

KEMIAN LAITOS  
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

## **BODIPY-yhdisteet syöpäkuvantamisessa**

Kandidaatintutkielma  
14.3.2022  
Nelma Peuhu



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO



## **Tiivistelmä**

Tässä kandidaatintutkielmassa käsitellään BODIPY-yhdisteitä sekä niiden soveltamista syöpäkuvantamisessa. Tutkielmassa esitellään BODIPY-yhdisteiden rakenne ja käsitellään BODIPY-yhdisteiden tärkeimpiä ominaisuuksia. Tutkielmassa perehdytään tarkemmin BODIPY-johdannaisten biokuvantamisessa hyödynnettäviin fluoresoiviin ominaisuuksiin ja yhdisteiden käyttämiseen syöpäsolujen kuvantamisessa. Tutkimusten perusteella BODIPY-yhdisteiden on huomattu olevan merkittävässä roolissa tulevaisuuden biokuvantamisessa.

## **Esipuhe**

Tämä kandidaatintutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella keväällä 2022. Tutkielman kirjallisuuslähteiden etsiminen aloitettiin tammikuussa 2022 ja kirjoittaminen helmikuun alussa 2022. Tutkielma valmistui maaliskuun alussa 2022. Kirjallisuuslähteiden hakuun käytettiin JYKDOK- sekä Web of Science -tietokantoja. Kandidaatinutkielman ohjaajana toimi professori Maija Nissinen.

Haluan kiittää professori Maija Nissistä tutkielmani erinomaisesta ohjauksesta, ammattitaitoisesta otteesta sekä kiinnostavasta aiheesta. Kiitän myös Jyväskylän yliopiston kemian laitosta edistyksellisestä opetuksesta sekä kanssaopiskelijoitani saadusta vertaistuesta.

## Sisällysluettelo

<b>Tiivistelmä</b>	<b>iii</b>
<b>Esipuhe</b>	<b>iv</b>
<b>Sisällysluettelo</b>	<b>v</b>
<b>Käytetyt lyhenteet</b>	<b>vi</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2 Fluoresenssi</b>	<b>2</b>
<b>3 Biokuvantaminen</b>	<b>3</b>
<b>4 BODIPY-yhdisteiden rakenne ja ominaisuudet</b>	<b>5</b>
4.1 BODIPY-yhdisteiden rakenne	5
4.2 BODIPY-yhdisteiden ominaisuudet	6
4.3 BODIPY-johdannaiset	7
<b>5 BODIPY-yhdisteet fluoresoivina väriaineina</b>	<b>10</b>
<b>6 BODIPY-yhdisteet syöpäkuvantamisessa</b>	<b>11</b>
6.1 BODIPY-yhdisteet biokuvantamisessa	11
6.2 Syöpäsolujen kuvantaminen BODIPY-yhdisteillä	14
<b>7 Yhteenveto</b>	<b>17</b>

**Käytetyt lyhenteet**

<b>BODIPY</b>	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diatso-s-indaseeni
<b>DBU</b>	1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni
<b>DDQ</b>	2,3-dikloori-5,6-disyano-4-bentsokinoni
<i>in vivo</i>	Koejärjestely elollisessa ympäristössä
<i>in vitro</i>	Koejärjestely elottomassa ympäristössä
<b>PDT</b>	Fotodynaaminen terapia
<b>PS</b>	Valoherkistin
<b>NIR</b>	Lähi-infrapuna
<b>PAI</b>	Fotoakustinen kuvantaminen

## 1 Johdanto

BODIPY eli dipyrrometeenibooridifluoridi on booridifluorididipyrrinatokompleksi, joka eristettiin johdannaisistaan vuonna 2009.<sup>1</sup> Monet BODIPY-johdannaiset osoittavat voimakasta fluoresenssia, minkä vuoksi niitä voidaan käyttää fluoresoivina väriaineina.

Viimeisten vuosikymmenien ajan BODIPY-yhdisteiden tutkimus on ollut merkittävässä kasvussa. Ensimmäisten BODIPY-yhdisteiden synteesin suorittivat saksalaiset Alfred Treibs ja Franz-Heinrich Kreuzer vuonna 1968.<sup>2</sup> Tämän jälkeen 1980-luvulla löydettiin BODIPY-yhdisteiden käyttö valosähköisinä materiaaleina<sup>3</sup> sekä kiinteinä auringonsäteilyn kerääjinä<sup>4</sup>. BODIPY-yhdisteitä alettiin myöhemmin käyttää myös fluoresoivina väriaineina fluoresenssikuvantamisessa<sup>5</sup> sekä indikaattoriväriaineina sensorisovelluksissa.<sup>6</sup>

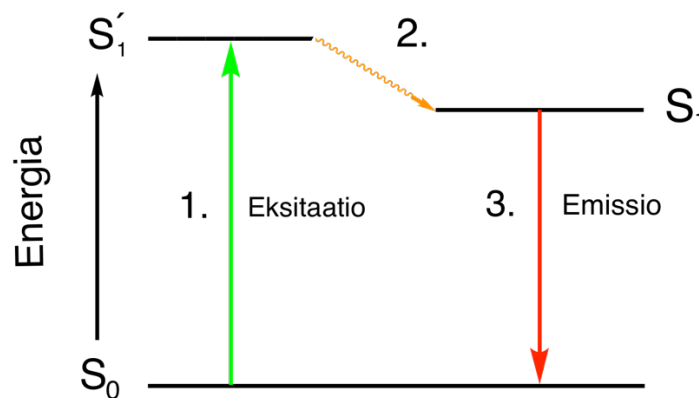
BODIPY-väriaineille on löydetty monia sovelluksia niin biotekniikassa kuin lääketieteessäkin. Biotekniikassa BODIPY-väriaineita on käytetty fluoresoivina merkkiaineina havaitsemaan pienmolekyylejä ja lääketieteessä niiden avulla on onnistuttu kuvantamaan eläviä soluja.<sup>3</sup> BODIPY-väriaineiden monipuoliset sovellukset selittyvät muun muassa niiden neutraalilla kokonaisvarauksella<sup>3</sup> ja poikkeuksellisilla spektroskooppisilla ominaisuuksilla, kuten valostabiilisuudella ja korkealla molaarisella vaimennuskertoimella<sup>7</sup>. Lisäksi BODIPY-väriaineet eivät ole juurikaan herkkiä ympäristön polaarisuudelle tai pH:lle. Näiden merkittävien ominaisuuksien vuoksi BODIPY-väriaineita pidetään potentiaalisina yhdisteinä tulevaisuuden biotutkimuksen kannalta.<sup>5</sup>

Tässä kandidaatintutkielmassa BODIPY-yhdisteitä käsitellään biokuvantamisen näkökulmasta. Tutkielmassa perehdytään BODIPY-yhdisteiden ominaisuuksiin, joita voidaan käyttää hyväksi tulevaisuuden syöpäkuvantamisessa.<sup>4</sup>

## 2 Fluoresenssi

Fluoresenssia esiintyy vain tietyillä molekyyeillä, kuten polyaromaattisilla hiilivedyillä ja heterosykleillä. Näitä fluoresenssiin kykeneviä molekyyeitä kutsutaan fluoroforeksi eli fluoresoiviksi väriaineiksi. Fluoroforit voivat toimia fluoresoivina koettimina, joiden tarkoituksena on reagoida tiettyyn ärsykkeeseen tai paikantaa tietty alue biologisessa näytteessä.<sup>8</sup>

Fluoresenssilla tarkoitetaan ilmiötä, jossa aine ensin absorboi valoa tai muuta sähkömagneettista säteilyä, ja sen jälkeen emittoi matalaenergisempää valoa, jolla on suurempi aallonpituus.<sup>9</sup> Fluoresenssi on kolmivaiheisen prosessin tulos, jota havainnollistetaan usein Jablonskin diagrammilla (Kuva 5).<sup>8</sup>



Kuva 5. Jablonskin diagrammi.

