

KEMIAN LAITOS  
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

## **BODIPY-yhdisteiden antibakteeriset sovellukset**

Kandidaatintutkielma  
20.04.2023  
Sanna Stenfors



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO



## Tiivistelmä

Dipyrrrometeenibooridifluoridi (BODIPY) ja sen johdannaiset ovat fysikaalisilta ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan fluoresoiviksi väriaineiksi eli kromoforeiksi soveltuvia molekyyliä, joilla on myös antibakteerinen vaikutus. Tutkielmassa esitellään BODIPY-yhdisteiden rakenne, erilaisia synteesireittejä sekä BODIPY:iden tärkeimpiä ominaisuuksia. Tutkielmassa keskitytään BODIPY-yhdisteiden antibakteeristen ominaisuuksien parantamiseen sekä yhdisteiden käyttöön antibiootteja korvaavina aineina. Tutkimusten perusteella yksi lupaava vaihtoehto on fotodynaamiseen terapiaan (PDT) perustuvat antibakteeriset aineet.

Tutkielmassa käytettiin alkuperäisen aineiston ja kielen saatavuutta aineiston rajaustekijänä.

Avainsanat: BODIPY, antibakteerisuus, antibakteeriset sovellukset, antibioottiresistenssi, valoherkistysaine, fotodynaaminen terapia, fotodynaaminen antimikrobinen kemoterapia

## **Esipuhe**

Tämä kandidaatintutkielma suoritettiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella keväällä 2023. Tutkielman kirjallisuuskatsauksen tekeminen aloitettiin tammikuun puolivälissä 2023 ja kirjoittaminen helmikuun alussa 2023. Tutkielma valmistui huhtikuussa 2023. Kirjallisuuskatsauksen tekemiseen käytettiin JYKDOK- ja Web of Science-tietokantoja. Kandidaatintutkielman ohjaajana toimi professori Maija Nissinen.

Haluan kiittää ohjaajaani Maija Nissistä mielenkiintoisesta aiheesta, erinomaisesta ohjauksesta sekä kannustuksesta koko prosessin ajan. Haluan osoittaa kiitokseni myös kemian laitokselle hyvästä opetuksesta sekä mahdollisuudesta tutkimusprojektin toteuttamiseen. Kiitän myös väitöskirjatutkija Elsa Korhosta tutkimusprojektin ohjauksesta sekä saadusta avusta ja tuesta sen aikana. Viimeisenä muttei vähäisimpänä, haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni heidän antamastaan kannustuksesta – olette korvaamattomia!

## 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 BODIPY-yhdisteet.....</b>	<b>2</b>
2.1 Rakenne ja synteesi .....	2
2.2 Ominaisuudet.....	4
2.3 Ominaisuuksien parantaminen .....	5
<b>3 BODIPY-yhdisteet ja antibakteerisuus.....</b>	<b>8</b>
3.1 Antibioottiresistenssi .....	8
3.2 Fotodynaaminen terapia (PDT) .....	9
3.3 BODIPY-yhdisteet fotodynaamisessa hoidossa .....	10
3.3.1 Valoherkistimenä toimiminen ja rajoittavat ominaisuudet .....	10
3.3.2 Toiminnan parantaminen .....	11
3.4 Fotodynaaminen antimikrobinen kemoterapia (PACT) .....	13
<b>4 BODIPY-yhdisteiden antibakteerisia sovelluksia .....</b>	<b>15</b>
4.1 MOF-yhdisteet.....	15
4.2 NIR-väriaineet .....	17
4.3 2-(dimetyyliamino)etyylimetakrylaatti (DMAEMA).....	19
4.4 BODIPY-TMA .....	20
4.5 Polyamidoamiinit.....	21
<b>5 Yhteenveto.....</b>	<b>22</b>
<b>Kirjallisuusluettelo .....</b>	<b>23</b>

## Käytetyt lyhenteet

<b>aPDT</b>	Antimikrobinen fotodynaaminen hoito
<b>Ar</b>	Aryyliryhmä
<b>BODIPY</b>	Dipyrrometeenibooridifluoridi, 4,4-difluori-4-bora-3a,4a-diatsa-s-indaseeni
<b>CLSM</b>	Konfokaalinen laserpyyhkäisymikroskooppi
<b>DBU</b>	1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni
<b>DDQ</b>	2,3-dikloori-5,6-disyano-1,4-bentsokinoni
<b>DMAEMA</b>	2-(dimetyyliamino)etyylimetakrylaatti
<b>ISC</b>	Systeemien välinen siirtymä
<i>in vitro</i>	Koejärjestely elottomassa ympäristössä
<i>in vivo</i>	Koejärjestely elollisessa ympäristössä
<b>MIC</b>	Pienin inhiboiva pitoisuus
<b>MOF</b>	Metallo-organinen verkkorakenne
<b>MRSA</b>	Metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>NIR</b>	Lähi-infrapunasäteily
<b>NP</b>	Nanopartikkeli
<b>PAA</b>	Polyamidoamiini
<b>PACT</b>	Fotodynaaminen antimikrobinen kemoterapia
<b>PDT</b>	Fotodynaaminen terapia
<b>PEG</b>	Polyetyleeniglykoli
<b>PS</b>	Valoherkistin
<b>ROS</b>	Reaktiiviset happilajit
<b>SEM</b>	Pyyhkäisyelektronimikroskopia
<b>S<sub>N</sub>Ar</b>	Nukleofiilinen aromaattinen substituutio
<b>SOCT-ISC</b>	Spin-rata-varauksensiirto-systeemin välinen siirtymä
<b>TMA</b>	Trimetyyliamiini

## 1 Johdanto

Treibs ja Kreuzer<sup>1</sup> raportoivat vuonna 1968 ensimmäisen 4,4-difluori-4-bora-3a,4a-diatsa-s-indaseeni-molekyylin. Tämä molekyyli tunnetaan paremmin nimellä BODIPY eli dipyrrometeenibooridifluoridi, jonka johdannaisten on todettu olevan hyvin potentiaalisia fluoresoivia väriaineita. Tutkimuksen lisääntyminen alalla on nostanut molekyylien suosiota ja kasvattanut huomasti tutkimustulosten sekä patenttien määrää.<sup>1</sup> Merkittävä määrä BODIPY-johdannaisia onkin syntetisoitu ja karakterisoitu viime vuosikymmenien aikana.<sup>2</sup>

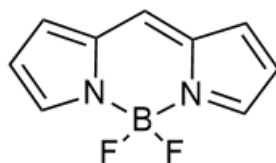
Monilla BODIPY-johdannaisilla on voimakas fluoresenssi ja ne ovat stabiileja biologisissa olosuhteissa. Lisäksi ne ovat kokonaisvaraukseltaan neutraaleja, niiden liukoisuus on hyvä orgaanisiin liuottimiin eivätkä ne muodosta helposti aggregaatteja. BODIPY-johdannaiset ovat myös suhteellisen epäherkkiä pH:n sekä polariteetin muutoksille ja ne kestävät hyvin valoa ja kemikaaleja. Nämä erinomaiset ominaisuudet selittävät BODIPY-molekyylien kasvavan suosion erilaisissa sovelluksissa.<sup>1-3</sup> Perinteisellä BODIPY-kromoforilla on kuitenkin kaksi merkittävää haittaa, jotka ovat alle 600 nm:n emissioaallonpituus ja hydrofobisuus. Kun nämä spektroskooppiset ja fotofysikaaliset ominaisuudet tunnetaan, voidaan kuitenkin suunnitella erilaisiin sovelluksiin sopivia BODIPY-väriaineita. Pienten muutosten tekeminen BODIPY-kromoforin rakenteisiin mahdollistaa niiden ominaisuuksien säätelyn sekä käyttämisen eri sovelluksiin.<sup>3</sup>

Kliinisesti tärkeille bakteereille on tänä päivänä ominaista yksittäinen lääkeresistenssi ja moninkertainen antibioottiresistenssi johtuen mikrobilääkkeiden käytöstä ja väärinkäytöstä viime vuosikymmenien aikana. Lääkeresistentit gram-positiiviset ja -negatiiviset patogeeniset (ns. superbakteerit) ovat resistenttejä jopa viimeisille mahdollisille lääkeaineille, kuten vankomysiinille. Lääkeresistenssi on jatkuvasti kasvava maailmanlaajuinen kansanterveydellinen uhka, joka koskee kaikkia tärkeimpiä mikrobien patogeeneja ja mikrobilääkkeitä. Uusilla vaikutuskohteilla tai erilaisten mekanismien kautta vaikuttavilla antibioottihdokkailla on suurin potentiaali resistenssin voittamiseen.<sup>4,5</sup> Useilla BODIPY-johdannaisilla on havaittu antibakteerista aktiivisuutta gram-positiivisia ja -negatiivisia bakteereita vastaan, minkä seurauksena niitä voidaan hyödyntää antimikrobisissa hoidoissa. Nämä hoidot korvaavat antibiootit eivätkä ole alttiita lääkeresistenssille, mikä parantaa niiden tehokkuutta.<sup>6</sup>

## 2 BODIPY-yhdisteet

### 2.1 Rakenne ja synteesi

BODIPY eli dipyrrometeenibooridifluoridi (Kuva 1) on väriaine, jonka rakenne koostuu dipyrrometeeniryhmästä ( $C_9H_7N_2$ ) ja siihen kiinnittyneestä booridifluoridiryhmästä ( $BF_2$ ). BODIPY-yhdisteet koostuvat nimensä mukaisesti kahdesta pyrroliyksiköstä, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa meteenisillalla ja heteroatomien koordinoimalla booriatomilla. Molekyylin hiiliatomien runko on tasomainen ja heteroatomien (boori, fluori ja typpi) vuoksi hieman polarisoitunut, mikä tarjoaa nukleofiilisiä ja elektrofiilisiä reaktiokohtia eri puolilla molekyyliä. Nämä reaktiokohdat mahdollistavat substituutiot suoraan BODIPY:n hiilirunkoon, ja aiheuttavat ydinyhdisteen alhaisen stabiilisuuden.<sup>7</sup>

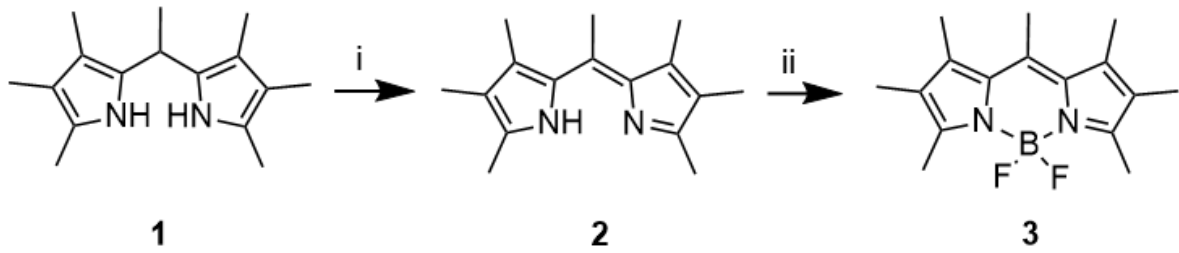


Kuva 1. BODIPY:n molekyyli rakenne.<sup>7</sup>

BODIPY-väriaineiden synteesi voidaan toteuttaa erilaisilla reaktioreiteillä, jotka perustuvat pyrrolin kondensaatioon aldehydien kanssa. Näiden reittien erot riippuvat tuotteen halutuista symmetrisistä tai epäsymmetrisistä substituutorakenteista.<sup>7</sup> BODIPY-johdannaisten yleinen synteesi sisältää dipyrrometeenin (tai dipyrriinin) käsittelyn booritrifluorididietyylieteraattilla tertiääriseen amiiniin, kuten trietyyliamiiniin tai 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eenin (DBU) läsnä ollessa (Kuva 2).<sup>2</sup>

