

A fényérzékenyítők elhelyezkedése a membránokban és szerepük a fotodinamikus reakciókban

Doktori értekezés

Dr. Bócskei-Antal Barnabás

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy László, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Rácz Frigyes Sámuel, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán Ph.D., az MTA doktora, egyetemi tanár
Tagok: Dr. Kovács Mihály Ph.D., az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Cervenák László Ph.D., tudományos tanácsadó

Budapest
2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés.....	4
1.1. Mikroszkopikus és szubmikroszkopikus biológiai rendszerek	4
1.2. A fotodinamikus terápia	6
1.2.1. A fotodinamikus terápia eredete.....	6
1.2.2. A fotodinamikus terápia hatásmechanizmusa	7
2. Célkitűzések	13
3. Felhasznált anyagok, módszerek.....	14
3.1. A modellrendszer.....	14
3.2. Alkalmazott módszerek	17
3.2.1. A liposzómák épségének a vizsgálata (DLS).....	17
3.2.2. A porfirinkötődés mérése (Fluoreszcencia spektrometria).....	21
3.2.3. A fényérzékenyítők lokalizációjának vizsgálata (FLN).....	22
3.2.4. A keletkező ROS kimutatása (Abszorpciós spektrometria)	28
3.2.5. A ROS általi membránkárosodás kimutatása (FCS, DLS).....	31
4. Eredmények.....	34
4.1. A kötődésvizsgálat.....	34
4.2. A fényérzékenyítők membránon belüli elhelyezkedése	38
4.3. A keletkezett ROS	42
4.4. Direkt ROS membránkárosítás kimutatása.....	45
4.5. A fotoindukált membránkárosodás.....	48
5. Megbeszélés	52
5.1. A porfirin molekulák kötődése a membránokhoz	52
5.2. A keletkező ROS kimutatása.....	58
5.3. A ROS membránkárosító hatása	61
6. Következtetések	67
7. Összefoglalás.....	71
8. Summary	72
9. Irodalomjegyzék.....	73
10. Saját publikációk jegyzéke.....	82
11. Köszönetnyilvánítás	83

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Angol jelentés	Magyar megfelelő
AFM	atomic force microscope	atomierő mikroszkóp
DiO	dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate	dioktadeciloxakarbocianin-perklorát
DMF	dimethylformamide	dimetilformamid
DMPC	dimyristoyl phosphocholine	dimirisztoil-foszfadilkolin
DOPC	dioleoyl phosphocholine	dileoil-foszfadilkolin
DPPC	dipalmitoyl phosphocholine	dipalmitoil-foszfadilkolin
DSPC	disteraoyl phosphocholine	disztearoil-foszfadilkolin
EDKC	ethyl dioxolane kryptocyanine	etil-dioxolán-kriptocianin
FLN	fluorescence line narrowing	(nincs jó magyar megfelelője)
HPD	hematoporphyrin derivatives	hematoporfirin származékok
IDF	inhomogeneous distribution function	inhomogén eloszlásfüggvény
LED	light-emitting diode	világító dióda
MEM	maximum entropy method	maximum entrópia módszer
MLV	multilamellar vesicle	többrétegű liposzóma
MPCI	mesoporphyrin IX dihydrochloride	mezoporfirin IX-dihidroklorid
MPE	mesoporphyrin IX dimethyl ester	mezoporfirin IX-dimetilészter
OLED	organic light-emitting diode	szerves világító dióda
PBS	phosphate buffered saline	foszfát pufferolt sóoldat
PDT	photodynamic therapy	fotodinamikus terápia
PW	phonon wing	(nincs jó magyar megfelelője)
RES	reticulo-endothelial system	reticulo-endoteliális rendszer
ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigén származékok
SHB	spectral hole burning	(nincs jó magyar megfelelője)
SUV	small unilamellar vesicle	kisméretű egyrétegű liposzóma
TRPS	tunable resistive pulse sensing	hangolható rezisztív pulzusérzékelés
VLDL	very-low-density lipoprotein	(nincs jó magyar megfelelője)
ZPL	zero phonon line	(nincs jó magyar megfelelője)

1. BEVEZETÉS

A természetben lejátszódó valamennyi folyamat háttérében, akár globális szintű vagy egyéni szervezet szintjén valósuljon is meg, kimutathatóak illetve megtalálhatóak olyan parányi elemek, amelyek a „mozgatórugók” szerepét töltik be. A technika folyamatos fejlődésével lehetőségünk nyílt ezen mikroszkopikus rendszerek megismerésére, tanulmányozására. Így mára tanúbizonyságot nyert az, hogy számos betegség kóroki tényezőjeként bizonyos mikroszkopikus rendszerek például baktériumok, vírusok a felelősek.

A tanulmányozások során egyre újabb kérdések merültek fel. Hogyan tudjuk vizsgálni a szubmikroszkopikus „világot”? Milyen okokra lehet az eddig kapott eredményekből következtetni? Ezekre és a többi hasonló kérdésre a biofizika, biokémia és biológia kísérleti eszköztárának a segítségével keressük a választ.

Jelen munkám során az optikai spektroszkópia adta lehetőségek, eszközök használatával végeztem szubmikroszkopikus rendszerek tanulmányozását. Az általam előállított mesterséges kétrétegű modellmembránokon – liposzómákon – vizsgáltam a fotodinamikus terápiák háttérében lezajló fotokémiai folyamatok elvi alapjait, és hatásmechanizmusát.

A saját eredmények részletes bemutatása előtt ismertetem a kutatásban valamint a gyógyászatban alkalmazott mikroszkopikus és szubmikroszkopikus rendszerek egyes típusait és a fotodinamikus terápia alapjait, jelentőségét.

1.1. Mikroszkopikus és szubmikroszkopikus biológiai rendszerek

A tudósokat már az ókorban is foglalkoztatta a parányi, szemmel nem látható világ. Az idő során lehetővé vált az egyre kisebb és kisebb méretek megismerése. A tényleges nanovilág az 1 μm alatti mérettartományt jelenti. Az ilyen kisméretű részecskékkal foglalkozó nanotechnológia széles körben terjed napjainkban, és mára teret hódított az orvostudomány területén is.

A biomedicinában használatos nanotechnológia két nagy csoportra osztható: diagnosztikus (szenzorok) és terápiás célúra. Talán a nanorobotok egykor a két ágat

egyesíthetik. Az orvosi nanotechnológia magába foglalja olyan anyagok és módszerek tervezését, alkalmazását, amelyekkel az emberi testről szubcelluláris (akár molekuláris) szinten, magas specificitással lehet információt nyerni, illetve hatni rá [1].

A nanotechnológia új lehetőségeket kínál a klinikailag fontos markerek, molekuláris elváltozások vizsgálatára és eszközt a terápiás beavatkozásokra [2]. Ezáltal kitágulnak a határok a molekuláris diagnosztika terén és lehetővé válik a személyre szóló medicina kialakítása.

A nanotechnológia felhasználható arra is, hogy egyes gyógyszereket specifikusan egy adott szövetbe ill. sejtbe jutassunk be – ezáltal csökkentve a mellékhatásokat. A kóros szöveteknek az egészségestől eltérő patofiziológiai viselkedése és anatómiája biztosítja számunkra ezt a lehetőséget [3]. A gyógyszer tudomány már évek óta használja a nanorészecskék közé tartozó különböző méretű és szerkezetű liposzómákat, mint transzport vezikulákat [4]. Segítségükkel a gyógyszerhatóanyagok felszabadulását mind időben mind térben szabályozni lehet, így növelve a gyógyszer molekulák hatékonyságát, és csökkentve a toxicitásukat. A liposzómák másik fontos felhasználási területe a sejtmembrán-modellként való alkalmazásuk, mivel szerkezetükben jelentős hasonlóságot mutatnak a sejtmembrán lipid kettősrétegével. Ezáltal szerepük van a membrán szerkezet, a transzport folyamatok, valamint a különböző molekulák membránokra gyakorolt hatásainak vizsgálatában, vagyis a gyógyszerfejlesztésben. Hasonló módon a genetikai betegségek kezelésére és megelőzésére bevezetett géntechnológiának is megvannak a nano eszközei, mint a liposzómák, nanorészecskék és dendrimerek [5].

Munkám során a már említett liposzómákat - mint nano rendszereket - használtam fel a fotodinamikus terápiában használt fényérzékenyítő anyagok vizsgálatára. Azt kutattam, hogy ezen fényérzékenyítőknek milyen a sejtmembránhoz történő kötődése illetve a membránokban való elhelyezkedése, ugyanis ez a tényező kiemelkedően befolyásolja a fotodinamikus terápia hatékonyságát. Az általam elvégzett vizsgálatok és eredmények bemutatása előtt összefoglalom a fotodinamikus terápia működési elvét és ebben a vizsgálatban alkalmazott eszközöket és azok elméleti hátterét.

1.2. A fotodinamikus terápia

A fotodinamikus reakciók alkalmazása ma már széles körben elterjedt és az orvostudomány számos területen választja kezelésként. A lokális fotodinamikus terápia (PDT) egy non- invazív terápiás lehetőség, amely használata napjainkban is egyre jobban nő.

A PDT során úgynevezett fényérzékenyítőt (a leggyakrabban egy porfirinszármazék) juttatnak a véráramba, amely kémiai tulajdonságai (vagy vívmolekulák) által felhalmozódik a célzott sejtek membránjaiban, DNS molekulái közelében vagy más sejtorganellumokban. Ezt követően az adott szövetet megvilágítva a megfelelő hullámhosszúságú fényvel, egy fotokémiai átalakulás játszódik le a fényérzékenyítő molekulákban, amely során oxidációs folyamatok indulnak be a sejteken belül. E folyamatok végül a sejtek károsodásához vezetnek.

Manapság a PDT leggyakoribb felhasználási területei a *malignus és benignus bőrdaganatok* (illetve egyéb bőrbetegségek) mellett az időskori *macula degeneráció*, és más olyan szembetegségek, amelyek összefüggésbe hozhatók a neo-vaszkularizációval. A fotodinamikus terápia utat tört a kardiológia és a reumatológia területén is. A módszer, eredményesnek bizonyult artériás *intima hyperpláziák* kezelésében és vannak próbálkozások sztent implantációk utáni PDT alkalmazásra is. Még kipróbálás alatt áll az antigén-indukált *reumatoid arthritis* elleni fotodinamikus synoviectomia. Nem utolsó sorban mikrobiológiai vonatkozásban felhasználható *vérkészítmények sterilizálására*, valamint célzottan mikroorganizmusok ellen.

1.2.1. A fotodinamikus terápia eredete

A fény terápiás tulajdonságai már évezredek óta ismertek, ugyanakkor a fotodinamikus terápia csak a múlt század során alakult ki [6]. Az ősi egyiptomi, kínai és indiai civilizációk már használtak fényt (kb. 3000 évvel ezelőtt) különböző betegségek, köztük psoriasis, vitiligo és bőrdaganatok kezelésében.

A 19. század végén a dán származású Niels Finsen felfedezte a vörös fény jótékony hatását a himlő pusztulák kialakulásának és kifakadásának megelőzésében [7]. A Napból származó ultraibolya sugárzással eredményeket ért el a kután tuberkulózis

kezelésében is. A fotodinamikus terápia kezdetét jelentette mintegy 120 évvel ezelőtt, amikor kísérletileg bizonyították (Oscar Raab), hogy egyes vegyületek és fény kombinációja képes sejthalált indukálni. H. von Tappeiner és A. Jesionek 1903-ban már ezint alkalmazott lokálisan bőrdaganatok kezelésében – az általuk észlelt jelenséget *fotodinamikus hatásnak* nevezték el [8].

Ezt követően 1913-ban a német tudós Friedrich Meyer–Betz alkalmazott először porfirint emberen fotodinamikus terápia céljából – hematoporfirint saját kezén [9]. 1955-ben Samuel Schwartz és munkatársai kifejlesztették a hematoporfirin származékokat (HPD) [10], amelyekről későbbiekben bebizonyosodott, hogy kétszer olyan fototoxikusak, mint a hematoporfirin, képesek szelektíven a daganatos szövetekhez kötődni, és alkalmasak a tumorok fotodetekálására is. A PDT rákos betegek terápiájában való tényleges alkalmazásának kialakulása hosszú ideig tartott. Habár az első kísérletek már 1903-ban megtörténtek, az első jelentős áttörést 1976-ban érték el (J. F. Kelly és mtsai.) humán *hólyagcarcinoma* hematoporfirin származékkal történő kezelésével [11]. Thomas Dougherty szintén sikerrel alkalmazott HPD-t *bőrdaganat* terápiájában [12]. Az azóta eltelt évek és a klinikai eredmények igazolták, hogy a PDT ajánlott a *korai stádiumú inoperábilis daganatok* kezelésére, mint az oesophagealis tumor, gyomor carcinoma, intraocularis tumor, agydaganatok, mesothelioma, colorectalis daganat és pankreász daganat.

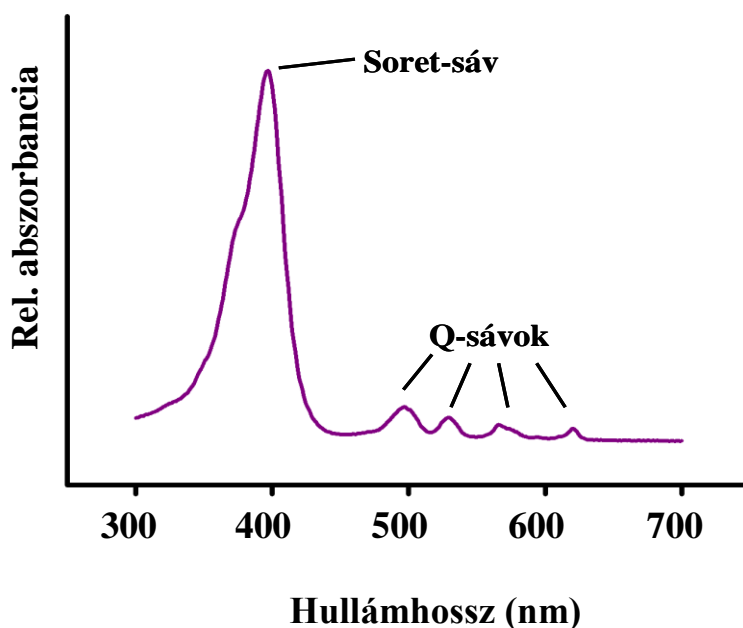
1.2.2. A fotodinamikus terápia hatásmechanizmusa

A fotodinamikus terápia során az érintett sejtekhez kötődött úgynevezett fényérzékenyítőkből megfelelő hullámhosszúságú, többnyire lézerrel előállított fény hatására fotokémiai reakciók mennek végbe. A sejtkárosító hatást a gerjesztett állapotú molekula különböző reakcióutakon (*I. típus, II. típus*) keresztül válthatja ki [13].

A legtöbb, mind a klinikumban, mind a kísérleti munkában fényérzékenyítőként használt molekula aromás tetrapiról származék, amelyhez hasonlók a természetben is előfordulnak (pl. hem). Az ideális fényérzékenyítők jellemzőit már ismerjük [14]. Besugárzás nélkül alacsony szintű toxicitással kell rendelkezniük, továbbá ne okozzanak olyan nem kívánt reakciókat, mint például a hypotenzio és az allergia. Lényeges, hogy a gerjesztő fény megfelelő szöveti penetrációja céljából abszorpciójuk a vörös ill. ahhoz közeli hullámhossztartományba essen. Rövidebb hullámhosszúságú

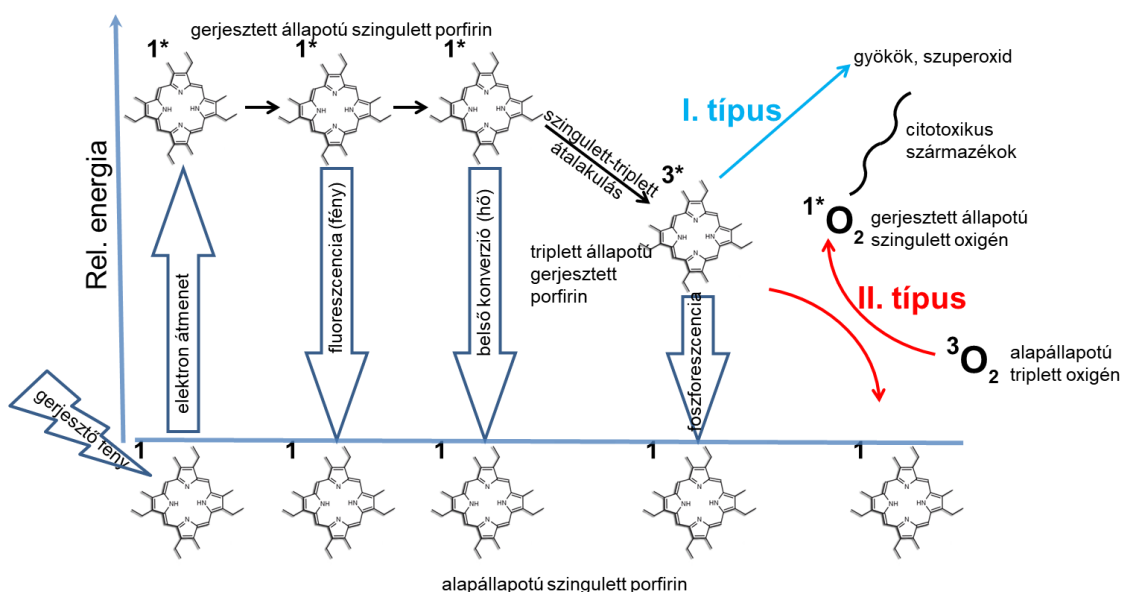
abszorpciónál ugyanis a fény nem jutna elég mélyre a szövetekben a kívánt hatás kiváltásához, így csak a bőr felszínének fényérzékenyítését idézné elő. A hosszabb hullámhosszú (>800nm) fény pedig azért nem megfelelő, mert a fotonok nem rendelkeznek elegendő energiával ahhoz, hogy a fényérzékenyítők gerjesztett állapotba kerüljenek a további reakciók végbemeneteléhez. Mindemellett kívánatos, hogy a fényérzékenyítők abszorpciós együtthatója kellően nagy legyen az alkalmazott gerjesztési hullámhosszon, így minimalizálhatjuk a hatás eléréséhez szükséges anyag mennyiségét.

A fotodinamikus terápiák alapját a már említett fényérzékenyítő anyagok képezik, amelyek leggyakrabban porfirin származékok. Megjegyzendő, hogy a kereskedelmi forgalomban lévő klinikailag beteg gyógyításra engedélyezett fényérzékenyítők száma még ma is kevés. (Az első engedélyezett szer a Photofrin volt 1993-ban Kanadában.)



1. ábra Porfirin abszorpciós spektrum Az ábrán az egyik felhasznált porfirin molekula (MPCl) abszorpciós spektruma látható. A Soret-sáv, vagyis az abszorpciós maximum 397 nm-nél figyelhető meg. A 450-625 nm közötti tartományban találhatóak az úgynevezett Q-sávok, amelyek közül általában a legnagyobb hullámhosszal rendelkezőt használják a fotodinamikus terápia során a fényérzékenyítők gerjesztésére.

Spektroszkópiai szempontból a tetrapirolookra általában jellemző az ún. *Soret-sáv* (abszorpció sáv), amely 400 nm környékén található és jelentős mértékű. A vörös tartomány felé haladva 500-700 nm között jelennek meg az ennél lényegesen kisebb abszorbanciájú ún. *Q-sávok*. Az említett két sáv típus általánosan megfigyelhető minden porfirin esetében, de ezeken kívül még más járulékos sávok is előfordulhatnak. Az általam használt egyik porfirin molekula (MPCI) abszorpció spektrumát az 1. ábrán tüntettem fel.



2. ábra A fotodinamikus terápia során végbemenő fotofizikai és fotokémiai mechanizmusok. Az ábrán lévő számok a molekulák spinállapotát jelölik (1-szingulett, 3-triplett), míg * jelzi a gerjesztett állapotot. Vastag kék nyilakkal ábrázoltam az energiaszintek közti közvetlen átmeneteket. A piros és világos kék nyilak az I. ill. a II. típusú reakcióutakat jelölik.

Alapállapotban a fényérzékenyítők két ellentétes spinű elektronnal rendelkeznek a legkülső betöltött molekula orbitálon (szingulett alapállapot „1”). A gerjesztő fényfoton abszorpcióját követően az egyik elektron átkerül egy magasabb energiájú pályára, ugyanakkor a spin állapotát megtartja (gerjesztett szingulett állapot „1*”). Ebből az állapotból vibrációs relaxáció után több lehetséges átmenet történhet. Ez lehet rövid, nanoszekundum életidejű fény emisszió (fluoreszcencia), szingulett állapotok között végbemenő sugárzás nélküli belső konverzió vagy szingulett-triplett átalakulás (intersystem crossing), amikor a gerjesztett elektron spinje megfordul és kialakul egy hosszú (legalább mikroszekundum) életidejű gerjesztett *triplett* állapot („3*”), ahol az

elektron spinek paralelek. A hosszú életidőt az a tény magyarázza, hogy az energiától fény emisszió (foszforeszcencia) formájában való megszabadulás első közelítésben tiltott spin-átmenettel járó folyamat. A 2. ábrán a fentebb leírt folyamatokat és az ezt követő két reakciót mutatom be. A fényérzékenyítő a gerjesztett triplett állapotából ezt követően kétféle reakcióúton mehet keresztül. *I. típus:* reakcióba léphet közvetlenül olyan proton ill. elektron akceptorokkal, amelyekkel proton ill. elektron transzfer formájában gyököket képez. A keletkező gyökök további kölcsönhatásba léphetnek oxigénnel reaktív oxigén termékeket (ROS) eredményezve. *II. típus:* a fényérzékenyítő az energiáját közvetlenül átadhatja molekuláris oxigénnek (ami triplett alapállapotú), így az gerjesztett szingulett állapotba jut, ami egy nagyon reaktív oxidáló szer. A PDT esetében a reaktív oxigén szerepe tűnik fontosabbnak, habár a két reakciótípus szimultán is végbemehet. A kettő arányát nagyban meghatározza az alkalmazott érzékenyítő, az akceptor és az oxigén koncentrációja, valamint az érzékenyítő és az akceptor kapcsolata. Abban az esetben, ha a szöveti oxigén szintje magas a II. típusú reakció megy végbe, míg alacsonyabb oxigén koncentráció mellett inkább az I. típusú. Általánosságban elmondható, hogy a PDT hatásossága oxigéndependens, eltekintve pár kationos érzékenyítőtől, mint a cianin festék (EDKC), ami oxigén-independens mechanizmussal hat.

Az I. típusú reakcióban gyakran képződik kezdő lépésként szuperoxid anion molekuláris oxigén monovalens redukciójával. A szuperoxid önmagában kevésbé reakcióképes, de *hidrogén-peroxidot* (H_2O_2) képezhet, amely szabadon mozoghat a sejtmembránokon keresztül. A hidrogén-peroxid oxidációjával (általában fém ionok redukciójával kapcsoltan) *hidroxilgyök* képződik, amely transzportját illetően hasonlóan viselkedik a peroxidhoz, és diffúziótól függő károsító hatással bír. A hidroxilgyök reakcióba léphet a sejtmembránt alkotó zsírsavláncokkal hidroxilált adduktokat képezve, amely szintén gyök lévén más molekulákkal láncreakciót indíthat el. Ezzel tulajdonképpen a membránt alkotó zsírsavláncok és más lipidek oxidatív károsodását okozva.

A ROS és a II. típusú úton képződő szingulett oxigén oxidáló ágensek, amelyek közvetlenül reakcióba léphetnek több biológiai molekulával. A fehérjékben lévő aminosavak (cisztein, metionin, triptofán, tirozin, hisztidin) fontos célpontok. A DNS lánc is károsodhat oxidatívan, mind a nukleotid bázisokon (leggyakrabban a guaninon),

mind a DNS láncot összekapcsoló cukor molekulákon keresztül, a cukor molekulák kapcsolódásának oxidációjával vagy DNS-fehérje keresztkötések kialakulásával. Bár minden sejt rendelkezik javító mechanizmusokkal oxidatív stressz esetére, azonban a fehérjékben illetve a DNS-ben bekövetkező nagyszámú károsodás a sejtek mutációjához vagy halálához vezet.

A ROS és a szingulett oxigén élettideje (lipidfázisban $50-100 \cdot 10^{-6}$ s, sejt környezetben $0,6 \cdot 10^{-6}$ s), így a sejten belüli diffúziós távolsága is kicsi, pár nm nagyságrendbe esik. Ezért a közvetlen sejtkárosító hatását a keletkezés helyének közelében fejt ki [15, 16], amit meghatároz az alkalmazott érzékenyítő lokalizációja, és ez kémiai tulajdonságainak függvénye [17]. A hidrofíl tulajdonságúak főleg a lizoszómákban felhalmozódva, a hidrolitikus enzimek citoplazmába jutását eredményezik. A kationosak a mitokondriális dominanciával, mitokondrium károsodást okoznak [18]. A lipofil, anionos festékek pedig a membránokhoz kötődve – plazma-, mitokondrium-, lizoszóma-, endoplazmás retikulum-, magmembrán – fejtenek ki károsító hatást. A koleszterol és a telítetlen foszfolipidek fotoperoxidációja a membrán permeabilitás megváltozásához, a fluiditás elvesztéséhez és a membránhoz kötött enzimek és receptorok inaktivációjához vezet [19-21]. E folyamatok végezetül mind sejthalált indukálnak.

Ma már ismert, hogy a fotodinamikus terápia három fő mechanizmus révén fejt ki daganatellenes hatását [22]. Elsősorban a keletkező ROS *direkt tumor sejtpusztító* hatással rendelkezik. In vivo tumor PDT után megfigyelhető a klonogénikus sejtek számának csökkenése a direkt fotokárosodás következtében. Ennek ellenére csupán ezen reakció által a teljes tumor eradikáció nem lehetséges többek között a fényérzékenyítők egyenetlen szöveti eloszlása, valamint a szöveti oxigén hiány miatt – ami kialakulhat a terápia hatására is. Egy további mechanizmus, ami szerepet játszik a PDT hosszú távú hatékonyságában, a daganatot ellátó *érhálózat károsodása*. A daganatos sejtek életképességét azokat tápláló erek mennyisége határozza meg, amelyek kialakulását a daganat és a gazdasejtek által termelt növekedési faktorok befolyásolják. Megfigyelték a fotodinamikus terápiát követően a kiserek kollapszusát a daganatban, ami lokálisan komoly, tartós hypoxiát eredményezett. Egyes fényérzékenyítők után kétlépcsős ér-válasz tapasztalható. Azonnali reakcióként vazokonstriktio jelentkezik, majd néhány órával később egy második, hosszú hatású válasz alakul ki ér trombus

formájában. A kialakult trombus heparinnal oldható, ugyanakkor tartós hypoxiát okozva késlelteti a daganat növekedését. Harmadik fő mechanizmusként *immunválasz* aktiválódik a daganatos sejtek ellen. Megfigyelhető a limfociták, leukociták valamint a makrofágok felszaporodása a PDT-t követően a kezelt szövetekben. Az eredmények azt igazolták, hogy bár a PDT direkt károsító hatása képes elpusztítani a daganat nagy részét, a megmaradó sejtek eliminálásához szükség van a megfelelő immunválaszra. Az említett mechanizmusok egymást befolyásolják, ugyanakkor az optimális hosszú távú hatás eléréséhez mindegyikre szükség van, különösképpen metasztázisok esetén [23].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a fotodinamikus terápia során a szingulett oxigén és más reaktív oxigén származékok (ROS) élettartamát, reakcióképességét és a mennyiségét is nagyban befolyásolja a képződés helye, így nélkülözhetetlen a fényérzékenyítők sejtben való elhelyezkedésének és megoszlásának a pontos ismerete. Ezek a tényezők pedig mind befolyásolják a fotoreakciók sejtkárosító hatását, vagyis a terápia hatásosságát.