Fluoresenssin ensimmäinen vaihe on eksitaatio eli virittyminen, jossa molekyyeitä pommitetaan ulkoisen lähteen fotoneilla, kuten laserilla. Fluorofori absorboi fotonin energian, jolloin syntyy viritystila  $S_1'$ . Toisessa vaiheessa viritystila on olemassa noin 1-10 nanosekuntia, jonka aikana fluoroforin konformaatio muuttuu ja se on altis molekulaarisille vuorovaikutuksille. Tämä aiheuttaa  $S_1'$ -tilan osittaisen hajoamisen ja viritystilan  $S_1$  syntymisen. Osa energiasta palaa takaisin  $S_0$ -viritystilalle. Energian jakautuminen johtuu molekyylien törmäyksistä sekä fluoresenssiresonanssista. Kolmannessa vaiheessa fotonin energia emittoituu, jonka seurauksena fluorofori palaa takaisin perustilalle  $S_0$ . Fluoresenssin toisessa vaiheessa tapahtuvan energiahäviön vuoksi emittoituneen fotonin energia on pienempi ja aallonpituus suurempi kuin absorboituneen fotonin. Absorptio- ja emissiofotonien energia- tai aallonpituuseroa kutsutaan Stokes-siirtymäksi. Fluoresenssikvanttisaannolla kuvataan



fluoresenssissa emittoituneiden fotonien lukumäärän suhdetta absorboituneiden fotonien lukumäärään. Fluoresenssikvanttisaanto kuvaa siis näiden kahden prosessin laajuutta.<sup>8,9</sup>

### 3 Biokuvantaminen

Biokuvantaminen on prosessi, jossa elävien solujen biologista aktiivisuutta visualisoidaan tietyllä ajanjaksolla.<sup>10</sup> Pieniin molekyyliin perustuvista fluoresoivista koettimista on tullut korvaamattomia työkaluja modernissa biologiassa, erityisesti biokuvantamisessa, sillä ne tarjoavat tietoa molekyylien sijainnista ja määrästä ilman näytteeseen käytettävää geenitekniikkaa. Biologisen aktiivisuuden tutkimisessa voidaan käyttää fluoresoivia koettimia paikantamaan tiettyä aluetta biologisessa näytteessä.<sup>11</sup> Biologisista kudoksista emittoituvat signaalit voivat tarjota molekyyli-tietoa erilaisista fysiologisista ja patofysiologisista prosesseista.<sup>12</sup>

Optinen kuvantaminen on yksi tärkeimmistä biolääketieteellisessä tutkimuksessa käytettävistä tekniikoista, sillä sen avulla saadaan vastauksia makro-, mikro-, ja nanomittakaavan elämästä. Optisessa kuvantamisessa kuva muodostetaan säätämällä eksitaatiovaloa ja havaitsemalla valon ja kudosten vuorovaikutuksista syntyviä signaaleja. Optisessa kuvantamisessa käytettävien väriaineiden vaatimukset ovat nousseet biokuvantamisen viimeaikaisen kehityksen myötä. Väriaineiden haluttuihin ominaisuuksiin lukeutuvat hyvä liukoisuus, kemo- ja valostabiilisuus, korkea kirkkaus solun sisällä ja vähäinen sytotoksisuus.<sup>13</sup>

Optista kuvantamista varten väriaine kuljetetaan solujen sisälle käyttämällä vektoria, joka helpottaa sisäänkäyntiä soluihin ja edistää selektiivistä paikallistamista tietyssä organelissa.<sup>13</sup> Fluoresoiva väriaine voidaan kiinnittää kohteeseen vasta-aineen, aptameerin, peptidin tai pienen ligandin avulla, jotka pystyvät selektiivisesti ohjaamaan signaalintyösköön kohteeseen.<sup>14</sup> Vaihtoehtoisesti väriaineen kemiallista rakennetta voidaan muokata soluihin tunkeutumiselle suotuisaksi.<sup>13</sup> Fluoroforin kirkkaus määrittää havaitun signaalin intensiteetin ja herkkyuden, joiden avulla fluoroforin absorptiokerroinkin määrittyy. Liittämällä kohdennettavaan aineeseen useampi kuin yksi fluoresoiva väriaine, absorptiokerroimen arvoa ja siten kirkkautta voidaan kasvattaa.<sup>14</sup>

Perinteinen optinen kuvantaminen tapahtuu näkyvän valon spektrialueella, 400-650 nm. Näkyvän valon aallonpituusalueella joissakin molekyyliissä, kuten vedessä, rasvoissa ja hemoglobiinissa esiintyy laajaa sirontaa ja absorptiota, mikä voi aiheuttaa valon vaimenemista. Lisäksi näkyvän valon aallonpituudella joillakin molekyyleillä voi esiintyä kuvantamista häiritsevää autofluoresenssia. Näkyvän valoon verrattuna lähi-infrapunavalo (650-1700 nm) pystyy tunkeutumaan paremmin elimistöön, etenkin syvemmälle ihoon ja vereen, kun valoa siroaa ja absorboituu vähemmän. Tämän takia lähi-infrapuna-alueen biokuvantamiseen kehitetään koettimia, joita voidaan käyttää syvällä sijaitsevien ja herkkien kudosten reaaliaikaiseen kuvantamiseen erilaisissa biologisissa prosesseissa ja näytteissä.<sup>15</sup>

Lähi-infrapunakuvantamisessa käytettävät fluoresoivat koettimet ovat pienmolekyylijä, joita voidaan helposti ankkuroida tiettyihin kohdennettavan aineen kohtiin. Pienmolekyylikoettiin perustuvan optisen kuvantamisen etuja ovat koettimien monipuoliset rakenteelliset muokkausmahdollisuudet, alhainen sytotoksisuus sekä hyvä solun läpäisevyys. Koettimien rakenteellisella muokkauksella absorptio- ja emissioaallonpituuksia voidaan laajentaa lähi-infrapuna-alueelle, jolloin myös kuvantamisen kontrasti paranee.<sup>12</sup>

Biokuvantamista on myös mahdollista toteuttaa hyödyntäen fotoakustista kuvantamista (PAI), joka on viime aikoina noussut esille uutena elävien kudosten poikkeavuuksien kuvantamismenetelmänä. Fotoakustinen kuvantaminen perustuu fotoakustiseen ilmiöön, jossa ultraääni ja optinen kuvantaminen yhdistyvät. Kudokseen lähetetään laser-pulsseja, joista osa absorboituu ja osa muuttuu lämmöksi. Hetkellisen lämpölaajenemisen johdosta kudoksesta emittoituu ultraääntä. Fotoakustinen kuvantaminen on osoittautunut tehokkaaksi työkaluksi verisuoniverkoston visualisointiin, veren happisaturaatiotasojen määrittämiseen sekä ihosyövän diagnosointiin. Fotoakustisen kuvantamisen ongelmiin kuuluu valon intensiteetin vaimeneminen suurissa kudossyvyyksissä, minkä vuoksi muiden syöpien diagnosointi tuottaa hankaluuksia. Tehokas tapa minimoida valon intensiteetin vaimenemista on käyttää virityslaseria, joka toimii lähi-infrapuna-alueella (700-1000 nm). Tällä alueella kuvattavilla kudoksilla on suhteellisen pieni absorptio ja sironta.<sup>16</sup>

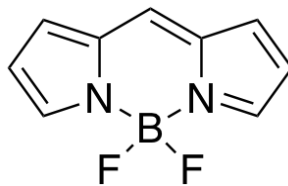
Fotoakustisen kuvantamisen parantamiseksi on kehitetty erilaisia absorboivia aineita, jotka koostuvat hiilinanomateriaaleista, nanopartikkeleista tai pienimolekyyllisistä väriaineista. Monet nanorakenteisiin perustuvat aineet ovat erittäin lupaavia materiaaleja fotoakustiseen kuvantamiseen, mutta niiden aineenvaihduntaominaisuudet ja mahdollinen pitkäaikainen

myrkyllisyys kehossa ovat vielä tutkinnan alla. Pienimolekyylisiä väriaineita taas rajoittaa lähi-infrapuna-alueella absorboivien väriaineiden saatavuus.<sup>16</sup>

