

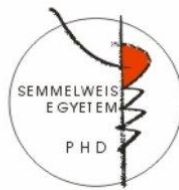
# **A fényérzékenyítők elhelyezkedése a membránokban és szerepük a fotodinamikus reakciókban**

Doktori Tézisek

**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

# **1. BEVEZETÉS**

## **1.1. A fotodinamikus terápia**

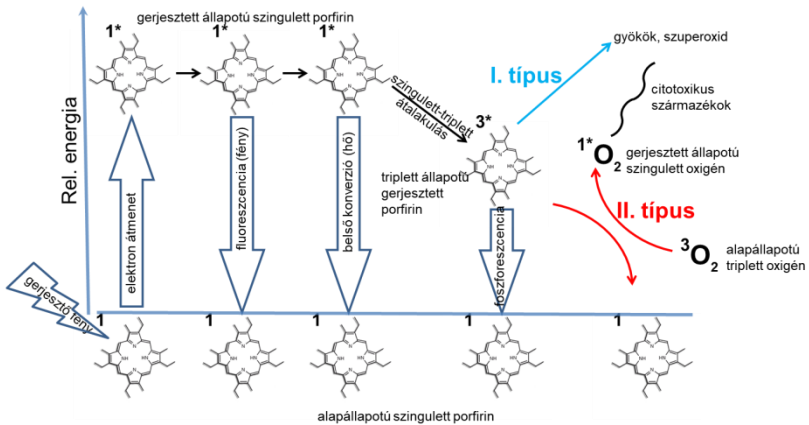
A fotodinamikus reakciók alkalmazása ma már széles körben elterjedt és az orvostudomány számos területen választja kezelésként. A lokális fotodinamikus terápia (PDT) egy non- invazív terápiás lehetőség, amely használata napjainkban is egyre jobban nő.

A PDT során úgynevezett fényérzékenyítőt (a leggyakrabban egy porfirinszármazék) juttatnak a véráramba, amely kémiai tulajdonságai (vagy vívómolekulák) 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. A fotodinamikus terápia hatásmechanizmusa

A fotodinamikus terápia során az érintett sejtekhez kötődött úgynevezett fényérzékenyítőkből megfelelő hullámhosszúságú fény általi gerjesztés hatására fotokémiai reakciók mennek végbe. A fényérzékenyítő a gerjesztett tripllett állapotából ezt követően kétféle reakcióúton mehet keresztül. (1. ábra)



**1. ábra A fotodinamikus terápia során végbemenő fotofizikai és fotokémiai mechanizmusok.** Az ábrán lévő számok a molekulák spinállapotát jelölik (1-szingulett, 3-tripllett), 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.

**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 tripllett 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.

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. 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 hullámhosszúságú (>800nm) fény pedig azért nem megfelelő, mert a fotonok nem rendelkeznének elegendő energiával ahhoz, hogy a fényérzékenyítők gerjesztett állapotba kerüljenek a további reakciók végbemeneteléhez. Mindemellett kívánatos, hogy a fényérzékenyítők abszorpciók együtthatója kellően nagy legyen az alkalmazott gerjesztési hullámhosszon, így minimalizálhatjuk a hatás eléréséhez szükséges anyag mennyiségét.

## 2. CÉLKITÚZÉS

Mivel a fotodinamikus terápia hatásosságát, vagyis a szingulett oxigén és más reaktív oxigén származékok (ROS) élettartamát, reakcióképességét és a mennyiségét is nagyban befolyásolja a képződés helye, így nélkülözhetetlen a fényérzékenyítők sejtekben való elhelyezkedésének és megoszlásának a pontos ismerete.

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 kettősréteghez való kötődésüket illetve elhelyezkedésüket? Pontosan milyen helyzetben találhatók 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?