Munkám során egy egyszerű kis unilamelláris vezikulumokból és hozzáadott fényérzékenyítőkből álló sejtmembrán modell segítségével három fő kérdésre kerestem a választ.

1. A fényérzékenyítő anyagok kémiai tulajdonságai hogyan befolyásolhatják a lipid kettősréteg hez való kötődésüket illetve elhelyezkedésüket? Pontosan milyen helyzetben találhatóak ezek a viszonylag merev lapos nagy felületű molekulák a membránokban? Milyen lehet ezeknek az úgynevezett kötődési helyzeteknek az eloszlása?
2. A membránokon belüli egyes lokalizációk esetében kialakuló kémiai és fizikai kölcsönhatások milyen hatással vannak a fotokémiai reakciók során keletkező reaktív oxigén ágensek mennyiségére?
3. Felfedezhető-e összefüggés a fotodinamikus reakció során termelődő ROS mennyisége és a keletkezés helye, illetve az esetlegesen kialakuló membránkárosító hatás között?

A feltett kérdések megválaszolásához az optikai spektroszkópai módszerek közül a konvencionális szobahőmérsékleti emissziós illetve abszorpciós spektroszkópia mellett még olyan unikális metodikákat is felhasználtam, mint az alacsony hőmérsékletű, energiaszelektív nagyfelbontású fluoreszcencia spektroszkópia, az FLN és a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia, az FCS. E két utóbbi módszer felhasználása ezen a területen még egyedülállónak tekinthető. A vizsgálati módszerek részletesebb ismertetése a következő fejezetben olvasható. Az optikai spektroszkópai méréseimet még kiegészítettem a liposzómák méretének meghatározására használt dinamikus fényszórásméréssel, a DLS-sel is, ami ezen a területen egy elterjedtebb vizsgálómódszernek számít.

3. FELHASZNÁLT ANYAGOK, MÓDSZEREK

A méréseket egy mesterséges sejtmembrán-fényérzékenyítő szubmikroszkópikus modell segítségével végeztem. Ennek megalkotásakor az elsődleges szempont az volt, hogy olyan egyszerű nanorendszert készítsek, amelyben a fotodinamikus hatás során lejátszódó folyamatok tanulmányozhatóak és nem kell a komplex multifaktoriális rendszerekben fellelhető egyéb a vizsgálandó reakciókat perturbáló tényezőktől tartani. Ugyanakkor egy másik fontos tényező az, hogy a modellből nyerhető információk az élő sejtekkel kapcsolatban is relevánsak legyenek.

A biofizika és biokémia széles eszköztárából azért esett a döntés a spektroszkópia területére, mivel segítségével az esetek jelentős részében külső hozzáadott jelölő nélkül – pusztán a fotodinamikus hatás létrejöttéhez használt – fényérzékenyítők segítségével is elvégezhetőek a mérések ezáltal is csökkentve a modellt befolyásoló tényezők számát.

3.1. A modellrendszer

A sejtmembránban bekövetkező változások tanulmányozásához egy illetve többkomponensű kis unilamelláris liposzómákat (SUV – átmérője 100 nm alatti) használtam membránmodellként. Az egykomponensű vezikulumokban a membránalkotók telített zsírsavláncokkal rendelkező lipidek voltak, a 14 szénatomos dimirisztoiol-foszfátidilkolin (DMPC), a 16 szénatomos dipalmitoil-foszfátidilkolin (DPPC) és a 18 szénatomos disztearoil-foszfátidilkolin (DSPC). A többkomponensű mintákban telítetlen dioleoil-foszfátidilkolin (DOPC) molekulák 20 illetve 30 tömegszázalékban vetek részt a DPPC mellett a membránok felépítésében. A lipidmolekulákat a Sigma Aldrich-től szereztem be.

A liposzómák készítése vékonyréteg hidratációs technikával majd azt követően ultrahang besugárással illetve extrudálással történt. Első lépésként a megfelelő szintetikus lipidekből 10 mg-ot (0,1 mg pontossággal) feloldottam 200 µl kloroformban. Majd ezt egyenletesen párologtatva Argon gáz felhasználásával hoztam létre a lipidfilmet a kis üveg edény falán, amely a liposzómakészítés egy köztes állapota.

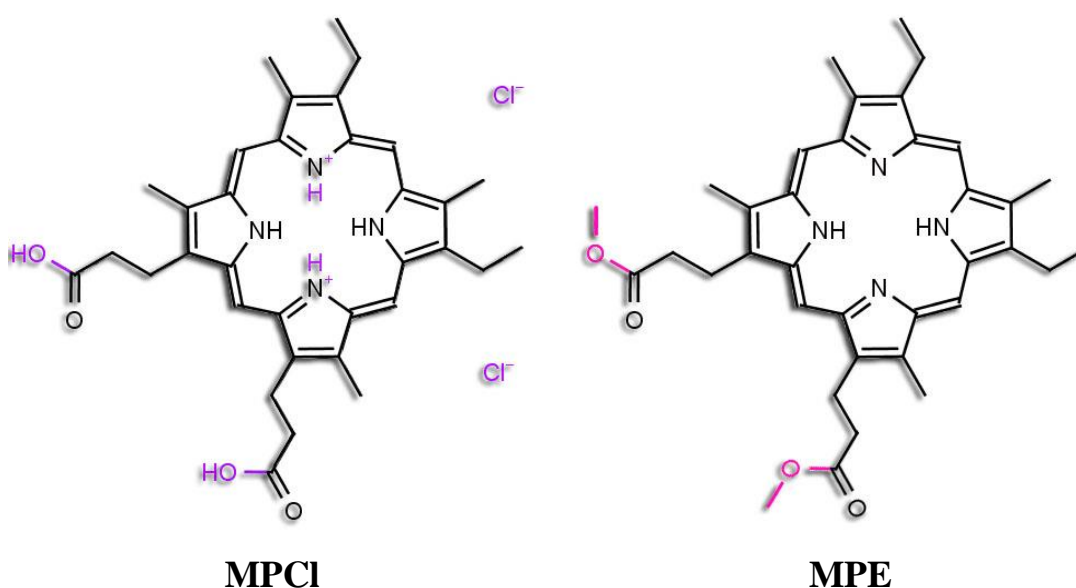
A további felhasználás előtt a kapott filmet legalább egy napig exszikkátorban tartottam a lipidfilm biztos kiszáradása érdekében. A lipidek ezt követő felhidralásánál 1 ml PBS-t (pH 7,4) alkalmaztam 10x100 µl-enként, két percenként adagolva. A hidralás a minták finom rázása közben vízfürdőben történt ügyelve arra, hogy a hőmérséklet végig az aktuális lipidek fő fázisátalakulási hőmérséklete (DOPC: -27 °C, DMPC: 24 °C, DPPC: 42 °C, DSPC: 56 °C, DPPC-DOPC /80:20/: -2 °C, DPPC-DOPC /70:30/: -7 °C) felett legyen. Az így kialakult liposzómák még heterogén méreteloszlásúak és nagy számban találhatóak köztük multilamelláris vezikulák (MLV). A kívánt mérettartományú kis unilamelláris vezikulák eléréséhez kétféle módszert használtam.

Az esetek többségében a ultrahang besugárzást alkalmaztam (MSE Soniprep 150) 20 kHz-en 2x10 percig (a két besugárzás közt 5 perc szünettel). Eközben a mintát kívülről vízfürdőn hűtöttem, megvédve a vezikulumokat a túl magas hőmérséklet károsító hatásától. Az esetlegesen aggregálódott vezikulumokat, valamint a szennyeződéseket amelyek a titán ultrahangfej kopásából adódtak 12000 1/perc fordulatszámmon (átszámolva ~11750 g) 10 perces centrifugálással (Heraeus Biofuge 13) távolítottam el. Az így előállított liposzómák sugara jól reprodukálhatóan 20 nm körüli értéknek adódott. Az ultrahang besugárzás előnye a gyors reprodukálható mintakészítés, azonban az így előállított vezikulumok a többszöri DLS mérés alapján nem bizonyultak kellően stabilnak.

Az extrudált liposzómák szobahőmérsékleten akár több nap múlva is stabilak maradtak. Az extrudálás során az MLV-t tartalmazó lipid törzsoldatot a fázisátalakulási hőmérséklet fölé emelve nanopórusú membránokon nyomjuk keresztül több lépcsőben. A szűrőmembrán pórusátmérőjét fokozatosan csökkentve elérhető a kívánt méretű unilamelláris liposzóma. Az első lépcsőben 400 nm-es pórusátmérőjű szűrőmembránt használtam, amelyen nyomtam keresztül a mintákat egymás után tizenháromszor. Ezt követte a 100 nm-es szűrőmembrán használata szintén tizenhárom átnyomással. Az utolsó fázisban 50 nm-es póruson harmincöttször átpréselt liposzómák adták a végső kívánt átmérőt, amely 25 nm körüli sugarat jelentett a DLS mérések alapján.

Az előállított sejtmembrán modellekben fényérzékenyítőként kétfajta mezoporfirint alkalmaztam, mezoporfirin IX dihidro-kloridot (MPCl) és mezoporfirin IX dimetil-észtert (MPE) (3. ábra) - ezekre a későbbiekben a megadott rövidítésekkel hivatkozom. E kétfajta mezoporfirin IX molekula csak kis szerkezeti

eltérést mutat, korábbi kutatások alapján már jól ismert fotoszenzitzáló hatásuk, emellett az energia-szelektív fluoreszcencia módszer szempontjából jobb jeladók, mint más porfirin molekulák. Ezek a tények kifejezetten alkalmassá teszik őket a kitűzött célok szempontjából. Az általam használt porfirin származékok a Frontier Scientific-től származnak és 1,00 mg/ml koncentrációjú törzsoldatban alkalmaztam őket dimetilformamidban (DMF - Sigma Aldrich) feloldva. A MPE molttömege 595 g, tehát a törzsoldat koncentrációja $1,7 \cdot 10^{-3}$ M, míg a MPCl molttömege 640 g és törzsoldata $1,6 \cdot 10^{-3}$ M volt. A koncentrációkat abszorpcióméréssel ellenőriztem (mindkét porfirin esetén a moláris extinkciós együttható: $1,55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 397 nm-nél).



3. ábra A felhasznált fényérzékenyítők szerkezete A két mezoporfirin molekula közötti különbségeket színekkel emeltem ki.

A minta összeállításában külön nehézséget jelentett, hogy a porfirin molekulák a liposzómákat tartalmazó oldat hidofil közegében (PBS) aggregálódásra hajlamosak, míg a liposzómákat, mint lipidvezikulumokat a szerves oldószerek így a DMF is oldja. Ezért szükséges volt a megfelelő koncentráció arány eltalálása. A végső minta összeállítás során a PBS:DMF térfogataránya a liposzóma épségének megőrzése illetve a porfirin molekulák aggregálódásának megelőzése céljából 9:1 arányú volt.

3.2. Alkalmazott módszerek

A liposzómakészítés után, továbbá az egyes munkafolyamatok között a liposzómamembránok épségét DLS segítségével ellenőriztem.

Az egyes fényérzékenyítőknek a vizsgált membránokhoz viszonyított affinitásának a megismerésére konvencionális (szobahőmérsékleti) fluoreszcencia spektrometriát használtam.

A fényérzékenyítő anyagok lipid kettősrétegben való elhelyezkedésének a vizsgálatához, vagyis a lehetséges lokalizációk meghatározásához a korábban már említett nagyfelbontású FLN spektrometriát alkalmaztam.

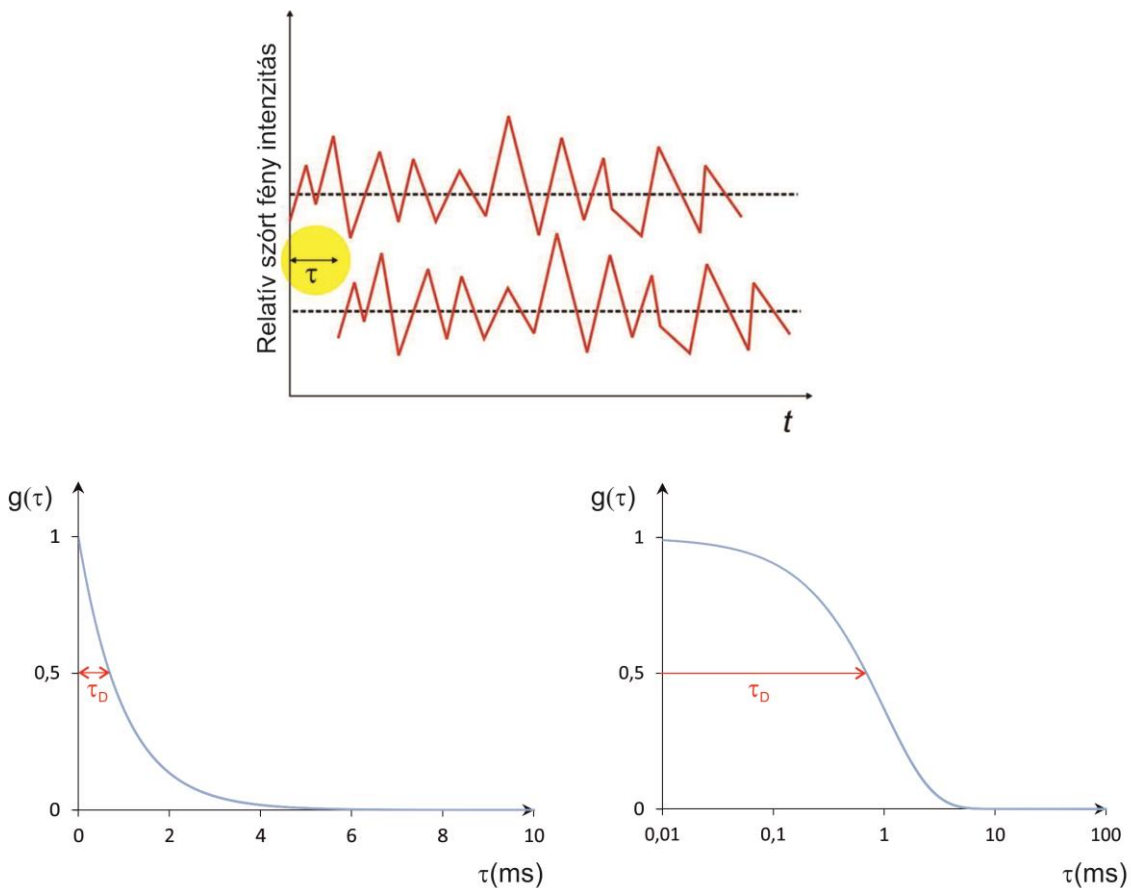
A fotodinamikus reakció során keletkező ROS mennyiségének a meghatározása abszorpciós spektrometriával történt. Ezáltal lehetőség nyílt az egyes lipid-fényérzékenyítő összeállítások esetében a reakció hatásosságának a kimutatására is.

Az előállított liposzómák ROS általi membránkárosításának a kimutatása fluoreszcencia korrelációs spektrometriával illetve dinamikus fényszórásméréssel történt.

3.2.1. A liposzómák épségének a vizsgálata (DLS)

A releváns eredmények érdekében fontos az elkészített liposzómák méreteloszlásának a pontos ismerete illetve ennek a fotokémiai reakciót követő változása. A liposzómák épségének, homogenitásának a vizsgálatára a munkafolyamat minden fázisát követően dinamikus fényszórásmérést (DLS) végeztem. A DLS mérés során a mintákat lézerefénnyel (Melles Griot 58-BLS-301, 457 nm) világítottam meg és a megvilágítás irányára merőlegesen vizsgáltam a szórt fény időbeli intenzitás-változását egy nagy időfelbontással bíró fotoelektron-sokszorozóval (Hamamatsu H7155). A liposzómakészítés után végzett DLS mérés nem csak referenciaként szolgált a későbbi reakciók során bekövetkező változások követésére, hanem általa megelőzhető volt az aggregálódott, vagy szétesett vezikulumok felhasználása.

A dinamikus fényszórásmérés alapja az, hogy a fény a kis részecskéken a tér minden irányába koherensen szóródik (Rayleigh-szóródás), amíg a részecskék mérettartománya nem haladja meg a fény hullámhosszának a nagyságát. A mintában a vízmolekulák hőmozgásából adódóan a vezikulumok Brown-mozgást végeznek, aminek következtében az időben változik a (μl nagyságrendű) megvilágított térfogatban jelenlévő részecskék száma. Ez a változás maga után vonja a szórt fény intenzitásának az időbeli változását is.



4. ábra Az autokorrelációs függvény előállítás Az ábra felső részén a görbe a szórt fény intenzitásának a változását mutatja az idő függvényében. Ezt a görbét önmagához képest τ idővel eltolva állítható elő az ábra bal alsó részén láthat autokorrelációs függvény. A $g(\tau)$ a korrelációs függvény, τ pedig az eltolás mértéke. Amennyiben $\tau=0$, akkor $g(\tau)$ értéke maximális. Minél nagyobb τ , annál kevésbé fog a függvény önmagára hasonlítani $g(\tau)$ értéke tart 0-hoz. A jobb alsó ábra az autokorrelációs függvények gyakran használt logaritmikus ábrázolását mutatja, ahol az exponenciális autokorrelációs függvény egy szigmoid görbéként látható. Az egyes autokorrelációs görbék félmagasságánál mért szélesség feleltethető meg az egyes részecsketípusok diffúziós idejeinek τ_D .

Ha hosszabb időskálán (1-2 s) vizsgáljuk a szórt fény átlagos intenzitását, akkor konstans értéket kapunk, mivel homogén mintát feltételezve egységnyi idő alatt átlagosan ugyanannyi szórócentrum fog ki- illetve belépni a vizsgált térfogatba.

Amennyiben mikroszekundumos mintavételezést használva rögzítjük a szórt fény intenzitását 1-2 másodpercen keresztül úgy egy átlagos érték körüli intenzitás fluktuáció lesz megfigyelhető (4. ábra felső része).

Konvencionálisan dinamikus fényszórásmérés során 90°-os szögben vizsgáljuk a szórt fény intenzitásának az időbeli változását $f(t)$. Ezt az időbeli fluktuációt az autokorrelációs függvénnyel $g(\tau)$ jellemezzük (4. ábra alsó része), amely azt mutatja meg, hogy az $f(t)$ függvény mennyire hasonlít önmagára ha τ idővel eltoljuk azt.

$$g(\tau) = \int_t f(t) \times f(t + \tau) d\tau \quad (1)$$

Az (1) egyenlet szerint az időben folytonos jeleknél a korreláció akkor lesz maximális, ha az eltolás mértéke zérus, azaz $\tau = 0$. Amennyiben τ idő elég hosszú (például 1 s), a korreláció 0-hoz tart, ami azt jelenti, hogy már nincs egymásnak való megfelelés a mintavétel kezdetén és τ - val később mért szórt fény intenzitások között. A csökkenés mértéke a vizsgált térfogatban jelen lévő részecskék mozgásának sebességétől illetve a diffúziós állandójuktól függ. Amennyiben a vizsgált minta csak egy jól meghatározott adott méretű részecskesokaságot tartalmaz, vagyis monodiszperz rendszereknél, a $g(\tau)$ egy egyszerű exponenciális függvénnyel illeszthető a (2) egyenlet szerint.

$$g(\tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad (2)$$

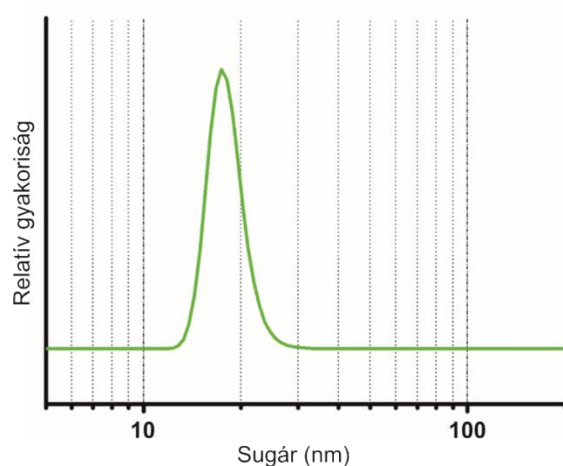
Ahol Γ egyenesen arányos a translációs diffúziós együtthatóval (D). Gömb alakú részecskéket feltételezvé (az én méréseimben használt liposzómákra ez teljesen igaz) az Einstein-Stokes összefüggés alapján adhatjuk meg a diffúziós együttható ismeretében a hidrodinamikai sugarat - (3) egyenlet.

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

k a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet (K), η az oldat viszkozitása. Különböző méretű polidiszperz rendszereknél $g(\tau)$ függvény több exponenciális görbe összegeként fogható fel - (4) egyenlet.

$$g(\tau) = \sum_i e^{-\Gamma_i \tau} \quad (4)$$

Az exponenciális függvények összege alapján nem egyértelmű meghatározni a diffúziós állandókat ugyanis több lehetséges méreteloszlás eredményezheti ugyanazt az autokorrelációs függvényt. A DLS mérések során kapott autokorrelációs függvényeket a maximum entrópia módszer (MEM) alapján értékeltem ki. [24, 25] Az elv lényege az, hogy a sok lehetséges eloszlás közül az a legvalószínűbb, amelyhez a legnagyobb entrópia tartozik. Matematikailag elmondható hogy az egyenletes eloszlás a legrendezetlenebb, vagyis a legnagyobb entrópiájú. A módszer következőképp a vizsgált részecskéknek egy olyan lehetséges méreteloszlását számolja ki, ahol a legkisebb négyzetek elve a maximális entrópia mellett teljesül. Az általam vizsgált DPPC liposzómák MEM segítségével számolt méreteloszlását mutatja az 5. ábra. Ez a méreteloszlás a korábban leírt ultrahangos besugárzással előállított liposzóma preparálási módszerrel jól reprodukálhatónak adódott az összes használt liposzómatípus esetében.



5. ábra Liposzómák méreteloszlása Az ábra az általam használt DPPC liposzómák tipikus méreteloszlását mutatja be. Az eloszlás már a részecskék méretével korrigált eredményt mutatja.

Mivel a szórt fény intenzitása arányos a szórócentrumok súlyával, ezért az eredményül kapott eloszlást a részecskék méretével (d) minden esetben korrigálni kell (osztani d^2 -tel). Ezt a már korrigált eloszlást használtam az összes mérésnél, amikor a liposzómák méretének gyakorisági eloszlását vizsgáltam, mint az 5. ábrán is.

3.2.2. A porfirinkötődés mérése (Fluoreszcencia spektrometria)

A két vizsgált mezoporfirin molekula membránok iránt mutatott kötődési affinitásának meghatározására konvencionális fluoreszcencia spektroszkópiát használtam. Konvencionális körülményeken a nem kriogenikus hőmérsékleteket (pl. szobahőmérsékletet) és hagyományos fényforrás-monokromátor rendszert értünk. A méréseket Jobin Yvon Florolog-3 emissziós spektrofotométerrel végeztem. A gerjesztő fényforrás egy xenon lámpa volt, az eszköz gerjesztő és emissziós oldalán egy-egy monokromátorral biztosította a megfelelő gerjesztési hullámhossz kiválasztását és az emissziós spektrum felvételét. A detektor egy fotonyszámláló üzemmódú fotoelektronsokszorozó volt (Hamamatsu R928P).

A porfirin molekulák kötődési affinitásának megismerése céljából egy titrációs fluoreszcencia mérést végeztem el. Meghatározott koncentrációban (150 nM) mezoporfirin molekulákat – MPE vagy MPCl – tartalmazó oldatokhoz egyre növekvő mennyiségben adtam kis unilamelláris vezikulumokat tartalmazó oldatot. A titrációs sorozathoz olyan lipidkoncentrációkat választottam, hogy a membránok minden mintában telítődjenek a porfirinmolekulákkal, és lehetőleg a legnagyobb lipidkoncentráció (~400 μ M) mellett kötődjön az összes alkalmazott mezoporfirin molekula a membránokhoz. A mérést elvégeztem a három különböző telített zsírsavláncot tartalmazó liposzóma mintákkal - DMPC, DPPC, DSPC. Mivel a membránokban elhelyezkedő porfirin molekulák más molekuláris környezetben találhatóak, mint az oldatban lévők, ezáltal az emissziós spektrumuk is megváltozik. Állandó gerjesztés mellett az emissziós spektrum változásait tanulmányozva egyértelműen következtetni lehet a mezoporfirin molekulák membránokba történő belépésére. A mintákat a mérést megelőzően szobahőmérsékleten tartottam. A gerjesztés a porfirin molekulák korábban már bemutatott (1. ábra) abszorpciós maximumánál, 397 nm-nél (Soret-sáv), az emissziós spektrum felvétele 600-640 nm közötti tartományban 0,5 nm-es felbontással történt.

3.2.3. A fényérzékenyítők lokalizációjának vizsgálata (FLN)

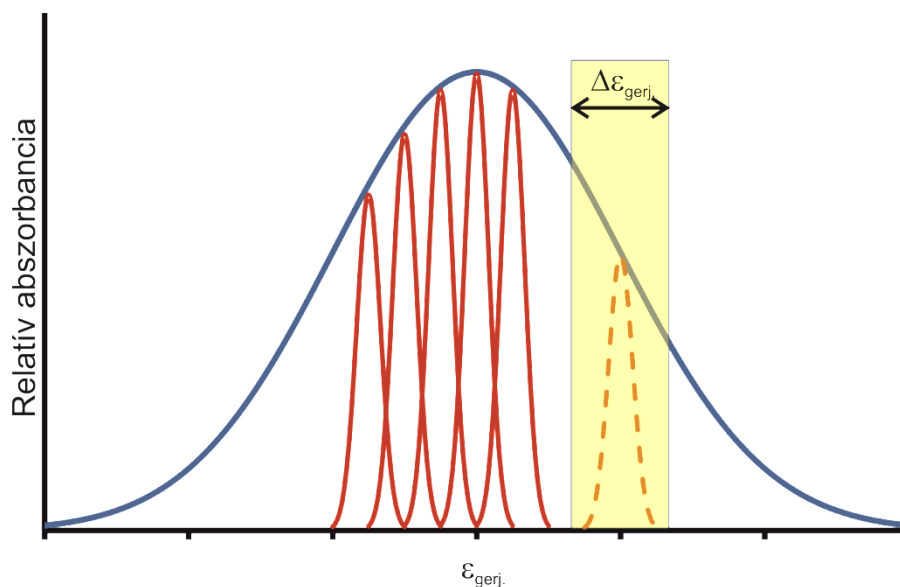
A két mezoporfirin molekula membránokon belüli lehetséges elhelyezkedésének, lokalizációjának a meghatározásához a konvencionális spektrofotometria nem szolgáltat elég információt. Ezért erre a célra a nagyfelbontású energia-szelektív fluoreszcencia line narrowing, röviden FLN, spektroszkópiát alkalmaztam. Mivel az FLN nem egy széles körben elterjedt vizsgálómódszer, ezért az alábbiakban röviden ismertetem a mérés elvét.