## 4 BODIPY-yhdisteiden rakenne ja ominaisuudet

### 4.1 BODIPY-yhdisteiden rakenne

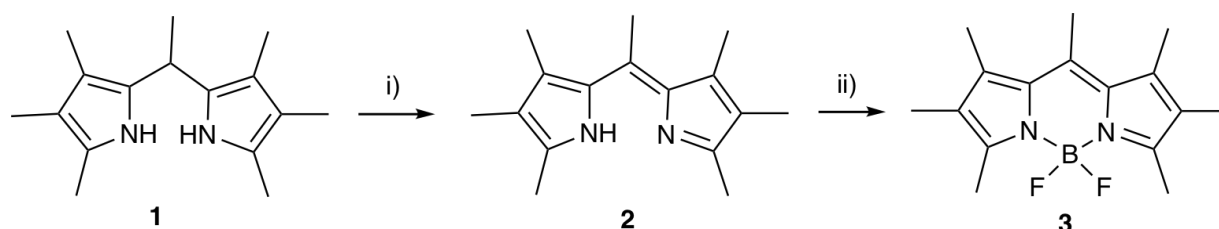
BODIPY eli 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diatso-s-indaseeni (Kuva 1) on väriaine, jossa booridifluoridiryhmä (BF<sub>2</sub>) on kiinnittynään dipyrrometeeniryhmään (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>). Tämän vuoksi yhdistettä kutsutaan myös dipyrrometeenibooridifluoridiksi. BODIPY-yhdisteet koostuvat kahdesta pyrroliryhmästä, jotka ovat kiinnittyneet meteenisillalla ja booriatomilla, johon heteroatomit koordinoituvat. Molekyylillä on tasomainen lukuun ottamatta kahta fluoriatomia, jotka sijaitsevat kohtisuorassa hiilirunkoon nähden. BODIPY:n tasomaisuuden aiheuttavat molekyylin konjugoituneet π-elektronit, jotka tekevät rakenteesta jäykän. Molekyylin heteroatomit (boori, typpi ja fluori) ovat polaarisia, mikä aiheuttaa molekyylin rungon heikon polarisoitumisen. Heikosti polarisoituneen rakenteen vuoksi molekyylin eri kohdissa on nukleofiilisiä ja elektrofiilisiä reaktiokohtia. Nämä reaktiokohdat mahdollistavat substituutioreaktiot suoraan BODIPY-molekyylin hiilirunkoon. Huoneenlämpötilassa BODIPY esiintyy stabiilina punaisena kiteisenä aineena. Kooltaan BODIPY-molekyylillä on suhteellisen pieni.<sup>1,17</sup>



Kuva 1. BODIPY:n (dipyrrrometeenibooridifluoridi) molekyylirakenne.

BODIPY voidaan valmistaa monien eri reaktioreittien kautta, jotka kaikki kuitenkin perustuvat pyrrolikonkondensaatioon aldehydien kanssa. Eroavaisuudet reaktioreiteissä johtuvat syntetisoidun tuotteen halutuista symmetrisistä ja epäsymmetrisistä substituutorakenteista.<sup>17</sup> BODIPY ja sen yleiset johdannaiset voidaan syntetisoida käsittelemällä dipyrrometeeniä

booritrifluorididietyylieteraattilla ( $\text{BF}_3 \cdot (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ ) tertiäärisen amiinin, kuten trietyyliamiinin tai 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eenin (DBU) läsnä ollessa. Koska dipyrrometeenejä voidaan valmistaa helposti hapettamalla dipyrrometaaneja käyttäen hapettimena 2,3-dikloori-5,6-disyano-4-bentsokinonia (DDQ) tai p-kloorianiilia, voidaan monia BODIPY-johdannaisia syntetisoida tällä menetelmällä (Kuva 2).<sup>1</sup>



Kuva 2. BODIPY:n synteysi. Ensimmäisessä vaiheessa dipyrrometaanin (yhdiste 1) hapetus dipyrrometeeniksi (yhdiste 2) olosuhteissa i) DDQ tai p-kloorianiili. Toisessa vaiheessa BODIPY:n (yhdiste 3) synteysi reaktio-olosuhteina ii)  $(\text{BF}_3 \cdot (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O})$  tai DBU.<sup>1</sup>

## 4.2 BODIPY-yhdisteiden ominaisuudet

Viime vuosina BODIPY-yhdisteet ovat kasvattaneet suosiotaan fluoresoivina väriaineina, sillä niillä on havaittu olevan haluttuja kemiallisia<sup>18</sup> sekä valofysikaalisia<sup>19</sup> ominaisuuksia. Näitä erinomaisina pidettyjä valofysikaalisia ominaisuuksia ovat muun muassa hyvä valostabiilisuus<sup>7</sup>, korkea absorptiokerroin<sup>18</sup>, kapea absorptio- ja emissiovyö<sup>20</sup>, korkea fluoresenssikvanttisaanto<sup>18</sup>, terävä intensiteettiipiikki<sup>21</sup> ja pieni Stokes-siirtymä<sup>22</sup> eli absorptio- ja emissiospektrien intensiteettimaksimien välien ero.

BODIPY-yhdisteiden kapea emissiovyö aiheuttaa korkeamman intensiteettiipiikin kuin monella muulla väriaineella.<sup>8</sup> Esimerkiksi Tram *et al.*:n<sup>1</sup> tutkimuksessa BODIPY-rungon absorptanssimaksimi havaittiin aallonpituudella 497 nm absorptiokertoimen ollessa  $64\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Emissiomaksimin havaittiin olevan aallonpituudella 504 nm, jolloin Stokes-siirtymäksi absorptio- ja emissiomaksimeista laskettiin 7 nm. Korkeasta intensiteettiipiikistä ja absorptiokertoimesta johtuen BODIPY-väriaineet ovat helposti havaittavia. Tutkimuksessa BODIPY:n fluoresenssin eliniäksi saatiin 6,89 ja 3,95 nanosekuntia. Koska BODIPY-yhdisteiden fluoresenssiviritystila on suhteellisen pitkäikäinen, yhdisteitä voidaan käyttää esimerkiksi fluoresenssipolarisaatiomäärittämisessä.<sup>8</sup>

Hyvästä valostabiilisuudesta johtuen BODIPY-yhdisteet eivät reagoi herkästi valossa. Valostabiilisuus on erittäin tärkeä ominaisuus fluoresenssikoettimelle, sillä se lisää yhdisteen käytettävyyttä ja mahdollistaa solun sisällä tapahtuvien dynaamisten tapahtumien havaitsemisen ja valvonnan.<sup>5</sup> Lisäksi BODIPY-yhdisteiden ominaisuudet eivät riipu ympäristön polaarisuudesta ja pH:sta, mikä tekee niistä stabiileja fysiologisissa ympäristöissä.<sup>21</sup>

BODIPY:n hyvät spektroskooppiset ominaisuudet ja yhdistettä viritettäessä syntyvä triplettila mahdollistavat sen muuttamisen fluoresoivasta väriaineesta valotunnistimeksi (PS), joka absorboi valoa ja siirtää energiansa viereiselle molekyyllille. Syntyvä triplettila saa aikaan singlettihapen muodostumisen, mikä johtaa soluvaurioihin. Tämän vuoksi BODIPY-yhdistettä voidaan hyödyntää valodynaamisessa terapiassa (Kappale 6.2).<sup>4</sup> Spektroskooppisten ominaisuuksien lisäksi BODIPY-yhdisteet ovat kemiallisesti kestäviä<sup>4</sup> ja niillä on hyvä liukoisuus moniin orgaanisiin liuottimiin<sup>20</sup>.

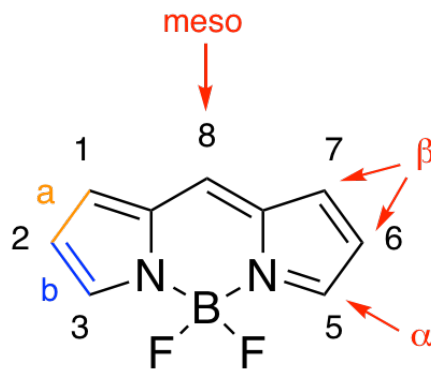
BODIPY-yhdisteitä pidetään tärkeinä väriaineina etenkin nukleotidien, aminohappojen ja pienten molekyylien leimaamisessa, sillä niiden ominaisuudet pyrkivät minimoimaan väriaineen aiheuttaman häiriön. Pienen kokonsa vuoksi BODIPY-yhdisteitä on helppo liittää osaksi muita pieniä molekyyliä, ja ne myös läpäisevät paremmin elävien solujen solukalvon.<sup>8</sup>

