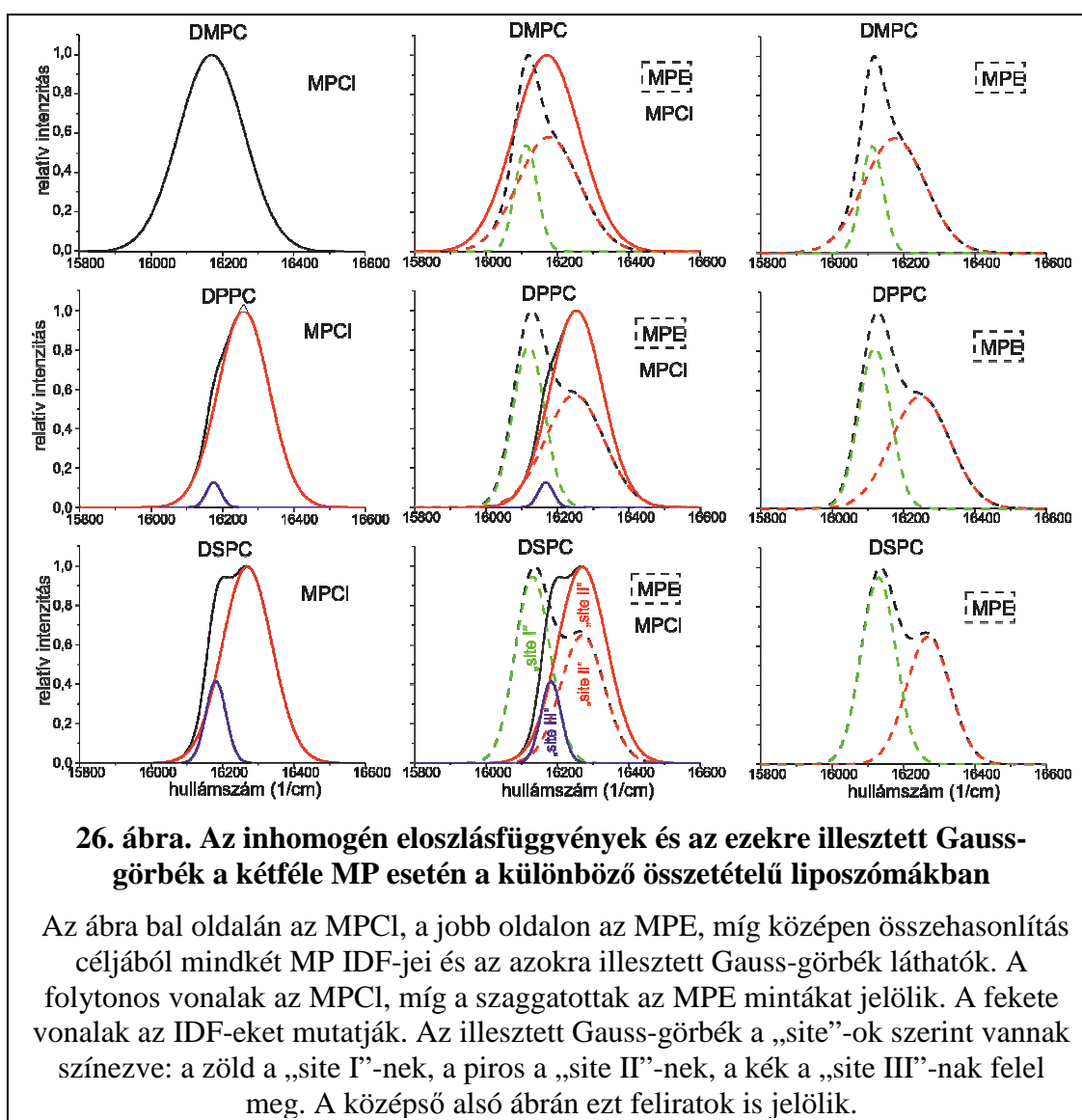
A vázolt eredmények miatt a többi mintát csak „kvázi-FLN” módon vizsgáltam.





#### 4.3.4. Az inhomogén eloszlásfüggvények és illesztésük

A különböző MP-liposzóma rendszereket megvizsgálva megállapítottam, hogy a kapott 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 (26. ábra – a „site”-ok értelmezését a megbeszélésekben taglalom). Az MPCl-DMPC kivétel ez alól, ugyanis ennek IDF-je 1 Gauss-görbével is jól illeszthető. A többi esetben a 2 Gauss-görbével végzett illesztés volt az optimális. Az illesztési paramétereket a 3. táblázatban tüntettem fel.





### 3. táblázat. Az IDF-ekre illesztett Gauss-görbék paraméterei a különböző MP-SUV rendszerekben

Az illesztési paraméterek:

*közép*: a középvérték,

*fwhh*: a félértékszélesség (Full Width of the peak at Half-Height),

*rel.T*: a görbe alatti relatív területarány.