A hagyományos optikai spektroszkópiában bevett gyakorlat szerint a fotonenergiákat elsősorban a hullámhosszal (nm-ben kifejezve) adják meg. Az energia-szelektív spektroszkópia témakörében célravezetőbb egy tényleges fotonenergia skála használata. Így a hullámhossz helyett az FLN spektroszkópia taglalása és a későbbi FLN eredmények bemutatása során én is a hullámszámot használom – ami a cm-ben kifejezett vákuumbeli hullámhossz reciprokaként származtatható (cm^{-1}). (1 nm-nek körülbelül 25 cm^{-1} felel meg a látható tartomány közepén.) A hullámszám alkalmazásának egyik előnye, hogy egy az energiával arányos mennyiséget kapunk, amely az oldat törésmutatójának pontos ismerete nélkül is jól alkalmazható mennyiség.

Konvencionális spektroszkópia alkalmazása során találkozhatunk a vonalkiszélesedés fogalmával, ami a molekulák energia-átmeneteihez tartozó spektrumvonalak kiszélesedését jelenti. Ez az említett vonalkiszélesedés két okból fakad. Adott hőmérsékleten ($T \neq 0 \text{ K}$) a molekulák termikus gerjesztésének következtében figyelhetjük meg a homogén vonalkiszélesedést, amelynek az értéke megközelítőleg megegyezik a termikus energiával ($k \cdot T$). Azért hívjuk homogén kiszélesedésnek, mivel az összes energiaátmenetet egyaránt érinti. A csökkentésének leghatásosabb módja a hőmérséklet csökkentése, például a cseppfolyós hélium hőmérsékletén (4,2K) a homogén vonalkiszélesedés már $0,1 \text{ cm}^{-1}$ alatti érték.

A spektrumvonalak kiszélesedésének másik oka a vizsgált molekulák különböző molekuláris környezetéből következik, vagyis a molekulákat tartalmazó mátrix – esetünkben a lipid kettősréteg – inhomogenitásából. A különböző környezet hatással lesz molekuláról molekulára az alap és gerjesztett állapotok energianívóira. Ezáltal a sok molekulából álló minta energiaszintjei kiszélesednek, az újabb vibrációs átmenetek megjelenése miatt. Ezt nevezzük inhomogén vonalkiszélesedésnek, amelynek értéke még a cseppfolyós hélium hőmérsékletén is akár $\sim 300 \text{ cm}^{-1}$ lehet. A homogén illetve

az inhomogén vonalkiszéledés hozzájárulását a teljes vonalkiszéledéshez a 6. ábra szemlélteti. Az inhomogén abszorpciós sáv a homogén sávok szuperpozíciója révén jön létre. A homogén sávokat Lorentz-görbékkel illeszthetjük ezek összegeként kapott inhomogén eloszlást, pedig Voigt-eloszlásként írhatjuk le. [26] A gyakorlatban sokszor ezeket a sávokat egyszerűen Gauss-görbékkel szokták jellemezni.

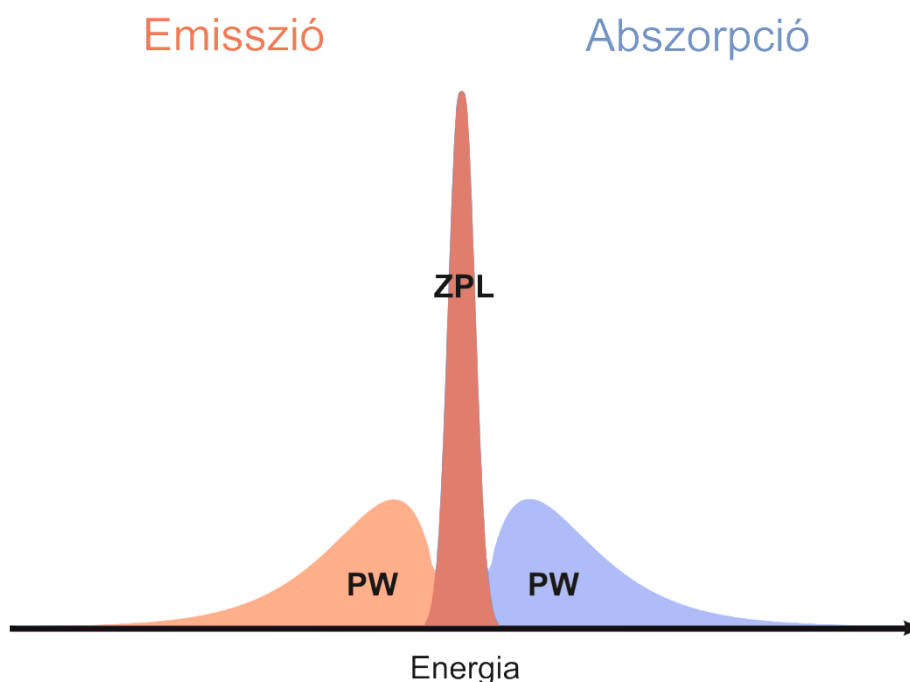


6. ábra A vonalkiszéledés szemléltetése Az ábrán kék színnel van feltüntetve egy tipikus inhomogénen kiszéledett vonal. Ezen belül pedig a piros görbék jelentik az egyes rezonáns gerjesztésekhez tartozó homogénen kiszéledett vonalakat. Az ábra egyszerűbb áttekinthetősége kedvéért csak pár átmenetet jelöltem. A szaggatott görbe az aktuálisan vizsgált rezonáns gerjesztést jelöli. $\Delta\varepsilon_{gerj}$ a gerjesztési sáv szélességet jelenti ε_{gerj} pedig a gerjesztési energiát.

A korábban bemutatott konvencionális spektroszkópia spektrális felbontása 100 cm^{-1} körüli értéket érhet el. A sokatomos szerves molekulák emissziós és gerjesztési spektrumai ezen körülményeken a vonalkiszéledés következtében 100 és 1000 cm^{-1} közötti sávokból állnak, így a molekuláris környezetükre lényegében következtetni nem lehet.

Az FLN technika alkalmazásával lehetőségünk nyílik a homogén vonalkiszéledés csökkentésére, továbbá a molekulák inhomogenitási profiljának jellemzésére. Első lépésként a mintát igen alacsony hőmérsékletre (esetemben $T < 10\text{ K}$) hűtjük le. Ez a kriogenikus hőmérséklet azt vonja maga után, hogy a molekuláink szerkezeti mozgásai befagyottnak tekinthetők, a spektrumvonalak homogén kiszéledése lecsökken, valamint feltételezhetően minden molekula gerjesztetlen, mind az elektron,

mind a vibrációs átmenetek szempontjából, vagyis (0,0) állapotban van. Ebben az állapotban történik a gerjesztés – általában lézer fényforrás által – egy szűk sávzélességű $\Delta\varepsilon_{gerj}$ tartományban. Ahogy az a 6. ábrán is jól látható $\Delta\varepsilon_{gerj}$ jelentősen keskenyebb, mint az inhomogén vonalkiszélesedés mértéke, ezáltal az inhomogén kiszélesedett sávnak csak egy keskeny tartományát képes gerjeszteni ($S_0 \rightarrow S_1$).



7. ábra Zero-phonon line és phonon wing Sematikus ábrázolása a kriogenikus hőmérsékleten vizsgált molekula abszorpciós illetve emissziós vonalainak. A megfigyelhető keskeny vonal a zero-phonon line (ZPL), ami a tiszta rezonáns gerjesztésből származik, ahol nincs fonon csatolás. A szélesebb elterülő sáv a phonon-wing (PW), ami az elektron-fonon csatolás következtében jön létre. Abszorpció esetében a PW a nagyobb energiák irányában található, míg emissziót vizsgálva a gyakorlatilag mozdulatlan ZPL-től a kisebb energiák irányában helyezkedik el.

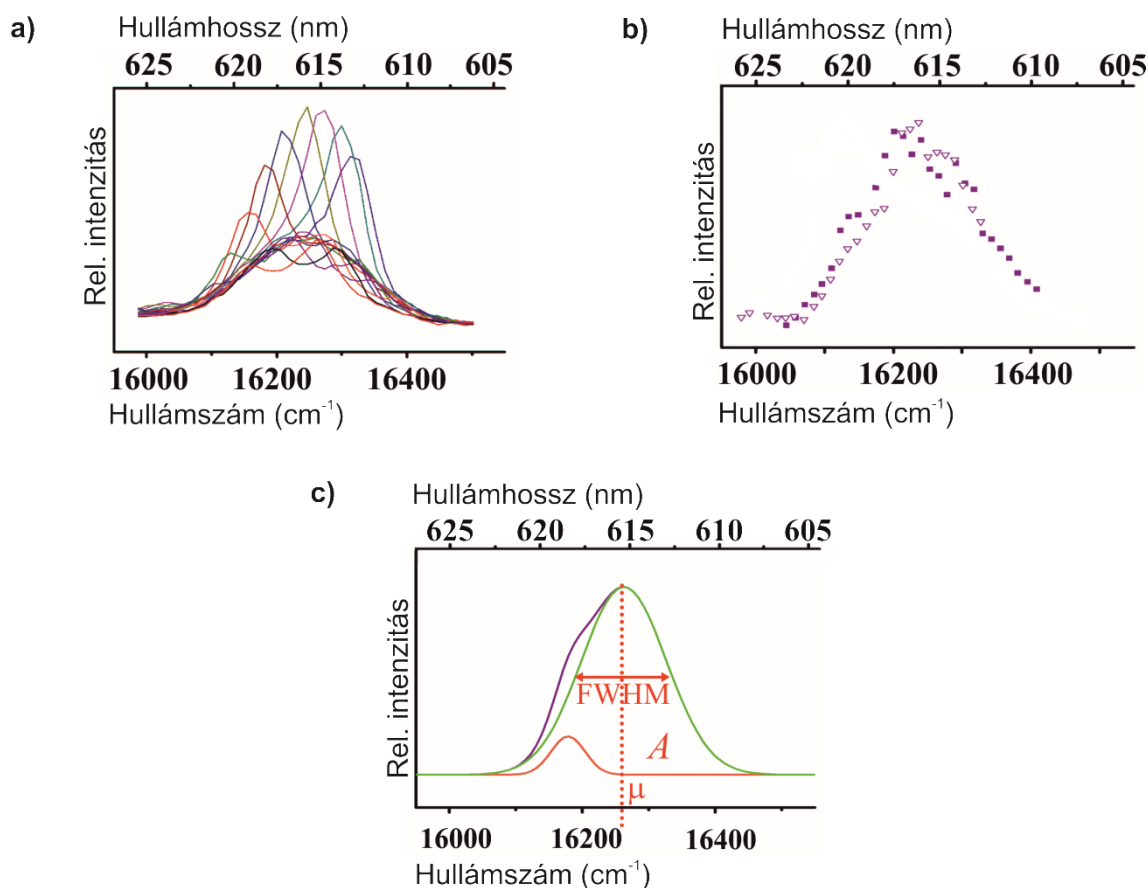
Amennyiben egyedülálló molekulákat gerjesztünk kriogenikus hőmérsékleten, akkor az abszorpciós spektrum két fő részből áll (7. ábra). Egy keskeny vonalból, amely az úgynevezett zero-phonon line (ZPL – hivatalos magyar megfelelője nem ismert, de én fonon mentes vonalnak hívnám), egy a környezet fonon csatolásától mentes tiszta energiaátmenetet jelent. Ettől a nagyobb energiák irányában található egy sokkal szélesebb sáv, ami az úgynevezett phonon-wing (PW – hivatalos magyar megnevezés híján én fonon szárnyának nevezném), ez a fonon-elektron csatolás következménye. A ZPL szélessége a vizsgált kromofór életidejétől függ. A ZPL és a PW egymáshoz képesti aránya a hőmérséklet függvénye, mértékét pedig a Franck-Condon törvény adja

meg. A 7. ábra a kettő arányát mutatja 10 K körüli hőmérsékleten. Minél magasabb a hőmérséklet, annál valószínűtlenebb lesz a phonon mentes átmenet, vagyis a ZPL egyre csökkenni fog. Szobahőmérsékleten már csak a széles PW látható. A gerjesztést követő fotonemisszió nál ennek megfelelően szintén megjelenik a ZPL és a PW annyi különbséggel, hogy a PW már a ZPL-től a kisebb energiák irányában helyezkedik el, ahogy ez a 7. ábrán is látható.

Mindezek alapján a gerjesztés két fajtáját különböztethetjük meg: rezonáns gerjesztésről beszélünk akkor, ha a keskeny ZPL-ben gerjesztünk, rezonancián kívüli a gerjesztés abban az esetben ha, a széles PW-t találjuk el. Az FLN spektrumokban látható széles alapvonalyszerű sávokból kinyúló keskeny vonalak a rezonáns gerjesztéseknek felelnek meg, míg a rezonancián kívüli csaknem teljes molekulapopulációt érintő gerjesztés okozza a széles sávokat. Kis sáv szélességű megvilágítással rezonáns módon csak azon molekulák gerjeszthetők, amelyek alapállapota és a gerjesztett állapot adott vibrációs szintje közti energiakülönbséggel megegyező a fényforrás fotonjainak az energiája (ϵ_{gerj}). A 6. ábra pirossal jelzett keskeny abszorpciós görbéi a rezonáns gerjesztéseket jelölik. Az FLN spektrumok rezonancián kívüli gerjesztésére jellemzően – a konvencionális fluoreszcencia spektroszkópiához hasonlóan – a sávok helye független a gerjesztési energiától, mivel mindkét esetben gyakorlatilag az összes molekulát gerjesztjük. A rezonáns vonalak helyzete ezzel ellentétben a gerjesztési energia változtatásával eltolódik, mivel mindig más-más alpopulációk gerjesztődnek (8. ábra a) része).

Az FLN spektrumok felvételét követően, ha a különböző gerjesztési energiákon felvett spektrumok változatlan részeit és a zaj adta háttérét levonjuk, akkor már a csak rezonáns gerjesztést magába foglaló vonalokhoz jutunk. Az egyes energiasávokon belüli molekula alpopulációkat jellemző energiaszintek gyakorisági eloszlásai nemcsak az energiakülönbségek eloszlását adják meg, hanem az inhomogén környezetnek a molekulahalmazra kifejtett hatását is jellemzik (8. ábra b) része). Ez a függvény az ún. *inhomogén eloszlásfüggvény* (IDF), amelyet a spektrumvonalak változásának követésével állíthatunk elő. Esetünkben egy ilyen függvény azt adja meg, hogy a porfirin molekulák mekkora hányada gerjeszthető az adott frekvenciájú fényvel. Mivel a gerjeszthetőséget a porfirin molekula és annak molekuláris környezete határozza meg, ezért az így kapott eloszlásfüggvénnyel az egyes eltérő környezetű asszociációk

jellemezhetőek. Feltételezve, hogy egy lehetséges környezet egy adott kötőhelyhez tartozik, így a molekulák membránokon belüli elhelyezkedését is leírhatjuk. [23]



8. ábra a) A spektrumsorozat Az ábra a DPPC membránjában elhelyezkedő MPCl molekulák FLN spektrumát mutatja változó gerjesztési energia mellett. Megfigyelhető a közös háttér, amely az egyes molekulapopulációk összeadódó PW-jének a következménye. **b) Inhomogén eloszlásfüggvény előállítás** A háttérrel levonva és a csúcsok változását végigkövetve a spektrumsorozaton keresztül az inhomogén eloszlásfüggvényhez (IDF) jutunk. Az ábrán az MPCl molekulák FLN mérését követően (DPPC liposzómában) meghatározott eloszlásfüggvénye látható. **c) Inhomogén eloszlásfüggvények jellemzése** Az eloszlásfüggvényeket a rájuk illesztett Gauss-görbék paraméterivel jellemezzük. μ az eloszlás várható értékét adja meg, az egyes molekulapopulációkat ez alapján különböztetjük meg egymástól. FWHM segítségével adjuk meg az egyes populációk heterogenitását, míg a görbék integrálja (A) az egyes populációkhoz tartozó molekulák számával arányos.

Az egyes populációkat az IDF-re illesztett Gauss-eloszlások paramétereivel jellemezzük (8. ábra c) része). Az eloszlás várható értéke, vagyis μ alapján tudjuk az egyes molekulapopulációkat egymástól elkülöníteni. A görbék félértékszélessége (FWHM) a populációk heterogenitását jellemzi. Az eloszlásokhoz tartozó görbe alatti terület (A) a populációk nagyságát, vagyis az oda tartozó molekulák számát írja le.

Az FLN méréshez a két mezoporfirin törzsoldatból (MPE, MPCl) adtam az egykomponensű telített lipideket tartalmazó liposzómákhoz (DMPC, DPPC, DSPC) külön-külön, így összesen hat mintán végeztem vizsgálataimat. Alacsony hőmérsékletű méréseknél bevett szokás a mintakészítés során glicerint, mint krioprotektáns alkalmazása. A glicerint használatának másik oka az, hogy általa kriogenikus hőmérsékleten is átlátszóak maradnak a minták (ami a spektroszkópia mérések egyik feltétele). A végső mintákban használt 50 % (v/v) glicerint liposzómákra gyakorolt hatásának ellenőrzésére is DLS-t használtam. Elmondható, hogy a glicerint nem befolyásolta a méreteloszlását a mintáknak, így feltételezhetően a membránok integritását sem. A végső minták körülbelül 70 μM mezoporfirint és 7 mM foszfolipidet tartalmaztak. A mintakészítést közvetlenül követte az alacsony hőmérsékletű mérés. Az esetleges szabad porfirin molekulák nem okoztak zavart a spektrumsorozatok felvételében, mivel a membránokhoz kötött porfirin molekulák spektrálisan jól elkülöníthetőek.

Az FLN mérésekhez használt mérési összeállítást annyiban változtattam, hogy nem az FLN technikánál megszokott lézer általi (kis sávzélességű) gerjesztést alkalmaztam, hanem a kötődési affinitás mérésénél használt eszközt (a már említett Jobin Yvon Florolog-3) bővítettem egy kriosztáttal. Ezáltal a minták gerjesztésére egy xenon lámpa szolgált, amivel a spektrumsorozatok felvételéhez szükséges gerjesztési hullámhossztartományt könnyebben be tudtam állítani. Az elért kisebb spektrális felbontás (hagyományos FLN esetében $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$, míg az általam használt eszköznél $\sim 15 \text{ cm}^{-1}$) az inhomogén eloszlásfüggvények készítése során nem jelentet problémát. Mivel korábban általam leírtak szerint alacsony hőmérsékletű méréseknél a kellő felbontás elérése érdekében hangolható festéklézereket használnak gerjesztésként, így az általam használt mérési összeállítást a részletezett okok miatt csak egy „kvázi-FLN” technikának tekinthetjük. Mivel a vizsgált minták esetében az alkalmazott mérési összeállítás is elég jó felbontásúnak bizonyult a konvencionális emissziós spektroszkópiához képest így a továbbiakban is FLN-ként hivatkozom rá. Az emissziós spektrumvonalak 600-640 nm közötti tartományban kerültek felvételre 0,5 nm-es felbontással, míg a gerjesztés 555-585 nm között történt (a porfirin molekulák Q-sávjában 1. ábra) 1 nm-es lépésközzel. A mérés kivitelezéséhez alkalmazott 10K-es hőmérsékletet egy hőmérséklet-kontrollált zárt-ciklusú hélium

kriosztát biztosította (Cryophysics). A kriosztátban gerjesztett minta által emittált fényt egy fotonszámláló üzemmódú fotoelektron-sokszorozó rögzítette (Hamamatsu R928P).

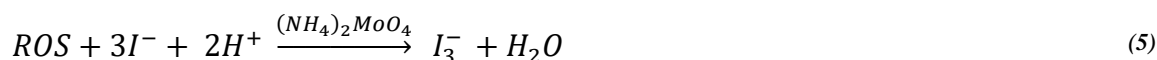
A spektrumfelvételt követően az IDF illesztése az egyes spektrumsorozatokban Gauss-görbékkel történt. A különböző minták illesztése során a görbék szélességét konstans értéken tartottam, míg az illesztéshez használt két változó paraméter a csúcsok helyéhez tartozó hullámszám és a görbe alatti terület volt. Az illesztésekhez az Originlab Origin 8.0 szoftvert használtam. A kapott illesztési paraméterek alapján történt az inhomogén eloszlásfüggvények (IDF) jellemzése.

3.2.4. A keletkező ROS kimutatása (Abszorpciós spektrometria)

A liposzómamembránokban elhelyezkedő mezoporfirin molekulák fotodinamikus aktivációja közben létrejövő ROS kimutatását abszorpciós spektrofotométer segítségével végeztem. A ROS magas reaktivitásuk és nagy instabilitásuk miatt gyorsan reakcióba lépnek, oxidálnak más molekulákat, ennek révén új végtermékek képződnek, amelyek a ROS kimutatás alapját képezik. Mivel ezen termékek közvetlen abszorpciós mérése nehéz, ezért egy kapcsolt reakció útján, indirekt módon történt a ROS meghatározás. A szakirodalmat áttekintve két módszer tűnt az általam használt rendszerben keletkező reaktív termékek meghatározására a legalkalmasabbnak.

Az egyik módszer során egy a membránokhoz kapcsolt – a lipid kettősréteghez „horgonyzott” a vizes fázisba nyúló – molekula, a dihidrorodamin-B-oktadecilészter által lehetőség nyílik a membránokban keletkező reaktív oxigén származékok meghatározására a membrán közvetlen közelében. [27] Az említett molekula egy 18 szénatomból álló zsírsavlánccal rendelkezik, amely benyúlik a liposzómák membránjába. A membránon kívüli rész ROS hatására oxidálódik, 550 nm-nél egy jól követhető abszorpciós maximum növekedésének kíséretében. A módszer noha alkalmas lehet a membránokban keletkező reaktív oxigén származékok meghatározására, az általam végzett mérési összeállításban nem volt alkalmazható, mivel a méréseim során a dihidrorodamin-B-oktadecilészter fényérzékenységet mutatott és a reakció oxidatív ágensek nélkül is lezajlott.

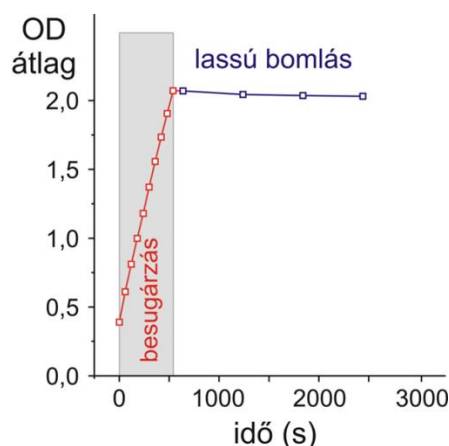
A másik módszer szerint egy az oldatban jelen lévő – nem a membránokhoz kötött – molekula oxidációja során keletkező abszorbancia változásból következtethetünk a keletkező ROS-ra. [28] Kálium-jodidból reaktív oxigén hatására trijodid (I_3^-) keletkezik ammónium-molibdenát kofaktor jelenlétében az (5) reakcióegyenlet szerint.



A reakcióban a trijodid mennyisége egyenesen arányos a fotodinamikus reakció során keletkező ROS, főleg szuperoxid (1O_2), mennyiségével. A trijodid két fő abszorpciós csúccsal rendelkezik (280 nm, 355 nm körül). Ezek közül a 355 nm körüli csúcs a liposzómákat tartalmazó mintában tapasztalható kisebb mértékű fényszórás ellenére is jól mérhető. Mivel ez a reakció a próbaméréseim során is valóban csak a gerjesztett fényérzékenyítők jelenlétében játszódott le, ezért a ROS meghatározáshoz ezt a módszert választottam.

Az abszorpciós spektrumok felvételét Cary 4E UV-VIS (Varian) abszorpciós spektrofotométerrel végeztem. Először minden esetben felvettem egy teljes spektrumot 250-450 nm között, majd a további mérésekhez a fölösleges fotoaktivációt elkerülendő csak 350-360 nm között rögzítettem az abszorpciós maximum környezetét. A minták besugárzása egy saját készítésű megvilágító összeállítással történt, amely lehetővé tette az abszorpciós spektrofotométerbe helyezett oldatok közvetlen megvilágítását azok kivétele nélkül. Ezzel a megvilágító rendszerrel tovább tudtam csökkenteni a nem kontrollált megvilágításból fakadó fotoaktivációt. A porfirin molekulák besugárzására egy Fibrolux halogén fényforrással rendelkező lámpa szolgált. A fényt optikai kábel segítségével juttattam el a mintákhoz. A megvilágítás kb. 500 klux volt.

A besugárzás nélküli teljes spektrum felvételét követően többszöri egy perces megvilágítást alkalmaztam. Eközben a már említett 350-360 nm-es, tartományban követtem az abszorpciós spektrum változását, majd erre a tartományra átlagot számoltam. Az egy perces megvilágításokat addig folytattam, amíg a spektrum változás már nem volt észlelhető illetve a kb. 2-es abszorbancia eléréséig 9. ábra.



9. ábra A ROS kimutatása A 350-360nm közötti tartományra számolt átlagolt optikai denzitás változása látható az idő függvényében. A szürkével jelzett szakasza a görbének az egy perces besugárzások hatására a fotoaktiváció során keletkező trijodidot mutatja. Ezt a besugárzás után a molekulák lassú bomlása követi (kékkel jelölve).

Az ábrán jól látható a besugárzások hatására bekövetkező szigorú monoton abszorbancianövekedés. A kiértékelés során erre a szakaszra (a 9. ábrán szürkével jelölve) illesztett egyenes meredekségével jellemeztem a keletkezett ROS mennyiségét. Mivel a trijodid időben bomlást mutat, ezért a mérések elvégzése előtt meg kellett bizonyosodnom arról, milyen mértékben befolyásolja ez a tény a kapott eredményeket. Az első besugárzás-sorozatot követően az alkalmazott mintát fél órán keresztül sötétben hagyva ellenőriztem az optikai denzitás változását (az 9. ábra kékkel jelölt része). Egyértelműen látszik, hogy ez alatt az idő alatt az abszorbancia nem mutatott számottevő változást. Tehát a módszer a trijodid bomlása ellenére is alkalmas a fotoaktiváció során keletkező oxidatív ágensek kimutatására.