Tram *et al.*<sup>2</sup> onnistuivat syntetisoimaan ensimmäistä kertaa täysin substituomattoman BODIPY:n hapettamalla dipyrrometaania  $-78^\circ C$  lämpötilassa. Tätä reaktiota seurasi booritrifluorididietyylieteraattilla käsittely emäksen läsnä ollessa (Kuva 2). Substituomattoman BODIPY:n valmistamista hankaloitti kuitenkin dipyrrometeenin herkkyys altistua nukleofiilille substituutioreaktioille, minkä seurauksena sen todettiin olevan epästabiili yli  $-40^\circ C$  lämpötiloissa. Täysin substituomaton BODIPY eristettiin 5–10 % saannolla kiinteänä kirkkaan punaisena aineena.<sup>2</sup>

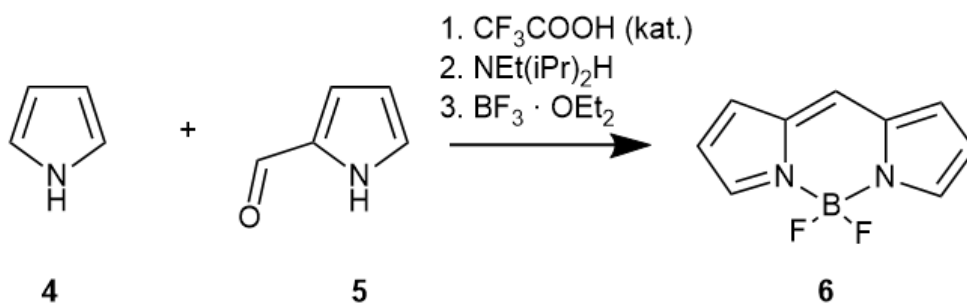




Kuva 2. BODIPY:n synteisi symmetrisen valmistusreitit kautta.<sup>7</sup> Ensin dipyrrometaani (**1**) hapetetaan dipyrrometeeniksi (**2**) DDQ:lla tai p-kloorianiililla (i). Toisessa vaiheessa tapahtuu BODIPY **3**-yhdisteen synteisi reaktio-olosuhteissa ii)  $(\text{BF}_3 \cdot (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O})$  tai DBU.<sup>2</sup>

Koska dipyrrometeenejä voidaan valmistaa helposti hapettamalla dipyrrometaaneja 2,3-dikloori-5,6-disyano-1,4-bentsokinonilla (DDQ) tai p-kloorianiililla, voidaan useita BODIPY-johdannaisia syntetisoida tätä menetelmää käyttäen (Kuva 2).<sup>2</sup>

BODIPY:n ydin (**6**) voidaan valmistaa myös käyttäen epäsymmetristä synteisireittiä (Kuva 3), jolloin vältetään ylimääräinen hapetusvaihe dipyrrometaanista dipyrrometeeniksi. Synteisi sisältää 1H-pyrrolin (**4**) ja 2-formyyliipyrrolin (**5**) suoran kondensaation, jota katalysoi trifluoretikkahappo. Tätä seuraa deprotonointi dietyylidi-isopropyyliamiinilla, jonka jälkeen tapahtuu dipyrrometeenivälituotteen kompleksointi booritrifluorieteraatin kanssa.<sup>7</sup>



Kuva 3. BODIPY-ytimen synteisi epäsymmetrisen valmistusreitit kautta.<sup>7</sup>

Suoraviivaisesta synteisistä huolimatta tuotteen puhdistus on melko haastavaa. Useiden sivutuotteiden, kuten polymeerien, esiintyminen vaatii toistuvia puhdistusvaiheita nopealla suodatuksella sekä pylväskromatografialla. Lisäksi yhdisteen on havaittu olevan lämpötilaherkkä ja korkeat ( $>50\text{ °C}$ ) lämpötilat johtavat nopeaan fluoresenssin häviämiseen.<sup>7</sup>

## 2.2 Ominaisuudet

BODIPY-johdannaiset ovat monipuolisia voimakkaan fluoresenssin omaavia kromoforeja, joilla on laajasti sovelluksia eri aloilla, kuten diagnostisessa kuvantamisessa sekä DNA:n ja proteiinien leimaamisessa.<sup>8</sup> BODIPY:n perusrungon helppo synteesi ja hyödylliset ominaisuudet, kuten näkyvän valon spektrin absorptanssin korkea ekstinktiokerroin (molaarinen absorptiokerroin  $\epsilon$ ) ja voimakas fluoresenssi tekevät yhdisteryhmästä mielenkiintoisen em. sovelluksille. BODIPY:itä on käytetty laajasti myös bioteknologiassa fluoresoivina markkereina, pienmolekyylien havaitsemisessa ja lääketieteessä esim. elävien solujen ja eläinten kuvantamisessa prekliinisissä tutkimuksissa.<sup>3,9</sup>

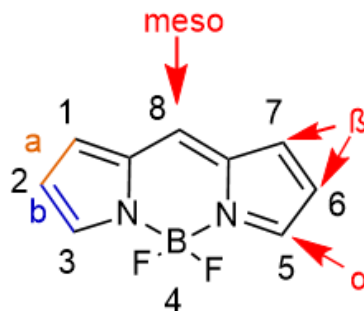
BODIPY-johdannaiset ovat hyviä ehdokkaita valoherkistäjiksi (photosensitizer, PS) erinomaisten valofysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien ansiosta. Hyödyllisiä valofysikaalisia ominaisuuksia ovat mm. erinomainen valostabiilisuus, suuret molaariset absorptiokertoimet sekä reaktiivisten happilajien (reactive oxygen species, ROS) muodostuksen korkeat kvanttisaannot.<sup>10</sup> Valostabiilisuus on erittäin tärkeää käytännön sovelluksille, sillä valostabiilisuus mahdollistaa solujen sisällä tapahtuvien dynaamisten tapahtumien seuraamisen.<sup>11</sup> BODIPY-johdannaisia voidaan hyödyntää valoherkistäjinä fotodynaamisessa terapiassa (photodynamic therapy, PDT), jossa niitä käytetään ympäristön hapen muuttamiseen bakteereja tuhoaviksi reaktiivisiksi happiyhdisteiksi (ROS) erityisesti singlettihapeksi (kappale 3.2).<sup>10</sup>

BODIPY-väriaineiden kemiallinen kestävyys mahdollistaa myös monet synteettiset muutokset mesoaryylisubstituenttiin, kuten hapettumisen, pelkistymisen ja nukleofiilisen aromaattisen substituution ( $S_NAr$ ), ilman väriaineen merkittävää hajoamista. Pienen kokonsa ansiosta BODIPY-yhdisteet läpäisevät solukalvon melko helposti ja pystyvät täten tunkeutumaan soluihin suuria molekyyliä paremmin.<sup>1</sup> Muutokset esim. ympäristön polariteetissa tai pH:ssa eivät vaikuta BODIPY-yhdisteiden ominaisuuksiin, mikä mahdollistaa niiden stabiilisuuden monissa biologisissa ympäristöissä.<sup>2</sup>

## 2.3 Ominaisuuksien parantaminen

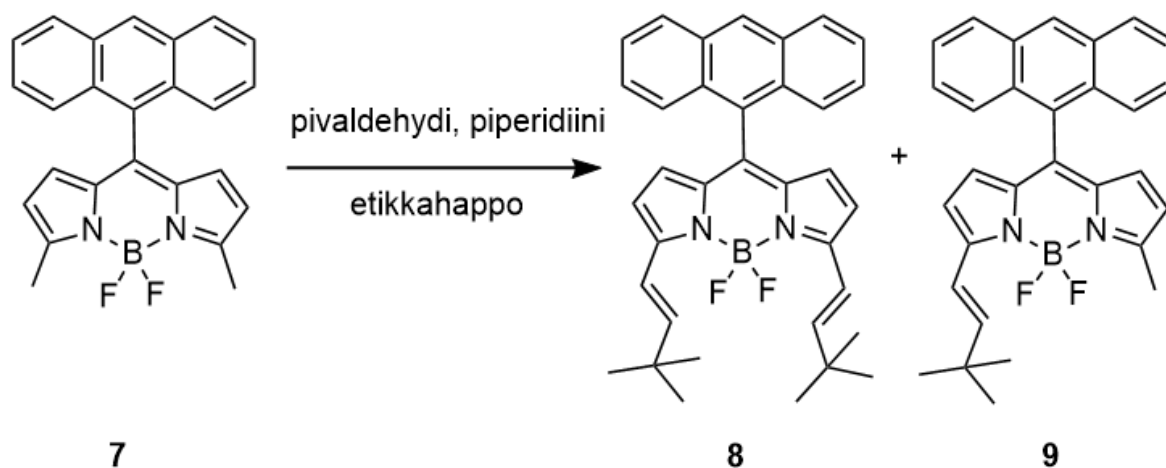
BODIPY-yhdisteiden ominaisuuksia voidaan muokata monipuolisesti ja selektiivisesti modifioimalla niiden ytimiä.<sup>6</sup> BODIPY-yhdisteitä voidaan muokata hyvin monipuolisesti erilaisilla synteisireiteillä, minkä seurauksena spektroskooppisia ja fotofysikaalisia ominaisuuksia voidaan muokata hyvin tarkasti.<sup>1</sup> Yleisiä paranneltavia rajoitteita ovat mm. alhainen singlettihapen muodostus, absorptio näkyvän spektrin lyhyellä aallonpituudella sekä korkea hydrofobisuus.<sup>8</sup> Spektroskooppisia ja fotofysikaalisia ominaisuuksia voidaan hienosäätää lisäämällä erilaisia elektroniheyttä luovuttavia tai puoleensavetäviä ryhmiä BODIPY-ytimen sopiviin kohtiin. Käytännössä minkä tahansa kelaattorin voi kiinnittää lähes mihin tahansa ytimen kohtaan, jolloin spektroskooppisia ja sitoutumisominaisuuksia voidaan muokata.<sup>1</sup>