		DMPC		DPPC		DSPC		DSPC HT
		MPE	MPCI	MPE	MPCI	MPE	MPCI	MPE
„site I”	közép (1/cm)	16112 ±1	nincs jelen	16119 ±2	nincs jelen	16130 ±3	nincs jelen	16125 ±3
	fwhh (1/cm)	73 ±6		104 ±5		115 ±6		109 ±6
	rel. T	0,25		0,44		0,54		0,46
„site II”	közép (1/cm)	16175 ±6	16176 ±1	16248 ±9	16257 ±4	16270 ±9	16268 ±7	16247 ±12
	fwhh (1/cm)	203 ±7	186 ±2	194 ±14	151 ±5	144 ±11	137 ±9	189 ±18
	rel. T	0,75	1,0	0,56	0,95	0,46	0,85	0,54
„site III”	közép (1/cm)	nincs jelen	nincs jelen	nincs jelen	16177 ±5	nincs jelen	16181 ±3	nincs jelen
	fwhh (1/cm)				55 ±11		55 ±9	
	rel. T				0,05		0,15	

## 5. Megbeszélés

A DLS, valamint egyes fluoreszcencia mérések eredményei és a Marvin Beans szoftver segítségével megmutattam, hogy a különféle beavatkozások során a MP-liposzóma modellrendszer épsége nem sérült, elviselte a glicerin hozzáadást és a kriogenikus hőmérsékletet is, a liposzóma megtartotta MP tartalmát, valamint a kötődés szempontjából értékes fluoreszcencia jelet egyféle MP monomer konformáció adta – a spektrumbeli változásokat a különböző környezetek eredményezték. Igazoltam azt is, hogy jelen modellrendszer vizsgálatára a „kvázi-FLN” módszer is alkalmas, a környezeti inhomogenitásról ugyanolyan végső információval bír, mint a klasszikus FLN.

### 5.1. A kötődésre vonatkozó szobahőmérsékletű fluoreszcencia mérések információtartalma

Az MPE esetén az alkalmazott új ábrázolási mód (15. és 16. ábra) alapján a DMPC tartalmú liposzómánál egy, míg a DPPC és a DSPC tartalmúnál két eltérő kötőhelyet (környezetet) feltételezhetünk. Bár a hurkok megjelenése a grafikonon megmutatja, hogy a mintában eltérő kötési paraméterekkel rendelkező környezetek vannak, azonban nem ad módot ezek számszerű jellemzésére és elkülönítésére. A klasszikus kötődési görbe a kvalitatív elkülönítésre sem adott lehetőséget (17. ábra). Ezek miatt a különböző kötőhelyek átlagos paramétereikhez jutunk. Az MPCl esetén a vizes környezetben is mérhető szabad MP fluoreszcencia jele miatt (amely maga is hurkot eredményez) az új ábrázolási mód sem alkalmas a liposzómában esetlegesen meglevő eltérő kötőhelyek megjelenítésére.

A kötődési görbe illesztéséből kétféle információ adódik: az (átlagos) lehetséges kötőhelyek száma ( $n$ ) – azaz egy lipidmolekulára eső MP-k maximális száma –, valamint a kötődés erősségét jellemző (átlagos) disszociációs ( $K_d$ ), illetve (átlagos) kötődési ( $K_b$ ) állandó. A 2. táblázat azt mutatja, hogy az MPE esetében a disszociációs állandók – a mérési hibán belül – azonosak a különböző SUV-ok esetén. A kötődési állandók is csak kissé térnek el (kétszeres szorzón belül) a kissé eltérő lehetséges

kötőhelyszám miatt. Az MPCl–SUV mintáknál a disszociációs állandók DMPC és DPPC esetén megegyeznek egymással és nagyobbak, mint az MPE-nél mérték, azonban DSPC-nél ez az érték körülbelül az előzőek harmada, illetve fele. Ennek megfelelően a  $K_b$ -k MPCl–DMPC és MPCl–DPPC esetében kisebbek, mint az MPE–SUV-oknál, az MPCl–DSPC  $K_b$ -ja pedig ez utóbbiakkal közel azonos.

A kapott kötődési állandók értéke jó egyezést mutat az irodalomban hasonló rendszeren mért adatokkal [32, 63, 68, 69]. Jó egyezés alatt nagyságrendileg megegyező kötődési állandókat értek. Figyelembe véve a szakirodalmi és saját adataim mérési és illesztési hibáit, láthatjuk, hogy az egy nagyságrenden belüli eltérés jó egyezést jelent.

Az 1. táblázat adatainak és  $n$  felhasználásával szemléletes becslést adhatunk egy átlagos liposzóma telítési mezoporfirin számára. A számolásaim alapján ez liposzómánként körülbelül 50–150 MP molekulát jelent.

Összefoglalva általánosságban azt mondhatjuk, hogy az MPE esetén nagyobb a lehetséges kötőhelyek száma és erősebb a kötődés a liposzómákhoz, mint az MPCl-nél.

## 5.2. Az IDF-re illesztett Gauss-görbék információtartalma

Az FLN mérések eredményeként kapott IDF-ekre illesztett Gauss-görbék segítségével jellemezhetjük az eltérő környezeteket, „*site*”-okat, azaz kötőhelyeket. A Gauss-görbék különböző paraméterei a következő információt nyújtják. A görbék *középértékei* a nagyobb változást, azaz a térben elválasztott kötőhelyeket jellemzi, a görbe *félértékisélessége* az adott „*site*” mikrokörnyezeti változékonyságára utal, míg a görbe *alatti terület* az adott hely molekulapopulációjának számbeli nagyságát reprezentálja.

A megfigyeléseknek megfelelően rendezett 3. táblázat illesztési paraméterei és a 26. ábra alapján észrevehetjük, hogy a különböző MP–SUV rendszerek inhomogenitását leíró IDF-ekre illesztett Gauss-görbék középértékei számos esetben hasonlóak – összességében három eltérő energiatartományba („*site*”-ba) sorolhatók. A különböző kötőhelyeket ezek alapján neveztem „*site I, II, III*”-nak. Mind az MPE–SUV-ok, mind az MPCl–SUV-ok esetében 2-2 eltérő kötőhelyet kaptam, azonban ezek közül az egyik („*site II*”) a kétféle MP esetében is megegyezik. Az MPE–SUV-ok esetében az I. és II.