### 4.3 BODIPY-johdannaiset

Vaikka jo BODIPY-rungolla itsessään on moninaisia ominaisuuksia, voidaan ominaisuuksia ja sitä myötä BODIPY-yhdisteiden sovelluksia laajentaa ja säätää lisäämällä BODIPY:n perusrunkoon erilaisia substituentteja. Tällaisia substituentillisia BODIPY-yhdisteitä kutsutaan BODIPY-johdannaisiksi.<sup>3</sup> Modifikaatioilla voidaan vaikuttaa esimerkiksi BODIPY-yhdisteiden absorptio- ja emissioaallonpituuteen sekä hydrofiilisuuteen. Parantelemalla valofysikaalisia ominaisuuksia ja liukoisuutta BODIPY-väriaineita voidaan käyttää monenlaisissa eri sovelluksissa,<sup>3</sup> kuten proteiinien ja DNA:n leimaamisessa<sup>21</sup> ja syövän fotodynaamisessa hoidossa.<sup>4</sup>

BODIPY:n modifiointi voi tapahtua useaan eri BODIPY-rungon osaan (Kuva 3). BODIPY-rungon muokkaaminen perustuu rakenteen  $\pi$ -konjugaation laajentamiseen ja muokkaus tapahtuu konjugoituun  $\pi$ -systeemiin.<sup>5</sup> Delokalisoitunutta  $\pi$ -elektronien systeemiä voidaan laajentaa substituutiolla tai fuusioimalla yhteen tai molempiin pyrrolifragmentteihin uusia rengasrakenteita.<sup>23</sup> Substituentteja lisäämällä voidaan siis lisätä systeemin elektroneja luovuttavia ryhmiä, jotka aiheuttavat tavoiteltua punasiirtymää.<sup>24</sup>

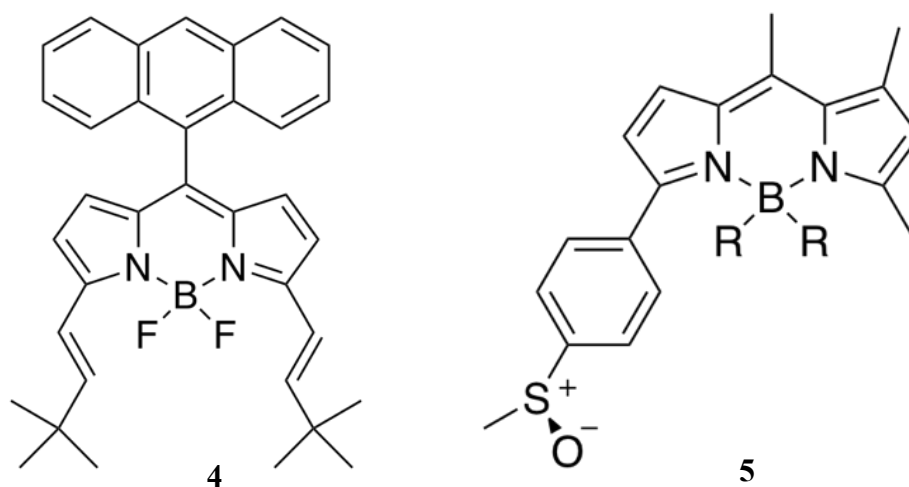
BODIPY:n muokkaamiseen ja  $\pi$ -konjugaation laajentamiseen on olemassa eri strategioita, jotka voidaan ryhmitellä kolmeen luokkaan. Ensimmäinen strategia perustuu BODIPY:n  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja meso-kohtien funktionalisointiin  $\pi$ -konjugaation laajentamiseksi. Tällaista rakennetta kutsutaan ”push-pull” -rakenteeksi. Toinen strategia on aromaattisten yksiköiden substituutio BODIPY:n pyrrolien a- tai b-sidoksiin ja kolmas strategia on meso-hiiliatomin korvaaminen imiinityyppisellä typpiatomilla yhdessä ensimmäisen tai toisen strategian kanssa.<sup>23</sup>



Kuva 3. BODIPY:n rakenne ja modifikaatiopaikat numeroituina.<sup>23</sup>

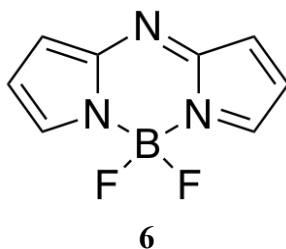
Yksinkertainen tapa laajentaa  $\pi$ -elektronien delokalisaatiota on aromaattisen yhdisteen, alkenyylin tai alkynyylin substituutio  $\alpha$ -kohtiin eli 3- ja 5-hiiliatomeihin. Esimerkiksi 3,3-dimetyyli-1-butenyyli-ryhmän liittäminen BODIPY-yhdisteen 3- ja 5-kohtiin sai aikaan absorptio- ja emissioaallonpituuden siirtymisen lähemmäksi kohti haluttua infrapuna-aluetta sekä paransi yhdisteen liukoisuutta. Paranneltujen ominaisuuksiensa vuoksi tämä väriaine onkin kiinnostava käytettäväksi biokuvauksessa.<sup>5</sup> Myös aryyli-ryhmien substituointi BODIPY-rungon 3- tai 5-hiiliatomeihin aiheutti batokromisen siirtymän (punasiirtymä) rakenteen konjugoidun systeemin laajetessa (Kuva 4). Lisäksi, jos aryyli-ryhmässä oli elektronin luovuttajina toimivia funktionaalisia ryhmiä, punasiirtymä kasvoi entisestään.<sup>24</sup> Aromaattisia

yksiköitä voidaan  $\alpha$ -,  $\beta$ -, ja meso-kohtien lisäksi fuusoida BODIPY-runkoon a- ja b-sidosten kautta. Tällöin aromaattinen yhdiste sulautuu osaksi BODIPY-rakennetta.<sup>23</sup>



Kuva 4. BODIPY **4**, jonka 3- ja 5-kohtiin on substituoitu 3,3-dimetyyli-1-butenyyliryhmä (vasemmalla)<sup>5</sup> ja BODIPY **5**, jonka 3-kohtaan on substituoitu funktionaalisia ryhmiä sisältävä aryyliiryhmä (oikealla)<sup>24</sup>.

Esimerkkinä kolmannesta strategiasta laajentaa  $\pi$ -konjugaatiota on atsa-BODIPY (Kuva 5). Atsa-BODIPY on BODIPY-johdannainen, jonka meso-kohdan hiiliatomi on korvattu imiinin kaltaisella typpiatomilla. Atsa-BODIPY:illä on muuten samat ominaisuudet, kuin tavanomaisella BODIPY:illä, mutta niiden absorptio- ja emissiospektrit ovat siirtyneet punaiselle alueelle, mikä tekee niistä biokuvantamisen kannalta suotuisampia.<sup>23</sup> Atsa-BODIPY:illä on myös sovelluksia valotunnistimina valodynaamisessa terapiassa.<sup>4</sup>



Kuva 5. Atsa-BODIPY:n rakenne.<sup>23</sup>

## 5 BODIPY-yhdisteet fluoresoivina väriaineina

BODIPY:n pienen koon vuoksi se voidaan liittää muihin molekyyliin, kuten proteiineihin ja aminohappoihin.<sup>1</sup> Tätä kutsutaan bioleimaamiseksi.<sup>22</sup> Bioleimaamisen avulla BODIPY-väriainetta voidaan käyttää fluoresoivana koettimena paikantamaan tiettyä aluetta biologisessa näytteessä. Biologisten materiaalien bioleimaamisessa käytettävistä väriaineista juuri BODIPY-fluoroforit ovat saaneet paljon huomiota, ja niistä on tullut kaupallisesti houkuttelevia tuotteita. Tämä johtuu bioleimaamiselle suotuisista ominaisuuksista, kuten suuresta absorptiokertoimesta, korkeasta fluoresenssikvanttisaannosta ja valostabiilisuudesta.<sup>11</sup> Ominaisuuksista on kerrottu lisää kappaleessa 2.2.