BODIPY-rakenteen  $\pi$ -konjugaation laajentaminen on usein perustana rungon muokkaamiselle. BODIPY:n modifiointi tapahtuu konjugoituun  $\pi$ -systeemiin ja se voidaan tehdä useaan eri rungon osaan (Kuva 4).<sup>11</sup> BODIPY-ytimen modifioimiseen ja  $\pi$ -konjugaation laajentamiseen käytettävät strategiat voidaan ryhmitellä kolmeen luokkaan. Ensimmäisessä strategiassa tapahtuu funktionalisointi BODIPY-ytimen  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja meso-kohtiin, mikä laajentaa  $\pi$ -konjugaatiota ja luo nk. "push-pull" -rakenteen.<sup>12</sup> "Push-pull"-rakenne kuvaa konjugoituja yhdisteitä, joiden elektroniheyttä luovuttava ryhmä (an electron donor group, D) ja elektroniheyttä puoleensavetävä ryhmä (an electron withdrawing group, A) osoittavat molekyyllinsisäistä varauksensiirtoa (ICT)  $\pi$ -konjugoitun sillan eli D- $\pi$ -A-systeemin kautta.<sup>13</sup> Toinen strategia perustuu BODIPY:n pyrrolien a- tai b-sidoksiin tehtävään aromaattisten yksiköiden substituutioon ja kolmas strategia on meso-hiilen korvaaminen imiinin tyyppisellä typpiatomilla yhdessä ensimmäisen ja/tai toisen strategian kanssa.<sup>12</sup>



Kuva 4. BODIPY-ytimen rakenne ja modifikaatiopaikat.<sup>12</sup>

Yang *et al.*<sup>11</sup> laajensivat tutkimuksessaan  $\pi$ -elektronien delokalisaatiota liittämällä 3,3-dimetyyli-1-butenyyliryhmän BODIPY-yhdisteen 3- ja 5-kohtiin. Lähtöaineiksi vaadittiin BODIPY **7** sekä pivaldehydi. Synteesin avainvaiheessa tehtiin Knoevenagelin reaktio toluenin ja piperidiinin seoksessa, mikä johti purppuranpunaisen disubstitoidun BODIPY-johdannaisen **8** syntyyn saannon ollessa 48 %. Samalla syntyi myös punaista monosubstituoitua BODIPY-yhdistettä **9**, jonka saanto oli 25 % (Kuva 5).<sup>11</sup>

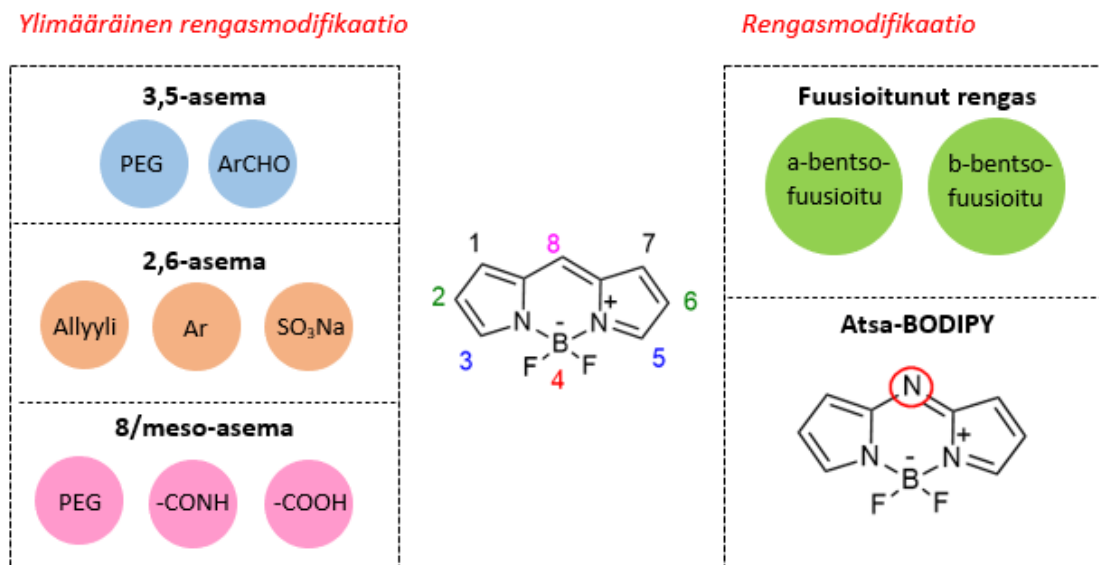


Kuva 5. BODIPY-yhdisteiden **8** ja **9** synteesireitti.<sup>11</sup>

Muokkaamattoman BODIPY-ytimen absorptio- ja emissioaallonpituudet ovat välillä 490–505 nm. Jos BODIPY-yhdisteitä halutaan käyttää fluoresoivina antureina elollisessa ympäristössä tapahtuvassa *in vivo* -tutkimuksessa, yhdistettä tulee muokata niin, että absorptio- ja emissioaallonpituudet siirtyvät kohti punaista spektrialuetta. Tällöin lähi-infrapunavalo (NIR, 650–900 nm) tunkeutuu syvemmälle kudoksiin ilman merkittäviä vaurioita biologisille näytteille ja estää biologisten näytteiden taustan autofluoresenssin aiheuttaman häiriön elävissä järjestelmissä.<sup>3,12</sup>

Koska BODIPY **8** on disubstituoitu, sillä on laajempi  $\pi$ -konjugaatio ja sen absorptio tapahtuu pidemmällä aallonpituudella punaisella alueella. 3,3-dimetyyli-1-butenyyliryhmien liittäminen siirsi absorptio- ja emissioaallonpituutta lähemmäs haluttua infrapuna-alueita sekä paransi yhdisteen liukoisuutta. Koska parempi liukoisuus mahdollistaa valon tunkeutumisen syvemmälle kudoksiin, BODIPY **8** on erityisen hyödyllinen biolääketieteellisissä kuvantamissovelluksissa.<sup>11</sup>

Tiettyjen substituenttien, kuten aryyliyhmiä (Ar) sekä fuusioituneiden rengasjärjestelmien lisääminen BODIPY-ytimeen tuottaa väriaineita, jotka absorboivat pitkän aallonpituuden valoa punaiselta ja NIR-alueelta.<sup>8</sup> Fluoresoivien väriaineiden emissioaallonpituuden lisäämiseen ja NIR-alueelle siirtämiseen käytetään enimmäkseen modifikaatiota 3/5-asemaan. Absorptio- ja emissioaallonpituuden punasiirtymät on lisäksi saavutettu konjugoimalla ryhmäsubstituutio 2/6-asemassa, tekemällä aromaattinen rengasfuusio pyrroliosan kanssa ja atsa-typpiatomisubstituutio meso-asemassa atsa-BODIPY-rakenteen muodostamiseksi (Kuva 6).<sup>3</sup>



Kuva 6. BODIPY-ytimen modifikaatiopaikat ja rakenteeseen tehtäviä muutoksia, jotka johtavat absorptio- ja emissioaallonpituuden punasiirtymiin ja/tai vesiliukoisuuden parantumiseen.<sup>3</sup> Kuva on muokattu lähteen 3 kuvasta 1.

Useimmissa tapauksissa vesiliukoisuuden parantamiseen käytetään polaarisia ryhmiä, kuten negatiivisesti varautunutta sulfonaattia. Ryhmä kiinnitetään BODIPY-rungon 2/6-asemaan, jolloin BODIPY:n hydrofobisuus vähenee. Monia vesiliukoisia BODIPY-johdannaisia on onnistuttu valmistamaan lisäämällä mm. polyetyleeniglykoliketjuja (PEG), nukleotideja, tai betaiiniosia BODIPY:n perusrunkoon. Modifikaatioilla 8/meso-asemiin on hyvin pieni merkitys absorptio- ja emissioaallonpituuksiin, joten vesiliukoisuuden parantamiseen on kiinnitetty enemmän huomiota.<sup>3</sup> BODIPY-ytimen ja meso-asemaan kiinnittyneiden aromaattisten substituenttien lähes ortogonaaliset geometriat voivat minimoida näiden alayksiköiden välisen elektronien tai elektronitiheyden siirron. Sitä vastoin pyrroliasemissa olevien substituenttien geometria on lähes tasomainen, mikä maksimoi elektronisen kytkennän. Boorikeskuksen orgaanisten osien vaikutus spektroskooppisiin ominaisuuksiin on vähäinen, mutta ne laajentavat osaltaan valmistettavien johdannaisten valikoimaa, mm. lisäämällä vesiliukoisuutta tai soveltuvuutta biomolekyylien leimaamiseen.<sup>1</sup>

### 3 BODIPY-yhdisteet ja antibakteerisuus

#### 3.1 Antibioottiresistenssi

Mikrobilääkeresistenssi on maailmanlaajuinen ongelma: yksittäisten organismien resistenssin laajuus, vastustuskykyisten organismien määrä ja lääkeresistenssin vaikutus maantieteellisiin sijainteihin ovat ennennäkemättömiä ja jatkuvasti kasvavia ongelmia. Sairaudet ja taudinaiheuttajat, joiden uskottiin olevan hallittavissa antibiooteilla, palaavat hoidoille vastustuskykyisinä.<sup>5</sup> Antibioottien väärinkäyttö on stimuloinut bakteerien evoluutiopotentiaalia ja mutaatioita, mikä on johtanut vähitellen lääkeresistenttien bakteerikantojen lisääntymiseen ja infektioista johtuvien kuolemien kasvuun.<sup>6</sup> Uusien antibioottien kehittäminen ja niiden markkinoille saaminen ei ole pysynyt bakteeriresistenssin kasvavan uhan tahdissa. Yksi syy tälle saattaa olla innovatiivisempien lähestymistapojen (esim. uusien vaikutuskohteiden tai kemiallisten ominaisuuksien) pidemmät kehitysajat. Nykyiset antibiootit myös menettävät tehonsa nopeammin kuin niitä voidaan korvata, mikä muodostaa lääkeresistenssin ohella kasvavan uhan kansanterveydelle.<sup>4</sup>

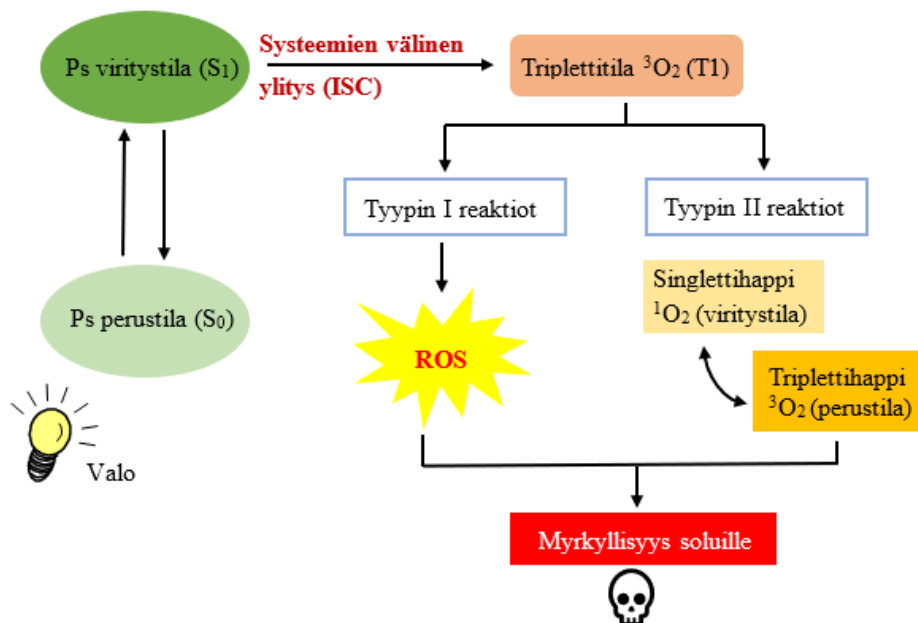
Resistenttien bakteerien kasvu maailmanlaajuisesti on pakottanut tutkijat löytämään antimikrobisia hoitoja, jotka korvaavat antibiootit ja jotka eivät ole alttiita lääkeresistenssille. Bakteeribiofilmi on peruuttamaton bakteeriaggregaatiokalvo, joka muodostuu kiinnittymällä kiinteään pintaan ja erittämällä bakteeriyhteisön ympäröivää polysakkaridimatriisia. Bakteerien vastustuskyky vahvistuu biofilmien muodostuessa ja tehokkailla antibakteerisilla aineilla tulisi olla kyky tämän estämiseen. Solunulkoiset polymeerit voivat estää antibakteeristen aineiden tunkeutumisen, jotka ovat biofilmin pääkomponentti. Tämä tekee biofilmibakteereista erittäin vastustuskykyisiä antibakteerisille lääkkeille.<sup>6</sup>