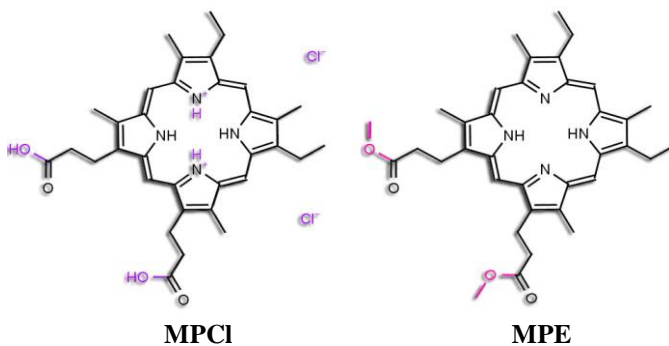
A feltett kérdések megválaszolásához az optikai spektroszkópiai módszerek közül a konvencionális szobahőmérsékleti emissziós illetve abszorpciós spektroszkópia mellett még olyan unikális metodikákat is felhasználtam, mint az alacsony hőmérsékletű, energiaszelektív nagyfelbontású fluoreszcencia spektroszkópia, az FLN és a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia, az FCS. A liposzómák méretének meghatározására dinamikus fényszórásmérést, DLS, használtam.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. A modellrendszer

A sejtmembránban bekövetkező változások tanulmányozásához egy illetve többkomponensű kis unilamelláris liposzómákat (SUV) 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 vettek részt a DPPC mellett a membránok felépítésében. A liposzómák készítése vékonyréteg hidratációs technikával majd azt követően ultrahang besugárzással illetve extrudálással történt.

Az előállított sejtmembrán modellekben fényérzékenyítőként kétfajta mezoporfirin alkalmaztam, mezoporfirin IX dihidro-kloridot (MPCl) és mezoporfirin IX dimetil-észtert (MPE) (2. ábra) - ezekre a későbbiekben a megadott rövidítésekkel hivatkozom.



2. ábra A felhasznált fényérzékenyítők szerkezete

### **3.2. A liposzómák épségének a vizsgálata (DLS)**

A liposzómák épségének, homogenitásának a vizsgálatára a munkafolyamat minden fázisát követően dinamikus fényszórásmérést (DLS) végeztem. A DLS mérés során a mintákat lézerténnyel (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.

### **3.3. A porfirinkötődés mérése (Fluoreszcencia spektrometria)**

A porfirin molekulák kötődési affinitásának megismerése céljából egy titrációs fluoreszcencia mérést végeztem el. Meghatározott koncentrációban (150 nM) mezoporfirin molekulákat – MPE vagy MPC1 – 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  $\mu$ 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 abszorpciós maximumánál, 397 nm-nél (Soret-sáv), az emissziós spektrum felvétele 600-640 nm közötti tartományban 0,5 nm-es felbontással történt.

### **3.4. A fényérzékenyítők lokalizációjának vizsgálata (FLN)**

A két mezoporfirin molekula membránokon belüli lehetséges elhelyezkedésének, lokalizációjának a meghatározására a nagyfelbontású energia-szelektív fluoreszcencia line narrowing, röviden FLN, spektroszkópiát alkalmaztam.

Az FLN technika segítségével lehetőség nyílik a fényérzékenyítő molekulák egyes vibrációs állapotaink a szelektív gerjeszthetőségére. Ehhez nélkülözhetetlen egy kellően jó felbontást biztosító fényforrás, illetve kriogenikus hőmérséklet (tipikusan  $T < 10$  K) alkalmazása. Ez az alacsony hőmérséklet azt vonja maga után, hogy a molekuláink szerkezeti mozgásai befagyottnak tekinthetők, így az egyes molekula alpopulációk (vibrációs állapotok) elkülöníthetőek. Mivel a molekulák gerjeszthetőségét a molekuláris környezet befolyásolja, így vibrációs állapotokból a lehetséges lokalizációkra is következtetni lehet. Az egyes energiasávokon belüli molekula alpopulációkat az ún. *inhomogén eloszlásfüggvénnyel* (IDF) jellemezhetjük. Esetünkben egy ilyen függvény azt adja meg, hogy a porfirin molekulák mekkora hányada gerjeszthető az adott frekvenciájú fényvel, vagyis az alpopuláció heterogenitását is megkapjuk eredményül. Feltételezve, hogy egy lehetséges környezet egy adott kötőhelyhez tartozik, így a molekulák membránokon belüli elhelyezkedését is leírhatjuk.