A besugárzás hatására keletkezett ROS kimutatását először 6 mintán végeztem el: két mezoporfirin molekulát (MPE, MPCl) a különböző telített lipidekből (DMPC, DPPC, DSPC) előállított liposzómákat tartalmazó mintákhoz adva. Ezt a mérésorozatot a későbbiekben kiegészítettem telítetlen lipideket is tartalmazó liposzómák felhasználásával (DOPC:DPPC – 20:80). A porfirin molekulákat illetve a liposzómákat a konvencionális fluoreszcencia spektrometria mérésnek megfelelő telítési koncentrációban alkalmaztam. Az elkészített minták 0,12 M kálium-jodidot illetve 10 μ M ammónium-molibdenátot tartalmaztak a bevált módszer szerint [28].

3.2.5. A ROS általi membránkárosodás kimutatása (FCS, DLS)

A fotokémiai reakció során képződő ROS liposzómamembrán destruáló hatásának a kimutatására, vagyis a vezikulumok szétesésének a tanulmányozására magától értetődő módszernek adódik a korábban leírt DLS.

Először kontrollvizsgálatként a telítési porfirinkoncentrációkat alkalmazva a liposzómáknak a fotoindukált oxidatív ágensek hatására bekövetkező méreteloszlás változását tanulmányoztam. A fényérzékenyítőként használt molekulákat a korábban már említett Fibrolux halogén lámpával világítottam meg. Ezt követően előállítottam olyan liposzómákat, amelyek 80/20 m/m % arányban tartalmaztak DPPC és DOPC molekulákat. Az összetett vezikulumok telítetlen zsírsavlánccokat tartalmazó DOPC molekulái elvileg támadási pontot jelentenek a keletkező oxidatív származékok számára. Ezt a hipotézist hidrogén-peroxid közvetlenül a komplex liposzómákhoz történő adásával szándékoztam igazolni. Mivel a kezdeti mérések kivitelezése során az általam használt DLS módszer nem bizonyult kellő érzékenységűnek a fotoindukált membránkárosodás kimutatására, így a mérési metodikán a továbbiakban változtatnom kellett.

Tovább növeltem az összetett liposzómákban telítetlen DOPC mennyiségét (30 m/m %-ra), illetve a liposzómák épségének a vizsgálatához egy még érzékenyebb módszert, a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiát (FCS), választottam. Az alábbiakban röviden ismertetném az FCS elvi működését és technikai alapjait.

Az FCS lehetőséget nyújt gyakorlatilag bármely fluoreszkáló részecske diffúziós együtthatójának a meghatározására a DLS-hez hasonló módon. Az FCS mérés során konfokális mikroszkóp segítségével a gerjesztett minta egy kis térfogatában vizsgáljuk a fluoreszcencia intenzitás változását. Az ingadozás – a DLS-hez hasonlóan itt is – abból fakad, hogy a molekulák ki-be lépnek a vizsgált térfogatba. Ezért szükséges a vizsgált térfogat nagyságának a csökkentése is. A gyakorlatban fl-es vizsgált térfogat mellett még nM-os koncentrációt alkalmazva elérhető a kellő relatív változás egy részecske mozgásának a meghatározásához. Ez a kis térfogat (fl – vagyis $1 \mu\text{m}^3$) teszi szükségessé a konfokális mikroszkóp használatát. A DLS kiértékeléshez hasonlóan szintén az időbeli változásból lehet meghatározni a vizsgált részecskék sebességét, vagyis a korábban már leírt autokorrelációs függvényt írhatjuk fel (1).

A $g(\tau)$ értéke függ a diffúziós együtthatótól D , a vizsgált részecskék számától N és a konfokális mikroszkóp által tanulmányozható fókusz úgynevezett alakfaktorától γ . Az alakfaktor a (6) képlet szerint határozható meg.

$$\gamma = \frac{z_0}{w_{xy}} \quad (6)$$

Ahol w_{xy} a forgási ellipszoid alakú fókusz xy -síkjában mérhető sugár, z_0 a konfokális fókusz függőleges z -tengelye szerint mérhető tengely hossza. A két paraméter segítségével adható meg a tipikus vizsgált ellipszoid térfogat. w_{xy} alapján megadható a részecskék átlagos diffúziós ideje τ_D (4. ábra) a konfokális térfogat x - y síkjában.

$$\tau_D = \frac{w_{xy}^2}{4D} \quad (7)$$

Az általam alkalmazott FCS mérés kiértékelésének az elve annyiban módosult, hogy a porfirin molekulák olyan koncentrációban voltak jelen, hogy azok mind liposzómákban helyezkedtek el, így porfirin-liposzóma rendszer közös mozgása került megfigyelésre. A mozgás gyorsasága, pontosabban a mérhető diffúziós állandó a liposzómák méretétől függ vagyis a közös rendszer együttes diffúziós állandója megegyezik a liposzómákéval. Ezáltal elvileg érzékenyebben lehetne a membránkárosodást megfigyelni, mivel a membránok szétesése következtében a porfirin molekulák egy része a vizes oldatba kijuthat. Ezek a szabad molekulák már teljesen más diffúziós állandóval fognak rendelkezni. Vagyis az FCS módszer lehetőséget adna a fotoindukált membránkárosodás következtében a vezikulumokból kiszabaduló porfirin molekulák külön meghatározására továbbá a liposzómák méreteloszlásában bekövetkező változásokat is láthatóvá tudná tenni.

A gyakorlatban azonban az FCS méréshez rendelkezésre álló fényforrásokkal nem tudtam az általam vizsgált molekulákat (MPC1) a megfelelő hullámhosszokon gerjeszteni ahhoz, hogy a fluoreszcencia jel kellőképpen kiértékelhető legyen. Ezért az FCS kivitelezéséhez egy speciálisan a membránokhoz kötődő festéket – dioktadeciloxakarbocianin-perklorát (DiO) – alkalmaztam. Ez a molekula nem mutat

számottevő fluoreszcenciát vizes közegben szabadon, de a membránokhoz kötődve fotostabil és 489 nm-es gerjesztési és 505 nm-es emissziós maximummal rendelkezik. A hullámhosszak alapján a porfirin fotoaktivációját sem zavarja, ezért is alkalmasnak bizonyult a liposzómák jelölésére.

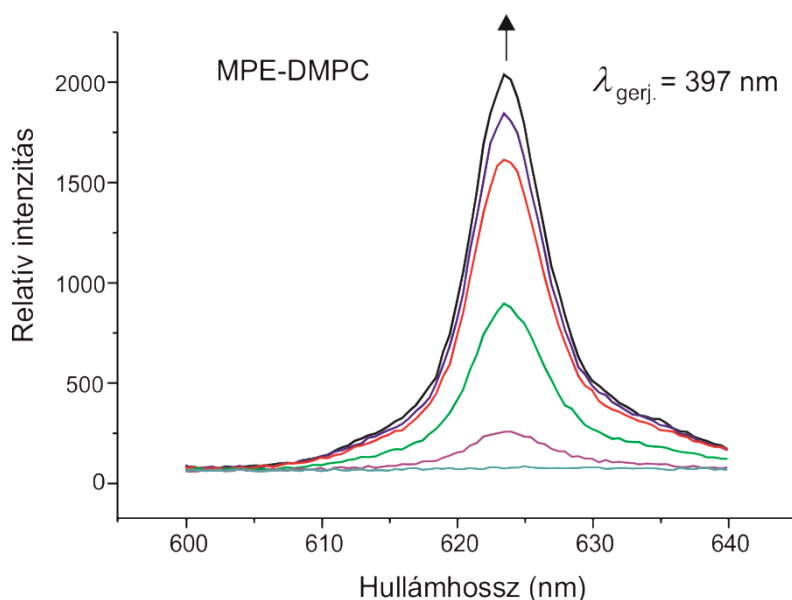
A vizsgálatokhoz DOPC:DPPC 80/20 m/m % arányú komplex unilamelláris liposzómákat használtam, amelyhez még a lipidfilm készítés közben hozzáadtam a DiO molekulákat. A minta hidrálása után az elkészült liposzóma-DiO törzsoldatához szobahőmérsékleten mértem hozzá az MPCl-t telítési koncentrációnál kisebb koncentrációban, így a mérés során a kezdeti szabad porfirin molekulák száma nem volt jelentős. Ezt a kész oldatot hígítottam ($\sim \times 120$), így a DiO-nak $\sim 2 \mu\text{M}$, míg a fényérzékenyítőnek $\sim 40 \mu\text{M}$ volt a végleges mennyisége.

Az általam használt FCS mérési összeállítás az alábbi volt. Egy Olympus IX70 invertált mikroszkóp UplanApo/IR 60x (NA=1,2) víz immerziós objektívvel szolgált a minta vizsgálatára. A gerjesztő fényforrás szerepét egy 491 nm hullámhosszon sugárzó Cobolt dióda lézer töltötte be. A fluoreszcencia fény mérése - egy $100 \mu\text{m}$ átmérőjű pinhole-on keresztül - SPCM-AQR-13 Perkin-Elmer lavina fotodiódával és egy sáváteresztő szűrővel (535DF35 Omega Optical) történt. Az autokorrelációs függvények előállítását egy ALV-5000/E korrelátor kártya végezte. A kiértékeléshez használt alakfaktor $\gamma=6$ volt. Mivel a fókuszt beállítása nem mindig reprodukálható, így az összes FCS mérés első lépése egy ismert diffúziós együtthatójú jó fluoreszcenciával rendelkező molekula megmérése, amely mérési eredmények alapján történik a fókuszt méretének a megállapítása. Esetemben erre a célra Alexa 488 festéket használtam. A kiértékelést az összehasonlíthatóság kedvéért a DLS-nél már leírt maximum entrópia módszerrel (MEM) is elvégeztem.

4. EREDMÉNYEK

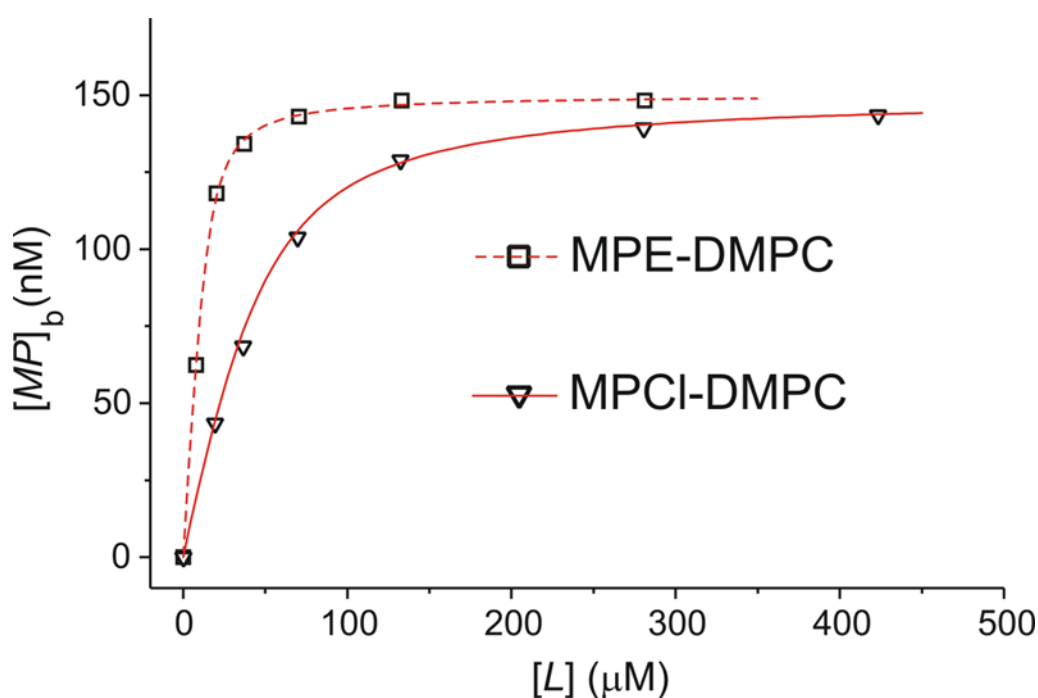
4.1. A kötődésvizsgálat

A fényérzékenyítők membránokhoz való kötődését titrációs fluoreszcencia mérés segítségével vizsgáltam. Az abszorpciós maximumnál (397 nm) történt gerjesztést követően (10. ábra) a lipid kettősrétegbe beépült porfirin molekulák fluoreszcencia intenzitásának változását mértem 600-640 nm között. Mivel a szabad mezoporfirin IX molekulák észterezett változata nem mutat fluoreszcenciát a vizsgált hullámhossztartományban, így az ott mért emissziós intenzitás változása csak a kötésben lévő molekuláktól származik. Noha kémiai értelemben nem beszélhetünk tényleges kötés kialakulásáról, inkább egy fajta membránokhoz lokalizált elhelyezkedésről, de a továbbiakban a membránok belsejében elhelyezkedő molekulákat – elkülönítve az oldatban lévő szabad molekuláktól – kötött molekuláknak fogom nevezni.



10. ábra A titrációs görbék Az ábra MPE-DMPC minták titrációs sorozatát mutatja be. A gerjesztés 397 nm-nél történt. Az emissziós görbékét 600-640 nm között vettem fel. A legalsó kék színű referencia vonal az MPE molekulák liposzóma nélküli vizes oldatában mért nem fluoreszkáló esetét mutatja. A görbék alulról felfelé haladva növekvő lipidkoncentráció mellett a fluoreszcencia intenzitás változását ábrázolják a membránokba belépő MPE molekuláknak megfelelően.

Az adott 600-640 nm közötti tartományban az emissziós maximum változása alapján tehát a liposzómamembránokba beépült fényérzékenyítők mennyisége egyértelműen meghatározható. Mivel mind az MPE mind az MPCI lipofil tulajdonságot mutat, így elmondható, hogy nagyobb eséllyel találhatók meg ezek a molekulák a lipid kettősrétegben, mint a vezikulumokon kívüli vizes közegben. Következésképpen minél nagyobb mennyiségben találhatók liposzómák a rendszerben, annál több porfirin molekula fog elhelyezkedni a membránokhoz kötődve. Az emissziós spektrumok alapján meghatároztam a membránokban található porfirin molekulák mennyiségét. Ezt a kötött mezoporfirin koncentrációt a liposzómakészítéshez alkalmazott lipidkoncentráció függvényében ábrázolva állítottam elő a kötődési görbéket. A 11. ábra a két mezoporfirin IX molekulának DMPC tartalmú liposzómákhoz történő kötődését mutatja.



11. ábra Kötődési görbék A lipidkoncentráció $[L]$ függvényében ábrázolt kötött mezoporfirin koncentráció $[MP]_b$ DMPC-ből előállított egykomponensű liposzómák esetében. A folyamatos görbe az MPCI, míg a szaggatott az MPE kötődését ábrázolja. Leolvasható, hogy a mezoporfirin IX molekulának az észterezett formája már kisebb lipidkoncentráció mellett eléri kötődési maximumát, vagyis nagyobb az affinitása.

Mivel az amfifil foszfatidilkolin molekulák az általam alkalmazott vizes közegben szabad formában nem fordulnak elő – hanem csak liposzómákba rendeződve – így elméletileg célszerű választás lett volna a kötött mezoporfirin koncentrációjának a liposzómák számától való függésének az ábrázolása. Az oldatban lévő liposzómák számának meghatározása ugyan indirekt módon lehetséges.[29, 30] Ezeknél a módszereknél abszorpciós kolorimetriát vagy fényszórásmérést alkalmaznak. A limitáló tényező eme a vizsgálatoknál az alkalmazott lipidek típusa, a liposzóma mérete és a minták polidiszperzitása. Ezért csak közelítő becslést lehet adni a fent nevezett módszerek segítségével a liposzómák mennyiségére vonatkozólag, ami nem minden esetben reprezentálja a valódi liposzóma koncentrációt. Mivel a különböző mennyiségű liposzómákat tartalmazó minták készítése egy ismert lipidmennyiségből előállított homogén liposzóma törzsoldatból hígítással történt, így az egyes mintákba került lipid-anyagmennyiség pontosan meghatározható volt. A kötődési görbék ábrázolásakor így a mintakészítéshez használt lipidkoncentráció – mint egzaktul megadható változó – függvényében tüntettem fel a membránokhoz kötött porfirin molekulák koncentrációját. A kötődési görbékből a kötődési paraméterek meghatározása a tömeghatás törvénye alapján történt. (8)

$$n[L]_f [MP]_f = K_d [MP]_b \quad (8)$$

Ahol n az egy lipidmolekulára eső lehetséges kötőhelyek számát, $[L]_f$ a szabad lipidmennyiségét, $[MP]_f$ a szabad mezoporfirin mennyiségét, $[MP]_b$ a kötött mezoporfirin mennyiségét jelöli, míg K_d a disszociációs állandó. Az (8) egyenletet úgy átrendezve, hogy a kötött mezoporfirin anyagmennyiség $[MP]_b$ a lipidkoncentráció $[L]$ és a teljes mezoporfirin koncentráció $[MP]$ – mint két pontosan megadható független változó – függvénye, kapjuk az alábbi egyenletet.

$$[MP]_b = \frac{1}{2} \{ n[L] + [MP] + K_d - \sqrt{(n[L] + [MP] + K_d)^2 - 4n[L][MP]} \} \quad (9)$$

A (9) egyenlet alapján a kötődési paraméterek meghatározhatóak, mivel a fluoreszcencia intenzitás és a kötött porfirin anyagmennyiség között egyenes arányosság található. A kötődési együttható K_b , mint a kötéseket jellemző paraméter a (10) egyenletből következik.

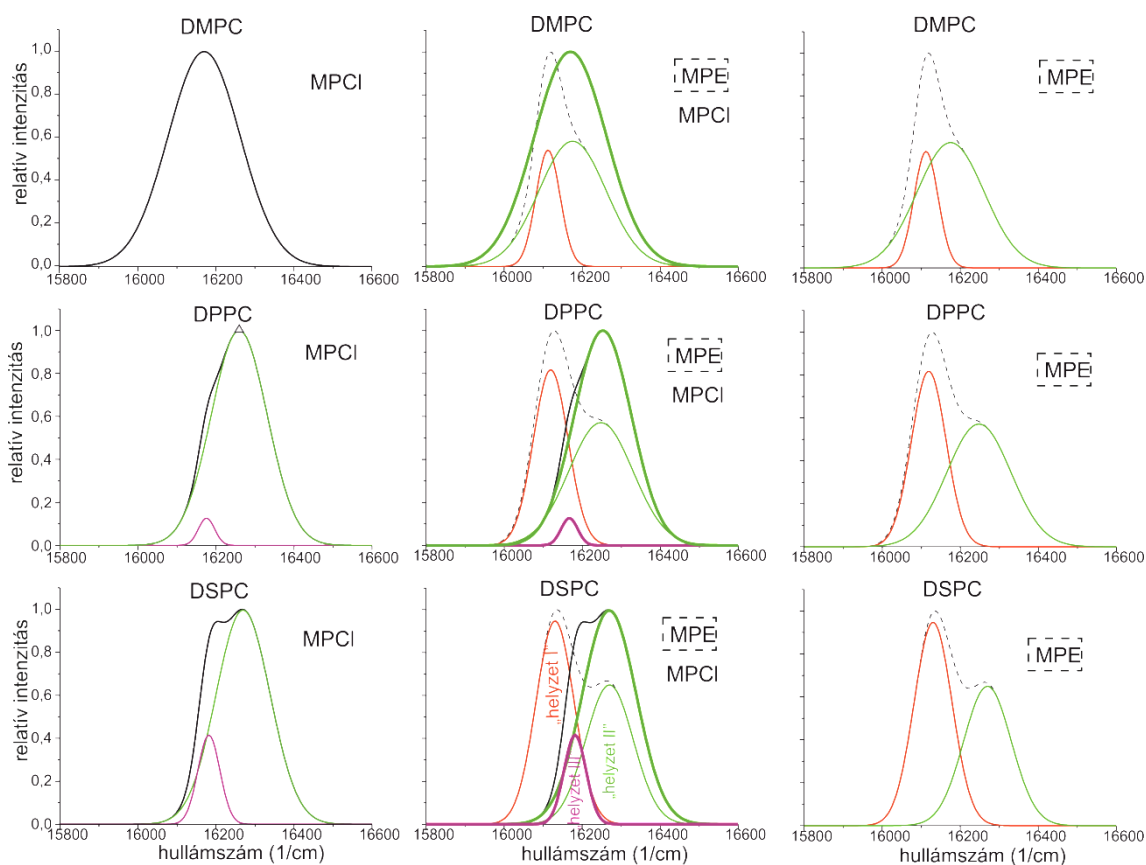
$$K_b = n/K_d \quad (10)$$

A kötődési paramétereket mindhárom telített foszfatidilkolinból (DMPC, DPPC, DSPC) előállított liposzómatípushoz kötődő mezoporfirinekre meghatároztam. Az eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat A meghatározott kötődési paraméterek K_b , a kötődési állandó, K_d a disszociációs állandó, n az egy lipidmolekulára jutó kötőhelyek számát adja meg.

	DMPC		DPPC		DSPC	
	MPE	MPCI	MPE	MPCI	MPE	MPCI
n	0,0083±0,003	0,0037±0,001	0,0044±0,0008	0,0026±0,0005	0,0079±0,0006	0,0038±0,0006
K_d (nM)	30 ± 10	52 ± 16	28 ± 7	53 ± 13	33 ± 9	15 ± 4
K_b (M ⁻¹)	2,8 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵

4.2. A fényérzékenyítők membránon belüli elhelyezkedése



12. ábra Inhomogén eloszlásfüggvények Az ábra két szélső oszlopában az MPCI és az MPE molekulák különböző lipidkörnyezetekben (DMPC, DPPC, DSPC) meghatározott inhomogén eloszlásfüggvénye látható. Az ábra középső részén a két különböző mezoporfirin molekula eloszlásfüggvényeinek az egymásra vetítése látható a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. MPE esetében két egymástól jól elkülöníthető populáció látható, amelyek a zsírsavlánc hossz növelésével egyre jobban elkülönülnek egymástól. Az MPCI molekuláknál általánosan egy jellemző populáció látható, míg a hosszabb zsírsavláncú lipidmolekulákból előállított liposzómákban egy másik kisebb elemszámú populáció is jelen van, ami nem különül el élesen a másik nagyobb elemszámú populációtól.

A korábban már bemutatott szobahőmérsékleti emissziós spektrometria segítségével ugyan a mezoporfirin molekulák membránokhoz történő kötődési affinitása tanulmányozható és számszerűsíthető is, de nem ad pontos információt a molekulák membránokon belüli tényleges elhelyezkedésére „kötőhelyeire” vonatkozólag. Eme kötőhelyek pontos megismerése érdekében a korábbi fejezetben már részletezett nagyfelbontású fluoreszcens módszert az FLN-t hívtam segítségül. Az FLN lehetőséget nyújt az emissziós spektrumcsúcsokat alkotó egyes molekulapopulációk pontosabb

felderítésére és ezek tulajdonságainak megismerésére. Az egyes molekulapopulációk eloszlását nagyban befolyásolja a molekuláris környezetük. Amennyiben a molekulák inkább hasonló környezetben helyezkednek el, akkor az eloszlásfüggvény is homogénebb, keskenyebb lesz. A heterogénebb molekuláris környezet pedig az eloszlásfüggvények kiszélesedéséhez vezet. A kapott eloszlásfüggvények egymástól való különbsége pedig az egyes kötőhelyek egymástól való különbözőségeit jellemzi.

Az FLN mérések során eredményül kapott inhomogén eloszlásfüggvényeket a 12. ábrán Gauss-görbék összegeként tüntettem fel. Az eloszlásfüggvények vízszintes tengelyén a hullámszám került feltüntetésre $1/\text{cm}$ mértékegységben.

2. táblázat A Gauss-görbék illesztési paramétereit Az IDF görbéken megfigyelt molekulapopulációkat jellemző Gauss-görbék illesztési paramétereit láthatóak. Az egyes Gauss-görbék középértékével az alpopulációk egymástól való különbözőségét, a görbék félértékszélességével (fwhm) a populációk heterogenitását, míg a görbe alatti relatív területekkel az adott helyzetben lévő molekulák relatív számát adhatjuk meg.

		DMPC (14)		DPPC (16)		DSPC (18)	
		MPE	MPCI	MPE	MPCI	MPE	MPCI
„I. helyzet”	<i>közép (1/cm)</i>	16112 ± 1	<i>nincs jelen</i>	16119 ± 2	<i>nincs jelen</i>	16130 ± 3	<i>nincs jelen</i>
	<i>fwhm (1/cm)</i>	73 ± 6		104 ± 5		115 ± 6	
	<i>rel. terület</i>	0,25		0,44		0,54	
„II. helyzet”	<i>közép (1/cm)</i>	16175 ± 6	16176 ± 1	16248 ± 8	16257 ± 4	16270 ± 6	16268 ± 7
	<i>fwhm (1/cm)</i>	203 ± 7	186 ± 2	194 ± 14	151 ± 5	144 ± 11	137 ± 9
	<i>rel. terület</i>	0,75	1,0	0,56	0,95	0,46	0,85
„III. helyzet”	<i>közép (1/cm)</i>	<i>nincs jelen</i>	<i>nincs jelen</i>	<i>nincs jelen</i>	16177 ± 5	<i>nincs jelen</i>	16181 ± 3
	<i>fwhm (1/cm)</i>				55 ± 11		55 ± 9
	<i>rel. terület</i>				0,05		0,15

A Gauss-görbék illesztési paramétereit a 2. táblázat mutatja. A Gauss-görbék középértéke az egyes molekula-alpopulációkat jellemzi, míg a görbék félértékszélessége (FWHM) a környezet heterogenitására utal. A görbék alatti relatív terület pedig az egyes kötőhelyen lévő porfirinmolekulák számával arányos.

Az 12. ábra bal oldalán az MPCl inhomogén eloszlásfüggvényeinek a változása látható föntről lefelé haladva növekvő szénatomszámú (14, 16, 18) zsírsavláncok környezetében fekete folytonos vonallal ábrázolva. A DMPC tartalmú lipidmembránokban az MPCl csak egy egyszerű szélesebb eloszlást mutat. Növelve a liposzómákat felépítő lipidmolekulák hosszát (DPPC - 16) – vagyis növelve a liposzómamembránok vastagságát – az eloszlásfüggvény bal oldalán 16175 1/cm körül egy „váll” jelenik meg. Az ennek megfelelő (az ábrán lilával feltüntetett) eloszlás területe csak töredéke a teljes eloszlás másik részét alkotó „aleloszlásnak” (az ábrán zölddel feltüntetve). A leghosszabb (DSPC - 18) szénatomszámú láncok jelenlétében két nem élesen elkülönülő csúcs látható. Ezek a csúcsok a DPPC tartalmú membránoknál látott két eloszlásnak felelnek meg 16175 1/cm (az ábrán lilával jelölve) illetve 16280 1/cm középvértékekkel (az ábrán zölddel feltüntetve). A kisebb hullámszámhoz tartozó „lila” eloszlás itt keskeny és nagyobb relatív görbe alatti területtel rendelkezik, mint a DPPC liposzómák esetében.