Uusia innovaatioita antibakteerisiksi aineiksi ovat mm. uudet bakteerifarmakoforit ja molekyylikohteet. Aine voi vaikuttaa tavanomaisessa vaikutuspaikassa ja olemassa olevassa kemiallisessa ympäristössä, mutta sillä on uusia fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia verrattuna olemassa oleviin aineisiin. Toisaalta vaikuttava aine voi sisältää muutoksia olemassa olevaan kemialliseen rakenteeseen, joka voittaa resistenssin (esim. MRSA-fluorokinolonit). Aine voi myös vaikuttaa tunnetussa kohteessa, mutta sen vaikutusmekanismi tai sitoutumiskohta on uusi. Myös täysin uusiin kohteisiin vaikuttavat yhdisteet ovat tärkeitä.<sup>4</sup>

### 3.2 Fotodynaaminen terapia (PDT)

Viime vuosina fotodynaaminen terapia (PDT) on kasvattanut suosiotaan antibakteerisissa sovelluksissa, koska sitä on helppo hallita ja se on hyvin herkkä bakteerien vastustuskykymekanismeille.<sup>10</sup> Ihanteelliset PDT-antibakteeriset aineet ovat stabiileja fysiologisissa olosuhteissa, myrkyttömiä normaaleille soluille pimeässä ja ne tuottavat runsaasti singlettihapetta vesiliuoksessa. Hapen tehokas vuorovaikutus kohdebakteerin pinnan kanssa tuottaa pienellä alueella reaktiivisia happilajeja vahingoittamatta ympäröiviä isäntäkudoksia.<sup>14</sup>

Fotodynaaminen terapia vaatii valon, molekyylihapen ja valoherkistimen (PS) yhdistelmän. Valoherkistimellä tulisi olla korkea affiniteetti kohdesoluun kiinnittymiseen ja taipumus siihen kerääntymiseen. PS aktivoidaan yleensä käyttämällä maksimiabsorption aallonpituutta vastaavaa valosäteilyä, mikä indusoi valoherkistäjän perustilalta ( $S_0$ ) singlettiviritystilaan ( $S_1$ ) ja edelleen systeemien välisen ylityksen (intersystem crossing, ISC) triplettiltaan ( $T_1$ ). Tässä tilassa valoherkistimet voivat reagoida ympäröivien molekyylien kanssa pääasiassa kahdella mekanismilla. Tyypin I reaktiossa reaktiivisia happilajeja, kuten vetyperoksidia, syntyy elektronien tai protonien siirrolla virittyneen PS:n ja molekyylihapen tai ympäröivien biomolekyylien välillä. Tyypin II reaktio perustuu suoraan energian siirtoon triplettilan valoherkistäjästä molekyyliiseen happeen ( $^3O_2$ ), mikä johtaa erittäin reaktiivisen singlettihapen ( $^1O_2$ ) muodostumiseen (Kuva 7). Singlettihappi on pääasiallinen sytotoksinen aine PDT:ssä.<sup>8,10</sup>



Kuva 7. PDT:n mekanismi. Tyypin I reaktioihin liittyy ROS:n muodostuminen, kun taas energian menetys tyypin II reaktioissa aikaansaa erittäin reaktiivisen  $^1O_2$ :n muodostumisen, mikä johtaa lopulta solutoksisuuteen.<sup>15</sup> Kuva on muokattu lähteen 15 kuvasta 1.

PDT:n perustana on singlettihapen reaktio biologisten substraattien kanssa ja soluvaurioiden aiheuttaminen vaikutusalueella.<sup>16</sup> Energia vapautuu pääasiassa fluoresenssin avulla energian absorption ja ensimmäiseen singlettiviritystilaan siirtymisen jälkeen sen sijaan, että sitä käytettäisiin singlettihapen muodostumista vaativaan systeemien väliseen siirtymiseen T1-tilaan. Tämä ilmiö selittää singlettihapen tuotannon alhaisen hyötysuhteen. Koska kyky tuottaa singlettihapetta on erityisen tärkeää PDT:n tehokkuudelle, BODIPY:n rakennetta on muokattu <sup>1</sup>O<sub>2</sub>:n muodostumisen lisäämiseksi (Luku 4).<sup>8</sup>

### 3.3 BODIPY-yhdisteet fotodynaamisessa hoidossa

#### 3.3.1 Valoherkistimenä toimiminen ja rajoittavat ominaisuudet

Fotodynaamisessa terapiassa yleisesti käytetyt valoherkistimet ovat orgaanisia molekyylejä, joille on ominaista laaja  $\pi$ -sidiskonjugaatio ja kyky absorboida säteilyä sähkömagneettisen kentän näkyvällä alueella.<sup>9</sup> BODIPY-molekyyleillä on useita houkuttelevia ominaisuuksia, kuten helppo synteesi, korkeat absorptiokertoimet ja valostabiilisuus, minkä vuoksi niitä voidaan käyttää valoherkistiminä PDT:ssä.<sup>8</sup> BODIPY-yhdisteillä on kuitenkin myös käyttöä rajoittavia ominaisuuksia, kuten hydrofobisuus ja siitä aiheutuva agglomeroituminen vesiliuoksissa, reilusti alle 500 nm:n absorption aallonpituusmaksimi sekä vahva fluoresenssi, joka aiheuttaa singlettihapen muodostumisen kannalta epäsuotuisaa energian hukkaa.<sup>9</sup>

Fluoresenssi tapahtuu singlettiviritystilojen relaksaation kautta. Vahva fluoresenssi ja korkeat fluoresenssin kvanttisaannot eivät ole toivottavia, sillä suuri osa virityksessä absorboituneesta energiasta ei voi silloin siirtyä triplettitiloihin. PDT:ssä tapahtuvan säteilyvaurion uskotaan tapahtuvan pääasiassa triplettiviritystilojen kautta, minkä vuoksi BODIPY:itä on muokattava fluoresenssin vähentämiseksi sekä singletti- että triplettitilojen välisten siirtymien (ISC) tehostamiseksi.<sup>16</sup>

BODIPY-valoherkistimien agglomeroituminen tapahtuu fysiologisissa olosuhteissa, mikä johtaa molekyylien viritystilan sammumiseen itsestään ja myöhemmän <sup>1</sup>O<sub>2</sub>:n tuotannon vähenemiseen BODIPY-molekyylin hydrofobisen luonteen vuoksi. ROS-tuotannon väheneminen johtaa lopulta heikentyneeseen antibakteeriseen suorituskykyyn. Tällaiset valoherkistimet tarvitsevat orgaanisia liuottimia, joilla voi kuitenkin olla pieninäkin määrinä haitallisia vaikutuksia biologisiin järjestelmiin. Huokoisten materiaalien, kuten nanokuitujen lisääminen vähentää tehokkaasti PS:ien agglomeroitumista ja parantaa näiden PDT-tehokkuutta.<sup>10,14</sup>

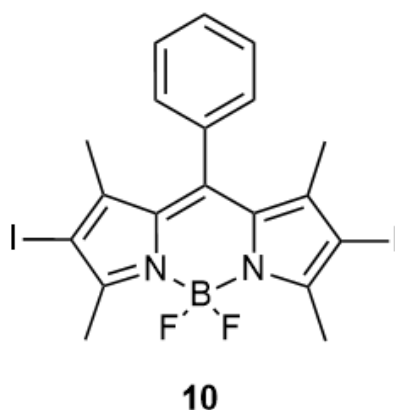


### 3.3.2 Toiminnan parantaminen

BODIPY-yhdisteiden toiminnan parantaminen edellyttää rakenteen muokkauksen avulla tehtävää liukoisuuden optimointia solunsisäisen kuljetuksen helpottamiseksi sekä soluun tunkeutumisen tai sitoutumisen mahdollistamiseksi. Lisäksi on aikaansaattava batokrominen absorbanssi siirtymä siniseltä alueelta näkyvän valon spektrin vihreäpunaisille alueille, mikä mahdollistaa molekyylien aktivoinnin syvemmillä kudoksissa. Myös fluoresenssin kvanttitason vähentäminen on oleellista, sillä se estää energian häviämistä radioaktiivisen vaiheen kautta ja lisää siirtymistä singlettivilasta triplettiviritilään.<sup>9</sup>

Antibakteerisissa valoherkistimissä tulisi olla yksi tai useampi kationinen ryhmä, mikä mahdollistaa ionisen vuorovaikutuksen bakteerin negatiivisesti varautuneen soluseinän kanssa. Tämän lisäksi PS:iän sitoutumista mikro-organismeihin voitaisi tehostaa lisäämällä PS:iin neutraali, komplementaarinen lisäke, joka edesauttaa lipidikalvon läpäisemistä (nk. snorkkeliefekti).<sup>17,18</sup>

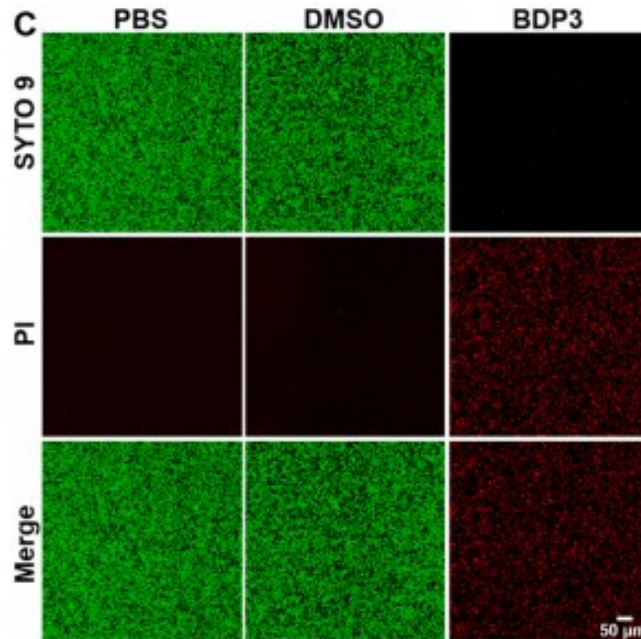
Shi *et al.*<sup>6</sup> syntetisoivat kuusi erilaista BODIPY-johdannaisista ja osoittivat, että BODIPY-johdannaiseen **10** tehty diiodikorvaus ja bentseenirenkaan lisääminen meso-asemaan paransivat merkittävästi ROS-tuotantoa ja täten myös valoherkistimenä toimimista (Kuva 8).<sup>6</sup>