„site” van jelen, míg az MPCl mintákban a „site I” eltűnt, és a DPPC és DSPC esetén a „site III” jelent meg.

### **5.3. Az $n$ kötődési paraméter és a kötőhelyre jellemző görbe alatti**

#### ***terület összevetése***

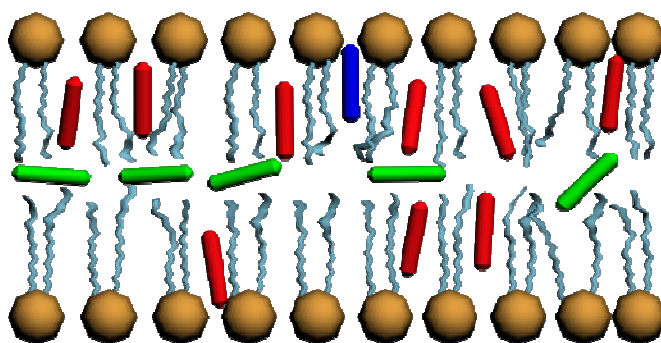
A szobahőmérsékletű mérésekből származó  $n$  paraméter (az egy lipidmolekulára eső lehetséges porfirinkötőhelyek száma) információt nyújt a mintákban kötött állapotban levő MP molekulák számáról. Az FLN mérésekből származó görbe alatti terület pedig a kötött molekulák számának relatív arányát adja meg a lehetséges kötőhelyek között. Így a kötött állapotban lévő MP molekulák számának, valamint az elfoglalt kötőhelyek arányának szorzata adja meg az adott „site” által kötött molekulák számát. Ezek ismeretében vettem össze a DPPC-t és DSPC-t tartalmazó mintákat a két MP esetén. (A DMPC-nél kapott  $n$  értékek hibája jóval nagyobb, mint a másik két esetben, ugyanis a mintaösszeállítási és mérési hőmérséklet – 22 ° C – közelebb van a DMPC  $T_m$ -jéhez.) Az MPCl és MPE „közös” kötőhelye a „site II”, ahol ezt az összehasonlítást érdemes megtenni. A 2. és 3. táblázat adatai alapján a következőkre jutottam. Az MPE–DPPC-re a szorzat:  $0,0044 \cdot 0,56 = 0,0025$ , míg MPCl–DPPC-re ez  $0,0026 \cdot 0,95 = 0,0025$ , valamint DSPC-re  $0,0079 \cdot 0,46 = 0,0036$ , illetve  $0,0038 \cdot 0,85 = 0,0032$ . A számszerű eredmények jó egyezést mutatnak, ami arra utal, hogy a „site II” ugyanazt a környezetet jelentheti a kétféle MP számára.

### **5.4. Az MP kötőhelyek molekuláris szintű értelmezése**

Munkám egyik fő kérdése, hogy hogyan azonosíthatók az IDF alapján kapott „site”-ok, mint a liposzómán belüli eltérő elhelyezkedésű MP kötőhelyek. Az irodalomban a fényérzékenyítők kettős lipidrétegen belüli helyét legtöbb esetben a membránon belüli mélységgel jellemezték, feltételezve, hogy a PS többé-kevésbé párhuzamos a lipidek szénhidrátláncával [36, 39, 41, 65, 68, 70, 71]. Az MP-hez hasonló protoporfirinről kimutatták, hogy a membrán mélyebb régiójában kötődik [41,

71, 72]. Kis molekulák esetében találunk a lipidrétegek közötti, illetve „zsírsavlánc végénél” való elhelyezkedésre is publikációkat [72-74].

Ha esetünkben az egyes MP-k mind a lipidek szénhidrátláncá mentén helyezkednének el, csak a membránbeli mélység lenne a különbség, akkor az IDF-et egyetlen Gauss-görbével lehetne illeszteni. A két görbével való illeszthetőség azt jelzi, hogy a környezet szempontjából jobban eltérő kötőhelyeket kell feltételeznünk. Hipotézisem szerint a „site I”-nek megfelelő MP sokaság a kettősrétegben a két lipidmolekula-réteg között helyezkedik el, a legnagyobb hányadban előforduló „site II” a membránban mélyen a lipidek szénhidrátláncával párhuzamosan található, míg a „site III”-sal jelzett kötőhely a lipidek fejcsoportjánál, de még a membránban levő MP populációt jelöli. Ezt a következő gondolatmenettel kívánom alátámasztani. A könnyebb követhetőség miatt egy sematikus ábrát is készítettem (27. ábra). (Az MP-k és lipidek körülbelüli méretarányának becsléséhez a Marvin Beans szoftvert használtam. Ennek megfelelően rajzoltam az ábrát.)



**27. 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.

Vizsgáljuk először meg az MPE–SUV modelleket, a „site I”-et és „site II”-t. Az MPE–DMPC, MPE–DPPC és MPE–DSPC minták közötti különbséget a liposzómákat alkotó foszfolipidek szénláncossza adja. Ez a körülmény két módon befolyásolja a membránstruktúrát: a membrán *rendezettsége* és a szénláncok eltérő *flexibilitása* (a láncvégek „elhajlása”) révén.