A 12. ábra jobb szélén az MPCl-nél már leírtakhoz hasonló módon mutatom be az MPE molekulák jelenlétében felvett inhomogén eloszlásfüggvényeket (fekete szaggatott vonal) a különböző molekuláris környezetet jelentő lipidmembránokban.

A DMPC tartalmú liposzómáknál egy összetett eloszlásfüggvény látható a jobb oldalán egy markánsabb „vállal”. Ez az eloszlás szintén felbontható két kisebb Gauss-eloszlásra (az ábrán zölddel és pirossal jelölve). A két eloszlás jelentősen különbözik heterogenitásukban. A pirossal jelzett egy kisebb területű keskeny eloszlás, míg a zöld egy nagyobb területű szélesebb. A heterogenitásbeli különbségek mellett a kettő nagymértékű átfedést mutat.

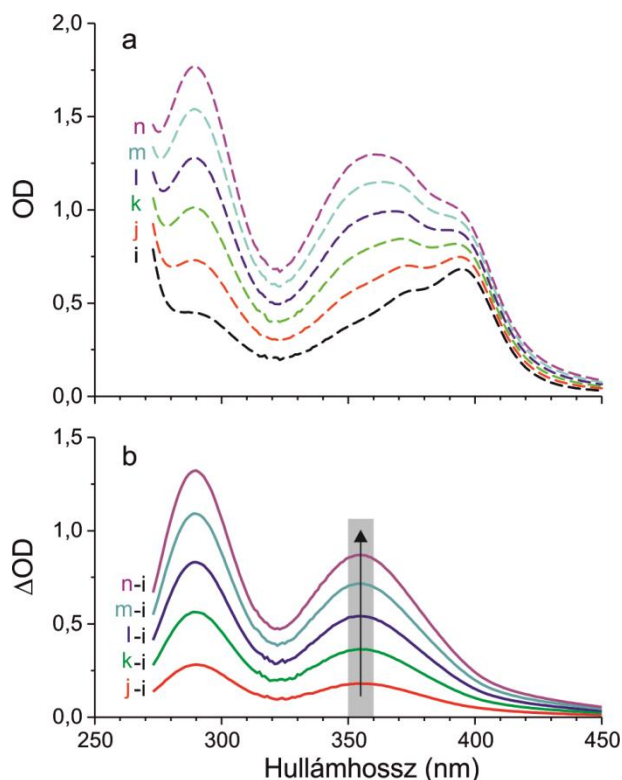
A zsírsavláncok növekedésével (DPPC - 16) a jobb oldali „váll” még markánsabbá válik. A DMPC-nél leírt eloszlások – itt is fellelhetőek (az ábra jobb oldalán piros és zöld görbék) – és egyre jobban elkülönülnek egymástól, de a kettő továbbra is nagymértékű átfedést mutat. A kisebb hullámszámhoz tartozó „piros” eloszlás középvértéke 16110 1/cm körüli, míg a másik, „zöld” középvértéke 16280 1/cm-nél látható. A pirossal jelzett eloszlás relatív görbe alatti területe növekszik, már közel megegyezik a „zöld” relatív görbe alatti területével, ugyanakkor a „zöld” eloszlás szélessége csökken.

A zsírsavlánchossz ismételt növelésével (DSPC - 18) összhangban az inhomogén eloszlásfüggvény korábbi jobb oldali „váll” része már csak nem teljesen elkülönülő csúcsot formál. A már leírt két Gauss-eloszlás szintén fellelhető, egymástól egyre jobban elkülönülnek, immár csak részleges átfedést mutatnak egymással. A „piros” 16110 1/cm-es középértékkel, míg a „zöld” 16280 1/cm-es középértékkel rendelkezik a DPPC-nél leírtakhoz hasonlóan. A „piros” eloszlás relatív görbe alatti területe már meghaladja a „zöld” eloszlás relatív görbe alatti területét.

Az 12. ábra középső részén a két mezoporfirin molekula inhomogén eloszlásfüggvényeit vetítettem egymásra a könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért. Az MPCl eloszlásfüggvénye fekete folytonos vonallal, míg az MPE eloszlásfüggvénye fekete szaggatott vonallal van jelezve. Az egyes populációkat jellemző Gauss-eloszlások a korábban részletezetteknek megfelelően piros, zöld illetve lila színekkel vannak jelölve. Megfigyelhető, hogy az MPE zölddel jelzett eloszlásának a maximuma pontosan egy helyre esik az MPCl „zöld” eloszlásának a maximumával. A „zöld” eloszlás ezek alapján ugyanazt a molekulásokaságot jelenti a két mezoporfirin molekulánál annyi különbséggel, hogy az említett eloszlás nagyobb heterogenitással és elemszámmal rendelkezik az MPCl esetében. Az MPE molekulák zölddel jelzett eloszlása a zsírsavlánchossz növelésével egyre kisebb relatív görbe alatti területtel rendelkezik, a szélessége pedig csökken. Az összehasonlítás alapján még elmondható, hogy az MPCl zölddel jelzett és az MPE pirossal jelzett eloszlása két különböző eloszlást takar, amelyek egyszerre nem fordulnak elő és a zsírsavlánchossz növekedésével összhangban relatív görbe alatti területük növekszik. Ezek alapján összesen három lehetséges eloszlással lehet a mezoporfirin molekulapopulációkat jellemezni. Ezek közül egy molekula esetében egyszerre csak kettő figyelhető meg, de a zölddel jelzett mindig fellelhető.

Mivel az eddig taglalt molekulapopulációk FLN spektrumok alapján látható emissziós energiakülönbsége a porfirinmolekuláknak az egyes liposzómákban elfoglalt különböző molekuláris környezetekből – kötőhelyeiből – fakad, így ezeket, mint molekuláris „helyzeteket” is lehet azonosítani (ábra alsó részén „helyzet I.”, „helyzet II.”, „helyzet III.” jelölés). Ezekre a membránokban elfoglalható helyzetekre pedig a zsírsavlánchossza, vagyis a membránoknak a vastagsága közvetlen hatással van.

4.3. A keletkezett ROS



13. ábra a) Abszorpciós spektrumsorozat Az alsó fekete szaggatott görbe (i) az MPCl-liposzóma rendszer abszorpciós spektrumát mutatja a rá szuperponálódó trijodid (I_3^-) két abszorpciós csúcsával. A további spektrumok ($j \rightarrow n$) az egyperces megvilágítások hatására a spektrumokban megfigyelhető változásokat szemléltetik. **b) Trijodid keletkezés vizsgálata** Az a) ábrarész kiindulási spektrumának (i) az azt követő spektrumokból ($j \rightarrow n$) történő kivonása során előállított újabb spektrumsorozat az egyperces megvilágítások alatt keletkező trijodid változását mutatja.

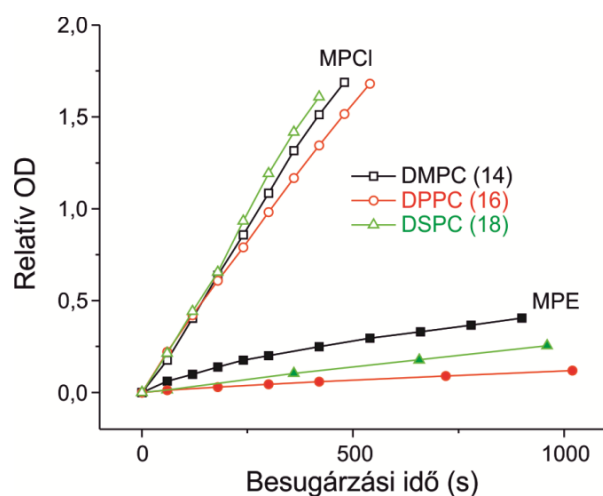
A keletkezett ROS kimutatása a korábbi fejezetben ismertetett kapcsolt reakció útján történt. Első lépésként egy olyan mérést végeztem, ahol a telített porfirin-liposzóma mintákhoz adott kálium-jodid több lépcsőben történő fehér fény általi besugárzása során keletkező trijodidot határoztam meg. A jodid ionok ammónium-molibdenát jelenlétében ROS hatására trijodiddá oxidálódnak. A keletkezett trijodid abszorpciós spektrofotometriával egyértelműen meghatározható. Azért volt szükséges a méréshez telített lipidekből készült liposzómák használata, hogy a keletkezett ROS ne a lipid-peroxidáció révén reagáljon el, mert ebben az esetben a fentebb leírt reakcióban keletkező trijodid nem az összes keletkező ROS mennyiségével lenne arányos.

A 13. ábra a) része az abszorpciós spektrofotométerrel készített spektrumsorozatot mutatja. A legalsó, fekete szaggatott vonallal jelzett spektrum (i) a kálium-jodid jelenlétében rögzített MPCl-liposzóma mintához tartozó abszorpciós spektrum, amelyre szuperponálódik az MPCl molekulák fotodinamikus aktivációja során a ROS hatására keletkező trijodid (I_3^-) elnyelési spektruma is. Ennek oka az, hogy a mintakészítés és a minta spektrofotométerbe történő behelyezése közben minden igyekezet ellenére sem megoldható a minta teljes sötétben tartása. Mindezek mellett maga az abszorpció mérése közben is lejátszódhat fotoaktiváció. Ezért választottam a spektrumok felvétele közben olyan hosszú megvilágítási időket, amely mellett a mérés folytán kialakuló fotoreakció elhanyagolható. A mérési sorozat során a feketével jelzett spektrumot tekintem a kiindulási, referencia spektrumnak – a további spektroszkópai mérésekhez ez szolgált alapvonalként – és ehhez képest vizsgáltam a ROS keletkezést. A további spektrumok (j \rightarrow n) ugyanezen mintával jól definiált geometriai feltételek mellett közölt egy perces fehér fény általi megvilágításának a hatását mutatják. A megvilágítás erőssége az alkalmazott beállítások mellett a küvetta felső síkjában kb. 500 klux volt. Az MPCl-liposzóma minta abszorpciós maximuma 398 nm-nél figyelhető meg, amelyre szuperponálódik a trijodid abszorpciós spektruma. Jól látható, ahogy az egyes megvilágítások után a trijodidhoz tartozó abszorpciós maximumok egyre jobban kiemelkednek a kiindulási spektrumból. Öt perces összesített megvilágítást követően pedig már a keletkezett trijodid lesz a meghatározó a spektrumban.

A spektrumsorozat pontosabb kiértékelése érdekében a kiindulási spektrumot (i) kivontam az összes többiből (j \rightarrow n), így jött létre a 13. ábra b) része. Az így keletkezett újabb spektrumsorozat már csak a trijodid elnyelési spektrumának a megvilágítás általi változását mutatja, vagyis a ROS képződést. Két jól elkülöníthető sáv látható a spektrumokban a trijodid adott környezetben mérhető abszorpciós csúcsainak megfelelően 290 nm illetve 355 nm-nél. Habár a 290 nm körüli vékonyabb sáv markánsabb változása figyelhető meg, én a kiértékelés során a 355 nm körüli szélesebb sávot alkalmaztam az eredeti próba alapján.[28] A kiértékeléshez választott hosszabb hullámhossz még abból a szempontból is praktikusabb volt, hogy a 290 nm-nél mért változásban, nem csak a fényabszorpció, hanem a minta fényszórása is szerepet játszik. A liposzómák méreteloszlásának a változása ezért nagymértékben befolyásolhatná az alacsonyabb hullámhossznál mérhető extinkciót, ezáltal zavarná a kiértékelés

pontosságát. Az optikai denzitás változásának (ΔOD) a meghatározásához a 350-360 nm közötti hullámhossztartomány hullámhossz szerinti átlagát használtam. Ebből történt az (1.) egyenlet alapján a keletkező ROS mennyiségének a becslése. A 13. ábrán megfigyelhető, hogy az MPCl-hez tartozó Soret-sáv (398 nm) nagysága nem változik, vagyis az öt perces besugárzás alatt a fényérzékenyítő mennyisége állandónak tekinthető. Az egyes megvilágítások közötti spektrumok hasonló mértékű változása alapján feltételezhető a keletkező trijodid lineáris kinetikája.

Az 13. ábra b) része alapján származtatható a trijodid keletkezésének reakciókinetika görbéje (14. ábra).



14. ábra Trijodid reakciókinetika görbék A keletkező trijodid relatív optikai denzitásának az ábrázolása (350-360 nm-es tartomány átlaga) a besugárzási idő függvényében a két mezoporfirin molekula különböző zsírsavlánccokat tartalmazó lipidkörnyezeteiben. Az MPCl molekula mindhárom liposzóma típus esetében nagyobb trijodid (ROS) képző aktivitást mutat, mint a hidrofóbabb karakterű MPE.

Ezek a görbék a mezoporfirin-liposzóma minták 355 nm-es csúcsa körüli 10 nm széles sávban az optikai denzitás átlagának a változását mutatják a megvilágítási idő függvényében. Az átlagos abszorbancia arányos a fotodinamikus reakció következtében létrejött trijodid mennyiségével, vagyis a keletkezett ROS mennyiségével. Ahogyan az a 14. ábrán már egyértelműen megfigyelhető, a ROS fotoindukált keletkezése az időben lineáris összefüggést mutat. Az MPCl illetve az MPE molekulák ROS képző affinitása a különböző telített zsírsavlánccokból felépülő liposzóma környezetekben a görbék meredekségével jellemezhető (3. táblázat).

3. táblázat ROS képző képesség Az 14. ábra alapján meghatározott reakciókinetika görbék relatív meredeksége különböző zsírsavláncú lipidekből előállított monokomponensű és multikomponensű liposzómák vizsgálatakor. Az adatok alapján az MPCl nagyobb ROS képző hatással rendelkezik, mint az MPE.

<i>c</i>	<i>DMPC</i>	<i>DPPC</i>	<i>DSPC</i>	<i>DPPC₂₀ + DOPC₈₀</i>
<i>MPCl</i>	3,54±0,08	3,38 ± 0,07	3,83 ± 0,05	9,17 ± 0,03
<i>MPE</i>	0,74±0,03	0,13 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,03

Szembetűnő, hogy az MPCl sokkal effektívebb ROS képző, mint az MPE. Ha figyelembe vesszük a reakciókinetika görbék relatív meredekségét, az alapján megállapítható, hogy az MPCl átlagosan tízszer hatásosabb, mint az MPE. Érdekes összehasonlítani a porfirinmolekulák ROS képző képességét és a membránokhoz viszonyuló kötődési affinitásukat. Amíg az MPCl sokkal kifejezettebb ROS képző, mint az MPE, sokkal gyengébb kötődéssel bír és fordítva. Továbbá érdekes észrevétel még, hogy az MPCl és MPE reakciókinetika görbéinek egyes liposzómatípusokban mért meredekségeinek a sorrendje követi a korábban a kötődési állandóknál az adott porfirinmolekulához tartozó egyes liposzómákban bemutatott sorrendet (1. táblázat). Ezáltal elmondható, hogy a kötődési állandó és a reakciókinetika görbék meredeksége összefüggést mutat a liposzómakörnyezet zsírsavláncainak szénatomszámaival. A két adatsor korrelációs együtthatója $r = 0,95$ az MPCl-re míg $r = 0,89$ az MPE-re.

4.4. Direkt ROS membránkárosítás kimutatása

Mivel a két mezoporfirin származék ROS képző hatása a korábbi bemutatott eredmények alapján bebizonyosodott, így a következő lépés a fotoaktivációt követő direkt membránkárosító hatás kimutatása volt. Ennek a feladatnak az elvégzéséhez a dinamikus fényszórásmérésre (DLS) esett a választásom, mivel ez egy megfelelő technika a liposzómák méreteloszlásának a követésére. A liposzómák szétesésével járó folyamatokban a minták méreteloszlásának a változása megfigyelhető, mivel kisebb vezikulumok illetve fragmentumok is megjelenhetnek.

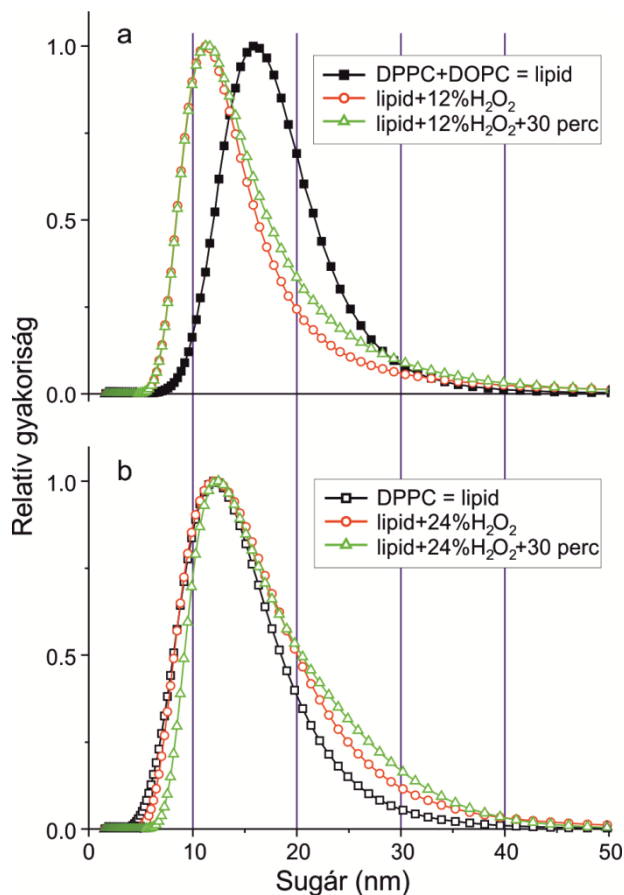
Habár a telített lipidekből álló vezikulumok ROS általi károsodása nem volt várható, a mérést negatív kontrollként elvégeztem ilyen liposzómákon is MPCl-t

tartalmazó mintákkal, mivel a kettő közül ennek a mezoporfirin származéknak volt nagyobb a ROS képző tulajdonsága. Az elvárásoknak megfelelően a méreteloszlásokban jelentős különbség egyik esetben sem volt tapasztalható.

A negatív kontrollvizsgálat után a mintákat úgy módosítottam, hogy telítetlen lipidösszetevőket is tartalmazzanak, ahol a telítetlen lipidmolekulák oxidációja révén létrejövő liposzómaszétválást, vagyis a membránkárosodást szándékoztam kimutatni. Az új membrán modell már DPPC és DOPC 80/20 arányú tömegszázalékos keveréke volt. Fényérzékenyítőként pedig a már említett MPCl-t alkalmaztam, mivel a ROS képző tulajdonsága a kevert lipidtartalmú liposzómák esetében is nagyobb volt, mint az MPE-nek (3. táblázat). Várakozásaim ellenére a mérés során negatív eredmények adódtak, ugyanis fény indukálta változás a telítetlen lipideket is tartalmazó minták méreteloszlásában többszöri ismétlés mellett sem volt megfigyelhető. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a fotoaktiváció során keletkező ROS egyáltalán nem okoz semmi membránkárosodást, illetve olyan kis mértékben keletkezik ROS, hogy még nem alakul ki ténylegesen mérhető változása a liposzómáknak.

Ennek a megválaszolására a ROS általi membránkárosodás kimutatására kitalált módszerem változtatnom kellett. Azon kiindulási hipotézisem megerősítésére miszerint a ROS a telítetlen lipideket tartalmazó liposzómák direkt károsítását váltja ki, a mérési koncepciót úgy alakítottam át, hogy már direkt úton adtam ROS-t vagyis hidrogénperoxidot a mintákhoz. Ezáltal lehetőségem nyílt egy tritrációs sor készítésére, ahol az oxidatív ágens mennyisége pontosan ismert és széles határok között tetszőlegesen változtatható. Először 12 m/m % koncentrációban alkalmaztam H_2O_2 -t a telített és a telítetlen lipidtartalmú mintáknál egyaránt. A csak telített lipideket tartalmazó liposzómák esetében változás nem volt megfigyelhető, így a H_2O_2 koncentrációt duplázva 24 m/m %-os mintákat használva is megismételtem a mérést. Ez utóbbi esetben ugyan kis változás megfigyelhető volt, de a vezikulumok egyértelmű szétválását nem tapasztaltam. Ahogy a 15. ábra b) részén is látható, a méreteloszlások módusza nem változott, csak a kis és a nagy részecskék arányában volt változás észlelhető, illetve a teljes eloszlás szélesedett ki valamelyest. A liposzómák szétválására jellemző kisebb méretű partikulumok nem keletkeztek. Ezek a változások 30 perccel később még kifejezettebbé váltak, feltételezhetőleg a liposzómák aggregációja folytán, ami az UH besugárzással készült minták kisebb fokú stabilitásának tudható be, de nem jelenti a

H₂O₂ általi közvetlen károsítást. Tehát a kontroll-mintákban negatív eredménnyel zárult a vizsgálat, az elvárásoknak megfelelően.



15. ábra a) Direkt ROS membránkárosítás Telítetlen lipideket is tartalmazó membránok károsodása 12% H₂O₂ hatására. A gyakorisági eloszlás módusza a kisebb méretek irányába tolódott jelezvén a membránokban bekövetkezett változást. **b) Kontrollvizsgálat telített lipidet tartalmazó membránon** A 24% H₂O₂ sem okozott jelentős változást a liposzómák méretének gyakorisági eloszlásában. Enyhe fokú aggregációra utaló kiszélesedése megfigyelhető, de ez nem jelenti a membránok egyértelmű oxidatív károsítását.

A kontrollmintával elvégzett közvetlen ROS hozzáadást megismételtem öszetett liposzómákat – telített DPPC (80 m/m %) és telítetlen DOPC (20 m/m %) – tartalmazó összeállítással is. A kontrollal szemben a DPPC-DOPC mintáknál már a kisebb 12 %-os H₂O₂ kezelést követően is a korábban várt változás – a liposzómák szétesését követő kisebb vezikulumok megjelenése – volt megfigyelhető a méreteloszlásban. A gyakorisági eloszlás módusza a kisebb méretek felé tolódott (a sugár 17 nm-ről 11 nm-re változott), ami már egyértelműen a membránok integritásának változására, vagyis a H₂O₂ által kialakult membránkárosodásra utal. A 15. ábra a) része szemlélteti

a telített és telítetlen foszfatidilkolin molekulákat is tartalmazó mintáknál tapasztalt méreteloszlások változását. A direkt ROS hozzáadását követő 30 perces várakozási idő e minták esetében is hasonló eredményt mutatott, mint a kontrollminta korábban, a méreteloszlás szélesedését a nagyobb méretek irányába, ami szintén a liposzómák UH besugárzásából eredő tulajdonságára utal.

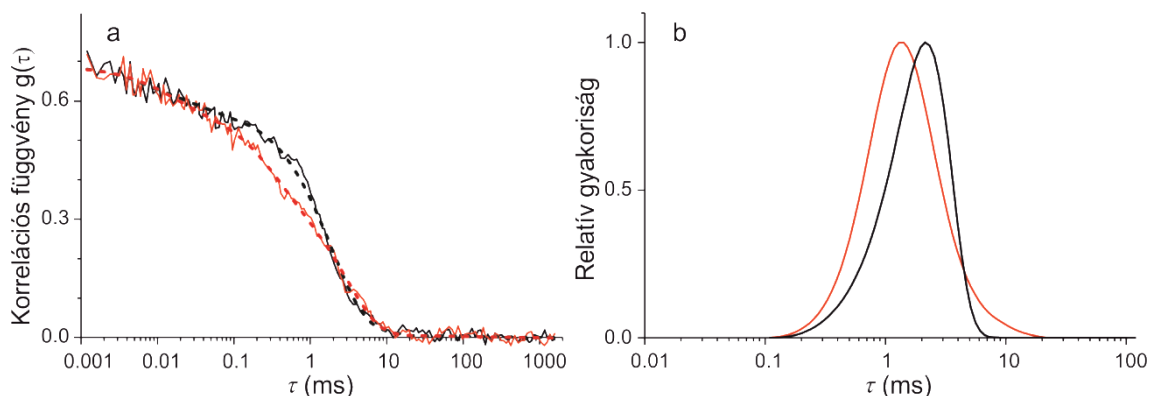
A leírt mérési eredmények alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a telítetlen lipideket is tartalmazó liposzómák valóban érzékenyek a környezetükben lévő oxidatív ágensekre. A membránok széteséséből fakadó gyakoriságieloszlás-változás pedig tényleg kimutatható. Ezek alapján felvetődik ismét a kérdés, hogy az első mérés során, amikor a viszonylag nagy ROS képző affinitást mutató MPCl molekulák fotoaktivációját követő oxidatív membránkárosítást tanulmányoztam, miért kaptam mégis negatív eredményt.

4.5. A fotoindukált membránkárosodás

A direkt membránkárosodás sikeres kimutatását követően egy olyan kellően érzékeny módszer kidolgozásán voltam, ami lehetőséget nyújt a fehér fény által megvilágított fényérzékenyítővel kezelt telítetlen lipideket is tartalmazó liposzómák méreteloszlásbeli változásának a kimutatására. A membrán minta ugyanaz volt, mint a korábbi esetben (DPPC-DOPC 80/20 m/m % keveréke) és MPCl, mint fényérzékenyítő. Mivel a fotoindukált károsítás kimutatására irányult DLS mérés negatív eredménnyel zárult így a további vizsgálatokhoz egy érzékenyebb spektroszkópai módszer alkalmazása vált célszerűvé. Így esett a választásom a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiára (FCS).

Az FCS mérésekhez használt mérési összeállítás nem tette lehetővé, hogy az eddig általam alkalmazott mezoporfirin molekulákat megfelelően gerjeszteni tudjam és segítségükkel tudjam a membránokban bekövetkező változásokat vizsgálni. Így az FCS mérések során egy külön a membránokba beépülő hozzáadott fluoreszcens jelölő (DiO) vált szükségessé. Mivel a két fluoreszcens molekula (mezoporfirin, DiO) más hullámhosszakon gerjeszthetőek, ezáltal különválasztható lett a fotoreakció kiváltásához és a membrán intaktság vizsgálatához használt hullámhossz tartomány.

A 16. ábra a) része mutatja az FCS mérés során felvett két autokorrelációs függvényét a kevert lipid összetevőjű mintáknak a fehér fény általi besugárzás előtt és után MPCl jelenlétében.



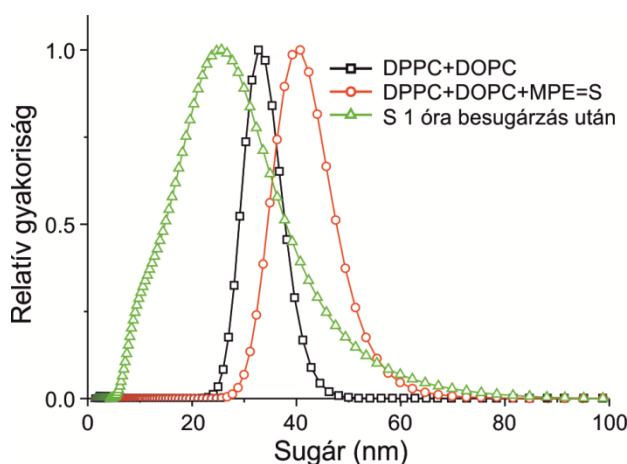
16. ábra a) Autokorrelációs függvények A fekete görbe a megvilágítás előtti FCS mérés eredményeként kapott autokorrelációs függvényt mutatja. A piros a fehér fény általi megvilágítást követően mutatja az autokorrelációs függvényt. **b) τ relatív gyakorisági eloszlása** Az a) autokorrelációs függvényekből MEM segítségével előállított gyakorisági eloszlások. A fekete eloszlás a megvilágítás előtti, a piros a megvilágítás utáni állapotot ábrázolja. A módusz 2 ms-ról 1,4 ms-ra csökkent, illetve az eloszlás is kiszélesedett.