Kuva 8. BODIPY-johdannaisen **10** rakenne, johon liitetyt jodi- ja aryyli substituentit paransivat valoherkistiminominaisuuksia.<sup>6</sup>

BODIPY **10**:n antibakteerinen aktiivisuus arvioitiin *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) vastaan. Yhdiste tappoi *S. aureuksen* tehokkaasti 10 nM:n pienimmällä inhiboivalla pitoisuudella (MIC). Lisäksi se esti biofilmin muodostumisen vihreällä valolla (LED, 18 mW/cm<sup>2</sup>, 5 min) säteilytettäessä.<sup>6</sup>

Antibakteerista mekanismia tutkittiin Live/Dead-värjäysmäärityksellä ja pyyhkäisyelektronimikroskopiolla (SEM). Tulokset osoittivat, että BODIPY **10** tuhosi bakteerien solukalvorakenteen tuottamalla reaktiivisia happilajeja, mikä johti lopulta bakteerien hajoamiseen ja kuolemaan. Lopuksi bakteerisolut havaittiin konfokaalisella laserpyyhkäisymikroskoopilla (CLSM) käyttäen kontrolliryhminä PBS:llä ja DMSO:lla käsiteltyjä bakteereita ja värjäysaineina SYTO 9:ää sekä propidiumjodidia (Kuva 9).<sup>6</sup>



Kuva 9. *S.-aureuksen* CLSM-kuvat, joissa vihreä väri kuvaa eläviä bakteereja ja punainen väri kuolleita bakteereja. Käytetyt värjäysaineet on esitetty pystyrivillä ja liuotinosuhteet vaakarivillä (BDP3 = BODIPY **10**).<sup>6</sup> Reprinted from Elsevier, 39, Shi, Q.; Mou, C.; Xie, Z. ja Zheng, M., Exploring BODIPY derivatives as photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy, 102901, Copyright (2022), with permission from Elsevier.

Propidiumjodidi (PI) ei läpäise soluja eli se voi värjätä vain kuolleita bakteereja, joiden solukalvo on vaurioitunut. Kontrolliryhmien bakteereilla havaittiin kirkkaan vihreä fluoresenssi, mikä osoitti bakteerien säilyvän hengissä. BODIPY-yhdisteellä **10** käsitellyt *S. aureus*-näytteet emittoivat voimakkaan punaista fluoresenssia vihreällä valolla säteilytyksen jälkeen. Tulokset osoittivat *S. aureus* kannan kuolleen ja vahvistivat, että BODIPY **10** voi inaktivoida *S. aureuksen* vihreällä valolla käsitellessä vahingoittamalla bakteerien solukalvoa. Tehokkaan antibakteerisen vaikutuksen, biofilmin estokyvyn ja bioyhteensopivuuden perusteella BODIPY **10** on lupaava PS-ehdokas bakteeri-infektioita vastaan.<sup>6</sup>

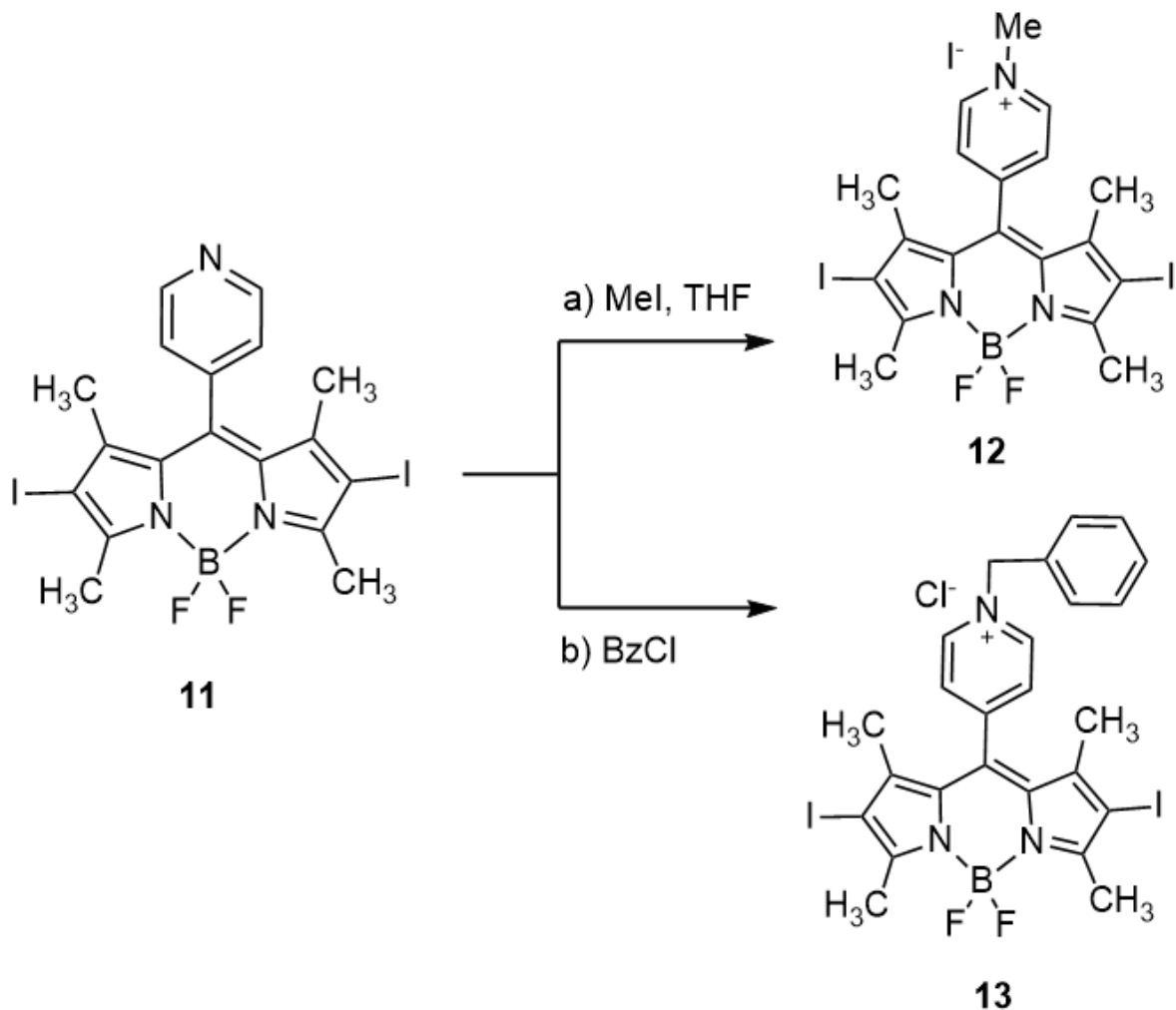
### 3.4 Fotodynaaminen antimikrobinen kemoterapia (PACT)

Fotodynaaminen antimikrobinen kemoterapia (PACT) eli antimikrobinen fotodynaaminen hoito (aPDT) on osoittautunut tehokkaaksi hoitomuodoksi bakteerien lääkeresistenssistä riippumatta eikä se todennäköisesti aiheuta resistenssiä epäspesifisen hapettumisen aiheuttaman inaktiivoinnin vuoksi.<sup>8</sup> Muihin hoitomuotoihin verrattuna PACT:lla on useita etuja, kuten lyhyt hoitoaika, soveltuvuus kaikkiin bakteerikantoihin niiden antibioottiresistenssistä riippumatta ja resistenssin muodostumattomuus useiden hoitojen jälkeen.<sup>9</sup>

PACT:n sivuvaikutukset ovat suhteellisen vähäisiä, koska tiettyjä alueita käsitellään paikallisesti normaalien kudossolujen vahingoittumisen välttämiseksi. PACT voi voittaa tehokkaasti patogeenien lääkeresistenssin, koska muodostuneet reaktiiviset happilajit voivat tuhota bakteerisolujen makromolekyylejä, kuten DNA:ta. Lisäksi PACT voidaan yhdistää muun tyyppiseen antibakteeriseen hoitoon synergisen antibakteerisen vaikutuksen saavuttamiseksi.<sup>6</sup> *In vivo* PACT:n vaatimat valoherkistimien pitoisuudet ja/tai valoannokset ovat vähintään sata kertaa suurempia kuin elottomassa ympäristössä tapahtuvan *in vitro* PACT:n. Tämä voi johtua useista syistä: valoherkistin voi esimerkiksi sitoa erilaisia biologisia komponentteja, mikä vähentää bakteerisen vaikutuksen käytettävissä olevaa määrää tai valoherkistin ei pysty vaikuttamaan syvällä kudoksissa oleviin bakteereihin.<sup>9</sup>

Raskaiden atomien, kuten bromin tai jodin lisäämistä BODIPY:n ydinrakenteeseen, tavallisesti BODIPY-ytimen 2- ja 6-kohtiin, kutsutaan raskasatomiefektiksi. BODIPY:n valokemialliset ominaisuudet paranevat raskasatomiefektin vaikutuksesta ja nämä BODIPY-johdannaiset soveltuvatkin käytettäväksi aPDT:iin.<sup>19</sup> Raskasatomiefekti johtaa mm. fluoresenssin intensiteetin pienenemiseen ja lyhyempään fluoresenssin keston. Lisäksi raskasatomiefekti aiheuttaa sisäisen spin-rata-ilmion, mikä johtaa parempaan ja stabiilimpaan systeemien väliseen siirtymiseen T1-tilaan. Tämän seurauksena BODIPY-johdannaiset muodostavat pitkäikäisen, korkeasaantoisen triplettiviritystilan tehokkaan singlettihapen tuotantoon, kun triplettitilassa oleva molekyyli vuorovaikuttaa molekyylihapen kanssa.<sup>8</sup> Kudoksissa tämä aiheuttaa soluvaurioita säteilytetyillä alueilla, mikä on fotodynaamisen terapian perusta.<sup>19</sup>

Caruson *et al.*<sup>9</sup> tekemä tutkimus osoitti, että rakenteellisilla muutoksilla on suuri vaikutus BODIPY-yhdisteiden toimintaan. Tutkimuksessa käytettiin kahta bakteerimallikantaa, gram-positiivista *Staphylococcus xylosusta* ja gram-negatiivista *Escherichia colia*, joita vastaan syntetisoidut BODIPY:t **12** ja **13** testattiin (Kuva 10).<sup>9</sup>



Kuva 10. BODIPY-yhdisteiden **12** ja **13** synteysi. BODIPY-yhdiste **11** valmistettiin kahdella reaktiolla, jonka jälkeen rakenteeseen suoritettiin metylointi (a) sekä bentsylointi (b).<sup>9</sup>

Yhdisteiden **12** ja **13** välillä havaittiin huomattava ero fotokatalyysitehokkuudessa mallimikro-organismeja vastaan. Metyloitu BODIPY **12** oli paljon tehokkaampi kuin bentsyloitu BODIPY **13**, minkä vuoksi perusteellinen tutkimus antibakteerisesta aktiivisuudesta tehtiin BODIPY **12**:sta.<sup>9</sup>