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. A végső minták körülbelül 70  $\mu\text{M}$  mezoporfirint és 7 mM foszfolipidet tartalmaztak. A mintakészítést közvetlenül követte az alacsony hőmérsékletű mérés. 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 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 fotonzámláló üzemmódú fotoelektron-sokszorozó rögzítette (Hamamatsu R928P).

A spektrumfelvételt követően az IDF jellemzése a rájuk illesztett Gauss-görbék paramétereivel történt. Az illesztésekhez az Originlab Origin 8.0 szoftvert használtam.

### **3.5. A keletkező ROS kimutatása (Abszorpciós spektrometria)**

A liposzómamembránokban elhelyezkedő mezoporfirin molekulák fotodinamikus aktivációja közben létrejövő ROS kimutatását abszorpciós spektrofotométer segítségével végeztem. Kálium-jodidból ROS hatására trijodid ( $I_3^-$ ) keletkezik ammónium-molibdenát kofaktor jelenlétében. A reakcióban a trijodid mennyisége egyenesen arányos a fotodinamikus reakció során keletkező ROS, főleg szuperoxid ( $^1\text{O}_2$ ), mennyiségével. A trijodid két fő abszorpciós csúccsal rendelkezik (280 nm, 355 nm körül). Ezek közül én a méréseim során 355 nm körüli csúcsot használtam.

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 főlösleges 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 csökkenteni tudtam 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.

A besugárzás hatására keletkezett ROS kimutatását először 6 mintán végeztem el: két mezoporfirin molekulát (MPE, MPCI) a különböző telített lipidekből (DMPC, DPPC, DSPC) előállított liposzómákat tartalmazó mintákhoz adva. Ezt a méréssorozatot 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  $\mu$ M ammónium-molibdenátot tartalmaztak.

### **3.6. A ROS általi membránkárosodás kimutatása (FCS, DLS)**

A ROS liposzómamembrán destruáló hatásának a kimutatására, vagyis a vezikulumok szétesésének a tanulmányozására hidrogén-peroxidot adtam közvetlenül a komplex (telítetlen lipideket is tartalmazó) liposzómákhoz, majd DLS-sel vizsgáltam a méreteloszlás változását. Mivel a kezdeti mérések kivitelezése során az általam használt DLS módszer nem bizonyult kellő érzékenységűnek a fotoindukált membránkárosodás

kimutatására, így ezekhez a méréseket kiegészítettem az érzékenyebb fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) módszerrel is.

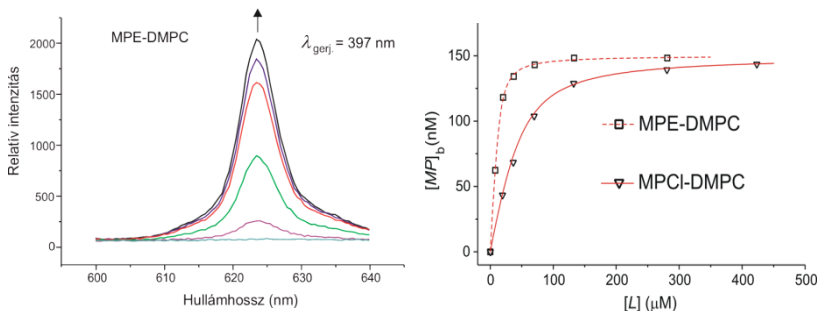
Az FCS kivitelezéséhez egy speciálisan a membránokhoz kötődő festéket – dioktadeciloxakarbocianin-perklorát (DiO) – alkalmaztam. A vizsgálatokhoz DOPC és DPPC tartalmú komplex unilamelláris liposzómákat használtam.