Az autokorrelációs függvények alapján a korrelációs idő (τ) relatív gyakorisági eloszlása maximum entrópia módszerrel (MEM) került meghatározásra (16. ábra b) része). Összességében elmondható, hogy az FCS mérés eredményei nagyon hasonlítanak a direkt ROS hozzáadást követően DLS-sel végzett mérések eredményeihez (15. ábra a) része). A módusz a megvilágítást követően 2 ms-ról 1,4 ms-ra csökkent, mindemellett az eloszlás kiszélesedése volt még megfigyelhető. Mivel a kisebb korrelációs idők kisebb részecskékre utalnak, így a megfigyelt változások a liposzómák szétesésének egyértelmű jeleként értelmezhetőek. Az egyedüli különbség a direkt hozzáadott ROS (H_2O_2) tartalmú mintákkal szemben az volt, hogy ebben az esetben a ROS az MPCl molekulák fehér fény általi megvilágításának a hatására keletkezett a kevert lipidekből DPPC-DOPC (80/20 m/m %) előállított liposzómákban.

Az FCS mérések alapján azonban felvetődik a kérdés, hogy a DiO jelenléte a mintákban milyen hatással lehet a tapasztalt membránkárosodásra. A mérési eredmények esetleges DiO általi „meghamisítását” elkerülendő, szükség volt annak az

igazolására, hogy az FCS mérési eredményekből tapasztalható liposzómák szétesésére utaló változások DiO nélkül is végbemennek, csak a megvilágítás hatására is.

Ezért újabb DLS méréseket végeztem, de a korábbi sikertelen próbálkozás miatt immáron érzékenyebb mintákkal. Az összetett liposzómáknak növeltem a relatív DOPC tartalmát (30 m/m % a korábbi 20 m/m %-kal szemben), a fényérzékenyítő továbbra is az MPCl volt a korábbi méréshez is használt mennyiségben alkalmazva. A mérés a liposzómák nagyobb DOPC tartalma ellenére sem zárult eredménnyel, továbbra sem sikerült a DLS segítségével a vezikulumok fotoindukált szétesését kimutatni. Az összehasonlíthatóság kedvéért ezeket a vizsgálatokat megismételtem a sokkal inkább hidrofób karakterű MPE molekulákkal is.



17. ábra A fotoindukált membránkárosodás Az ábra a 70/30 m/m %-os DPPC-DOPC liposzómák sugarának relatív gyakorisági eloszlását mutatja. A fekete görbe az MPE hozzáadása előtt, a piros görbe az MPE hozzáadása után, míg a zöld 1 óra besugárzás után szemlélteti a gyakorisági eloszlásokat.

Az 17. ábra mutatja a liposzómák sugarának relatív gyakorisági eloszlását a 70/30 m/m %-os DPPC-DOPC mintában az MPE hozzáadása előtt, közvetlenül az MPE hozzáadását követően illetve egyórás a megvilágítás után. Amint az ábrán is látszik a porfirin hozzáadását követően a gyakorisági eloszlás a nagyobb méretek felé tolódik el és az eloszlás kiszélesedik (pirossal jelzett görbe). Ez a változás betudható annak, hogy porfirin membránokba való beépülését követően a liposzómákban egyfajta szerkezeti változás játszódik le. A besugárzás utáni mintát vizsgálva azt láthatjuk, hogy az eloszlás tovább szélesedett és a kiindulási eloszlás (fekete görbe az ábrán) móduszánál jelentősen kisebb móduszú eloszlást eredményezett (zölddel jelzett görbe az ábrán). A 17. ábrát összehasonlítva a korábban már bemutatott 15. ábra eloszlásgörbéivel

észrevehető, hogy a 30 m/m %-os DOPC tartalmú liposzómáknál jelentősen nagyobb sugár tapasztalható, mint a kisebb (20 m/m %) mennyiségben DOPC-t tartalmazó liposzómáknál. Ennek az oka a nagyobb DOPC tartalmú liposzómák kisebb fokú szobahőmérsékleti stabilitásában keresendő. A 30 m/m % DOPC olyan mértékben csökkenti a liposzóma fázisátalakulási hőmérsékletét, hogy az a szobahőmérsékleten már a rendszer enyhe fokú instabilitásához vezet. Azért, hogy ez az instabilitás a méréseket ne befolyásolja, a mintakészítést követően a mintákat szobahőmérsékleten hagytam és rendszeresen ellenőriztem a liposzóma törzsoldat méreteloszlását. A leírt mérést akkor végeztem el, amikor a minta eloszlásában rövid időn belül már nem volt változás. A besugárzással párhuzamban alkalmaztam egy referencia mintát is, amely tartalmazta a komplex liposzómákat és a fényérzékenyítőt, de sötétben volt tartva szobahőmérsékleten. Ez a minta nem mutatott különbséget egy óra múlva sem összehasonlítván a besugárzás előtti mintával.

A mezoporfirin molekulák fény által indukált membránkárosító hatásának a vizsgálata egyértelmű ámbár nem várt eredménnyel zárult. Az MPE noha lényegesen kisebb mértékben képes ROS képzésére, mint az MPCI, ennek ellenére a két vizsgált fényérzékenyítő közül csak ennél a fokozott mértékben hidrofób természetű molekulánál volt egyértelmű látható jele a fotoaktiváció következtében széteső vezikulumoknak. Továbbá elmondható, hogy a DiO-t is tartalmazó FCS mérésekből látható eredmények szintén összhangban vannak a csak mezoporfirint tartalmazó liposzómáknál látott eloszlásváltozásokkal. Vagyis a liposzómák méreteloszlása egyértelműen a kisebb méretek irányába tolódik el, jelezvén a vezikulumok szétesését.

5. MEGBESZÉLÉS

A munkám kezdetén három fő kérdéskör megválaszolását tűztem ki célomul. Milyen lehetséges kötőhelyekkel rendelkezhetnek a fényérzékenyítő anyagok a membránokban?

Milyen mennyiségben keletkezhetnek reaktív oxigén ágensek a liposzómamembránokban a fotodinamikus reakciók során?

Kimutatható-e kapcsolat a kialakuló membránkárosodás és a porfirin molekulák membránokon belüli helyzete között?

5.1. A porfirin molekulák kötődése a membránokhoz

A porfirin kötődés kérdésének a megválaszolására végeztem el a spektroszkópiai titrálást és az inhomogén eloszlásfüggvények felvételét. A vizsgálathoz használt két mezoporfirin molekula kémiai tulajdonságai alapján már valószínűsíthető volt, hogy a fokozott mértékben hidrofób karakterű MPE mélyebben képes lesz behatolni a lipid kettősrétegbe. A kötőhely elnevezés használata nem teljesen egyértelmű ebben az esetben, mivel a porfirin molekulák nem egy speciális membrán összetevőhöz, mint receptorhoz kötődnek. Korábban egy kutatócsoport liposzóma modellen már tanulmányozta, hogy a porfirinmolekula-sejtmembrán kapcsolat termodinamikailag kötődésként vagy inkább a membránok és a külső vizes fázis közötti egyensúlyi eloszlásként jellemezhető. [31] Arra az eredményre jutottak, hogy a kötődés egy jobb matematikai megközelítése a porfirin molekulák membránokhoz történő asszociációjának. Ennél a mérésnél az általuk használt deuteroporfirin IX jól reprezentálja a porfirin IX származékok, vagyis az általam is használt mezoporfirin IX molekulák viselkedését. Ezek alapján termodinamikailag tekintve valóban helytállóbb nekem is e folyamatot kötődésnek és a lokalizációkat, vagyis a korábbi „helyzeteket” kötőhelyeknek neveznem. A mérési módszerem helyességét igazolja továbbá az a tény is, hogy az említett kutatócsoport is hasonló nagyságrendben ($2,3 \pm 0,7 \cdot 10^4$ M) határozta meg az általuk használt porfirin molekulák kötődési állandóját, mint ami az én mérési eredményeimből is adódott.

A porfirin származékok membránokhoz való kötődésének a vizsgálatában az általam is alkalmazott abszorpciós spektrometria egy bevett eljárás, amelyet már régóta használnak. [32, 33] A mérés elve ezekben az esetekben általában az, hogy a porfirin molekulák fő abszorpciós maximuma, vagyis a Soret-sáv, a membránokhoz kötődés hatására eltolódik a hosszabb hullámhosszak irányába. Így a fényérzékenyítők membránokba bejutásának ténye jól követhető, lehetővé téve a kötődés kinetikájának a vizsgálatát is.

Noha a másik vizsgálómódszerem, az FLN spektrometria sem újkeletű módszer, alkalmazása eddig inkább fehérjék vizsgálatában volt elterjedt. [34, 35] A mezoporfirin molekulák inhomogén eloszlásfüggvényeinek a felvétele liposzómákban, olyan unikális felhasználása az FLN spektroszkópiának, amit csak a mi kutatócsoportunk végzett eddig. [36]

A kapott FLN mérési eredmények alapján elmondható, hogy az MPE tartalmú liposzómák esetében két kötőhely, vagyis kötődési lokalizáció figyelhető meg az IDF görbéken. A DMPC tartalmú mintákban ez a két lokalizáció nem válik el egymástól, míg a DPPC és a DSPC tartalmú minták esetében ez a két lehetséges elhelyezkedés határozottan elkülönül. Az 1. táblázatban közölt kötődési paraméterek az MPE és MPCl molekulák esetében egyaránt az egyes lokalizációkhoz tartozó kötődési paraméterek átlagait mutatják. Ahogy a táblázatban is látható a disszociációs állandók értékei (K_d) az MPE és a különböző zsírsavlancú liposzómák esetében gyakorlatilag megegyeznek egymással. A kötődési állandókban (K_b) látható eltérés pedig az „ n ” értékéből (az egy lipidmolekulára jutó kötőhelyek száma) fakad. Az MPCl tartalmú minták eredményei alapján elmondható, hogy a disszociációs állandó értéke közel megegyezik a DMPC és DPPC tartalmú liposzómáknál, de lényegesen alacsonyabb a DSPC esetében. A kötődési állandókban fellelhető különbségek itt is szoros összefüggést mutatnak „ n ” értékeivel. Összehasonlítva a két mezoporfirin molekula eredményeit, MPCl kötődésénél 3-4-es faktossal kisebb kötődési állandó látható a DMPC és DPPC környezetben, míg DSPC-nél jelentős eltérés nem volt a különböző porfirin molekulák kötődésében.

Az IDF görbék kiértékelésekor felvetődik a kérdés, hogy a membránokhoz kötődött MPCl molekulák két propionát csoportja protonálódott állapotban van-e. Ugyanis az egyszerre jelenlévő különböző protonációs állapotok befolyásolhatják az

IDF görbék helyes értelmezését, ezáltal a lehetséges kötőhelyek meghatározását. A protonációs állapotok pontosabb megismerésére szimulációt végeztünk Marvin Beans szoftverrel. A szimulációk alapján kiderült, hogy az MPCl molekulák valamennyi propionát csoportja deprotonált állapotban található pH 6 fölött. Mivel a méréseimhez használt PBS puffer pH-ja 7,4 körüli volt, így kijelenthető, hogy az IDF felvétele közben csak a deprotonált forma fordulhatott elő. Következésképpen az IDF görbék elemzett komponensei csakis a különböző mezoporfirin környezetekből származhatnak. Ezek a molekuláris környezetek pedig megfeleltethetők a liposzómamembránokban fellelhető egyes kötőhelyeknek. A már bemutatott 12. ábrán jól láthatók a két mezoporfirin molekula IDF görbéi közötti különbségek, és ezek változása a liposzómamembránokat alkotó zsírsavláncok hosszának a függvényében. Az ábra bal oldalán az MPCl kötőhelyeit jellemző eloszlásfüggvények kerültek feltüntetésre. A DMPC-MPCl mintánál egy sávot lehet meghatározni, míg DSPC-MPCl mintáknál már egy hasadt kettős sáv figyelhető meg. DPPC-MPCl mintáknál markáns hasadt sáv az IDF-ben nem látható, de a sáv bal oldalán egy kisebb váll észlelhető. Ezek alapján elmondható, hogy a DMPC-MPCl minta kivételével összetett IDF görbék figyelhetők meg, amiből ezeknél a rendszereknél egynél több mezoporfirin kötőhelyre, alpopulációra, lehet következtetni.

A 2. táblázat illesztési paramétereit az I., II., III. kötőhellyel hozhatók összefüggésbe. A II. kötőhely mindegyik minta IDF görbéiben megtalálható. Noha a heterogenitása az egyes esetekben különböző, de a középértékek egyezősége alapján az MPE és MPCl tartalmú liposzómákban egyaránt ennek a molekuláris elhelyezkedésnek a jelenléte igazolható. A 12. ábra középső részén jól látható az említett eloszlás mindkét porfirin esetében. Összehasonlítva a két mezoporfirin IDF görbéit, még észrevehető, hogy az I. kötőhely egyáltalán nincs jelen az MPCl mintákban, de DPPC-MPCl és DSPC-MPCl mintákban helyette megjelenik egy III. kötőhely.

Az egyes IDF görbék változásait követve összefüggés ismerhető fel a korábban már bemutatott „*n*” értékekkel (1. táblázat) kapcsolatban. A DPPC és DSPC SUV-ok alapján elmondható, hogy az I. kötőhely az MPCl tartalmú liposzómák IDF görbéin nem létezik. Ebből következően a lehetséges kötőhelyek száma, vagyis „*n*” csökken az ugyanezen liposzómákban lévő MPE molekulákhoz képest. A kötőhelyek számának csökkenése mellett – valamint az III. kötőhely megjelenése miatt – érdekes kérdés, hogy

mi történik a II. kötőhellyel, változik-e az itt található porfirin molekulák száma az egyes mintákban. A kérdés megválaszolható a II. kötőhely relatív arányának ismeretében. A II. kötőhelyéhez az alábbi relatív területek tartoznak az MPE tartalmú DPPC és DSPC mintákban, 0,56 ill. 0,46. Ugyanezen kötőhelyhez MPCl tartalmú DPPC és DSPC liposzómáknál pedig 0,95 illetve 0,85 tartozik. Ezeket az értékeket megszorozva az 1. táblázat megfelelő „ n ” értékeivel kapjuk az „ n^* ” paramétert (4. táblázat). Mivel az „ n ” korábban, mint az egy lipidmolekulára eső kötőhely száma szerint volt definiálva, így az adott kötőhelyhez tartozó relatív területtel történő szorzás után „ n^* ”-ot az adott kötőhelyen elhelyezkedő relatív porfirin mennyiség egy lipid molekulára eső részeként lehet definiálni. A különböző minták „ n^* ” paramétereit összehasonlítva az látszik, hogy a „II. kötőhely”-hez tartozó egy lipidmolekulára eső porfirin mennyiségek közel megegyeznek az egyes liposzómatípusokban. Vagyis a „II. kötőhely”-en elhelyezkedő porfirin molekulák relatív száma független a többi említett kötőhely jelenlététől, de függ a liposzómát alkotó zsírsavláncok hosszától, vagyis a membrán vastagságától. Vastagabb membránhoz nagyobb „ n^* ” érték tartozik, következésképp több porfirin molekula helyezkedik el a „II. kötőhely”-en.

4. táblázat A „II. kötőhely”-hez tartozó relatív porfirinmennyiség A táblázat a „II. kötőhely” IDF görbék alapján meghatározott relatív területét hasonlítja össze az 1. táblázatban bemutatott megfelelő „ n ” értékekkel. A kettő szorzataként kapott „ n^* ” a „II. kötőhely”-en lévő relatív porfirin mennyiséget adja meg egy lipidmolekulára vonatkoztatva.

	DPPC (16)			DSPC (18)		
	<i>rel. terület</i>	<i>n</i>	<i>n*</i>	<i>rel. terület</i>	<i>n</i>	<i>n*</i>
MPE	0,56	0,0044	0,00246	0,46	0,0079	0,00363
MPCl	0,95	0,0026	0,00247	0,85	0,0038	0,00323

Az egyes porfirin molekulákhoz tartozó IDF görbék megismerését követően a fő célom az volt, hogy ezeket a kötőhelyeket molekuláris szinten is azonosítani tudjam a liposzómákon belül. A porfirin molekulák lipid vezikulumokban történő elhelyezkedését illetően több korábbi tudományos munka is született. Ezeket két fő teória szerint lehet csoportosítani. Az egyik elképzelés szerint a fényérzékenyítők a lipid membránokban a zsírsavláncokkal párhuzamosan helyezkedhetnek el és a membránokba történt behatolás mélységével lehet jellemezni a lokalizációjukat. [18, 20, 37-40] A másik elképzelés szerint a kis molekulák, mint a porfirinek is képesek

behatolni a két lipidréteg közé a zsírsavlancok végéhez ezáltal egy „szendvicsszerkezetet” létrehozva. [41-43] Kutatócsoportunk korábban felállított egy modellt az MPE-SUV mintákhoz, ahol az I. kötőhelyet a két lipid réteg közötti „merőleges” elhelyezkedésként, a II. kötőhelyet pedig a zsírsavlancok menti „párhuzamos” elhelyezkedésként azonosította. [36] A korábban felállított modell ugyan kis változtatásokkal, de jól használható az MPCl-liposzóma rendszer lehetséges kötőhelyeinek a jellemzésére is. A korábban már említett számítógépes szimulációkkal lehetőség nyílt a mezoporfirin származékok hidrofíl illetve hidrofób karakterének az összehasonlítására. Amíg az MPE pH 7,4-en nem mutat töltést, addig az MPCl ugyanezen pH-n két negatív töltéssel rendelkezik a deprotonálódott propionát csoportok miatt. Így az MPCl-ről elmondható, hogy kevésbé hidrofób, mint az észterezett változata. Ez a tény magyarázza az I. kötőhely (merőleges elhelyezkedés) eltűnését az IDF görbékről az összes MPCl-liposzóma minta esetében, mivel az MPCl nem tud a két lipid réteg közötti erősen hidrofób környezetben elhelyezkedni.

Korábban már igazolást nyert, hogy a protoporfirin képes a membránokban a szénhidrogén láncok mentén, a mélyre lejutni. [18] A parallaxis módszer segítségével meghatározható a fluorofórok mélysége a membránokban. A mélység meghatározása a membránokhoz kapcsolt ismert mélységben elhelyezkedő quencher molekulák relatív kioltása alapján történik. [39] Ezek alapján a protoporfirin membrán közepétől mért távolsága DMPC tartalmú kis unilamelláris vezikulumokban kevesebb, mint 1 nm-nek adódott. Ezt a távolságot összehasonlítva a kettősrétegű membránok 4,5 nm-es teljes vastagságával, valóban kijelenthető, hogy ezek a fényérzékenyítők a szénhidrogén láncokkal párhuzamosan helyezkedtek el. Mivel a proto- és mezoporfirin molekulák lipofilitásukat és membránokon belüli megoszlásukat [44] tekintve nagyon hasonló molekulák, így kijelenthető, hogy az általam is használt (MPE, MPCl) molekulák is a membránok mélyebb részében a zsírsavlancokkal párhuzamosan helyezkednek el általában.

Az MPE-SUV minták IDF görbéin II. kötőhelyként jellemzett rész korábban „párhuzamos” elhelyezkedésként volt azonosítva. Mivel a II. kötőhely középértéke az MPE és MPCl molekulák esetében gyakorlatilag megegyezik, ez bizonyítja a „párhuzamos” lokalizációt az MPCl-SUV mintákban egyaránt (2. táblázat). Az MPCl-SUV esetében a II. kötőhely szélességének a csökkenése az MPE-SUV-hoz

képezt annak tudható be, hogy a két lipidréteg közötti „merőleges” elhelyezkedés hiánya miatt a membránok nagyobb rendezettséget mutatnak. A korábbi feltételezés szerint a III. kötőhely megfeleltethető a mezoporfirin molekulák zsírsavláncok külső részén, a lipid molekulák fejcsoportjai közé részben benyúló kötőhelynek. Ezek alapján megkülönböztethetünk két különböző „párhuzamos” elhelyezkedést az MPCl-SUV mintákban. E két kötőhelyhez tartozó molekulák alkotják a belső, mélyebb II. kötőhely illetve külső, fejcsoporti III. kötőhely mezoporfirin alpopulációkat. A leírt feltételezést a következő tények támasztják alá.

Ismert, hogy az előátmeneti fázisátalakulási hőmérséklet (T_c) alatt – ami az általam használt monokomponenses SUV-ok esetében (DMPC, DPPC, DSPC) 15, 35, illetve 51 °C a zsírsavlánchossz növekedésének a sorrendjében – a membránokat alkotó lipidek fejcsoportjai is rendezettséget mutatnak, ami független a zsírsavláncok rendezettségétől. [45, 46]. Mivel a spektroszkópiai titrálást szobahőmérsékleten (22 °C) végeztem, így a lipid molekulák fejcsoportjai a DMPC-SUV minták kivételével nagyfokú rendezettséget mutattak. Ez egy lehetséges magyarázatot ad arra, hogy miért hiányozhatott a III. kötőhely az MPCl-DMPC minták IDF görbéiről. A másik két vizsgált liposzómában (DPPC és DSPC) a III. kötőhelyhez tartozó középértékek és a félértékszélességek jó közelítéssel megegyeznek és az eloszlásuk is kellően keskeny ahhoz, hogy egy jól definiálható lokalizációt jelentsenek. E két utóbbi mintában az egyes kötőhelyek közötti különbség a membránok eltérő vastagságából adódik. Az előzőekben részletezettek szerint az MPCl inkább a mélyebb, fokozott mértékben hidrofób régióban helyezkedik el a zsírsavláncok mentén. Amennyiben a lipid kettős réteg elég vastag hozzá, akkor a molekulák kellő mélységig le tudnak hatolni, és elhelyezkedhetnek ebben az erősen hidrofób környezetben, ezáltal elfoglalva a „belső párhuzamos” kötőhelyet. Ezzel szemben a lipid kettősréteg limitált vastagsága maga után vonhatja a „külső párhuzamos” kötőhely beszűkülését is. Ebben az esetben a keskenyebb bilayer kevesebb helyet nyújt az új kötőhelyek kialakulására. Ez a magyarázata a „külső párhuzamos” kötőhelyel rendelkező molekulák számának a zsírsavlánchossztól való függésére. Az imént részletezett tényezők eredményezik az IDF görbék III. kötőhelyéhez tartozó relatív terület különböző számértékét az egyes mintákban (2. táblázat).

Feltételezhető, hogy az MPCl-DSPC mintáknál meghatározott nagyobb kötődési állandó részben a „külső párhuzamos” kötőhelyek jelenlétének a következménye. Ahogy már kifejtettem, a kiszámolt kötődési állandó felfogható a belső illetve külső „párhuzamos” kötőhelyekhez tartozó egyedi kötődési állandók súlyozott átlagaként, ahol a súlyozási faktor az egyes molekula-alpopulációkhoz tartozó molekulák relatív számától függ. Mivel a „belső” párhuzamos kötőhely az egyes mintákban közel állandónak tekinthető, így a kötődési állandó növekedése a „külső párhuzamos” kötőhelynek tudható be. Az MPCl-DMPC mintában ez a bizonyos „külső” kötőhely egyáltalán nem jelenik meg. Míg az MPCl-DPPC mintákban a „külső” kötőhely nem változtatja meg jelentősen a K_d disszociációs együtthatót, addig az MPCl-DSPC mintákban ennek jelenléte a K_d 3,5-ed részére való csökkenését vonja maga után.

5.2. A keletkező ROS kimutatása

A második fő kérdés megválaszolásához a fotodinamikus reakció során keletkezett ROS mennyiségi meghatározását kellett elvégeznem. A keletkezett reaktív oxigén származékok kimutatásának napjainkban két fő módszere létezik, közvetlen és közvetett – vagyis kapcsolt reakció révén történő meghatározás. A közvetlen meghatározás leggyakrabban elektron spin rezonancia (ESR) segítségével történik [47, 48]. Az ESR módszer előnye, hogy a ROS meghatározása a szöveteken belül in vivo is lehetséges [49]. A közvetett ROS meghatározás során egy kapcsolt reakcióban keletkező terméket vizsgáljuk fluoreszcencia illetve fényabszorpció mérés révén. [50-52] E közvetett módszereken belül is a kemolumineszcencia mérése egy elterjedt eljárás, amely egy nagy érzékenységű és viszonylag egyszerű módszer a reaktív ágenseknek nem csak a kvantitatív meghatározására, hanem a valós idejű láthatóvá tételére, vagyis a képződésre is. [53] A kimutatás úgy történik, hogy a keletkezett reaktív oxigén származék DMSO-ban oldott luminollal lép reakcióba, amely során kék fény kibocsátása történik. Egy kutatócsoportnak sikerült a módszert tovább finomítani olyan módon, hogy kis koncentrációban (μM) is kimutatható legyen a ROS vagyis a nem fagocitáló sejtekben képződött ROS is meghatározható. [54] Ők az általánosan használt DMSO-t NaOH-ra cserélve tudták a kemolumineszcenciát még érzékenyebbé

tenni. Az említett reakció pH-érzékeny, így a NaOH által biztosított magasabb pH tette számukra ezt lehetővé. A módszer hátránya, amiért én ezt nem tudtam használni az a vizsgált rendszer mérettartománya. Az általam használt SUV-ok sugara 20 nm nagyságrendbe esik, ami a képképzést már nem teszi lehetővé, mivel a képképzésre használt rendszerek feloldási határa alatt található.