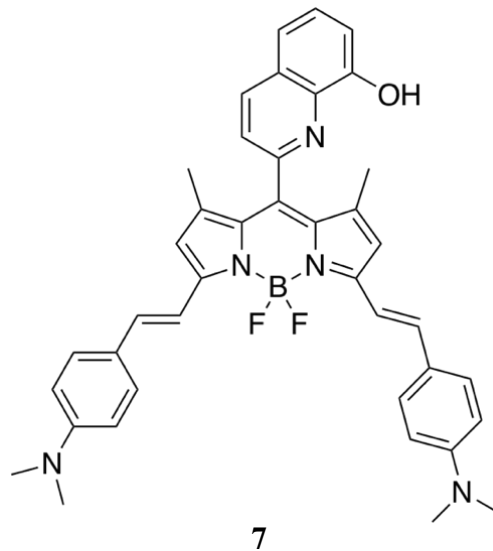
BODIPY-koetin voidaan konjugoida biomakromolekyyliin, kuten DNA:han ja vasta-aineisiin, koska ne sisältävät metyyliesteriryhmiä, jotka voidaan muuttaa happoryhmiksi yksinkertaisella hydrolyysillä.<sup>25</sup> BODIPY-koetin injektoidaan elävään kudokseen, jossa se säilyttää sille ominaisen kirkkauden ja mahdollistaa elion visualisoinnin. Vaikka fluoresoivia koettimia injektoidaan suoraan eläviin soluihin, ne eivät vaikuta merkittävästi elävien organismien käyttäytymiseen.<sup>14</sup>

BODIPY-koettimia käytetään muun muassa monivärileimauksessa, jossa molekyylin leimaamiseen käytetään kahta tai useampaa koetinta. Useamman kuin yhden koettimen käyttö mahdollistaa erilaisten biokemiallisen toimintojen samanaikaisen seuraamisen. Ihanteellisia ominaisuuksia monivärileimaukseen ovat väriaineen osoittama voimakas absorptio sekä hyvin erottuva emissiospektri. Näiden ominaisuuksien sekä kapean emissiovyön vuoksi BODIPY-väriaineet soveltuvat hyvin monivärileimaukseen.<sup>8</sup>

Hyvistä ominaisuuksistaan huolimatta BODIPY:llä ilmenee myös eräs haittapuoli elävien kohteiden sovelluksissa.<sup>5</sup> Normaalin BODIPY-rakenteen absorptio- ja emissioaallonpituus on noin 490-505 nm, mikä vastaa näkyvän valon aallonpituutta.<sup>26</sup> Tällä aallonpituusalueella elävien organismien fluoresenssibiokuvantamiseen vaikuttaa usein negatiivisesti taustahäiriö, itseabsorboituminen sekä sironta. Jotta BODIPY-väriaineiden spektroskooppiset ja valofysikaaliset ominaisuudet olisivat käyttökelpoisia fluoresoiville koettimille elävissä organismeissa, BODIPY-yhdisteiden tulisi absorboida ja emittoida pidemmällä aallonpituuksilla. BODIPY-yhdisteiden tulisi olla helposti säädettävissä infrapuna-alueelle (650-900 nm), koska tällä aallonpituusalueella kudoksiin kohdistuva vaurio sekä itseabsorptio



ovat minimissään.<sup>5</sup> Kehitteillä onkin yhä useampia BODIPY-johdannaisia, jotka absorboivat ja emittoivat korkeammilla aallonpituuksilla. Erityisesti tarvetta on fluoresoiville koettimille, jotka emittoivat yli 800 nm aallonpituudella, sillä elävät kudokset läpäisevät valoa parhaiten tällä aallonpituusalueella.<sup>21</sup> Esimerkiksi Loudet ja Burgess<sup>21</sup> raportoivat erään BODIPY-johdannaisen absorptiomaksimiksi 705 nm ja emissiomaksimiksi 791 nm (Kuva 6).



Kuva 6. Infrapuna-alueella absorboivan ja emittoivan BODIPY 7:n rakenne.<sup>21</sup>

## 6 BODIPY-yhdisteet syöpäkuvantamisessa

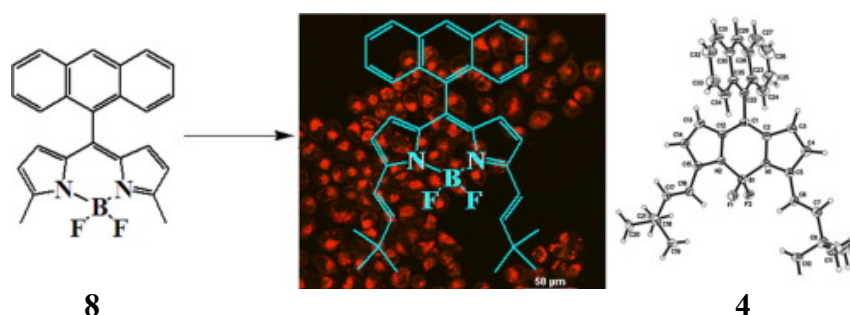
### 6.1 BODIPY-yhdisteet biokuvantamisessa

BODIPY:n mahdollisuudet biokuvauksessa tunnistettiin 1980-luvun jälkeen, jolloin useita uusia BODIPY-pohjaisia väriaineita suunniteltiin ja kaupallistettiin biologista leimausta varten. BODIPY-yhdisteet tulivat biokemisteille ja biologeille tutuiksi fluoreseiinin valostabiilimpana korvikkeena ja niiden suosio biokuvaamisessa käytettävänä työkaluina kasvoi.<sup>11</sup>

BODIPY:t voivat soveltua väriaineiksi fotoakustiseen kuvantamiseen niiden suhteellisen helpon funktionalisointimahdollisuuden, voimakkaan ja säädettävän absorptiospektrin sekä luontaisen bio- ja valonkestävyyden vuoksi. Samoista ominaisuuksista ja pienestä koosta johtuen BODIPY:t tarjoavat mahdollisuuksia niin perinteiseen optiseen biokuvantamiseen kuin

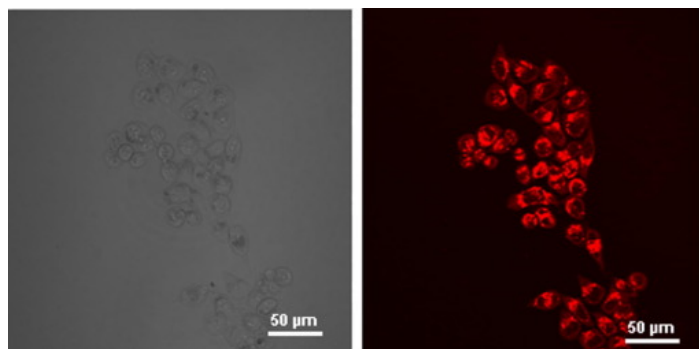
lähi-infrapuna-alueen kuvantamiseen. BODIPY-yhdisteiden absorptiospektrin laajentaminen 600-800 nanometrin alueelle mahdollistaa niiden hyödyntämisen bioanalyysissä ja *in vivo* -kuvauksessa.<sup>12,13,16</sup>

Yang *et al.*<sup>5</sup> tutkivat BODIPY-yhdisteiden käyttöä fluoresoivana koettimena konjugoimalla BODIPY-rungon 3- ja 5-kohtiin 3,3-dimetyyli-1-butenyyli-ryhmän ja käyttämällä syntynyttä BODIPY 4 -yhdistettä (Kuva 7) fluoresoivana väriaineena solukuvauksessa.



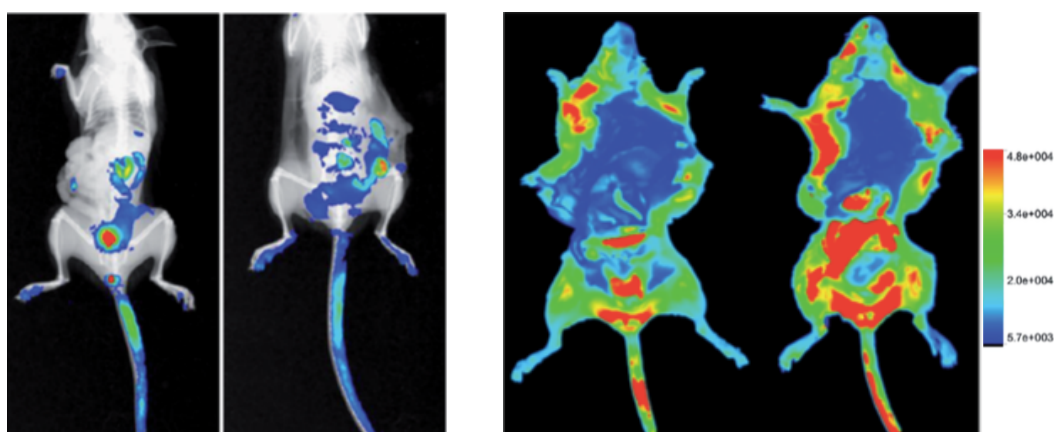
Kuva 7. BODIPY 4 -yhdisteen yksikidediffraktiorakenne (oikealla) ja sen synteesi BODIPY 8 -yhdisteestä (vasemmalla). Keskimmäisessä kuvassa on esitetty BODIPY 4:n rakennekaava ja HeLa-solujen solunsisäinen fluoresenssikuva BODIPY 4:n injektion jälkeen.<sup>5</sup> Reprinted from Elsevier, 25, Yang, L.; Liu, Y.; Liu, W.; Ma, C.; Zhang, C. ja Li, Y., Divinyl BODIPY derivative: Synthesis, photophysical properties, crystal structure, photostability and bioimaging, 5716-1719, Copyright (2015), with permission from Elsevier.