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. Mivel a fókusz 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 fókusz méretének a megállapítása. Esetemben erre a célra Alexa 488 festéket használtam.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A kötődésvizsgálat

Az abszorpciós maximumnál (397 nm) történt gerjesztést követően a lipid kettősrétegbe beépült porfirin molekulák fluoreszcencia intenzitásának változását ábrázoltam 600-640 nm között. 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. (3. ábra)



**3. ábra** A bal oldali rész az MPE-DMPC minták titrációs sorozatát mutatja be. A legelső 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 jobb oldali ábrán a lipidkoncentráció  $[L]$  függvényében ábrázolt kötött mezoporfirin koncentráció  $[MP]_b$  látható a DMPC-ből előállított egykomponensű liposzómák esetében.

A kötődési görbékéből a kötődési paraméterek meghatározása a tömeghatás törvénye alapján történt.

$$n[L]_f [MP]_f = K_d [MP]_b$$

Ahol  $n$  az egy lipidmolekulára eső lehetséges kötőhelyek számát,  $[L]_f$  a szabad lipidmennyiségét,  $[MP]_f$  a szabad mezoporfirin mennyiségét,  $[MP]_b$

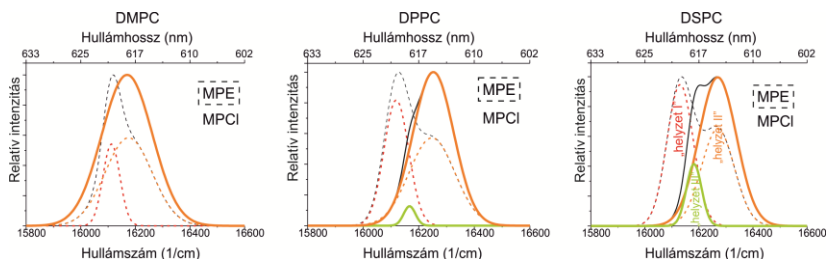
a kötött mezoporfirin mennyiségét jelöli, míg  $K_d$  a disszociációs állandó. A fenti egyenlet átrendezése után a kötődési paraméterek meghatározhatóak, mivel a fluoreszcencia intenzitás és a kötött porfirin anyagmennyiség között egyenes arányosság található. A kötődési paramétereket mindhárom telített foszfatidilkolinból (DMPC, DPPC, DSPC) előállított liposzómátípushoz kötődő mezoporfirinre 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 a következő egyenlet szerint.  $K_b = n / K_d$

	DMPC		DPPC		DSPC	
	MPE	MPCI	MPE	MPCI	MPE	MPCI
$n$	$0,0083 \pm 0,003$	$0,0037 \pm 0,001$	$0,0044 \pm 0,0008$	$0,0026 \pm 0,0005$	$0,0079 \pm 0,0006$	$0,0038 \pm 0,0006$
$K_d$ (nM)	$30 \pm 10$	$52 \pm 16$	$28 \pm 7$	$53 \pm 13$	$33 \pm 9$	$15 \pm 4$
$K_b$ ( $M^{-1}$ )	$2,8 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$

#### 4.2. A fényérzékenyítők membránon belüli elhelyezkedése

Az FLN mérések során eredményül kapott inhomogén eloszlásfüggvényeket a 4. ábrán Gauss-görbék összegeként tüntettem fel. Az eloszlásfüggvények vízszintes tengelyén a hullámszám illetve az ennek megfelelő hullámhossz került feltüntetésre. Az MPCl eloszlásfüggvénye folytonos vonallal, míg az MPE eloszlásfüggvénye szaggatott vonallal van jelezve. Összesen három lehetséges eloszlással lehet a mezoporfirin molekulapopulációkat jellemezni.



**4. ábra Inhomogén eloszlásfüggvények** Az MPCl és az MPE molekulák különböző lipidkörnyezetekben (DMPC, DPPC, DSPC) meghatározott inhomogén eloszlásfüggvénye látható. Az MPCl-hez tartozó görbék folytonos, míg az MPE esetében szaggatott vonallal kerültek ábrázolásra. A piros, zöld és narancssárga az előforduló alpopulációkat jelöli.