A minták azonos hőmérsékleten készültek, amely minden esetben a liposzómamembrán fő fázisátalakulási hőmérséklete alatt volt. Az azonos preparálási hőmérséklet azonban eltérő rendezettséget jelentett a különböző lipidmolekulákra nézve, ugyanis a hosszabb szénlánc esetén magasabb a  $T_m$ . A rendezettség mértéke a transz-gauche izomerizációval van összefüggésben. A  $T_m$ -től távol a láncok teljes hosszukban transz állapotban vannak, míg ha a hőmérséklet közelít a  $T_m$ -hez, a szénláncokban a gauche formák száma nő, azaz a környezeti változatosság nő a szénláncok mentén. Az izomerizáció mindig a láncok végén indul meg először.

A szénláncok flexibilitása a láncvégeknek az egyenes lánctól való elmozdulásával áll kapcsolatban. A szénlánc hossz növelésével a láncvégek elmozdulásának a valószínűsége nő meg.

A „site I” és „site II” között lényeges különbség, hogy míg az előbbi környezetet a szénlánc végek, ez utóbbit a láncok „belső része” határozza meg.

Ennek megfelelően a „site I” környezetet a flexibilitás határozza meg – a rendezettség kis hatással van rá. A környezetet tehát mindig a közel azonos láncvég jelenti: a Gauss-görbék középvértéke csak kissé változik a szénlánc hossz növelésével (lásd korábban 3. táblázatban és 26. ábrán). A görbék viszonylag kicsi („site II”-höz hasonló) félértékszélessége is hasonlóbb környezetnek megfelelő. A szénlánc hossz növelésével nő a flexibilitás és a környezeti változékonyság, amit a félértékszélesség növekedése is mutat. A flexibilitás növekedésével a lazább láncvégi terület megnő, ezáltal több MP molekula kötődhet be – ezt jelzi a relatív területarány növekedése.

A „site II”-t alapvetően a rendezettség határozza meg, amely nagyobb változékonyságot mutat a szénlánc hossz csökkenésével – főleg a  $T_m$ -hez közel. Ennek megfelel, hogy a Gauss-görbék középvértékei is jobban különböznek az eltérő lipidösszetevők esetén (a 26. ábrán látható az is, hogy a 24 °C  $T_m$ -ű DMPC jobban eltér a többi SUV-tól), illetve a félértékszélességek nagyobbak, mint a „site I” esetében. A szénlánc hossz növelésével a rendezettség nő, ezt mutatja a félértékszélességek csökkenése. Ugyanezeket láthatjuk az MPC1-SUV mintáknál is a „site II” esetén.

A hipotézis további ellenőrzése céljából készítettem a DSPC HT mintát – az erre vonatkozó adatokat a 3. táblázat utolsó oszlopában foglaltam össze. Ebben az esetben a mintaösszeállítási hőmérséklet (45 °C) és a  $T_m$  különbsége kisebb – így a rendezettség tekintetében a rövidebb szénlánc hosszúságú mintát szimulálhattam. Ennek

eredményeképpen a DSPC HT minta Gauss-görbéinek paraméterei közelítettek a DPPC mintához (lásd korábban a 3. táblázatban) az eddig felvázolt gondolatmenetet alátámasztva.

A továbbiakban vizsgáljuk meg az MPCl-SUV modelleket, a „site III”-at. A Marvin Beans szoftver segítségével összehasonlíthatjuk a kétféle mezoporfirinszármazék hidrofobicitását. Amíg az MPE-nek nincs töltése 7,4-es pH-n, az MPCl a propionát csoportok deprotonáltsága miatt két negatív töltéssel rendelkezik. Ennek következménye, hogy az MPCl molekula kevésbé hidrofób, mint az észteres forma. Ez a tény magyarázza az erősen hidrofób „site I” eltűnését és „site III” megjelenését az IDF-ben az MPCl-SUV mintáknál. A korábbiakban már ismertettem az MPCl és MPE „site II”-k azonosságát mutató eredményeket. Az előzőeknek megfelelően a „site III”-nak egy hidrophilebb régióknak kell lennie. Ezt a következő gondolatmenettel is alátámasztanám.

A lipid fejcsoportok rendezettségét az elő-fázisátalakulási hőmérséklet ( $T_p$ ) határozza meg, amely szintén függ az adott lipid zsírsavdallancának hosszától. Ennek értéke  $\approx 15^\circ\text{C}$ ,  $\approx 35^\circ\text{C}$ ,  $\approx 51^\circ\text{C}$  a DMPC, DPPC, DSPC összetételű liposzómáknak megfelelően. Látható, hogy a DMPC-nél a  $T_p$  kisebb, mint a mintaösszeállítási hőmérséklet, így a nagyfokú rendezetlenség magyarázza a „site III” hiányát az IDF-ben az MPCl-DMPC minta esetén. A másik két esetben a lipidfejcsoportok rendezettek, így csak igen kis környezeti különbséget jelentenek az MPCl számára. Ennek megfelelően, hogy a „site III” illesztett Gauss-görbéinek középértéke lényegében megegyezik, valamint az eloszlás keskeny mind a DPPC, mind a DSPC mintáknál. A csak kissé eltérő rendezettségen túl a DPPC és DSPC minták közötti különbséget a lipidréteg vastagsága adja: a vastagabb membrán lehetőséget nyújt az újabb eltérő kötőhely megjelenésének. A „site III” nagyobb arányával magyarázom az MPCl-DSPC-nél mért nagyobb kötődési állandót is.

Ezek alapján az IDF-re illesztett Gauss-görbék paramétereinek változása a különböző MP-SUV rendszerekben alátámasztotta a hipotézist, miszerint a „site I”-nek megfelelő MP sokaság a két lipidmolekula-réteg között helyezkedik el, a „site II”-nek megfelelő a membránban mélyen a lipidek zsírsavdallancával párhuzamosan található, míg a „site III”-assal jelzett kötőhely a lipidek fejcsoportjánál a membránban levő MP populációt jelöli.