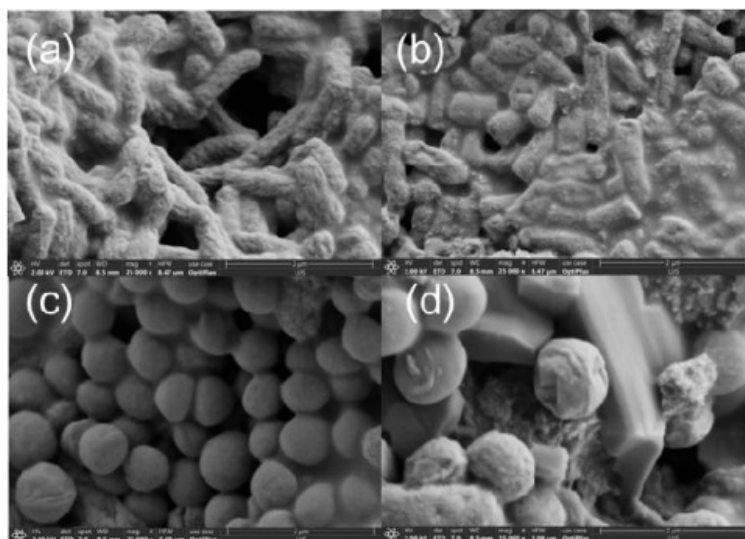
Tutkimus osoitti, että jodiatomeja 2,6-asemissa sisältäviä kationisia BODIPY:itä voidaan käyttää menestyksekkäästi *in vitro* PACT-säteilytyksessä vihreällä LED-valolla. BODIPY **12** osoittautui erittäin tehokkaaksi molempia bakteerikantoja vastaan jopa hyvin neutraaleissa olosuhteissa (lyhyt inkubaatioaika pimeässä, rajoitettu valon määrä ja alhainen PS-pitoisuus). Tämä tekee molekyylistä **12** erittäin lupaavan antibakteerisen PS:n.<sup>9</sup>

## 4 BODIPY-yhdisteiden antibakteerisia sovelluksia

### 4.1 MOF-yhdisteet

Etenkin metallikeskuksista ja monihampaisista orgaanisista ligandeista koostuvat metallo-organiset verkkorakenteet (MOF) ovat herättäneet paljon huomiota nanoantibakteeristen aineiden keskuudessa. Joillakin yleisillä esim. sinkkiä sisältävillä MOF-yhdisteillä on suuri huokoskoko, biologinen yhteensopivuus ja kyky vapauttaa metalli-ioneja, minkä vuoksi niitä on käytetty antibakteerisina aineina. MOF-yhdisteiden tärkeä ominaisuus on kyky tuottaa säteilytettynä reaktiivisia happilajeja (ROS), joilla on erittäin korkea hapetuskyky ja siten kyky vähentää bakteerien elinkelpoisuutta. Sinkki on yksi ihmiskehon välttämättömistä alkuaineista, joten Zn-pohjaisista MOF:ista, erityisesti ZIF-8:sta (Zeolitic imidazolate framework), on tullut yleinen tutkimuskohde alhaisen sytotoksisuuden ja laajakirjoisen antibakteerisen vaikutuksen vuoksi.<sup>10</sup>

Shen *et al.*<sup>10</sup> valmistivat uuden, näkyvän valon indusoiman nanoantibakteerisen BODIPY-ZIF-8-komposiitin, jossa valoherkkä BODIPY lisättiin ZIF-8:n runkoon. Valoherkistäjänä BODIPY:lla on hyvä näkyvän valon absorptiokyky, mikä paransi rakenteen näkyvän valon absorptiotehokkuutta, pienensi ZIF-8:n energiavyöväliä ja auttoi saavuttamaan hyvän antibakteerisen suorituskyvyn ROS-tuotantoa parantamalla. Lisäksi BODIPY vaikutti verkoston rakenteeseen ja säätelöi BODIPY-ZIF-8:n morfologiaa. ZIF-8:n erittäin huokoinen rakenne esti puolestaan BODIPY PS:n agglomeraatiota ja paransi täten sen PDT-antibakteerista tehokkuutta. BODIPY-ZIF-8:n antibakteerista aktiivisuutta tutkittiin *E. colia* ja *S. aureusta* vastaan ja bakteerien morfologiaa tutkittiin SEM:llä (Kuva 11).<sup>10</sup>

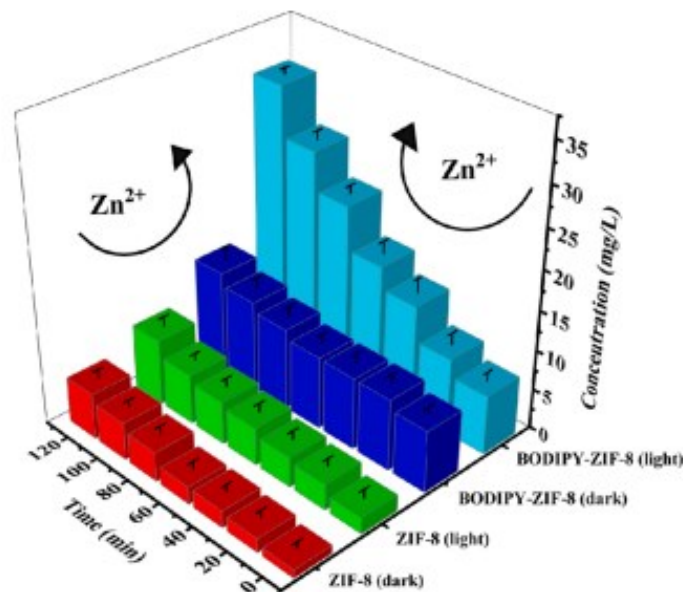


Kuva 11. SEM-kuvat *E. colista* ja *S. aureuksesta* ennen BODIPY- ZIF- 8:lla käsittelyä (a, c)

ja käsittelyn jälkeen (b, d).<sup>10</sup> Reprinted from Elsevier, 644, Shen, Z.-Q.; Qu, L.-L.; Kan, X.-L.; Chen, Q.-Y.; He, G.-Q. ja Sun, M., Construction of BODIPY functional ZIF-8 with improved visible light-induced antibacterial activity, 128835, Copyright (2022), with permission from Elsevier.

BODIPY-ZIF-8:lla käsitellyt *E. coli* ja *S. aureus* rypistyvät ja vaurioituvat merkittävästi, mikä osoitti BODIPY-ZIF-8:n antibakteerisen vaikutuksen. Zn-pohjaisten MOF:ien antibakteerisesta aktiivisuudesta vastaava päämekanismi on ROS-tuotanto, sillä reaktiiviset happilajit voivat reagoida helposti DNA:n ja proteiinien kanssa. Valolla säteilytettäessä ZIF-8:n fotoeksitaatio voi käynnistää elektroni-aukkoparien erottumisen, mikä johtaa ROS:n muodostumiseen bakteerisoluihin.<sup>10</sup>

Zn<sup>2+</sup> voi vuorovaikuttaa bakteerisolukalvon kanssa ja vahingoittaa bakteereja. Zn<sup>2+</sup>:a vapautui ZIF-8:ssa ja BODIPY-ZIF-8:ssa jatkuvasti, mikä aiheutti vaurioita mitokondrioissa ja DNA:ssa ja siten pitkäaikaisen antibakteerisen vaikutuksen. Zn<sup>2+</sup>:n vapautumismäärä kasvoi komposiittien vedessä liuotusajan kasvaessa ja vapautuminen oli suurempaa valossa kuin pimeässä (Kuva 12).<sup>10</sup>



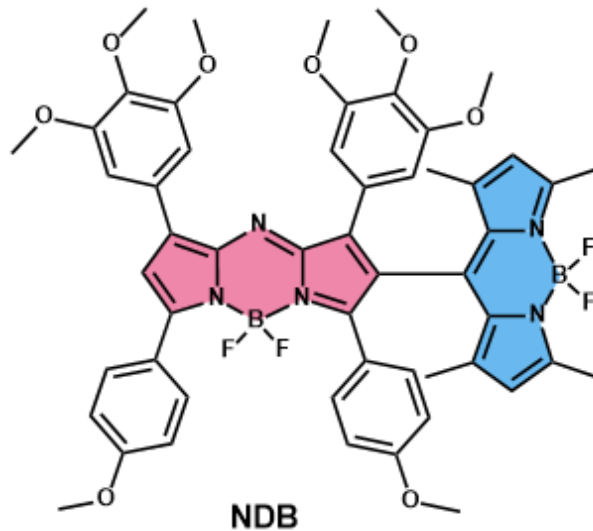
Kuva 12. Zn<sup>2+</sup>:n vapautuminen ZIF-8:ssa ja BODIPY-ZIF-8:ssa valon kanssa ja ilman. BODIPY-ZIF-8:n tapauksessa valo kasvattaa huomattavasti Zn<sup>2+</sup>-ionien vapautumista vedessä liuotusajan kasvaessa, mikä lisää molekyylin antibakteerista vaikutusta.<sup>10</sup> Reprinted from Elsevier, 644, Shen, Z.-Q.; Qu, L.-L.; Kan, X.-L.; Chen, Q.-Y.; He, G.-Q. ja Sun, M., Construction of BODIPY functional ZIF-8 with improved visible light-induced antibacterial activity, 128835, Copyright (2022), with permission from Elsevier.

## 4.2 NIR-väriaineet

Orgaaniset NIR-väriaineet ovat lupaavia aineita tehokkaiden ja turvallisten antibakteeristen nanomateriaalien kehittämisessä. NIR-väriaineita voidaan viritellä lähi-infrapunavalolla (NIR) tuottamaan reaktiivisia happilajeja (ROS) ja paikallista liikalämpöä proteiinien selektiiviseen denaturoimiseen ja mikro-organismien tappamiseen. Lisäksi väriaineita käytetään antibakteeriseen hoitoon ja paikalliseen patogeenien eliminointiin. Perinteiseen antibioottihoitoon verrattuna valohoidolla on vertaansa vailla olevia etuja, kuten kauko-ohjattavuus, vähäinen resistenssi ja vähäiset sivuvaikutukset. Menetelmällä on hyviä antibakteerisia ominaisuuksia lääkeresistenttien bakteri-infektioiden hallinnassa ja ehkäisyssä, mikä minimoi antibioottien väärinkäytön haitallisia seurauksia.<sup>20</sup>