Manapság a ROS kimutatásban egyre fontosabb szerep jut a nanotechnológiának. [55] A legújabb módszerek a ROS nano részecskék fluoreszcencia „turn-on” (felkapcsoló) hatásán alapulnak. Ez annyit jelent, hogy a speciális funkciós csoportokat tartalmazó nano rendszerek ROS jelenlétében kezdenek csak el fluoreszcencia fényt kibocsátani (felkapcsolódnak). Az alkalmazott funkciós csoportok határozzák meg az egyes kimutatandó molekulákra irányuló specificitást. A módszer előnye az alacsony sejt toxicitás és a nagy érzékenység, amelyek lehetővé teszik az in vivo felhasználásukat és a képképzést is. [56] Ezek alapján a hidrogén-peroxid kimutatása történhet szén nanopontok és peroxalát segítségével. [57] Hidroxil gyökök valós idejű kimutatására fém-citrát burokkal bevont kvantumpontok használhatóak. [58] Trifenil-foszfónium alapú nano részecske alkalmas szingulett oxigén kimutatásra.[59]

Mivel számomra fontos szempont volt, hogy a membránokban lévő porfirin mennyiségét is folyamatosan tudjam ellenőrizni a ROS mérés közben így én a klasszikus már jól bevált fényabszorpció mérést választottam. Mivel a keletkező ROS-ok nagyon rövid életidővel bírnak, így csak a keletkezésük helyének a közelében lehet őket hatásosan kimutatni. [60, 61] Több kutatócsoport foglalkozott a legjellemzőbb ROS-ok vizes közegben való féléletidejének és diffúziós távolságának a meghatározásával. A H₂O₂ élettartama 1 ms és ez alatt ~1 µm-es diffúziós távolságba tud eljutni. [62] Az OH• a 9 ns-os élettartamával egy körülbelül 93 Å-ös diffúziós távolságot tesz lehetővé. [63] A szingulett oxigén (¹O₂) pedig a közel 4 µs-os élettartama alatt ~220 nm távolságot tud megtenni. [61] Ezek a diffúziós távolságok a membránokban jelentősen redukálódnak és már összemérhetőek sokszor a lipid kettősréteg vastagságával (~4-12 nm [64]).

A mérés a korábban már bemutatott reakción (5) alapult, vagyis a keletkező trijodid abszorpcióját mértem, ami arányos volt a fotodinamikus reakció során keletkező ROS mennyiségével. A mérés során gerjesztett két mezoporfirin molekula minden telített lipidekből álló liposzómában lineáris ROS termelő kinetikát mutatott.

Porfirin származékok gerjesztés hatására kialakuló hasonló lineáris ROS termelő kinetikáját már más kutatócsoport is leírta élő sejttenyészeteken is. [65] A reakciókinetika görbék lineáris szakaszainak a meredekségeit összehasonlítva (14. ábra) megállapítható, hogy az MPCl ugyanolyan hosszú megvilágítási idő alatt több ROS képzésére volt képes, mint az észterezett párja, az MPE. Az MPCl körülbelül 10-szer nagyobb mennyiségben termelt ROS-t. Ez a különbség nem jelenti okvetlenül azt, hogy az MPCl valóban többszörös mennyiségben termelné a reaktív oxidatív ágenseket. A korábban bemutatott kötődési görbékből (11. ábra) és azok paramétereiből látható, hogy az MPE nagyobb affinitást mutat a lipid kettősréteg iránt, mint az MPCl. Ez a tény és az IDF görbék alapján az MPE molekuláknál leírt a két lipidréteggel párhuzamosan elhelyezkedő I. kötőhely alátámasztja, hogy az MPE a lipidmembránok hidrofób mélyére képes lejutni. Következésképpen az MPE molekulák által termelt kevesebb ROS lehet annak a következménye is, hogy a membránok mélyéről az oldatba jutó ROS a rövid életideje miatt nem kerül mindig detektálásra. Az MPCl molekuláknál látható nagymértékű ROS képzés háttérében pedig az a tényező áll még, hogy e molekulák rendelkezhetnek egy a külső lipid fejcsoportok környezetében lévő III. kötőhellyel. Vagyis az MPCl képes liposzómamembrán legkülső perem régiójában is elhelyezkedni. Az ebben a régióban termelődő ROS sokkal nagyobb eséllyel kerül detektálásra a vizes fázisban, mint a liposzómamembrán belső hidrofób régiójában keletkező.

Megállapítható továbbá, hogy a kapott reakciókinetika görbék meredekségeinek sorrendje az MPCl és MPE molekuláknál követi a kötődési állandóknál meghatározott liposzómák szerinti sorrendet. (1. táblázat). Ezek alapján egyértelmű összefüggés mutatható ki az egyes fényérzékenyítő molekulák relatív ROS termelő képessége, a membránokhoz való affinitás mértéke és a membránokat felépítő molekulák zsírsavlánchossza között. Vagyis a hosszabb zsírsavláncból vastagabb membrán, abból pedig több lehetséges kötőhely következik. A „belső” és a „külső” kötőhelyek egymáshoz képesti relatív aránya befolyásolja a membránokból kijutó, detektálható ROS mennyiségét.

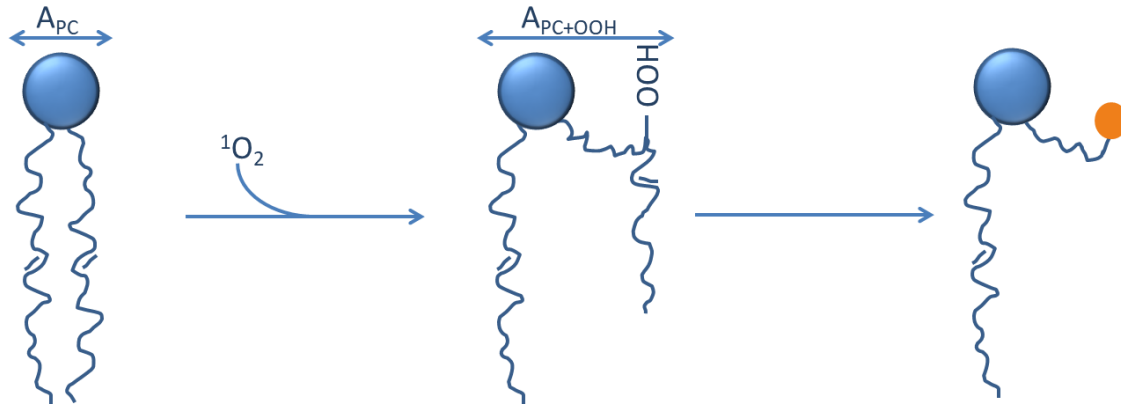
5.3. A ROS membránkárosító hatása

A két mezoporfirin származék ROS képző hatásának különböző összetevőjű liposzómákban való megmérését követően nagyobb rálátásom nyílt a feltett harmadik kérdés megválaszolására. Mivel a fotoaktivált membránkárosodás eléggé általános megfogalmazás, így célszerű egy – a folyamat pontosabb megismerését célzó – rövid áttekintéssel kezdeni a mérési eredmények magyarázatát.

A fotodinamikus reakció által kétféle módon változhat meg a lipid kettős rétegek szerkezete. A gerjesztett triplett állapotú fényérzékenyítő közvetlenül károsíthatja membránokat, vagy közvetett úton a keletkező ROS-ok okozhatnak változásokat a membránokban. A ROS közül a $^1\text{O}_2$ játszik legnagyobb szerepet a lipidek fotooxidációjában, mivel ezek az elektrofil molekulák képesek reakcióba lépni a telítetlen lipidekben az allilhelyzetű szénatomokhoz kapcsolódó hidrogénatomokkal, lipid hidroperoxidokat (LOOH) létrehozva. [66] A lipid hidroperoxidok a lipidek oxidációs folyamatának korai köztes termékei, amelyek további gyökök keletkezésében játszhatnak szerepet. [67] Egyes reakcióutakon keresztül az oxidált lipidek szabad gyökképzése alkoholokhoz, ketonokhoz, karboxil-savakhoz és aldehidekhez vezet. [68, 69] A közvetlen út során a triplett állapotú fényérzékenyítő egy hidrogén atomot kiszakíthat a telítetlen zsírsavból, úgynevezett lipid szénközpontú gyököt létrehozva. Ez utóbbival egy oxigén molekula újabb oxidációs sorozatot indíthat be, amely során végül ebben az esetben is alkoholok, ketonok, karboxil-savak és aldehidek keletkezhetnek. Következésképpen a telítetlen lipidekből és a lipid hidroperoxidokból a szabad gyökök illetve a triplett állapotú fényérzékenyítő hatására oxidált melléktermékek, pontosabban „hasított farkú” lipidek születnek (18. ábra). [70, 71]

A fotooxidáció kezdeti fázisában a lipid hidroperoxidok felhalmozódnak a membránokban és ez maga után vonja a membrán szerkezetének a megváltozását. Mivel az LOOH molekulák nagyobb térkitöltéssel rendelkeznek, ez azt jelenti, hogy jelenlétükben megnő a membránok egy lipíd molekulára eső átlagos felülete, vagyis a membrán összfelületében is növekedés lesz megfigyelhető. [72-74] Ez a felületnövekedés a lipid molekulák telítetlen zsírsavláncainak kettős kötéséhez kötődő hidroperoxid csoport következménye. (18. ábra) A hidroperoxid csoportok sokkal stabilabbak a poláros-apoláros határfelületeken, a hidrofíl karakterük valamint a vízmolekulákkal illetve a lipidek karbonil és foszfát csoportjaival alkotott

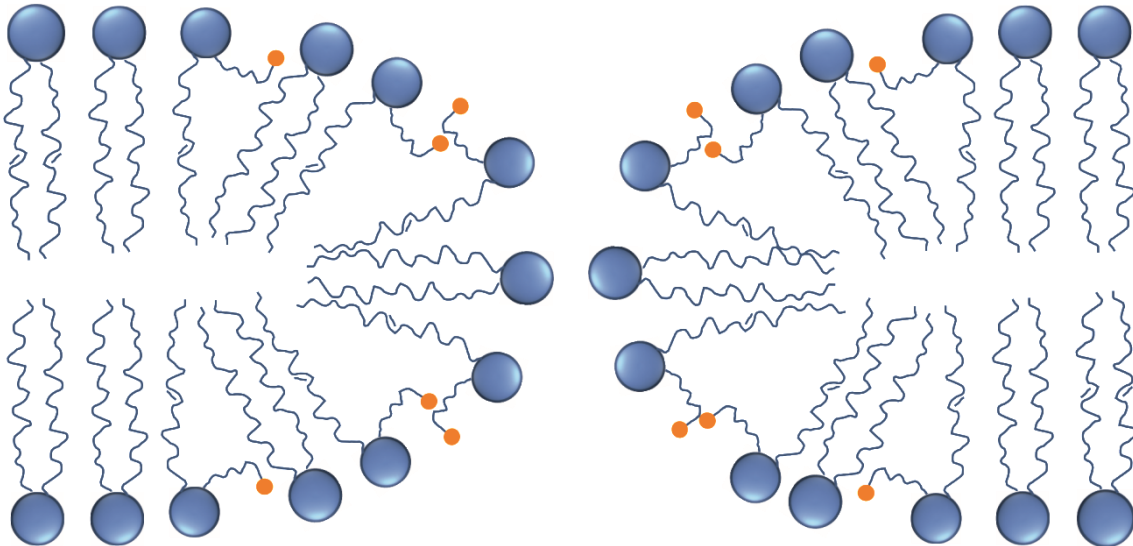
hidrogénhidak révén. [74, 75] Ezek a szerkezeti átalakulások még nem okoznak változást a membránok integritásában és a permeabilitásában [73], de jelentős szerepet játszanak a membránok rugalmassági modulusának a változásában. [76] A felület növekedése maga után vonja a membránok vastagságának a csökkenését is. [77] Ezeket a változásokat molekuladinamikai szimulációkkal is előre vetítették. [77, 78]



18. ábra Lipid oxidáció Az ábra bal oldalán a lipid peroxid (LOOH) képződése látható 1O_2 hatására. A_{PC} a foszfatidil-kolin molekula (PC) fajlagos felületét jelöli a membránokban illetve A_{PC+OOH} a foszfatidil-kolinból keletkező lipid hidropoxid fajlagos felületét jelöli. A hidropoxid csoport hidrofíl karaktere miatt deformálja a zsírsavláncot, azt a vizes fázis irányába „húzza”. A lipidoxidáció későbbi fázisában több lehetséges reakcióúton végül lipid peroxidból „hasított farkú” lipidek keletkeznek (ábra jobb széle). A narancssárga kör jelenthet alkohol-, keton-, karboxil- és ketoncsoporoakat.

A fotooxidáció későbbi fázisában a „hasított farkú” lipidek megjelenése eredményezi a membránok permeabilitásának a változását. Az egyik legelfogadottabb magyarázat szerint a fotodinamikus reakció hatékonysága és a membrán fotokárosodása közötti összefüggés háttérben a membránok permeabilitásának a változása áll. [32, 38, 79, 80] A permeabilitás változás a membrán károsodás és a helyben kialakuló pórusok miatt jön létre. [81] A permeabilitás változás mérésének egyik lehetséges módja az, hogy a liposzómák belső vizes fázisát nagy koncentrációjú fluoreszcens festékkel (pl.: karboxifluoreszcein) töltik meg, amelyek bezárva önkioltást mutatnak. Besugárzás hatására a fluoreszcens molekulák egy jelentős hányada kiszabadul a liposzómákból a külső vizes fázisba és ezáltal a fluoreszcencia intenzitás növekedését okozva. [79, 82]

Több tudományos munkában azt mutatták ki, hogy a fotooxidáció melléktermékei a membrán pórusok kialakulását segítik (19. ábra).



19. ábra Membrán pórusok kialakulása A membrán oxidáció késői fázisában történik a membrán pórusok kialakulása, ami maga után vonja a membránpermeabilitás változását is. A pórusok kialakulásában nagy szerepet játszanak a keletkező „hasított farkú” lipidek, mivel ezek kónuszos testként jellemezhetőek, így tégirényük a pórusképződést segítik.

Számos kísérleti [71, 83] és elméleti [84, 85] tanulmány igazolta a fotooxidáció során keletkező „hasított farkú” lipidek és a membránpermeabilitás változása közötti összefüggést. Más tudományos munkában a K^+ ionok fényérzékenyítést követő membránokon keresztüli áramát figyelték meg, ami szintén a pórusok jelenlétét igazolta. [86]

A membránok permeabilitásával foglalkozó publikációk egy másik fontos eredménye az volt, hogy az ionszivargás rámutathat a membránok integritásának a megváltoztatására még a tényleges membránszétérés bekövetkezése előtt. A membránon keresztüli ionvándorlásnak a fotokárosodás mellett egy másik lehetséges oka a modellmembránokat felépítő lipidek zsírsav összetételében keresendő. A különböző zsírsavak ugyanis módosítják a liposzómamembránok integritását. DOPC tartalmú bilayereken végzett molekuladinamika szimulációk segítségével kimutatták, hogy palmitinsav mint telített lipid, nagyobb mértékben képes a liposzómák destabilizációját

– szivárgását – kiváltani, mint az olajsav, amely telítetlen lipid. [87] Ezért következőképp az ionszivárgás nem egyértelmű bizonyítéka a liposzómák szétesésének.

A méréseim szempontjából az a már bizonyított tény meghatározó, hogy amennyiben a lipideket alkotó zsírsavak telítetlenségi foka növekszik, úgy a fényérzékenyített liposzóma membránon keresztüli szabad molekulatranszport is fokozódik. [88, 89] Ezzel szemben egy másik cikkben a szerzők eltérő eredményt mutattak be a bomlási sebesség állandók alapján, ahol a telítetlen zsírsav szingulett oxigénnel előidézett oxidációs reakcióval bomlott le. A bomlási állandó konstans módon növekedett a lipidek telítetlenségi fokának növekedésével, ami alól csak az olajsav képzett kivételt. Ez az eredmény azt jelzi, hogy az olajsav könnyen degradálódik alacsony telítetlenségi foka ellenére. [90] Ezért használtam jómagam is DPPC-DOPC tartalmú vezikulumokat a fotoindukált membránkárosodás kimutatására ugyanis feltételeztem, hogy az általam kimutatni kívánt reakcióhoz elég érzékeny lesz a rendszer.

Amennyiben összehasonlítjuk a liposzómák szétesésére vonatkozó mérési eredményeimet (17. ábra), a hasonló irodalmi adatokkal, összecsengenek. Az utólagosan hozzáadott protoporfirin-lipid (PL-C17) tartalmú kevert liposzómák méreteloszlását vizsgálva (DLS) a megvilágítás előtt illetve után a liposzómák átlagos átmérőjének a növekedését állapították meg. [91] A vezikulumok méretének növekedése mellett azt is megfigyelték, hogy a bezárt fluoreszcens festék kijutott a liposzómákból. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a liposzómák aggregálódása és a festék kiáramlása a vezikulumokból a liposzóma membrán károsodásának a következménye lehet.

Ahogy azt már korábban leírtam, csak a fluoreszcens festékek kijutása a vezikulumokból nem igazolja egyértelműen azok szétesését. Mivel a mért szórt fény intenzitás arányos a részecskék térfogatával, ezért a DLS méréseimnél a kapott eloszlásokat minden esetben korrigáltam, az intenzitásokat a vezikulák átmérőjének a négyzetével osztottam. Ugyanezt a korrekciót elvégezve az említett kutatócsoport eredményein is a korrigált adatok már az én méréseimet igazolták ezen mérés esetében is, mivel a kisebb partikulumok szintén megjelentek az eloszlásban. A tényleges ok

feltételezhetően a telítetlen lipid összetevőknek a fény hatására keletkezett ROS általi oxidációja.

A mérési eredményeket látva felvetődik a kérdés, hogy miért is volt a kevésbé hatásos ROS képző MPE esetében nagyobb mértékű a lipid vezikulumok károsodása. Az előző fejezetekben (5.1, 5.2) már taglaltam, hogy a méréseimhez használt MPE képes a lipid kettős réteg közepén a két foszfolipid réteg között a membránok síkjával párhuzamosan elhelyezkedni, ami maga után vonhatja azt a következményt, hogy az MPE által termelt ROS a liposzómák külső vizes fázisában már nehezebben detektálható.

Ahogy arról már szintén korábban írtam, a fotodinamikus terápia során a fényérzékenyítők elhelyezkedése a lipid kettősrétegben jelentősen meghatározza a kialakuló hatás mértékét mivel a szingulett oxigén – amely a legjelentősebb résztvevő a telítetlen lipidek oxidálásában – élettartama, nagyban függ a keletkezési környezettől. Ez a tipikus élettartam vizes környezetben körülbelül 4 μ s [92], de membránokban extrém rövid élettartammal bír, pár ns. [93] Így a kialakuló károsító hatás csak az idő alatt jöhet létre, amíg a reaktív oxigén a membránokon belül diffundál. Emiatt a ROS csak viszonylag a keletkezés helyéhez közel, a membránnak azon az oldalán képes hatni, ahol keletkezett. [93, 94]

A fentiek magyarázhatják azt a megfigyelést is, hogy az olajsav láncok és a protoporfirin IX közötti rövid intermolekuláris távolság okozhatja a membránok szingulett oxigén általi gyors szétesését. [90] Ez a tény azt sugallja, hogy az erőteljesebb hidrofób karakter általában együtt jár a jobb fotodinamikus hatékonysággal. [94] Tehát a hatásos fényérzékenyítő megfelelő kémiai tulajdonsággal rendelkezik ahhoz, hogy a lipid membránokba mélyen behatoljon, amíg más molekulák inkább felületesebben helyezkednek el. [95] Hasonló összefüggés figyelhető meg a negatívan töltött porfirinek és a különböző méretű alkil csoportok esetében is. [38]

A fényérzékenyítők membrán affinitása és a fotoreaktív membránkárosítás közötti összefüggést igazolja egy munka, ahol a szerzők a membrán fotooxidációjának a mechanizmusát 1. típusú – vagyis közvetlen kontaktust igénylő – fotodinamikus reakcióként írják le a fényérzékenyítő és a lipidek között. [70] Ez egyúttal molekuláris szintű magyarázatot is szolgáltat arra, miért mutat olyan szoros kapcsolatot egymással a membránkötődés és elhelyezkedés a fényérzékenyítők fotoreaktív hatékonyságával. Egy

néhány éve közölt publikációban molekula dinamikai szimulációk segítségével tárták fel, hogyan diffundál az oxigén a membránokon keresztül. A DPPC gél és folyadék fázisában egyaránt kisebb volt az oxigén koncentráció a lipid fejcsoportok közelében, mint a vizes fázisban, de a legtöbb oxigén molekula a lipid kettős réteg közepén – a két lipid réteg között, ahol az én mérési eredményeim alapján az MPE nagy mennyiségben kötődik – volt megtalálható. A membrán ezen régiójában az oxigén koncentráció egy nagyságrenddel meg is haladta a vizes fázisban mérhetőét. [96]

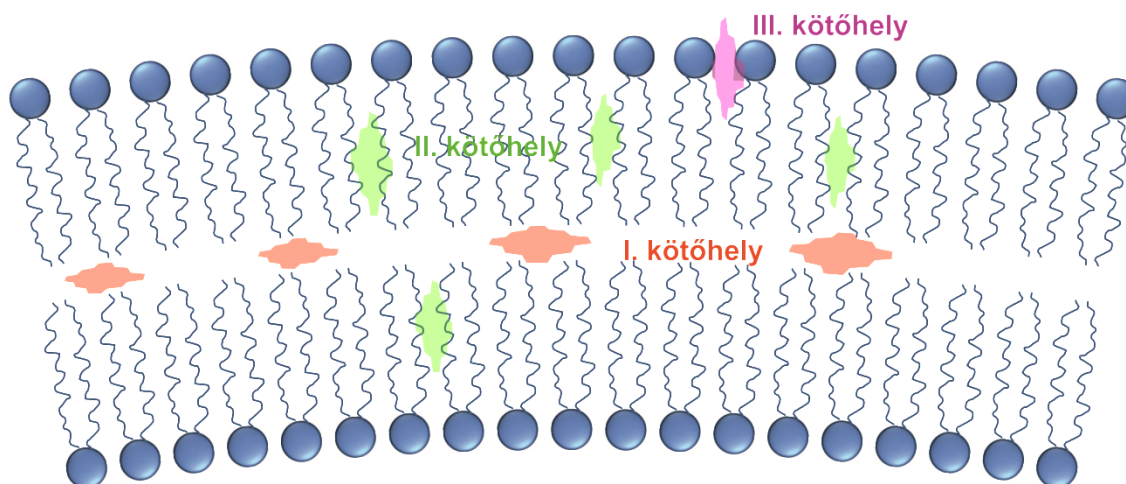
6. KÖVETKEZTETÉSEK

A munkám során három fő kérdésre kerestem a választ a fotodinamikus reakciókban használt fényérzékenyítők membránokban lévő elhelyezkedésével, a fotoindukált ROS képzéssel és az esetlegesen kialakuló membránkárosodással kapcsolatban.

1. A fényérzékenyítő anyagok kémiai tulajdonságai – például a molekulák hidrofób karaktere - hogyan befolyásolhatják a lipidkettősréteghez való kötődésüket illetve elhelyezkedésüket? Pontosan milyen helyzetben található a membránokban ezek a viszonylag merev lapos nagy felületű molekulák? Milyen lehet ezeknek a kötőhelyeknek az eloszlása?

A két mezoporfirin IX származék (MPE, MPCl) affinitását a telített lipidekből (DMPC, DPPC, DSPC) álló egykomponensű kis unilamelláris vezikulumokhoz titrációs fluoreszcencia mérés segítségével határoztam meg. A kötődési görbékből meghatározott kötődési állandók (1. táblázat) alapján elmondható, hogy az elvárásoknak megfelelően az erősebben hidrofób karakterű MPE nagyobb affinitást mutatott a membránokhoz, mint a kevésbé hidrofób MPCl. Ugyanilyen összetételű mintákon elvégzett FLN mérések által előállított IDF görbékből meghatároztam a porfirin molekulák liposzómamembránokban elfoglalható lehetséges kötőhelyeit. Eredményeim alapján elmondható, hogy ezek a molekulák három lehetséges kötőhellyel illetve elhelyezkedéssel rendelkezhetnek. Az I. kötőhely a lipid kettős réteg közepén, a két lipidréteg között, a membrán síkjával párhuzamosan található. A II. kötőhely és a III. kötőhely a membránokat alkotó lipidmolekulák zsírsavláncaival párhuzamosan található. (20. ábra) Ezek közül a II. kötőhely a zsírsavlánccok mentén mélyebben, míg a III. kötőhely a fejcsoportok közelében elhelyezkedő porfirin populációkat jelöli. Az egyes populációkat jellemző Gauss-görbék területeinek az egymáshoz viszonyított arányával (2. táblázat) lehetőségem volt a két porfirin molekula adott lipid környezetben mutatott kötőhelyeinek a megoszlására is következtetni. Az MPE mind a három lipidből előállított liposzómában képes volt az I. kötőhelyen elhelyezkedni, míg az MPCl-nél ez a lokalizáció egyáltalán nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor a III. kötőhely csak az MPCl esetében volt kimutatható. Ezek az eredmények összhangban vannak a két porfirin molekula polaritásával, vagyis hidrofób

karakterük mértékével. A membránokat alkotó lipidmolekulák zsírsavlánchosszának a növekedésével, vagyis a membránok vastagodásával egyre nagyobb mennyiségben találhatóak meg az MPE molekulák az I. kötőhelyen, míg az MPCl molekulákra vonatkozó hasonló változás a III. kötőhelyen volt megfigyelhető.



20. ábra Porphirin kötőhelyek a membránokban Az ábra a porfirin molekulák lipidmembránokban elfoglalható lehetséges kötőhelyeit szemlélteti. Az I. kötőhely a két lipidréteg közötti, a II. kötőhely a zsírsavlánccal párhuzamos, míg a III. kötőhely a lipidmolekulák fejcsoportjainak közvetlen közelében elhelyezkedő porfirin alpopulációkat jelöli.

2. A membránokon belüli egyes lokalizációk esetében kialakuló kémiai és fizikai kölcsönhatások milyen hatással vannak a fotokémiai reakciók során keletkező reaktív oxigén ágensek mennyiségére?

A két vizsgált mezoporphirin IX származék (MPE, MPCl) fotoindukált ROS képzését telített lipideket (DMPC, DPPC, DSPC) tartalmazó egykomponensű kis unilamelláris vezikulumokban abszorpciós spektrofotometria segítségével tanulmányoztam. A mérés a liposzómák külső vizes fázisában történt az (5) egyenlet szerint. Egyperces megvilágításokat alkalmazva követtem nyomon a keletkező I_3^- abszorpciós spektrumának változásait. E változások arányosak voltak a keletkezett ROS relatív mennyiségével. Az optikai denzitás időbeli változását ábrázolva előállítottam a trijodid reakciókinetika görbéket (14. ábra). Ezek kezdeti meredekségeit (3. táblázat) összehasonlítva meghatároztam az egyes porfirin molekulák ROS képző hatását az adott lipid molekulákból álló membránokban. A mérési eredmények azt mutatták, hogy az

MPCl átlagosan háromszor akkora ROS képző hatással bír, mint az MPE. A mérési eredmény értékelésénél figyelembe kell venni, hogy a ROS meghatározás a liposzómákon kívüli vizes fázisban történt és ismert a ROS rövid élettartama a membránokban, így elmondható, hogy minél nagyobb egy porfirin molekula affinitása a membránokhoz, vagyis minél mélyebben képes bejutni a membránokba (I. kötőhely) annál nehezebb a membránokon kívül detektálni a keletkezett ROS-t. Következésképpen minél nagyobb hányada található a molekuláknak a II. kötőhelyen illetve a III. kötőhelyen, annál nagyobb ROS képző képességet mutatnak a vizsgálat során. A porfirin molekulák lokalizációján kívül az egyes membránokhoz való kötődés mértéke is fontos szerepet játszik. Ezt igazolja az a tény is, hogy az MPE illetve MPCl molekulák kötődési állandóinak sorrendje az ugyanazon lipidből álló liposzómákban (1. táblázat) megfelel a ROS képző képességnél (3. táblázat) kapott sorrenddel.