## 6. Következtetések

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:

I.1. A szobahőmérsékletű fluoreszcencia mérésekhez készített különböző összetételű liposzómák homogén eloszlásúak és megfelelően stabilak voltak. Ezt a homogenitást és stabilitást megtartották DMF és MP hozzáadására, valamint a spektroszkópai mérések elvégzése után is. A vizsgált fluoreszcens jelet a porfirinek monomer formája adta. Ezért alkalmas volt a modellrendszer a kötődési paraméterek meghatározására.

I.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.

I.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.

II.1. Az I.1. részt kiegészítve megállapítottam, hogy a liposzómák homogenitása és stabilitása megmaradt a glicerinnel történő hozzáadására és a kriogén hőmérsékleten végzett mérés után is, valamint a glicerinnel tartalmú modellrendszer megtartotta mezoporfirintartalmát. Igazoltam, hogy a felbontott spektrumok monomer állapotú MP-k eredményei. Ezért a minták alkalmasak voltak az alacsony hőmérsékletű vizsgálatra.



II.2. 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.

II.3. Megmutattam az azonos IDF-ek alapján, hogy az egyszerűbb „kvázi-FLN” módszer is alkalmas lehet a fényérzékenyítő–membránmodell vizsgálatára.

II.4. A létrehozott IDF-ek és az ezekre illeszthető Gauss-görbék alapján egyértelműen kimutattam különböző kötőhelyek jelenlétét. Ezen túl kapcsolatot találtam a kötődési paraméterek és a Gauss-görbék paraméterei között.

II.5. 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 zsírsavoldalláncával párhuzamosan található, míg kis hányada a membránban a lipidek fejsoportjánál helyezkedik el.

## 7. Összefoglalás

A korszerű orvosi gyakorlatban egyre szélesebb körben alkalmazzák a fotokémiai hatáson alapuló eljárásokat, amelyek közül a fotodinamikus terápia, illetve a fotodinamikus detektálás az egyik legelterjedtebb. Ezek indikációs körét leggyakrabban a különböző daganatok képezik, de felhasználják a vérképzőszervek sterilizálásától kezdve egyes bőrbetegségeken (pl. psoriasis) és szembetegségeken (pl. maculadegeneratio) át az atheroscleroticus plakkok kezelésében is. A terápia és a hozzá kapcsolódó detektálás alapja fény és megfelelő fényérzékenyítő együttes használata oxigéndús környezetben.

A folyamat sikerességét befolyásolja a fényérzékenyítő asszociációja a sejtmembránhoz, valamint a membránokon belüli elhelyezkedése. Ezeket a kérdéseket széles körben tanulmányozzák porfirin típusú fényérzékenyítők és liposzómák segítségével.

Kutatásaim során két hasonló mezoporfirin IX (MP) származékot – MP dihidrokloridot (MPCl) és MP dimetilsztertert (MPE) – vizsgáltam. A membránok modelljeként különböző lipidösszetevőjű egykomponensű kis unilamelláris vezikulákat (SUV) használtam. Olyan MP–SUV modellrendszert alkottam, amely alkalmas volt mind szobahőmérsékletű, mind alacsony hőmérsékletű optikai spektroszkópiai vizsgálatokhoz.

Konvencionális fluoreszcencia spektroszkópia segítségével jellemeztem a mezoporfirinek asszociációját a lipidmembránhoz a lehetséges kötőhelyek száma, valamint a disszociációs, illetve kötődési állandó segítségével. Megállapítottam, hogy az MPE esetén nagyobb a lehetséges kötőhelyek száma és erősebb a kötődés a liposzómákhoz, mint az MPCl-nél. Egy új ábrázolási mód segítségével egyes esetekben sikerült kimutatnom eltérő kötőhelyek létezését.

Bemutattam, hogy a kromofórt körülvevő lipidkörnyezet inhomogenitásai kimutathatóak alacsony hőmérsékletű energiaszelektív FLN technikákkal. Az FLN mérések inhomogén eloszlásgörbéi alapján az eltérő MP–SUV rendszerekben három kötőhelyet tudtam azonosítani: egyet a két lipidmolekula-réteg között (csak az MPE-nél), egyet mélyen a lipidek szénhidrátláncával párhuzamosan (mindkét MP-re), és egyet a membránban a lipidek fejcsoportjánál (MPCl esetén).

## 8. Summary

In modern medical practice methods based on the photodynamic effect are widely used. The most important being is photodynamic therapy and detection. Indications are mostly different tumours, but it is used for sterilisation of blood products, curing skin diseases (e.g. psoriasis), eye diseases (e.g. maculadegeneration) and atherosclerosis. The therapy and the connected detection is based on the usage of light and a corresponding photosensitizer in an oxygen rich environment.

The effectiveness of this process is affected by the association of the photosensitizer to the cell membrane and the location of the sensitizer in the membranes. These processes are widely studied by porphyrinoid photosensitizers and liposomes as model systems.

In my experiments I examined two similar mesoporphyrin IX (MP) derivatives, namely, mesoporphyrin IX dimethyl ester (MPE) and mesoporphyrin IX dihydrochloride (MPCl). I used one component small unilamellar vesicles (SUV) as a membrane model. I created such MP—SUV model systems that suitable for both conventional and low temperature optical spectroscopic examinations.

I characterized the association of mesoporphyrins to the lipid membranes by the number of all the possible binding sites, the dissociation and the binding constant. I found in general that the binding ability of MPE is considerably greater and the number of all the possible binding sites is higher than that of MPCl.