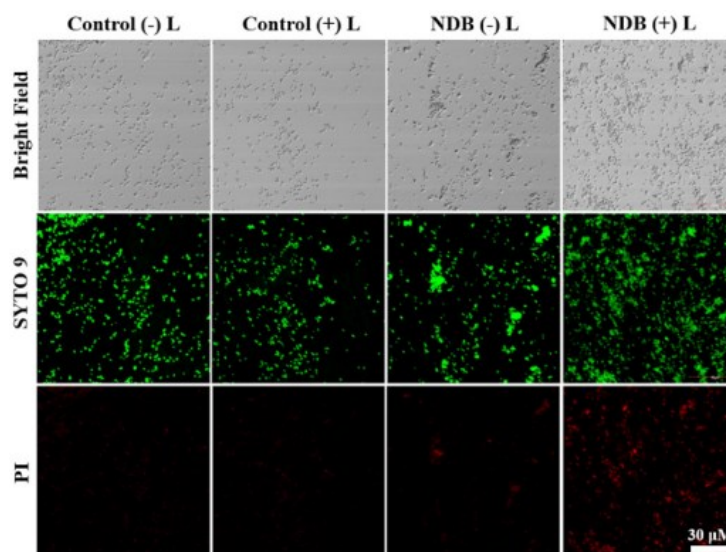
Atsa-dipyrrometeenibooridifluoridi (aza-BODIPY) on NIR-väriaine, jossa imiini-ryhmän (C=N) typpi atomi korvaa hiili atomin BODIPY:n mesoasemassa. Tämä BODIPY-johdannainen on herättänyt kiinnostusta suuren absorptiokertoimen, punasiirtymän absorptio- /emissioaallonpituuden (650–1060 nm) ja helposti viritettävän rakenteen vuoksi. Kun B-N-osa ja C=N-yksikkö on integroitu, atsa-BODIPY:tä käytetään yleisesti elektronivajaana rakennuspalikkana molekyylin sisäisellä varauksensiirtovaikutuksella (ICT) varustettujen luovuttaja-vastaanottaja-rakenteiden (D-A) valmistamiseen.<sup>20</sup> Halogeeniatomien (esim. Br) lisääminen atsa-BODIPY-runkoon on hyödyllistä systeemien välisen ylityksen kannalta, sillä se johtaa mm. korkeaan ROS-tuotantoon. Valoherkistysaineisiin tehtävät halogeenimodifioinnit johtavat kuitenkin myös pimeään toksisuuteen, mikä vaikeuttaa kliinistä käyttöä.<sup>21</sup>

Yang *et al.*<sup>21</sup> syntetisoivat fotodynaamista hoitoa varten uuden raskasatomittoman valoherkistäjän, atsa-BODIPY-johdannaisen NDB:n, jolla on hyvä ROS-tuotanto ja lähi-infrapuna-absorptio (Kuva 13). BODIPY-osa liitettiin atsa-BODIPY-yksikköön perustuen spin-rata varauksensiirto-systeemien välinen siirtymä-mekanismiin (SOCT-ISC), jolloin syntyi ortogonaalinen molekyylikonfiguraatio ja reaktiivisten happilajien muodostuminen nopeutui.<sup>21</sup>



Kuva 13. Ortogonaalisen NDB:n rakenne, jossa kiinnittyvä BODIPY-osa on merkitty sinisellä ja atsa-BODIPY-yksikkö punaisella.<sup>21</sup>

NDB-nanopartikkeleilla (NPs) oli tyydyttävä antibakteerisuus ja erinomainen fotostabiilisuus ja biologinen yhteensopivuus. NDB NP:iden antibakteerista aktiivisuutta tutkittiin metisilliiniresistentillä *S. aureus*-kannalla (MRSA) käyttämällä levypesäkkeiden laskentamenetelmää ja elävien/kuolleiden bakteerien värjäystä (Kuva 14). *In vitro* antibakteerinen määrittäminen vahvisti, että reaktiiviset happilajit ja NDB NP:iden tuottama lämpö voivat tuhota MRSA:n tehokkaasti altistuessaan 730 nm:n laserille, mikä viittaa NDB NP:iden mahdolliseen käyttöön valon käynnistämässä antibakteerisessa hoidossa.<sup>21</sup>



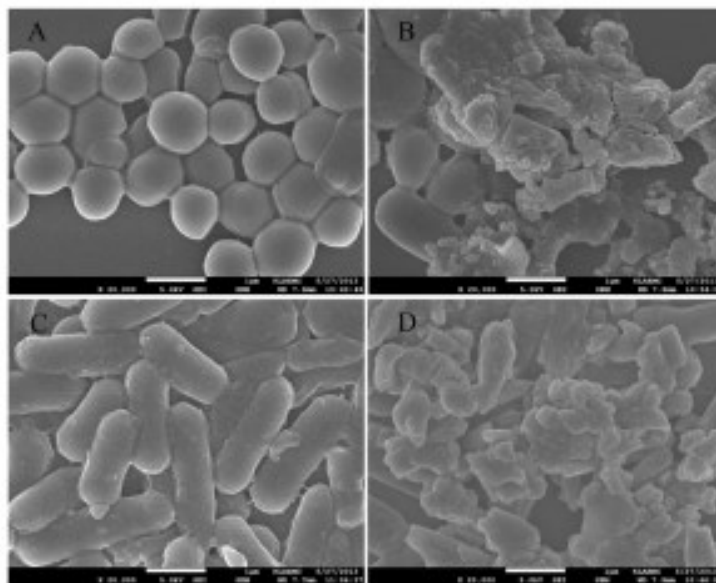
Kuva 14. Elävien ja kuolleiden bakteerien värjäytyminen eri olosuhteissa valon kanssa ((+)L) ja ilman valoa ((-)L). Vihreä väri kuvaa eläviä ja punainen väri kuolleita bakteereja. Käytetyt liuotinosuhteet on esitetty vaakarivillä ja värjäysaineet pystyrivillä.<sup>21</sup>



### 4.3 2-(dimetyyliamino)etyylimetakrylaatti (DMAEMA)

Kuten luvussa 3.3.1 todettiin, BODIPY-pohjaisten valoherkistimien fysiologisissa olosuhteissa tapahtuva aggregaatio johtaa lopulta  $^1\text{O}_2$ -tuotannon vähenemiseen. Gram-negatiivisilla bakteereilla on ylimääräinen kalvokerros soluseinämässä, minkä vuoksi PDT-valoherkistimet ovat tehottomampia tätä bakteeriryhmää vastaan. Lu *et al.*<sup>14</sup> valmistivat polymeeripohjaisen yhdisteen liittämällä 2-(dimetyyliamino)etyylimetakrylaattia (DMAEMA) ja galaktoosia BODIPY-pohjaiseen valoherkistäjä-molekyylisiin eri monomeerisuhteissa, joista 51,7 % / 45,8 % oli optimaalinen.<sup>14</sup>

Koska DMAEMA:lla on positiivinen varaus ja bakteereilla negatiivinen, DMAEMA voi lisätä valoherkistimen ja bakteerien välistä sitoutumista vesiliuoksessa. Galaktoosilla on erinomainen biologinen yhteensopivuus, minkä vuoksi sen avulla voitiin lisätä antibakteerisen aineen sytoyhteensopivuutta normaaleihin soluihin pimeässä. Pyyhkäisy-elektronimikroskopiaa (SEM) käytettiin makromolekyylisen valoherkistimen antibakteerisen aktiivisuuden tutkimiseen gram-positiivista *S. aureusta* ja gram-negatiivista *P. aeruginosa* vastaan (Kuva 15).<sup>14</sup>



Kuva 15. SEM-kuvat *S. aureuksesta* (A,B) ja *P. aeruginosasta* ennen säteilytystä (A,C) ja sen jälkeen (B,D). Bakteeriseinämien muutokset havaittiin selkeästi säteilytyksen jälkeen.<sup>14</sup>

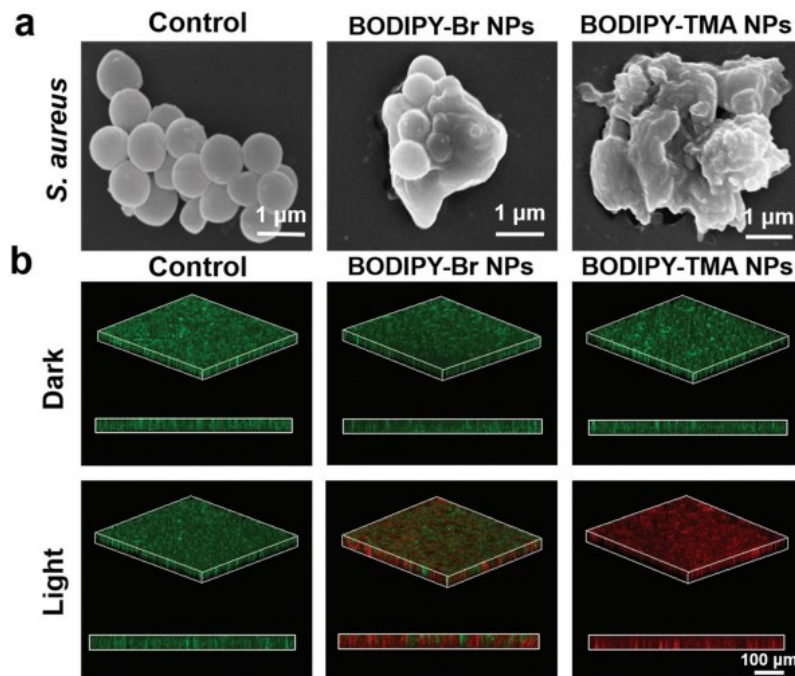
Used with permission of Royal Society of Chemistry, from BODIPY-based macromolecular photosensitizer with cation-enhanced antibacterial activity, Lu, Z.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Xue, Y.; Zhai, T.; Wu, Z. ja Li, C., 6, 2015; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Morfologian muutokset sileäpintaisiin kontrolliryhmien bakteereihin (A ja C) verrattuna olivat selkeitä. Säteilytyksen jälkeen bakteerien solurakenne romahti kokonaan ja niiden

sytoplasmiset ainesosat vuotivat ulos. Tuloksista voitiin päätellä, että singlettihapen muodostuminen oli vaurioittanut bakteerin kalvoa palautumattomasti, mikä johti lopulta bakteerien apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan.<sup>14</sup>

#### 4.4 BODIPY-TMA

Wang *et al.*<sup>22</sup> syntetisoivat antibakteerisia sovelluksia varten kvaternäärisellä trimetyyliamiini-suolalla (TMA) modifioidun BODIPY-valoherkistäjän (BODIPY-TMA), jossa yhdistyi positiivisesti varautuneen antimikrobisen materiaalin ja BODIPY-valoherkistäjän edut. BODIPY-TMA kerääntyi vedessä itsestään yhtenäisiksi nanopartikkeleiksi (BODIPY-TMA NPs), jotka tuottivat singlettihapetta tehokkaasti valosäteilyn vaikutuksesta. BODIPY-TMA NP:iden ja BODIPY-Br NP:iden vaikutus *S. aureuksen* morfologiaan vihreällä valolla säteilytyksen jälkeen havaittiin pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM). *S. aureus* -biofilmit käsiteltiin BODIPY-TMA NP:illä ja BODIPY-Br NP:illä valosäteilyssä (12 mW/cm<sup>2</sup>, 10 min), minkä jälkeen elävät ja kuolleet bakteerit värjättiin SYTO:lla ja PI:lla. Kuvaus suoritettiin lopuksi CLSM:lla (Kuva 16).<sup>22</sup>