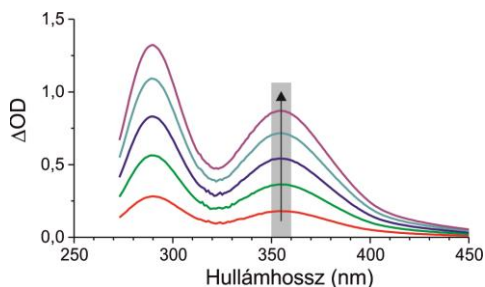
DMPC tartalmú lipidmembránokban az MPCl csak egy egyszerű szélesebb eloszlást mutat (narancssárga). Növelve a liposzómákat felépítő lipidmolekulák hosszát (DPPC, ill. DSPC) az eloszlásfüggvény bal oldalán 16175 1/cm körül egy „váll” jelenik meg (zöld).

A DMPC tartalmú liposzómáknál az MPE-nél egy összetett eloszlásfüggvény látható a jobb oldalon egy markánsabb „vállal”. Ez az eloszlás szintén felbontható két kisebb Gauss-eloszlásra (az ábrán narancssárgával és pirossal jelölve). 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, ill. DSPC) a két eloszlás egyre jobban elkülönül egymástól.

Mivel az eddig taglalt molekulapopulációk elfoglalt különböző molekuláris környezetekből – kötőhelyekből – fakadnak, így ezeket, mint molekuláris „helyzeteket” is lehet azonosítani (ábra jobb oldali részén „helyzet I.”, „helyzet II.”, „helyzet III.” jelölés).

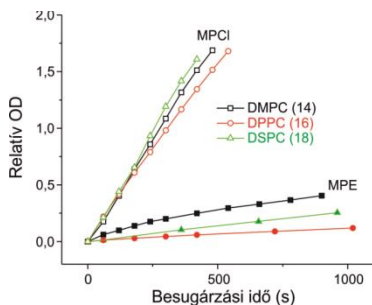
### 4.3. A keletkezett ROS

A keletkezett ROS kimutatása a korábbi fejezetben ismertetett kapcsolt reakció útján történt. A keletkezett trijodid abszorpciós spektrofotometriával egyértelműen meghatározható. Az 5. ábra a trijodid abszorpciós spektrumának a változást mutatja egy perces megvilágítások hatására MPCl-DPPC rendszerben.



**5. ábra Trijodid keletkezés vizsgálata** A spektrumsorozat a trijodid elnyelési spektrumának a megvilágítás általi változását mutatja. A jelzett tartományból számolt átlagos OD egyenesen arányos a keletkezett ROS mennyiségével.

Az optikai denzitás változásának ( $\Delta OD$ ) 350-360 nm közötti hullámhossztartomány hullámhossz szerinti átlagát az idő függvényében ábrázolva előállíthatók a reakciókinetika-görbék (6. ábra).



**6. ábra Trijodid reakciókinetika görbék** Az MPCl molekula mindhárom liposzóma típus esetében nagyobb ROS képző aktivitást mutat, mint az MPE.

Ahogy az a 6. 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 zsírsavláncokból felépülő liposzóma környezetekben a görbék meredekségével jellemezhető (2. táblázat).

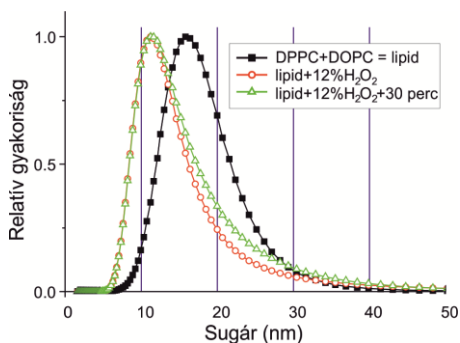
**2. táblázat ROS képző képesség A reakciókinetika görbék relatív meredeksége különböző zsírsavláncú lipidekből előállított liposzómák esetében**

	<i>DMPC</i>	<i>DPPC</i>	<i>DSPC</i>	<i>DPPC<sub>20</sub> + DOPC<sub>80</sub></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

A reakciókinetika görbék relatív meredeksége alapján megállapítható, hogy az MPCl átlagosan tízszer hatásosabb ROS képző, mint az MPE.

#### 4.4. A membránkárosodás

A komplex liposzómák ROS általi károsodását közvetlenül a mintákhoz adott hidrogén-peroxid hatására vizsgáltam DLS segítségével.