I demonstrated that low temperature site-selective FLN technics are applicable to characterise the inhomogeneous lipid environment of a chromophor. On the basis of the fit results of the decomposition of the IDFs into Gaussians I identified three binding sites in the different MP—SUV systems: one of the locations (for MPE) is between the two lipid layers, another one (for MPE and MPCl) is located deeply between the hydrocarbon chains, and a third one (for MPCl) is along the outer part of the hydrocarbon chains partially inserted between the head groups of lipid molecules.

## 9. Irodalomjegyzék

- [1] Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003,3:380-7.
- [2] Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., Mittleman, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*. 1978,38:2628-35.
- [3] Dougherty, T. J. Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1993,58:895-900.
- [4] Ibbotson, S. H. An overview of topical photodynamic therapy in dermatology. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010,7:16-23.
- [5] Taylor, M. N., Gonzalez, M. L. The practicalities of photodynamic therapy in acne vulgaris. *Br J Dermatol*. 2009,160:1140-8.
- [6] Souza, C. S., Felicio, L. B., Ferreira, J., Kurachi, C., Bentley, M. V., Tedesco, A. C., Bagnato, V. S. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009,6:207-13.
- [7] Bozzini, G., Colin, P., Betrouni, N., Nevoux, P., Ouzzane, A., Puech, P., Villers, A., Mordon, S. Photodynamic therapy in urology: What can we do now and where are we heading? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012.
- [8] Rockson, S. G., Lorenz, D. P., Cheong, W. F., Woodburn, K. W. Photoangioplasty: An emerging clinical cardiovascular role for photodynamic therapy. *Circulation*. 2000,102:591-6.
- [9] Biel, M. Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers Surg Med*. 2006,38:349-55.
- [10] Li, K. M., Sun, X., Koon, H. K., Leung, W. N., Fung, M. C., Wong, R. N. S., Lung, M. L., Chang, C. K., Mak, N. K. Apoptosis and expression of cytokines triggered by pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photodynamic therapy in nasopharyngeal carcinoma cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2006,3:247-58.
- [11] Mitton, D., Ackroyd, R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008,5:103-11.

- [12] Gabriel, D., Busso, N., So, A., van den Bergh, H., Gurny, R., Lange, N. Thrombin-sensitive photodynamic agents: a novel strategy for selective synovectomy in rheumatoid arthritis. *J Control Release*. 2009,138:225-34.
- [13] Igarashi, A., Konno, H., Tanaka, T., Nakamura, S., Sadzuka, Y., Hirano, T., Fujise, Y. Liposomal photofrin enhances therapeutic efficacy of photodynamic therapy against the human gastric cancer. *Toxicol Lett*. 2003,145:133-41.
- [14] Huang, L., Dai, T., Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol*. 2010,635:155-73.
- [15] Dai, T., Huang, Y. Y., Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009,6:170-88.
- [16] Ben-Hur, E., Geacintov, N. E., Studamire, B., Kenney, M. E., Horowitz, B. The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines. *Photochem Photobiol*. 1995,61:190-5.
- [17] Ishizuka, M., Abe, F., Sano, Y., Takahashi, K., Inoue, K., Nakajima, M., Kohda, T., Komatsu, N., Ogura, S., Tanaka, T. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int Immunopharmacol*. 2011,11:358-65.
- [18] Bonnett, R., Martinez, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2001,57:9513-47.
- [19] Bredell, M. G., Besic, E., Maake, C., Walt, H. The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: A short review. *J Photochem Photobiol B*. 2010,101:185-90.
- [20] Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M. L., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol*. 2008,26:612-21.
- [21] Lang, K., Mosinger, J., Wagnerová, D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord Chem Rev*. 2004,248:321-50.
- [22] Hoebeke, M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. *J Photochem Photobiol B*. 1995,28:189-96.

- [23] Schell, C., Hombrecher, H. K. Synthesis and investigation of glycosylated mono- and diarylporphyrins for photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem.* 1999,7:1857-65.
- [24] Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy.* 2004,1:279-93.
- [25] Ehrenberg, B., Anderson, J. L., Foote, C. S. Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media. *Photochem Photobiol.* 1998,68:135-40.
- [26] Dror, S. B., Bronshtein, I., Garini, Y., O'Neal, W. G., Jacobi, P. A., Ehrenberg, B. The localization and photosensitization of modified chlorin photosensitizers in artificial membranes. *Photochem Photobiol Sci.* 2009,8:354-61.
- [27] Nowis, D., Stoklosa, T., Legat, M., Issat, T., Jakóbsiak, M., Golab, J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005,2:283-98.
- [28] Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two - cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005,2:1-23.
- [29] Allison, R. R., Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2010,7:61-75.
- [30] Krammer, B., Verwanger, T. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid or its methyl ester: Which one is superior? *Med Laser Appl.* 2009,24:221-6.
- [31] Postigo, F., Mora, M., De Madariaga, M. A., Nonell, S., Sagrista, M. L. Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements. *Int J Pharm.* 2004,278:239-54.
- [32] Voszka, I., Szabo, Z., Csik, G., Maillard, P., Grof, P. Interaction of tetraphenylporphyrin derivatives with DPPC-liposomes: an EPR study. *J Photochem Photobiol B.* 2005,79:83-8.
- [33] Chwilkowska, A., Saczko, J., Modrzycka, T., Marcinkowska, A., Malarska, A., Bielewicz, J., Patalas, D., Banas, T. Uptake of photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells in vitro. *Acta Biochim Pol.* 2003,50:509-13.