3. Felfedezhető-e összefüggés a fotodinamikus reakció során termelődő ROS mennyisége és a keletkezés helye, illetve az esetlegesen kialakuló membránkárosító hatás között?

A fotoindukált ROS képzést fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) és dinamikus fényszórásmérés (DLS) segítségével határoztam meg telítetlen és telített lipideket is tartalmazó komplex liposzómák (DPPC-DOPC) felhasználásával. A mérési adatok első ránézésre azt az ellentmondásos eredményt adták, hogy a korábban nagyobb ROS képző hatást mutató MPCl-nél az MPE nagyobb membránkárosító hatással rendelkezik. Ez az ellentmondás azonban a két mezoporfirin membránaffinitásának, a membránokban elfoglalt kötőhelyeiknek az összehasonlítása alapján feloldható. Az MPE képes a lipid kettős réteg közepén megfigyelhető I. kötőhelyként jellemzett kötőhelyeket elfoglalni. Ebben a membránrégióban a megvilágítás hatására keletkező ROS ugyan a liposzómákon kívül nem kerül okvetlenül detektálásra, de nagyobb potenciális membránkárosító hatással rendelkezik, mivel a teljes élettartamát a membrán környezetben tölti, így nagyobb eséllyel tud a DOPC zsírsavláncának kettős kötéseinél lipidoxidációban résztvenni. Ezzel szemben a vizes fázisban ugyan nagyobb ROS képző hatást mutató MPCl a membránokban a II. kötőhelyen illetve a III. kötőhelyen figyelhető meg, vagyis inkább a membránok külső részén, így az általa termelt ROS nagyobb mértékben jut ki a liposzómákból. Így az MPCl besugárzása révén képződő

ROS nem tud olyan mértékű lipioxidációt kiváltani, mint az erősebben hidrofób karakterű párja. Közvetlen összefüggés ugyan nem mutatható ki a ROS képző affinitás és a létrejövő membrán károsodás között, azonban az általam használt rendszerben a kisebb detektált ROS mennyiség ellenére a korábban már megismert membránaffinitások és lehetséges kötőhelyek, illetve azok megoszlása alapján érthetővé válik az MPE molekulák nagyobb membránkárosító hatása.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A fotodinamikus terápia során a membránokban bekövetkező változásokat és a keletkező ROS mennyiségét befolyásoló tényezőket tanulmányoztam egy mesterséges sejtmembrán modellrendszer segítségével, amely telített illetve telítetlen lipideket is tartalmazó kis unilamelláris vezikulumokból (SUV) és mezoporfirin IX származékokból (MPE, MPCl) állt.

Hagyományos szobahőmérsékleti titrációs fluoreszcencia méréssel meghatároztam a két porfirin molekula telített lipideket (DMPC, DPPC, DSPC) tartalmazó liposzómákhoz mutatott kötődési görbéit. A kötődési állandók alapján az erősebben hidrofób karakterű MPE nagyobb affinitást mutatott a membránokhoz. A nagyfelbontású FLN spektroszkópia segítségével lehetőségem volt a pontos kötődési helyzeteket, lokalizációkat is megismerni. A telített lipideket tartalmazó membránokban az MPE képes volt a két lipidréteg közé, a membránok hidrofób régiójába is behatolni, míg az MPCl a zsírsavláncokkal párhuzamosan illetve a membránok fejcsoportjai közelében helyezkedett el inkább. Ez utóbbi eredményt erősítette meg a két mezoporfirin fotoaktivált ROS képzése is. A liposzómákon kívüli vizes fázisban KJ-ból ROS hatásra keletkező I_3^- abszorbanciájának méréséből következtethetünk a keletkezett ROS relatív mennyiségére. Bár az eredmények alapján az MPE kisebb ROS képző hatással bírt, mint kevésbé hidrofób társa, de ezeket a méréseket összehasonlítva az FCS-sel, illetve DLS-sel mért telítetlen lipideket is tartalmazó liposzómák (DSPC-DOPC – 70%:30%) fotoindukált membránkárosodásával az MPE hatékonyabb membránkárosító hatása igazolható.

Következtetésként levonható, hogy a membránokhoz jobban kötődő, vagyis a mélyebb membránrégiókba lejutó fényérzékenyítő nagyobb sejtmembrán károsító hatással rendelkezik, mint a csak felületesen bekötődők.

- Bocskei-Antal B, Zolcsak A, et al. Comparison of light-induced formation of reactive oxygen species and the membrane destruction of two mesoporphyrin derivatives in liposomes. *Sci Rep.* 2019;9(1):11312.
- Daniel V, Bocskei-Antal B, et al. Comparison of Binding Ability and Location of Two Mesoporphyrin Derivatives in Liposomes Explored with Conventional and Site-Selective Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B.* 2012;116(32):9644-52.

8. SUMMARY

I studied the basics of the photodynamic therapy, the changes in the membranes and the factors influencing the amount of ROS formed using an artificial cell membrane model system consisting of small unilamellar vesicles (SUVs) containing both saturated and unsaturated lipids and mesoporphyrin IX derivatives (MPE, MPCl).

Binding curves of the two porphyrin molecules to liposomes containing saturated lipids (DMPC, DPPC, DSPC) were determined by conventional room temperature titration fluorescence measurements. Based on the binding constants, the more hydrophobic MPE showed a higher affinity for the membranes. With the help of high-resolution FLN spectroscopy, I had the opportunity to get to know the exact binding sites and localizations. In membranes containing saturated lipids, MPE was able to penetrate between the two lipid layers, into the hydrophobic region of the membranes, while MPCl was located parallel to the fatty acid chains and near the head groups of the lipid membranes. The latter result was also confirmed by the formation of photoactivated ROS of the two mesoporphyrins. The relative amount of ROS formed in the aqueous phase outside the liposomes can be inferred from the measurement of the I_3^- absorbance that is produced from KJ in the present of ROS. The results show that MPE had a lower ROS-forming effect than its more hydrophilic counterpart, but comparing these measurements, with the photoinduced membrane damage, measured by FCS, of liposomes containing unsaturated lipids (DSPC-DOPC - 70%: 30%) demonstrated a more effective membrane-damaging effect of MPE.

It can be concluded that the photosensitizer, which has a higher affinity for the membranes, i.e. extends into the deeper membrane regions, also has a higher potential for cell membrane damaging effect than those that bind only superficially.

- Bocskei-Antal B, Zolcsak A, et al. Comparison of light-induced formation of reactive oxygen species and the membrane destruction of two mesoporphyrin derivatives in liposomes. *Sci Rep.* 2019;9(1):11312.
- Daniel V, Bocskei-Antal B, et al. Comparison of Binding Ability and Location of Two Mesoporphyrin Derivatives in Liposomes Explored with Conventional and Site-Selective Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B.* 2012;116(32):9644-52.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Sahoo, S. K., Parveen, S., Panda, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2007,3:20-31.
- [2] Lin, H., Datar, R. H. Medical applications of nanotechnology. *National Medical Journal of India*. 2006,19:27-32.
- [3] Sahoo, S. K., Labhasetwar, V. Nanotech approaches to delivery and imaging drug. *Drug Discovery Today*. 2003,8:1112-1120.
- [4] Vasir, J. K., Reddy, M. K., Labhasetwar, V. D. Nanosystems in drug targeting: Opportunities and challenges. *Current Nanoscience*. 2005,1:47-64.
- [5] Labhasetwar, V. Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005,16:674-680.
- [6] Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003,3:380-387.
- [7] Finsen, N. R. The Red Light Treatment of Small-Pox. *Br Med J*. 1895,2:1412-1414.
- [8] von Tappeiner, H., Jesionek, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münchener Med Wochenschr*. 1903,50:2042-2044.
- [9] Meyer-Betz, F. Untersuchung Über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Haematoporphyrins und anderen Derivative des Blut und Gallenfarbestoffs. *Dtsch Arch Klin Med*. 1913,112:476-503.
- [10] Schwartz, S. Porphyrins and porphyrin precursors in human and experimental porphyria. *Fed Proc*. 1955,14:717-722.
- [11] Kelly, J. F., Snell, M. E. Hematoporphyrin Derivative - Possible Aid in Diagnosis and Therapy of Carcinoma of Bladder. *Journal of Urology*. 1976,115:150-151.
- [12] Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., Mittleman, A. Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors. *Cancer Research*. 1978,38:2628-2635.
- [13] Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004,1:279-293.

- [14] Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J. H., Sibata, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004,1:27-42.
- [15] 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*. 2009,8:354-361.
- [16] Ytzhak, S., Bernstein, S., Loew, L. M., Ehrenberg, B. The correlation between photosensitizers' membrane localization, membrane-residing targets and photosensitization efficiency. 12th World Congress of the International Photodynamic Association: Photodynamic Therapy: Back to the Future. 2009,7380.
- [17] Lang, K., Mosinger, J., Wagnerova, D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*. 2004,248:321-350.
- [18] Ricchelli, F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *J Photochem Photobiol B*. 1995,29:109-118.
- [19] Hoebeke, M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. *J Photochem Photobiol B*. 1995,28:189-196.
- [20] 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.
- [21] 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*. 2004,278:239-254.
- [22] Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three- Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005,2:91-106.
- [23] 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 and Photodynamic Therapy*. 2005,2:1-23.

- [24] Bryan, R. K. Solving Oversampled Data Problems by Maximum-Entropy. *Maximum Entropy and Bayesian Methods* ///. 1990,39:221-232.
- [25] 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.
- [26] Jankowiak, R., Small, G. J. Fluorescence line-narrowing spectroscopy in the study of chemical carcinogenesis. *Anal Chem*. 1989,61:1023A-1024A, 1026A-1029A, 1031A-1103.
- [27] Chvanov, M., Huang, W., Jin, T., Wen, L., Armstrong, J., Elliot, V., Alston, B., Burdyga, A., Criddle, D. N., Sutton, R., Tepikin, A. V. Novel lipophilic probe for detecting near-membrane reactive oxygen species responses and its application for studies of pancreatic acinar cells: effects of pyocyanin and L-ornithine. *Antioxid Redox Signal*. 2015,22:451-464.
- [28] Mosinger, J., Mosinger, B. Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia*. 1995,51:106-109.
- [29] Vemuri, S., Rhodes, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv*. 1995,70:95-111.
- [30] Jones, M. N. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Adv Colloid Interface Sci*. 1995,54:93-128.
- [31] Rotenberg, M., Margalit, R. Porphyrin-membrane interactions: binding or partition? *Biochim Biophys Acta*. 1987,905:173-180.
- [32] Pavani, C., Uchoa, A. F., Oliveira, C. S., Iamamoto, Y., Baptista, M. S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci*. 2009,8:233-240.
- [33] Constantin, C., Neagu, M. Fluorescent porphyrin with an increased uptake in peripheral blood cell subpopulations from colon cancer patients. *Med Chem*. 2015,11:354-363.
- [34] Sudhakar, K., Loe, S., Yonetani, T., Vanderkooi, J. M. Fluorescent derivatives of human hemoglobin. Differences in interaction of the porphyrin with the protein between the alpha and beta subunits. *J Biol Chem*. 1994,269:23095-23101.

- [35] Nieder, J. B., Stojkovic, E. A., Moffat, K., Forest, K. T., Lamparter, T., Bittl, R., Kennis, J. T. Pigment-protein interactions in phytochromes probed by fluorescence line narrowing spectroscopy. *J Phys Chem B*. 2013,117:14940-14950.
- [36] Herenyi, L., Veres, D., Bekasi, S., Voszka, I., Modos, K., Csik, G., Kaposi, A. D., Fidy, J. Location of Mesoporphyrin in Liposomes Determined by Site-Selective Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*. 2009,113:7716-7724.
- [37] Ricchelli, F., Jori, G. Distribution of porphyrins in the various compartments of unilamellar liposomes of dipalmitoyl-phosphatidylcholine as probed by fluorescence spectroscopy. *Photochem Photobiol*. 1986,44:151-157.
- [38] 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*. 2002,82:2101-2110.
- [39] 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. *Biophysical Journal*. 2004,87:1155-1164.
- [40] Gross, E., Ehrenberg, B. The partition and distribution of porphyrins in liposomal membranes. A spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta*. 1989,983:118-122.
- [41] Katsikas, H., Quinn, P. J. The interaction of coenzyme Q with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *FEBS Lett*. 1981,133:230-234.
- [42] White, S. H., King, G. I., Cain, J. E. Location of Hexane in Lipid Bilayers Determined by Neutron-Diffraction. *Nature*. 1981,290:161-163.
- [43] 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*. 2004,131:107-121.
- [44] Kepczynski, M., Pandian, R. P., Smith, K. M., Ehrenberg, B. Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water? *Photochem Photobiol*. 2002,76:127-134.
- [45] Riske, K. A., Barroso, R. P., Vequi-Suplicy, C. C., Germano, R., Henriques, V. B., Lamy, M. T. Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochim Biophys Acta*. 2009,1788:954-963.

- [46] O'Leary, T. J., Ross, P. D., Levin, I. W. Effects of anesthetic tetradecenols on phosphatidylcholine phase transitions. Implications for the mechanism of the bilayer pretransition. *Biophys J.* 1986,50:1053-1059.
- [47] D'Errico, G., Vitiello, G., De Tommaso, G., Abdel-Gawad, F. K., Brundo, M. V., Ferrante, M., De Maio, A., Trocchia, S., Bianchi, A. R., Ciarcia, G., Guerriero, G. Electron Spin Resonance (ESR) for the study of Reactive Oxygen Species (ROS) on the isolated frog skin (*Pelophylax bergeri*): A non-invasive method for environmental monitoring. *Environ Res.* 2018,165:11-18.
- [48] Saita, M., Kobayashi, K., Yoshino, F., Hase, H., Nonami, T., Kimoto, K., Lee, M. C. ESR investigation of ROS generated by H₂O₂ bleaching with TiO₂ coated HAp. *Dent Mater J.* 2012,31:458-464.
- [49] Yamato, M., Egashira, T., Utsumi, H. Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. *Free Radic Biol Med.* 2003,35:1619-1631.
- [50] Mosinger, J., Lang, K., Kubat, P. Photoactivatable Nanostructured Surfaces for Biomedical Applications. *Top Curr Chem.* 2016,370:135-168.
- [51] Deshwal, S., Antonucci, S., Kaludercic, N., Di Lisa, F. Measurement of Mitochondrial ROS Formation. *Methods Mol Biol.* 2018,1782:403-418.
- [52] Jambunathan, N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Methods Mol Biol.* 2010,639:292-298.
- [53] Rost, M., Karge, E., Klinger, W. What do we measure with luminol-, lucigenin- and penicillin-amplified chemiluminescence? 1. Investigations with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. *J Biolumin Chemilumin.* 1998,13:355-363.
- [54] Kim, J. S., Jeong, K., Murphy, J. M., Rodriguez, Y. A. R., Lim, S. S. A Quantitative Method to Measure Low Levels of ROS in Nonphagocytic Cells by Using a Chemiluminescent Imaging System. *Oxid Med Cell Longev.* 2019,2019:1754593.
- [55] Jiang, H., Lin, Q., Yu, Z., Wang, C., Zhang, R. Nanotechnologies for Reactive Oxygen Species "Turn-On" Detection. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021,9:780032.
- [56] Wu, L., Sedgwick, A. C., Sun, X., Bull, S. D., He, X. P., James, T. D. Reaction-Based Fluorescent Probes for the Detection and Imaging of Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species. *Acc Chem Res.* 2019,52:2582-2597.

- [57] Shen, C. L., Lou, Q., Zang, J. H., Liu, K. K., Qu, S. N., Dong, L., Shan, C. X. Near-Infrared Chemiluminescent Carbon Nanodots and Their Application in Reactive Oxygen Species Bioimaging. *Adv Sci (Weinh)*. 2020,7:1903525.
- [58] Zhou, W., Cao, Y., Sui, D., Lu, C. Turn-On Luminescent Probes for the Real-Time Monitoring of Endogenous Hydroxyl Radicals in Living Cells. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016,55:4236-4241.
- [59] Choi, W., Lim, N. Y., Choi, H., Seo, M. L., Ahn, J., Jung, J. H. Self-Assembled Triphenylphosphonium-Conjugated Dicyanostilbene Nanoparticles and Their Fluorescence Probes for Reactive Oxygen Species. *Nanomaterials (Basel)*. 2018,8.
- [60] Han, Z., Tu, X., Qiao, L., Sun, Y., Li, Z., Sun, X., Wu, Z. Phototherapy and multimodal imaging of cancers based on perfluorocarbon nanomaterials. *J Mater Chem B*. 2021,9:6751-6769.
- [61] Redmond, R. W., Kochevar, I. E. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 2006,82:1178-1186.
- [62] Schmitt, F. J., Renger, G., Friedrich, T., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Los, D. A., Kuznetsov, V. V., Allakhverdiev, S. I. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochim Biophys Acta*. 2014,1837:835-848.
- [63] Roots, R., Okada, S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res*. 1975,64:306-320.
- [64] Mitra, K., Ubarretxena-Belandia, I., Taguchi, T., Warren, G., Engelman, D. M. Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004,101:4083-4088.
- [65] Kolarova, H., Bajgar, R., Tomankova, K., Nevrelouva, P., Mosinger, J. Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2007,21:1287-1291.
- [66] Girotti, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B*. 2001,63:103-113.
- [67] Girotti, A. W., Kriska, T. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2004,6:301-310.

- [68] Paillous, N., Fery-Forgues, S. Interest of photochemical methods for induction of lipid peroxidation. *Biochimie*. 1994,76:355-368.
- [69] Reis, A., Spickett, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2012,1818:2374-2387.
- [70] Bacellar, I. O. L., Oliveira, M. C., Dantas, L. S., Costa, E. B., Junqueira, H. C., Martins, W. K., Durantini, A. M., Cosa, G., Di Mascio, P., Wainwright, M., Miotto, R., Cordeiro, R. M., Miyamoto, S., Baptista, M. S. Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids. *J Am Chem Soc*. 2018,140:9606-9615.
- [71] Vignoni, M., Urrutia, M. N., Junqueira, H. C., Greer, A., Reis, A., Baptista, M. S., Itri, R., Thomas, A. H. Photo-Oxidation of Unilamellar Vesicles by a Lipophilic Pterin: Deciphering Biomembrane Photodamage. *Langmuir*. 2018,34:15578-15586.
- [72] Rosa, R., Spinozzi, F., Itri, R. Hydroperoxide and carboxyl groups preferential location in oxidized biomembranes experimentally determined by small angle X-ray scattering: Implications in membrane structure. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018,1860:2299-2307.
- [73] Riske, K. A., Sudbrack, T. P., Archilha, N. L., Uchoa, A. F., Schroder, A. P., Marques, C. M., Baptista, M. S., Itri, R. Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophys J*. 2009,97:1362-1370.
- [74] Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I. M., Tieleman, D. P., Monticelli, L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J*. 2007,93:4225-4236.
- [75] Garrec, J., Monari, A., Assfeld, X., Mir, L. M., Tarek, M. Lipid Peroxidation in Membranes: The Peroxyl Radical Does Not "Float". *J Phys Chem Lett*. 2014,5:1653-1658.
- [76] Weber, G., Charitat, T., Baptista, M. S., Uchoa, A. F., Pavani, C., Junqueira, H. C., Guo, Y., Baulin, V. A., Itri, R., Marques, C. M., Schroder, A. P. Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. *Soft Matter*. 2014,10:4241-4247.
- [77] Siani, P., de Souza, R. M., Dias, L. G., Itri, R., Khandelia, H. An overview of molecular dynamics simulations of oxidized lipid systems, with a comparison of ELBA and MARTINI force fields for coarse grained lipid simulations. *Biochim Biophys Acta*. 2016,1858:2498-2511.

- [78] de Souza, R. M., Siani, P., Schmidt, T. F., Itri, R., Dias, L. G. Methylene Blue Location in (Hydroperoxidized) Cardiolipin Monolayer: Implication in Membrane Photodegradation. *J Phys Chem B*. 2017,121:8512-8522.
- [79] Tasso, T. T., Tsubone, T. M., Baptista, M. S., Mattiazzi, L. M., Acunha, T. V., Iglesias, B. A. Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. *Dalton Trans*. 2017,46:11037-11045.
- [80] Antonenko, Y. N., Kotova, E. A., Omarova, E. O., Rokitskaya, T. I., Ol'shevskaya, V. A., Kalinin, V. N., Nikitina, R. G., Osipchuk, J. S., Kaplan, M. A., Ramonova, A. A., Moisenovich, M. M., Agapov, II, Kirpichnikov, M. P. Photodynamic activity of the boronated chlorin e6 amide in artificial and cellular membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2014,1838:793-801.
- [81] Ytzhak, S., Weitman, H., Ehrenberg, B. The effect of lipid composition on the permeability of fluorescent markers from photosensitized membranes. *Photochem Photobiol*. 2013,89:619-624.
- [82] Weinstein, J. N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R., Hagins, W. A. Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science*. 1977,195:489-492.
- [83] Runas, K. A., Malmstadt, N. Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers. *Soft Matter*. 2015,11:499-505.
- [84] Van der Paal, J., Neyts, E. C., Verlackt, C. C. W., Bogaerts, A. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chem Sci*. 2016,7:489-498.
- [85] Boonnoy, P., Jarerattanachat, V., Karttunen, M., Wong-Ekkabut, J. Bilayer Deformation, Pores, and Micellation Induced by Oxidized Lipids. *J Phys Chem Lett*. 2015,6:4884-4888.
- [86] Ytzhak, S., Ehrenberg, B. The effect of photodynamic action on leakage of ions through liposomal membranes that contain oxidatively modified lipids. *Photochem Photobiol*. 2014,90:796-800.
- [87] Leekumjorn, S., Cho, H. J., Wu, Y., Wright, N. T., Sum, A. K., Chan, C. The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009,1788:1508-1516.

- [88] Bour, A., Kruglik, S. G., Chabanon, M., Rangamani, P., Puff, N., Bonneau, S. Lipid Unsaturation Properties Govern the Sensitivity of Membranes to Photoinduced Oxidative Stress. *Biophys J.* 2019,116:910-920.
- [89] Ytzhak, S., Wuskell, J. P., Loew, L. M., Ehrenberg, B. Lipid composition affects the rate of photosensitized dissipation of cross-membrane diffusion potential on liposomes. *J Phys Chem B.* 2010,114:10097-10104.
- [90] Watabe, N., Ishida, Y., Ochiai, A., Tokuoka, Y., Kawashima, N. Oxidation decomposition of unsaturated fatty acids by singlet oxygen in phospholipid bilayer membranes. *J Oleo Sci.* 2007,56:73-80.
- [91] Tachikawa, S., Sato, S., Hazama, H., Kaneda, Y., Awazu, K., Nakamura, H. Localization-dependent cell-killing effects of protoporphyrin (PPIX)-lipid micelles and liposomes in photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem.* 2015,23:7578-7584.
- [92] Hackbarth, S., Roder, B. Singlet oxygen luminescence kinetics in a heterogeneous environment - identification of the photosensitizer localization in small unilamellar vesicles. *Photochem Photobiol Sci.* 2015,14:329-334.
- [93] Sokolov, V. S., Batishchev, O. V., Akimov, S. A., Galimzyanov, T. R., Konstantinova, A. N., Malingriaux, E., Gorbunova, Y. G., Knyazev, D. G., Pohl, P. Residence time of singlet oxygen in membranes. *Sci Rep.* 2018,8:14000.
- [94] Bacellar, I. O., Tsubone, T. M., Pavani, C., Baptista, M. S. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2015,16:20523-20559.
- [95] Engelmann, F. M., Mayer, I., Gabrielli, D. S., Toma, H. E., Kowaltowski, A. J., Araki, K., Baptista, M. S. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 2007,39:175-185.
- [96] Bacellar, I. O. L., Cordeiro, R. M., Mahling, P., Baptista, M. S., Roder, B., Hackbarth, S. Oxygen distribution in the fluid/gel phases of lipid membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019,1861:879-886.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Veres, D., Bocskei-Antal, B., Voszka, I., Modos, K., Csik, G., Kaposi, A. D., Herenyi, L. Comparison of Binding Ability and Location of Two Mesoporphyrin Derivatives in Liposomes Explored with Conventional and Site-Selective Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*. 2012,116:9644-9652.

Bocskei-Antal, B., Zolcsak, A., Kosa, N., Voszka, I., Csik, G., Toth, K., Herenyi, L. Comparison of light-induced formation of reactive oxygen species and the membrane destruction of two mesoporphyrin derivatives in liposomes. *Scientific Report* 2019,9:11312.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Herényi Levente docensúrnak, aki annak idején felkeltette a figyelmem a spektroszkópia iránt, határtalan türelmével vezetett engem végig a kutatói munka olykor rögös útjain és mindig fordulhattam hozzá problémáimmal, szakmai kérdéseimmal méréseim és a dolgozatom írása közben.

Köszönettel tartozom Dr. Fidy Judit professzor asszonynak és Dr. Kellermayer Miklós professzor úrnak, akik vezetése alatt a tudományos munkámat a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben végezhettem és támogatták szakmai előrehaladásomat nívós nemzetközi konferenciákon való részvételem segítése által.

Köszönöm Dr. Veres Dániel segítségét, aki megismertette velem a labormunka, köztük a liposzóma preparálás és a spektroszkópiai technikák alapjait, fortélyait és tudományos munkám kezdetén nyújtott támogatását.

Köszönöm egykori TDK hallgatóim Dr. Nagy Bianka, Dr. Tóth Szilvia és Dr. Zolcsák Ádám – aki későbbi szerzőtársam is egyben - munkáit, akik lelkesedésükkel, üde egyéniségükkel szint vittek az olykor monoton labormunkába és szakmai eredményeikkel növelték közös munkánk értékét.

Köszönet illeti valamennyi szerzőtársamat, közülük is Dr. Voszka István docens urat, a liposzómamembránok fizikai működésének megértésében nyújtott segítségért, Dr. Csík Gabriella címzetes professzor asszonyt amiért megismertette velem a fotodinamikus terápia elvi alapjait és Dr. Módos Károly docens urat a DLS technika használatának és elvi alapjaink a megtanításáért.

Köszönöm Dr. Tóth Katalinnak, hogy Heidelbergben a DKFZ Biophysics of Macromolecules intézetében végezhettem FCS méréseimet, megismertette velem ezt a technikát és a közös cikkünk írásában nyújtott segítségét.

Mivel egy kutatás sem létezhetne a háttérben megbúvó megfelelő szakmai segítség, támogatás nélkül, így köszönöm a Biofizikai és Sugárbiológia Intézet valamennyi laborasszisztensének és dolgozójának a munkám során nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Derka István bűzdítását, technikai tanácsait és Dr. Kiss Balázs docens úr szakmai, stílusztikai segítségét, amit dolgozatom készítése közben nyújtottak.

Köszönöm családomnak a dolgozatom írása közben adott támogatását.