Yang *et al.*:n<sup>5</sup> tutkimuksessa BODIPY 4:ssä (Kuva 7) esiintyi laajentuneesta  $\pi$ -konjugaatiosta johtuvia merkittäviä batokromisia siirtymiä absorptio- ja emissiospektreissä. Solukuvauskokeilla osoitettiin BODIPY 4:n soveltuvan mahdollisesti fluoresoivaksi koettimeksi sen hyvän kuvantamiskontrastin ansiosta. Solukuvaukset toteutettiin HeLa-soluilla (*human epithelial*) *in vitro*, joissa BODIPY 4 -yhdistettä käytettiin punaisena fluoresenssiväriaineena. HeLa-soluja tutkittiin konfokaalimikroskoopilla kahdella eri tavalla. Tutkimuksessa soluissa havaittiin ensin kirkas valo (*bright field*) punaisella alueella (Kuva 8). Lisäksi BODIPY 4 -yhdisteen paikallistaminen HeLa-soluissa suoritettiin käyttämällä fluoresoivia DNA-merkkiaineita (bis-bentsimidi H 33258), jotka värjäävät tiettyjä solunsisäisiä organelleja. Tulokset osoittivat, että BODIPY 4 oli jakautunut solujen sytosoliin, mutta ei tumaan. Tutkimuksen perusteella BODIPY 4 -yhdiste voisi olla varteenotettava kromoforiehdokas biokuvantamiseen ja sitä voitaisiin käyttää myös punaisen alueen biokuvantamisessa tai fotodynaamisessa terapiassa.



Kuva 8. BODIPY 4:n inkubaation jälkeinen HeLa-solujen kirkas kenttä -kuva (vasemmalla) ja solunsisäinen fluoresenssikuva (oikealla).<sup>5</sup> Reprinted from Elsevier, 25, Yang, L.; Liu, Y.; Liu, W.; Ma, C.; Zhang, C. ja Li, Y., Divinyl BODIPY derivative: Synthesis, photophysical properties, crystal structure, photostability and bioimaging, 5716-5719, Copyright (2015), with permission from Elsevier.

BODIPY-koettimen kertymistä ajan suhteen on tutkittu niin elottomassa (*in vitro*) kuin elollisessakin (*in vivo*) ympäristössä. Rodriguez *et al.*<sup>27</sup> tutkivat erään BODIPY-johdannaisen leviämistä elävissä soluissa. BODIPY-johdannaisen leviämiskäyttäytymisen määrittämiseksi tutkimuksessa analysoitiin yhdisteen kertymistä hiirien elimiin ajan suhteen. BODIPY-johdannaisista annettiin sekä suonensisäisesti että suun kautta. Jo 15 minuutin jälkeen elinten välillä huomattiin selkeää eroa kertymissä. Vuorokauden jälkeen BODIPY-koettimen läsnäolo oli mahdollista havaita tutkimuksessa olleiden hiirten elimistössä (Kuva 9).



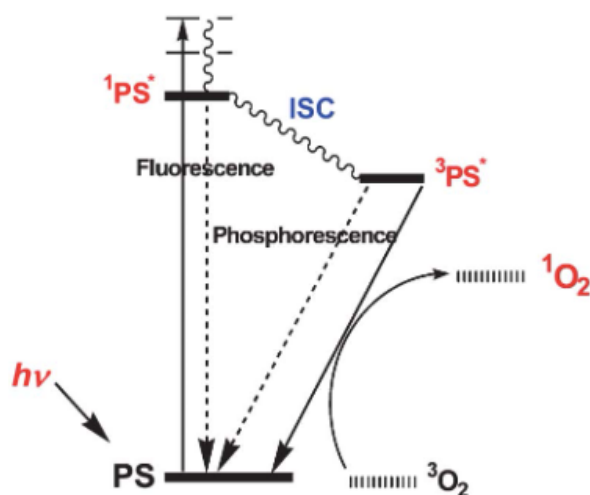
Kuva 9. Vasen: *In vivo* reaaliaikaiset kuvat mustista hiiristä ennen ja jälkeen häntälaskimon kautta annetun BODIPY-injektion. Kuvat on otettu 30 minuuttia (vasen) ja 120 minuuttia (oikea) BODIPY-injektion jälkeen. Oikealla kuvissa *in vivo* -kuva valkoisista hiiristä 60

minuuttia häntälaskimon kautta annetun (vasen) ja suun kautta annetun (oikea) BODIPY-injektion jälkeen.<sup>27</sup> Reproduced from Synthesis and in vivo proof of concept of a BODIPY-based fluorescent probe as a tracer for biodistribution studies of a new anti-Chagas agent, Rodríguez, G.; Nargoli, J.; López, A.; Moyna, G.; Álvarez, G.; Fernández, M.; Osorio-Martínez, C. A.; González, M. and Cerecetto, H., 7, 2022, with permission from the Royal Society of Chemistry.

## 6.2 Syöpäsolujen kuvantaminen BODIPY-yhdisteillä

Fotodynaaminen terapia on osoittautunut tehokkaaksi hoitomuodoksi syöpien ja joidenkin paikallisten sairauksien, kuten silmänpohjan rappeuman ja aktiivisen keratoosin hoidossa. Fotodynaamisen terapian kannalta tärkeitä komponentteja ovat valo, happi ja valoherkistin (PS). Hoitokohtaan, esim. kasvaimeen laitetaan valoherkistintä, jonka jälkeen hoitokohta altistetaan säteilylle reaktiivisten happilajien, erityisesti singlettihapen tuottamiseksi. Happiradikaalien syntyminen vahingoittaa tautikohtaa.<sup>4</sup>

BODIPY-yhdisteillä on merkittävää näyttöä syöpäsolujen kuvantamisessa ja syöpätutkimuksessa sekä syöpähoidoissa, kuten fotodynaamisessa (PDT)<sup>4</sup> ja fototermissä<sup>15</sup> terapiassa. Fotodynaamisessa terapiassa BODIPY-yhdisteitä voidaan käyttää valoherkistiminä niiden erinomaisten optisten ominaisuuksien ja synteettisen monipuolisuuden vuoksi.<sup>4</sup> BODIPY-yhdisteisiin voidaan lisätä substituentteja, joilla on sopiva hapetuspotentiaali.<sup>28</sup> Tällaisilla substituentteilla on elektroneja, jotka valoherkistintä säteilytettäessä synnyttävät suhteellisen pitkäikäisiä triplettitiloja (Kuva 10). Kun nämä triplettitilat ovat vuorovaikutuksessa happimolekyylin kanssa, muodostuu singlettihappi. Singlettihapet aiheuttavat soluvaurioita, niissä kudoksen osissa, joita on altistettu valolle.<sup>28</sup> Tämä prosessi on jaoteltu kahteen tyyppiin toimintaperiaatteensa mukaisesti. Tyypin I prosessissa virittyneen valoherkistimen reaktio substraatin kanssa käynnistää elektroninsiirron, joka johtaa radikaalien muodostumiseen. Radikaalit reagoivat happimolekyylin kanssa tuottaen reaktiivisia happilajeja, kuten superoksidia, vetyperoksidia ja hydroksyyli-ioneja. Tyypin II prosessissa triplettitilan valoherkistin siirtää energiansa happimolekyylille tuottaen näin singlettihapetta.<sup>4</sup>