- [34] Ben-Dror, S., Bronshtein, I., Wiehe, A., Roder, B., Senge, M. O., Ehrenberg, B. On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers. *Photochem Photobiol.* 2006,82:695-701.
- [35] Engelmann, F. M., Rocha, S. V., Toma, H. E., Araki, K., Baptista, M. S. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. *Int J Pharm.* 2007,329:12-8.
- [36] Lavi, A., Weitman, H., Holmes, R. T., Smith, K. M., Ehrenberg, B. The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency. *Biophys J.* 2002,82:2101-10.
- [37] Vilaplana, R. A., González-Vilchez, F. Physicochemical properties of the soluble porphyrin tetrakis-(4-N-methylpyridyl)-porphine encapsulated in large unilamellar vesicles. *Inorganica Chim Acta.* 2002,339:129-34.
- [38] Minnes, R., Weitman, H., You, Y., Detty, M. R., Ehrenberg, B. Dithiaporphyrin derivatives as photosensitizers in membranes and cells. *J Phys Chem B.* 2008,112:3268-76.
- [39] Ricchelli, F., Jori, G. Distribution of porphyrins in the various compartments of unilamellar liposomes of dipalmitoyl-phosphatidylcholine as probed by fluorescence spectroscopy. *Photochem Photobiol.* 1986,44:151-7.
- [40] Ricchelli, F., Jori, G., Gobbo, S., Tronchin, M. Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1991,1065:42-8.
- [41] Ricchelli, F., Gobbo, S. Porphyrins as fluorescent probes for monitoring phase transitions of lipid domains in biological membranes. Factors influencing the microenvironment of haematoporphyrin and protoporphyrin in liposomes. *J Photochem Photobiol B.* 1995,29:65-70.
- [42] Lakowicz, J. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Springer; 2006. p. 206.
- [43] Szalay, L., Damjanovich, S. Lumineszcencia a biológiában és az orvostudományban. Budapest: Akadémiai Kiadó; 1983. p. 50.
- [44] Szalay, L., Damjanovich, S. Lumineszcencia a biológiában és az orvostudományban. Budapest: Akadémiai Kiadó; 1983. p. 33.

- [45] Personov, R. I. Luminescence line narrowing and persistent hole burning in organic materials: principles and new results. *J Photochem Photobiol A*. 1992,62:321-32.
- [46] Personov, R. I., Al'Shits, E. I., Bykovskaya, L. A. The effect of fine structure appearance in laser-excited fluorescence spectra of organic compounds in solid solutions. *Opt Commun*. 1972,6:169-73.
- [47] Riesen, H. Hole-burning spectroscopy of coordination compounds. *Coord Chem Rev*. 2006,250:1737-54.
- [48] Ariese, F., Bader, A. N., Gooijer, C. Fluorescence line-narrowing spectroscopy for probing purposes in bioanalytical and environmental chemistry. *Trends Analyt Chem*. 2008,27:127-38.
- [49] Roberts, K. P., Jankowiak, R., Small, G. J. High-performance liquid chromatography interfaced with fluorescence line-narrowing spectroscopy for on-line analysis. *Anal Chem*. 2001,73:951-6.
- [50] Larsen, O. F. A., Kozin, I. S., Rijs, A. M., Stroomberg, G. J., de Knecht, J. A., Velthorst, N. H., Gooijer, Cees. Direct Identification of Pyrene Metabolites in Organs of the Isopod *Porcellio scaber* by Fluorescence Line Narrowing Spectroscopy. *Anal Chem*. 1998,70:1182-5.
- [51] Duhachek, S. D., Kenseth, J. R., Casale, G. P., Small, G. J., Porter, M. D., Jankowiak, R. Monoclonal antibody--gold biosensor chips for detection of depurinating carcinogen-DNA adducts by fluorescence line-narrowing spectroscopy. *Anal Chem*. 2000,72:3709-16.
- [52] Fidy, J., Laberge, M., Kaposi, A. D., Vanderkooi, J. M. Fluorescence line narrowing applied to the study of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998,1386:331-51.
- [53] Gall, A., Robert, B., Cogdell, R. J., Bellissent-Funel, M. C., Fraser, N. J. Probing the binding sites of exchanged chlorophyll a in LH2 by Raman and site-selection fluorescence spectroscopies. *FEBS Lett*. 2001,491:143-7.
- [54] Freiberg, A., Ratsep, M., Timpmann, K. u., Trinkunas, G. Excitonic polarons in quasi-one-dimensional LH1 and LH2 bacteriochlorophyll a antenna aggregates from photosynthetic bacteria: A wavelength-dependent selective spectroscopy study. *Chem Phys*. 2009,357:102-12.