Kuva 16. a) SEM-kuvat *S. aureuksesta* ilman käsittelyä sekä BODIPY-Br NP:illä tai BODIPY-TMA NP:illä käsittelyn kanssa vihreän valon säteilytyksen alla. b) CLSM-kuvat *S. aureuksen* biofilmeistä, jotka on käsitelty nanopartikkeleilla ja värjätty SYTO:lla ja PI:lla vihreän valon säteilytyksellä tai ilman. Vihreä väri kuvaa eläviä ja punainen väri kuolleita

bakteereita. Kun *S. aureusta* käsiteltiin BODIPY-TMA NP:illa, morfologia vaurioitui täysin ja kaikki bakteerit kuolivat.<sup>22</sup> Used with permission of Royal Society of Chemistry, from A cationic BODIPY photosensitizer decorated with quaternary ammonium for high-efficiency photodynamic inhibition of bacterial growth, Wang, H.; Li, C.; Wu, Q.; Wen, H.; Sun, T. ja Xie, Z., 10, 2022; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Kuten kuvasta 16a havaitaan, käsittelemättömän (kontrolli) *S. aureuksen* muodot säilyivät ehjinä ja pyöreinä. BODIPY-Br NP: illä ja valosäteilyllä käsittelyn jälkeen joidenkin bakteerien morfologia muuttui ja solukalvot rypistyivät hieman. BODIPY-TMA-nanopartikkelit ja valosäteily aiheuttivat *S. aureuksen* morfologian täydellisen vaurioitumisen ja kaikkien bakteerien kuoleman (Kuva 16b).<sup>22</sup>

TMA-ryhmän positiivisen varauksen havaittiin lisäävän vuorovaikutusta BODIPY-TMA-nanohiukkasten ja negatiivisesti varautuneiden bakteerikalvojen välillä. BODIPY-TMA NP:iden antibakteerinen vaikutus sekä *S. aureukseen* että *E. coliin* oli merkittävämpi verrattuna vastaaviin kontrollinanopartikkeleihin (BODIPY-Br NPs), joissa ei ollut positiivista varausta. Lisäksi BODIPY-TMA-nanopartikkelit estivät tehokkaasti biofilmien muodostumisen ja tuhosivat ennalta muodostuneet biofilmit. BODIPY-TMA NP:iden ja bakteerikalvojen välisten voimakkaiden sähköstaattisten vuorovaikutusten vuoksi BODIPY-TMA NP:illa on erinomaiset fotodynaamiset antibakteeriset vaikutukset sekä gram-positiivisiin (G+) että gram-negatiivisiin (G-) bakteereihin. Kationisten valoherkistimien muokkaus bakteerivuorovaikutuksen lisäämiseksi parantaa fotodynaamista antibakteerista vaikutusta, minkä vuoksi tämän odotetaan olevan tehokas antimikrobinen strategia.<sup>22</sup>

## 4.5 Polyamidoamiinit

Caruso *et al.*<sup>17</sup> raportoivat lineaaristen polyamidoamiinien (PAA:iden) huomattavasta adjuvantti- eli tehostevaikutuksesta BODIPY:n valoindusoidussa bakteerien tappamisessa. Polyamidoamiinit ovat *tert*-aminopolymeerejä, jotka on syntetisoitu amiinien polyadditiolla bisakryyliamideihin. Tutkimuksissa PAA:n, PS:n ja valon yhteisvaikutus sai aikaan sekä *S. aureuksen* että *E. colin* tuhoutumisen tunnin säteilytyksen jälkeen erittäin alhaisilla kationisen BODIPY:n pitoisuuksilla (1,0 ja 0,1  $\mu\text{M}$ ). Tämän perusteella PAA-valoherkistäjäyhdistelmä on mahdollisesti uusi ja tehokas menetelmä bakteerien tappamiseen. Tutkimuksessa raportoitua antibakteerista hoitoa voidaan menestyksekkäästi soveltaa bakteerien resistenssin voittamiseen.<sup>17</sup>

## 5 Yhteenveto

Antibiooteille vastustuskykyisten bakteerikantojen jatkuva kehitys on vähitellen heikentänyt antibakteeristen aineiden vaikutuskykyä ja vaikeuttanut täten tartuntatautien hoitoa. Mikrobi-infektioiden torjumiseksi ja kansanterveyden suojelemiseksi on kehitettävä ja tutkittava uusia antibakteerisia aineita tai menetelmiä. Viime vuosina on havaittu fotodynaamisen terapian (PDT) edut antibakteerisena menetelmänä, mikä tekee PDT:hen perustuvista antibakteerisista aineista potentiaalisia ehdokkaita antibioottien korvikkeiksi.<sup>14,22</sup>

Kationiset valoherkistimet (PS) ovat tehokkaita gram-negatiivisia bakteereja vastaan, koska ne muodostavat sähköstaattisen vuorovaikutuksen negatiivisesti varautuneen soluseinän kanssa. Seinämän natiivi järjestäytyminen on tämän seurauksena epävakaata, mikä tehostaa valoherkistäjän sitoutumista ja tunkeutumista soluun pienentäen myös tarvittavaa PS-pitoisuutta verrattuna neutraaleihin tai negatiivisesti varautuneisiin valoherkistäjiin. Gram-positiivisten bakteerien on todettu olevan herkempiä fotodynaamiselle inaktivaatiolle, sillä niiden soluseinästä puuttuu ylimääräinen lipidikalvo, jolloin ulkoinen este Ps:n tunkeutumiselle on pienempi.<sup>8</sup>

Dipyrrometeenibooridifluoridi (BODIPY)-johdannaiset ovat tärkeitä valoherkistimiä fotofysikaalisten ominaisuuksiensa, kuten erinomaisen valostabiilisuuden, suurten molaaristen absorptiokertoimien ja ROS-muodostuksen korkeiden kvanttisaantojen ansiosta.<sup>10</sup> BODIPY:n perusrakenteella on alhainen fototoksisuus ja kyky tuottaa reaktiivisia happilajeja (ROS), mikä tekee rakenteesta ihanteellisen fluoresenssi- ja kuvantamissovelluksiin. Jotta BODIPY-yhdisteet soveltuisivat antimikrobiseen fotodynaamiseen hoitoon (aPDT), rakennetta on kuitenkin muokattava esim. singletti- ja triplettilojen välisten siirtymien (ICT) sekä ROS-tuotannon tehostamiseksi, vesiliukoisuuden parantamiseksi biologisessa ympäristössä ja vuorovaikutuksen lisäämiseksi bakteerien kohderakenteiden kanssa.<sup>19</sup>

BODIPY-väriaineilla on voimakkaan fluoresenssinsa ansiosta lukuisia sovelluksia esim. bioteknologiassa pienmolekyylien havaitsemisessa ja lääketieteessä prekliinisessä tutkimuksessa tehdyssä kuvantamisessa.<sup>3</sup> Tällä hetkellä kliiniseen käyttöön hyväksytyt PDT-aineet eivät kuitenkaan sisällä BODIPY:itä, mutta tilanteen uskotaan muuttuvan tulevaisuudessa. Yksi lupaavimmista yhdistetyypeistä ovat atsa-BODIPY-yhdisteet, joiden absorptiomaksimi on lähi-infrapuna-alueella (NIR) ja punasiirtymä on saatu aikaan  $\pi$ -konjugaatiota laajentamalla. Atsa-BODIPY-yhdisteet ovat luultavasti lähempänä kliinistä kehitystä kuin muut BODIPY-yhdisteiden alaluokat.<sup>16</sup>

## Kirjallisuusluettelo

1. Boens, N.; Leen, V. ja Dehaen, W., Fluorescent indicators based on BODIPY, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1130–1172.
2. 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 Pigments*, **2009**, *82*, 392–395.
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. Gwynn, M. N.; Portnoy, A.; Rittenhouse, S. F. ja Payne, D. J., Challenges of antibacterial discovery revisited, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2010**, *1213*, 5–19.
5. Levy, S. B. ja Marshall, B., Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nat. Med.*, **2004**, *10 Suppl 1*, S122–S129.
6. Shi, Q.; Mou, C.; Xie, Z. ja Zheng, M., Exploring BODIPY derivatives as photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2022**, *39*, 102901.
7. 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)-diaza-s-indacene, *J. Fluoresc.*, **2009**, *19*, 755–758.
8. Piskorz, J.; Porolnik, W.; Kucinska, M.; Dlugaszewska, J.; Murias, M. ja Mielcarek, J., BODIPY-Based Photosensitizers as Potential Anticancer and Antibacterial Agents: Role of the Positive Charge and the Heavy Atom Effect, *ChemMedChem*, **2021**, *16*, 399–411.
9. Caruso, E.; Banfi, S.; Barbieri, P.; Leva, B. ja Orlandi, V. T., Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2012**, *114*, 44–51.
10. Shen, Z.-Q.; Qu, L.-L.; Kan, X.-L.; Chen, Q.-Y.; He, G.-Q. ja Sun, M., Construction of BODIPY functional ZIF-8 with improved visible light-induced antibacterial activity, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, **2022**, *644*, 128835.
11. 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.
12. Parisotto, S.; Lace, B.; Artuso, E.; Lombardi, C.; Deagostino, A.; Scudu, R.; Garino, C.; Medana, C. ja 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.
13. Niu, S.; Ulrich, G.; Retailleau, P. ja Ziessel, R., BODIPY-bridged push–pull chromophores: optical and electrochemical properties, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 4848–4853.

14. Lu, Z.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Xue, Y.; Zhai, T.; Wu, Z. ja Li, C., BODIPY-based macromolecular photosensitizer with cation-enhanced antibacterial activity, *Polym. Chem.*, **2015**, *6*, 302–310.
15. Gheewala, T.; Skwor, T. ja Munirathinam, G., Photosensitizers in prostate cancer therapy, *Oncotarget*, **2017**, *8*, 30524–30538.
16. Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y. ja Burgess, K., BODIPY dyes in photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 77–88.
17. Caruso, E.; Ferrara, S.; Ferruti, P.; Manfredi, A.; Ranucci, E. ja Orlandi, V. T., Enhanced photoinduced antibacterial activity of a BODIPY photosensitizer in the presence of polyamidoamines, *Lasers Med. Sci.*, **2018**, *33*, 1401–1407.
18. Punia, A.; He, E.; Lee, K.; Banerjee, P. ja Yang, N.-L., Cationic amphiphilic non-hemolytic polyacrylates with superior antibacterial activity, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 7071–7074.
19. Hohlfeld, B. F.; Gitter, B.; Flanagan, K. J.; Kingsbury, C. J.; Kulak, N.; Senge, M. O. ja Wiehe, A., Exploring the relationship between structure and activity in BODIPYs designed for antimicrobial phototherapy, *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, *18*, 2416–2431.
20. Yu, Q.; Huang, X.; Zhang, T.; Wang, W.; Yang, D.; Shao, J. ja Dong, X., Near-infrared Aza-BODIPY Dyes Through Molecular Surgery for Enhanced Photothermal and Photodynamic Antibacterial Therapy, *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2021**, *37*, 951–959.
21. Yang, D.; Sun, L.; Xue, L.; Wang, X.; Hu, Y.; Shao, J.; Fu, L. ja Dong, X., Orthogonal Aza-BODIPY–BODIPY dyad as heavy-atom free photosensitizer for photo-initiated antibacterial therapy, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **2022**, *15*, 2250004.
22. Wang, H.; Li, C.; Wu, Q.; Wen, H.; Sun, T. ja Xie, Z., A cationic BODIPY photosensitizer decorated with quaternary ammonium for high-efficiency photodynamic inhibition of bacterial growth, *J. Mater. Chem. B*, **2022**, *10*, 4967–4973.