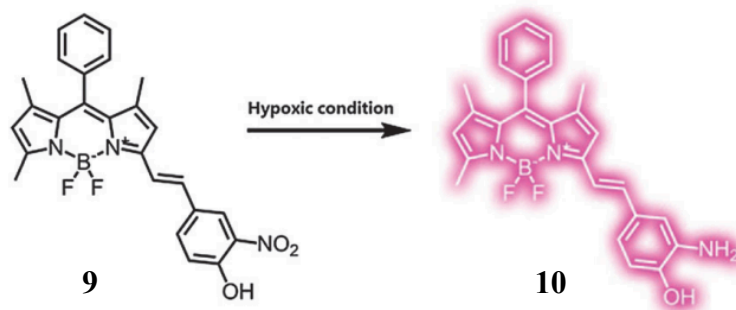
Kuva 10. Fotodynaamisen terapian toimintaperiaate yksinkertaistettuna Jablonskin diagrammilla.<sup>4</sup> Republished with permission of RSC Advances, from Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy, Awuah Ab, S. G. and You, Y., 2, 2022; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Fototermisessä hoidossa sähkömagneettista säteilyä, usein infrapunasäteilyä, käytetään tappamaan kasvainsoluja. Säteilytyksen aikana fototermiset aineet muuttavat fotonin energian lämmöksi, mikä saa aikaan kasvainten solukuoleman. Fototermisessä terapiassa käytettävien fototermisten aineiden absorbanssi on usein lähi-infrapuna-alueella, jotta säteily tunkeutuisi mahdollisimman syväälle kudokseen. Verratessa muihin fototermisiin aineisiin, kuten porfyriiniin ja syaniiniin, BODIPY-yhdisteet omaavat lähi-infrapuna-alueelle säädettävän absorptiospektrin, korkean absorptiokertoimen sekä hyvän valostabiilisuuden. Esimerkiksi atsa-BODIPY:jä on käytetty fotodynaamisessa hoidossa, mutta niiden käyttöä fototermisessä hoidossa on tutkittu vasta vähän.<sup>15</sup>

Fotodynaamisen ja -termisen terapian lisäksi BODIPY-yhdisteillä on muitakin sovellutuksia syöpäkuvantamisessa. Topel *et al.*<sup>22</sup> tutkimuksessaan onnistuivat ensimmäistä kertaa kuvantamaan BODIPY-päällysteisellä magneettisilla nanopartikkeleilla kahdenlaisia ihmissyöpäsoluja, A549 ihmiskeuhkojen adenokarsinoomaepiteelejä ja endometriaalisia adenokarsinomia. Tutkimuksessa valmistettiin magneettisia nanohiukkasia, jotka konjugoitiin BODIPY-runkoon kovalenttisesti. *In vitro* -biokuvaustulokset osoittivat, että hyvistä fluoresenssiominaisuuksistaan johtuen BODIPY-päällysteiset nanohiukkaset voivat helposti tunkeutua elävien solujen sytoplasmaan. Tämän vuoksi ne ovat soveltuvia solukuvaukseen.

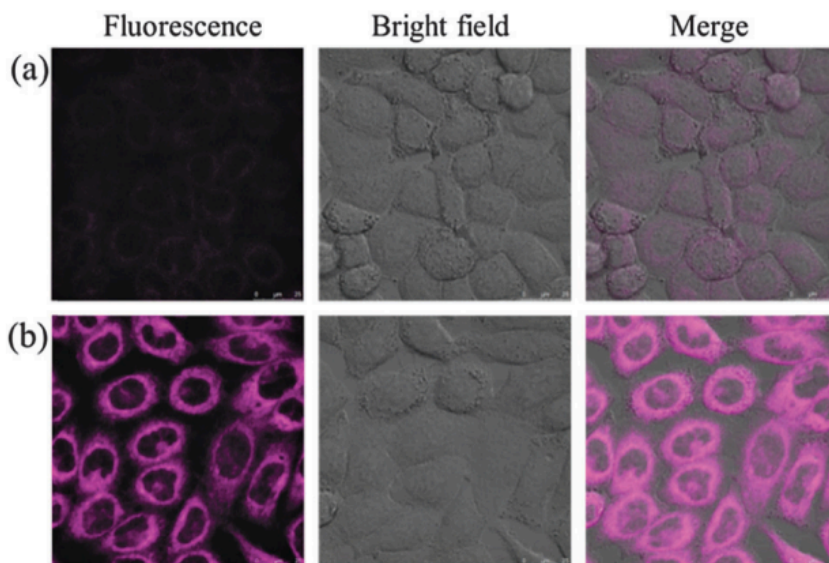
Tutkimuksessa havaittiin myös, että BODIPY-nanohiukkasten superparamagneettisista ominaisuuksista johtuen yhdisteitä voitaisiin käyttää varjoaineena magneettikuvauksessa.<sup>22</sup>

Syöpäkasvainsolujen nopea kasvu johtuu muutoksista sen mikroympäristössä, minkä aiheuttaa usein riittämätön hapensaanti. Hapenpuutteen seurauksena voi olla solujen hypoksia. Hypoksisia soluja voidaan hyödyntää syöpä- ja kasvainkuvantamisessa, sillä ne mahdollistavat kohdennetun kasvainspesifisen terapian. Hypoksiset fluoresoivat koettimet sisältävät usein nitroaryyliryhmän, joka muuttuu NH<sub>2</sub>-ryhmäksi hypoksisisissa olosuhteissa. Wang *et al.*<sup>7</sup> tutkimuksessaan demonstroivat erään BODIPY-yhdisteen (Kuva 11) käyttökelpoisuutta elävissä soluissa kuvantamalla HeLa-soluja hypoksisisissa olosuhteissa.



Kuva 11. BODIPY **9** -yhdisteen rakenne normaaleissa olosuhteissa (95% ilmaa ja 5% CO<sub>2</sub>) ja sen rakenteellinen muutos BODIPY **10** -yhdisteeksi hypoksisisissa olosuhteissa (95% typpeä ja 5% CO<sub>2</sub>).<sup>7</sup> Republished with permission of Chemical Communications, from BODIPY-based “turn-on” fluorescent probe for hypoxic cell imaging, Wang, S.; Liu, H.; Mack, J.; Tian, J.; Zou, B.; Lu, H.; Li, Z.; Jiang, J. and Shen, Z., 51, 2022; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Normaaleissa olosuhteissa BODIPY **9** käsitellyt HeLa-solut eivät osoittaneet juurikaan fluoresenssia. HeLa-soluissa, joita käsiteltiin BODIPY **9** -yhdisteellä hypoksisisissa olosuhteissa havaittiin merkittävää solunsisäistä fluoresenssia (Kuva 12). Fluoresenssi- ja kirkas kenttä -kuvat paljastivat, että fluoresenssi lokalisoitui solujen sytosoleihin. Tulokset osoittavat selkeästi, että BODIPY **9** on solukalvoa läpäisevä ja sopii kiinteiden kasvainten *in vitro* -kuvantamiseen.<sup>7</sup>



Kuva 12. BODIPY 9 inkubaation jälkeiset HeLa-solujen konfokaalikuvat. a) HeLa-solut normaaleissa olosuhteissa. b) HeLa-solut hypoksisissa olosuhteissa.<sup>7</sup> Republished with permission of Chemical Communications, from BODIPY-based “turn-on” fluorescent probe for hypoxic cell imaging, Wang, S.; Liu, H.; Mack, J.; Tian, J.; Zou, B.; Lu, H.; Li, Z.; Jiang, J. and Shen, Z., 51, 2022; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

## 7 Yhteenveto

BODIPY-yhdisteitä pidetään kiinnostavina fluoresoivina väriaineina niiden ainutlaatuisten valofysikaalisten ominaisuuksien vuoksi. BODIPY:n kasvavaa suosiota selittää niiden absorptio- ja emissiospektrin aallonpituuden siirtymä, kun BODIPY-runkoon liitetään muita ryhmiä.<sup>22,23</sup> Näillä pienillä rakenteellisilla muutoksilla BODIPY:istä saadaan monikäyttöisiä fluoroforeja, joilla on laajat sovellusmahdollisuudet ja biokuvantamiseen sopivat ominaisuudet.<sup>8</sup> BODIPY-fluoroforeilla on käyttökohteita esimerkiksi biokemiallisessa leimauksessa, supramolekulaarisissa fluoresoivissa geeleissä, ledeissä ja herkistiminä aurinkokennoissa.<sup>29</sup> Lisäksi BODIPY-fluoroforien käyttöä on tutkittu mahdollisina valoherkistiminä (PS) syöpähoidoissa käytettävässä fotodynaamisessa terapiassa.<sup>4,28</sup>