- [55] Laberge, M., Osvath, S., Fidy, J. Aromatic substrate specificity of horseradish peroxidase C studied by a combined fluorescence line narrowing/energy minimization approach: the effect of localized side-chain reorganization. *Biochemistry*. 2001,40:9226-37.
- [56] Anni, H., Vanderkooi, J. M., Sharp, K. A., Yonetani, T., Hopkins, S. C., Herenyi, L., Fidy, J. Electric field and conformational effects of cytochrome c and solvent on cytochrome c peroxidase studied by high-resolution fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*. 1994,33:3475-86.
- [57] Herenyi, L., Fidy, J., Gafert, J., Friedrich, J. Energy landscape of the tautomer states of mesoporphyrin embedded in horseradish peroxidase. *Biophys J*. 1995,69:577-82.
- [58] Edwards, K. A., Baeumner, A. J. Analysis of liposomes. *Talanta*. 2006,68:1432-41.
- [59] Lapinski, M. M., Castro-Forero, A., Greiner, A. J., Ofoli, R. Y., Blanchard, G. J. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir*. 2007,23:11677-83.
- [60] Modos, K., Galantai, R., Bardos-Nagy, I., Wachsmuth, M., Toth, K., Fidy, J., Langowski, J. Maximum-entropy decomposition of fluorescence correlation spectroscopy data: application to liposome-human serum albumin association. *Eur Biophys J*. 2004,33:59-67.
- [61] Dorsey, N. E. *Properties of Ordinary Water-Substance*. New York: Hafner Publishing Co.; 1940. p. 184.
- [62] Vural, U. S., Muradoglu, V., Vural, S. Excess molar volumes, and refractive index of binary mixtures of glycerol + methanol and glycerol + water at 298.15 K and 303.15 K. *Bull. Chem. Soc. Ethiop*. 2011,25:111-8.
- [63] Bárdos-Nagy, I., Galántai, R., Kaposi, A. D., Fidy, J. Difference in the transport of metal and free-base porphyrins steady-state and time-resolved fluorescence studies. *Int J Pharm*. 1998,175:255-67.
- [64] Zierler, K. An error in interpretation of double-reciprocal plots and Scatchard plots in the studies of binding of fluorescent probes to proteins, and alternative proposals for determining binding parameters. *Biophys Struct Mech*. 1977,3:275-89.
- [65] Bashford, C. L., Chance, B., Smith, J. C., Yoshida, T. The behavior of oxonol dyes in phospholipid dispersions. *Biophys J*. 1979,25:63-85.

- [66] Kaposi, A. D., Vanderkooi, J. M. Vibronic energy map and excited state vibrational characteristics of magnesium myoglobin determined by energy-selective fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992,89:11371-5.
- [67] Balgavy, P., Dubnickova, M., Kucerka, N., Kiselev, M. A., Yaradaikin, S. P., Uhríkova, D. Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study. *Biochim Biophys Acta*. 2001,1512:40-52.
- [68] Angeli, N. G., Lagorio, M. G., San Roman, E. A., Dicalio, L. E. Meso-substituted cationic porphyrins of biological interest. Photophysical and physicochemical properties in solution and bound to liposomes. *Photochem Photobiol*. 2000,72:49-56.
- [69] Csík, G., Balog, E., Voszka, I., Tölgyesi, F., Oulmi, D., Maillard, P., Momenteau, M. Glycosylated derivatives of tetraphenyl porphyrin: photophysical characterization, self-aggregation and membrane binding. *J Photochem Photobiol B*. 1998,44:216-24.
- [70] Sholto, A., Ehrenberg, B. Hydrophobicity, topography in membranes and photosensitization of silicon phthalocyanines with axial ligands of varying lengths. *Photochem Photobiol Sci*. 2008,7:344-51.
- [71] Bronshtein, I., Afri, M., Weitman, H., Frimer, A. A., Smith, K. M., Ehrenberg, B. Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency. *Biophys J*. 2004,87:1155-64.
- [72] Afri, M., Ehrenberg, B., Talmon, Y., Schmidt, J., Cohen, Y., Frimer, A. A. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part III: Locating Vitamin E, ubiquinol and ubiquinone and their derivatives in the lipid bilayer. *Chem Phys Lipids*. 2004,131:107-21.
- [73] Gross, E., Ehrenberg, B. The partition and distribution of porphyrins in liposomal membranes. A spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta*. 1989,983:118-22.
- [74] Katsikas, H., Quinn, P. J. The interaction of coenzyme Q with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *FEBS Lett*. 1981,133:230-4.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

*A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:*

Herényi, 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., Bócskei-Antal, B., Voszka, I., Módos, K., Csík, G., Kaposi, A. D., Fidy, J., Herényi, 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.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni:

Dr. Herényi Levente docens úrnak, hogy végig egyengette lépteim az Intézetben végzett munka során. Köszönöm őszinteségét, nagy türelmét, a tudományos gondolkodásra való tanítását és a dolgozat megírásához nyújtott segítségét és támogatását.

Dr. Gróf Pál docens úrnak az útmutatásokat és hogy mindig nyitott volt a vitára. Köszönöm kritikus megjegyzéseit.

Dr. Rontó Györgyi professzor asszonynak, Dr. Fidy Judit professzor asszonynak és Dr. Kellermayer Miklós professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet vezetőinek, az Intézetben végzett munka lehetőségét és tudományos munkám támogatását.

Dr. Békási Sándornak és Dr. Böcskei-Antal Barnabásnak a mérések kivitelezésében nyújtott segítségét.

Dr. Módos Károly adjunktus úrnak, Dr. Kaposi András docens úrnak és Dr. Schay Gusztávnak, hogy segítségemre voltak a különböző spektroszkópai technikák elsajátításában és a műszerek kezelésében. Továbbá köszönöm a tartalmas konzultációk lehetőségét is.

Dr. Csík Gabriella docens asszonynak, hogy segítségemre volt a fényérzékenyítőket érintő kérdésekben.

Dr. Voszka István adjunktus úrnak és Dr. Bozó Tamásnak, hogy megosztották velem tudásukat a liposzómapreparálásról, valamint készségesen válaszoltak a liposzómákat érintő kérdéseimre.

Dr. Gyimesi Gergelynek a Marvin Beans szoftveres szimulációkban kapott segítséget.

Dr. Agócs Gergelynek, hogy megvitathattam vele dolgozatom tartalmi, formai és grammatikai kérdéseit.