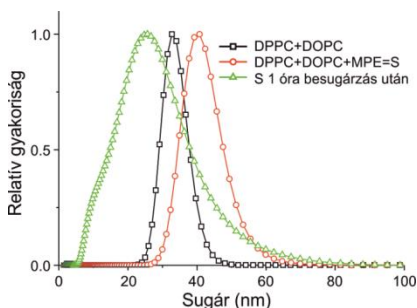


**7. ábra Direkt ROS membránkárosítás** Telítetlen lipideket is tartalmazó membránok károsodása 12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására.



A telített DPPC (80 m/m %) és telítetlen DOPC (20 m/m %) – tartalmazó mintáknál 12 %-os  $H_2O_2$  kezelés hatására a liposzómák szétesését követő kisebb vezikulumok megjelenése volt megfigyelhető a méreteloszlásban (7. ábra zöld és piros görbe).

A direkt membránkárosodás sikeres kimutatását követően fotoindukált károsítás kimutatására DLS illetve FCS módszert alkalmaztam. MPCl molekulák jelenlétében DLS módszerrel nem tudtam kimutatni a fotoindukált membránkárosítást. Azonban MPE molekulák estében a korábban megfigyelt membránkárosodás egyértelmű jelei voltak megfigyelhetők (8. ábra).

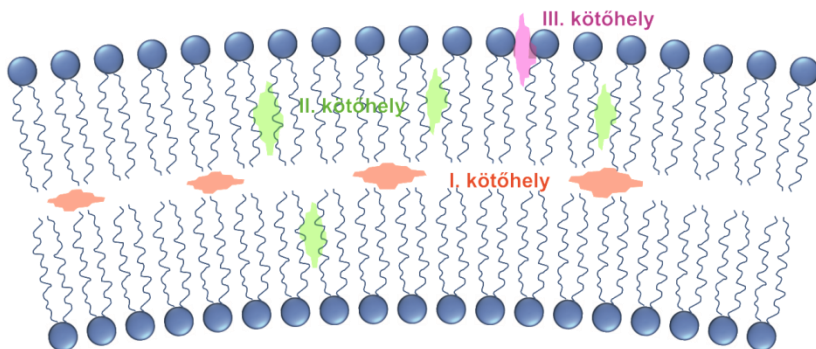


**8. ábra A fotoindukált membránkárosodás** Az ábra a 70/30 m/m %-os DPPC-DOPC liposzómák sugarának relatív gyakorisági eloszlását mutatja. A fekete görbe az MPE hozzáadása előtt, a piros görbe az MPE hozzáadása után, míg a zöld 1 óra besugárzás után szemlélteti a gyakorisági eloszlásokat.

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). 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).

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A titrációs fluoreszcencia mérés segítségével előállított kötődési görbékéből 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. Az FLN mérések alapján előállított IDF görbékéből 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 a zsírsavláncok mentén mélyebben, míg a III. kötőhely a fejcsoportok közelében elhelyezkedő porfirin populációkat jelöli.



**9. ábra** *Porfirin kötőhelyek a membránokban* Az ábra a porfirin molekulák lipidmembránokban elfoglalható lehetséges kötőhelyeit szemlélteti.

2. A két vizsgált mezoporfirin IX származék (MPE, MPCl) fotoindukált ROS képzését telített lipideket (DMPC, DPPC, DSPC) tartalmazó egykomponensű kis unilamelláris vezikulumokban abszorpciós spektrofotometria segítségével tanulmányoztam. A mérési eredmények

alapján az MPCl átlagosan háromszor akkora ROS képző hatással bír, mint az MPE. 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. Amennyiben a molekulák nagyobb hányada található a II. kötőhelyen illetve a III. kötőhelyen, akkor azok nagyobb ROS képző képességet mutatnak a vizsgálat során. A porfirin molekulák lokalizációján kívül az egyes membránokhoz való kötődés mértéke is fontos szerepet játszik a ROS képzésben.

3. 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. 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.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Daniel, V., 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*. 2012,116:9644-52.

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.