Tällä hetkellä BODIPY-yhdisteitä ei ole vielä hyväksytty kliniseen käyttöön fotodynaamisessa terapiassa, mutta on monia syitä uskoa tilanteen muuttuvan. BODIPY-pohjaisilla valoherkistimillä on tulevaisuudessa potentiaalia uutena valoherkistinluokkana, joka tarjoaa

monia etuja säädettävien valofysikaalisten ominaisuuksiensa vuoksi.<sup>4,28</sup> Lisäksi fluoresoivien atsa-BODIPY-pohjaisten molekyylien kehittämistä tulisi pitää varteenotettavana mahdollisuutena fototerminen terapian kehittämiseksi.<sup>15</sup> Viimeaikainen BODIPY-yhdisteiden tietämyksen räjähdysmäinen lisääntyminen voisi tarjota ideoita uusien BODIPY-pohjaisten väriaineiden ja valoherkistimien suunnitteluun.<sup>4</sup>

On odotettavissa, että BODIPY:jen tulevaisuuden kehityksen myötä niitä sovelletaan enemmän elävien solujen tutkimuksessa sekä osana valosähköisiä materiaaleja, jotka vaativat hydrofiilisuutta ja käytettävyyttä infrapuna-aallonpituudella. BODIPY:n käyttö valonkeräysjärjestelmissä saattaa lisääntyä, sillä tutkimusalue näyttää kasvavan nopeasti. Tutkimusalalla tarvitaan valostabiileja väriaineita, sillä valonkerääjät ja aurinkopaneelit ovat alttiita valokorroosiolle. BODIPY voisi tarjota ratkaisuja tälle kasvavalle tulevaisuuden tutkimusalalle.<sup>11</sup>



## Kirjallisuusluettelo

1. Tram, K.; Yan, H.; Jenkins, H. A.; Vassiliev, S. ja Bruce, D., The synthesis and crystal structure of unsubstituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY), *Dyes Pigm.*, **2009**, *82*, 392–395.
2. Treibs, A. ja Kreuzer, F.-H., Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, *718*, 208–223.
3. Liu, M.; Ma, S.; She, M.; Chen, J.; Wang, Z.; Liu, P.; Zhang, S. ja Li, J., Structural modification of BODIPY: Improve its applicability, *Chin. Chem. Lett.*, **2019**, *30*, 1815–1824.
4. Awuah Ab, S. G. ja You, Y., Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy, *RSC. Adv.*, **2012**, *2*, 11169–11183.
5. Yang, L.; Liu, Y.; Liu, W.; Ma, C.; Zhang, C. ja Li, Y., Divinyl BODIPY derivative: Synthesis, photophysical properties, crystal structure, photostability and bioimaging, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 5716–5719.
6. Tümay, S. O.; Okutan, E.; Sengul, I. F.; Özcan, E.; Kandemir, H.; Doruk, T.; Çetin, M. ja Çoşut, B., Naked-eye fluorescent sensor for Cu(II) based on indole conjugate BODIPY dye, *Polyhedron*, **2016**, *117*, 161–171.
7. Wang, S.; Liu, H.; Mack, J.; Tian, J.; Zou, B.; Lu, H.; Li, Z.; Jiang, J. ja Shen, Z., A BODIPY-based “turn-on” fluorescent probe for hypoxic cell imaging, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 13389–13392.
8. Johnson, I. D., *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11. painos, Life Technologies Corporation, 2010, ss. 3, 57-58.
9. Tkachenko, N. V., *Optical spectroscopy: Methods and instrumentations*, 1. painos, Elsevier Science & Technology, 2006, ss. 12-13.

10. Terai, T. ja Nagano, T., Fluorescent probes for bioimaging applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 515–521.
11. Ulrich, G.; Ziessel, R. ja Harriman, A., The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed, *Angew. Chem. - Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1184–1201.
12. Li, J.-B.; Liu, H.-W.; Fu, T.; Wang, R.; Zhang, X.-B. ja Tan, W., Recent Progress in Small-Molecule Near-IR Probes for Bioimaging Small-Molecule NIR Probes for Optical Bioimaging, *Trends Chem.*, **2019**, *1*, 224–234.
13. Didier, P.; Ulrich, G.; Mély, Y. ja Ziessel, R., Improved push-pull-push E-Bodipy fluorophores for two-photon cell-imaging, *Org. Biomol. Chem*, **2009**, *7*, 3639–3642.
14. Raj Thapaliya, E.; Zhang, Y.; Dhakal, P.; S. Brown, A.; N. Wilson, J.; M. Collins, K. ja M. Raymo, F., Bioimaging with Macromolecular Probes Incorporating Multiple BODIPY Fluorophores, *Bioconjugate Chem.*, **2017**, *28*, 1519–1528.
15. Liu, Y.; Song, N.; Chen, L.; Liu, S. ja Xie, Z., Synthesis of a Near-Infrared BODIPY Dye for Bioimaging and Photothermal Therapy, *Chem. Asian J.*, **2018**, *13*, 989–995.
16. Ni, Y.; Kannadorai, R. K.; Yu, S. W. K.; Chang, Y. T. ja Wu, J., Push-pull type meso - ester substituted BODIPY near-infrared dyes as contrast agents for photoacoustic imaging, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 4531–4535.
17. Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M. ja Jung, G., Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene, *J Fluoresc.*, **2009**, *19*, 755–758.
18. Wang, L.; Fang, G. ja Cao, D., Highly selective and sensitive detection of F<sup>-</sup> and CN<sup>-</sup> ions simultaneously by a reaction-based BODIPY-containing conjugated polymer, *Sens. Actuators B: Chem.*, **2015**, *221*, 63–74.
19. Clarke, R. G. ja Hall, M. J., Recent developments in the synthesis of the BODIPY dyes, *Adv. Heterocycl. Chem.*, **2019**, *128*, 181–261.

20. Lu, H.; Mack, J.; Yang, Y. ja Shen, Z., Structural modification strategies for the rational design of red/NIR region BODIPYs, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 4778–4823.
21. Loudet, A. ja Burgess, K., BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4891–4932.
22. Topel, S. D.; Topel, Ö.; Bostancioğlu, R. B. ja Koparal, A. T., Synthesis and characterization of Bodipy functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for potential bioimaging applications, *Colloids Surf. B*, **2015**, 128, 245–253.
23. Parisotto, S.; Lace, B.; Artuso, E.; Lombardi, C.; Deagostino, A.; Scudu, R.; Garino, C.; Medana, C. and Prandi, C., Heck functionalization of an asymmetric aza-BODIPY core: synthesis of far-red infrared probes for bioimaging applications, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 884–893.
24. Makukhin, N.; Tretyachenko, V.; Ackob Moskovitz, J. ja Míšek, J., A Ratiometric Fluorescent Probe for Imaging of the Activity of Methionine Sulfoxide Reductase A in Cells, *Angew. Chem.*, **2016**, 55, 12919–12922.
25. Zheng, Q.; Xu, G. ja Prasad, P. N., Conformationally Restricted Dipyrromethene Boron Difluoride (BODIPY) Dyes: Highly Fluorescent, Multicolored Probes for Cellular Imaging, *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 5812–5819.
26. Ni, Y. ja Wu, J., Far-red and near infrared BODIPY dyes: Synthesis and applications for fluorescent pH probes and bio-imaging, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 3774–3791.
27. Rodríguez, G.; Nargoli, J.; López, A.; Moyna, G.; Álvarez, G.; Fernández, M.; Osorio-Martínez, C. A.; González, M. ja Cerecetto, H., Synthesis and in vivo proof of concept of a BODIPY-based fluorescent probe as a tracer for biodistribution studies of a new anti-Chagas agent, *RSC Adv.*, **2017**, 7, 7983–7989.
28. Kamkaew, A.; Hui Lim, S.; Hong Boon Lee, bc; Voon Kiew, L.; Yong Chung, L. ja Burgess, K., BODIPY dyes in photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 77.

29. Doshi, A. ja Jäkle, F., Boron-Containing Polymers, *Compr. Inorg. Chem.*, **2013**, *1*, 861–891.