

Konposatu organometalikoak terapia fotodinamikorako

Organometallic complexes for photodynamic therapy

Rebeca Sola-Llano*¹, Antonio Veloso^{1,2}

¹ Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

² POLYMAT, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

LABURPENA: BODIPY kromoforoer (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indazeno koloratzaileak) loturiko iridio (III) ziklo metalikoak prestatu eta karakterizatu dira fotosentikortzaile berri eta efizienteak garatu nahian. Diseinu arrazionala dela bide, argi ikusgaia xurgatzeko gai diren konposatuak lortu dira, zeinak oxigeno singletea oso modu efizientean sortzeko gai diren, batzuk lehoi klinikora ere gerturaturaz; ehunetan sakon barneratzeko gai den argi-eremua dena, hain zuzen. Konposatuen igorpen fosforeszentea, erdibizitza denborak eta kalkulu teorikoak aurrera eraman dira ikusitako fotosentikortzaile-aktibitateari azalpena bilatu nahian, eta emaitza horien guztien arabera, oxigeno singletea sortzearen arduraduna BODIPY unitatea dela ondorioztatatu da. In vitro ikertu da terapia fotodinamikorako aktibitatea HeLa zelulekin, eta agerian jarri da konposatuak efizienteki barneratzen direla zeluletan, ez direla toxikoak haientzat ilunpean, eta argizatzean zelulak hiltzeko gai direla nahiz eta konposatuen kontzentrazioa baxua izan. Hau guztia dela eta, esan daiteke lan honetan deskribatzen diren konplexuak potentzialki egokiak direla teragnosirako agente gisa, fotosentikortzaile-aktibitateaz gain igorpen fluoresentea ere agertzen baitute.

HITZ GAKOAK: iridio (III) konplexuak, BODIPY koloratzaileak, terapia fotodinamikoa, oxigeno singletea, fotosentikortzaileak, teragnosia.

ABSTRACT: In the search of new and efficient photosensitizers, in this work BODIPY-bonded Iridium (III) cyclometalated compounds (BODIPY: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene dyes) have been synthesized and characterized. Through a rational design, compounds absorbing light in the visible range of the electromagnetic spectrum have been achieved, which efficiently generate singlet oxygen, even at wavelengths reaching the clinic window, where the penetration in tissues is higher. Phosphorescence and time-resolved measurements and theoretical calculations have been carried out in order to explain the photosensitization activity of the compounds, and the results suggest that the BODIPY moiety is the responsible for the singlet oxygen generation. Photodynamic Therapy activity has been studied in vitro with HeLa cells. These experiments showed that the complexes are efficiently internalized into the cells and display low dark-toxicity and high-phototoxicity even at low concentration rates. As a result, it can be asserted that the compounds herein described are potentially suitable as theragnostic agents, since they exhibit also fluorescence emission in addition to the photosensitizing activity.

KEYWORDS: iridium (III) complexes, BODIPY dyes, photodynamic therapy, singlet oxygen, photosensitizers, theragnosis.

* **Harremanetan jartzeko / Corresponding author:** Rebeca Sola-Llano, Kimika Fisikoa Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 644 posta-kutxa, 48080 Bilbo, Bizkaia, Euskal Herria. – rebeca.sola@ehu.eus – http://orcid.org/0000-0003-1998-3644.

Nola aipatu / How to cite: Sola-Llano, Rebeca; Veloso, Antonio (2019). «Konposatu organometalikoak terapia fotodinamikorako»; *Ekaia*, 35, 2019, 57-70. (https://doi.org/10.1387/ekaia.19701).

Jasoa: 15 maiatza, 2018; Onartua: 19 iraila, 2018.

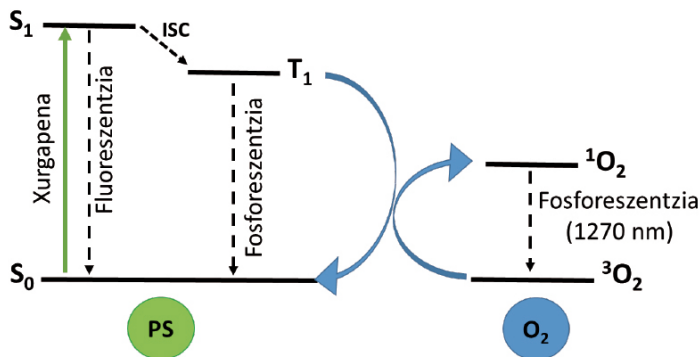
ISSN 0214-9001 - eISSN 2444-3255 / © 2019 UPV/EHU



Obra hau Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

1. SARRERA

Espainiako Onkologia Medikoko Elkartearen arabera (*Sociedad Española de Oncología Médica*, SEOM), 2017an 200.000 minbizi-kasu berri baino gehiago erregistratu ziren estatu-mailan; beraz, agerian dago minbiziaren kontrako tratamendu edo diagnostiko berrietara daraman edozein aurrerapen garrantzi handikoa dela. Zentzu horretan, terapia fotodinamikoa argiaren bidezko minbiziaren kontrako tratamendu erakargarria izan daiteke. Terapia fotodinamikoa oxigeno singletearen sorreran oinarritzen da argi-erradiazioaren pean [1-3]. Oxigeno singletea espezie zitotoxikoa da, eta bakterioak, birusak, onddoak eta zelulak hiltzeko gai da. Horrela, tratamendu berri hau ez da inbasiboa eta ohiko metodoek dakartzaten albo-efektuak saihesten dira, tratatu nahi den eremua bakarrik argiztatu eta beraz hori bakarrik kaltetzen delako, inguruko ehun eta organo osasuntsuei gaitz egin gabe.



1. irudia. Fotosentikortzaileen bidez gertatzen den oxigeno singletearen sorreraren prozesuaren azalpen eskematikoa. S_0 , S_1 eta T_1 egoerek oinarizko egoera eta lehenengo singlete eta triplete egoera kitzikatuak adierazten dituzte.

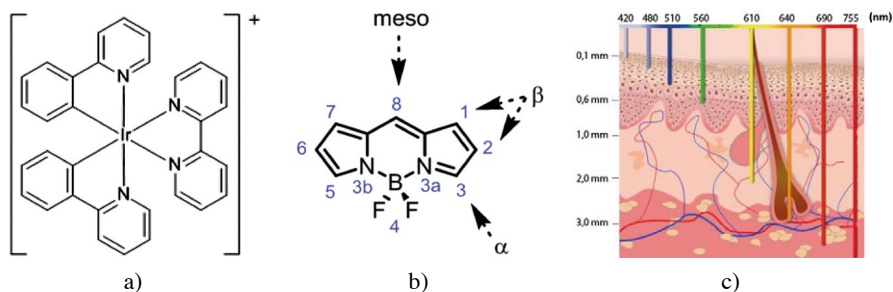
Oxigeno singletea sortzeko, fotosentikortzaile (PS) deitzen den molekula bat behar da. Fotosentikortzaileak, prozesu fotokimiko batean, beste molekula batean aldaketa kimikoak eragiten dituzten espezieak dira. Normalean, molekula fotoaktibo bat, argi egokiarekin kitzikatzen denean, bere oinarizko egoeratik (S_0) lehenengo singlete-egoera kitzikatura pasatzen da (S_1) fotoia absorbatzen baitu, eta egoera kitzikatu horretatik berriro oinarizko egoerara erlaxatzen da zenbait medio direla bide. PSekin gertatzen dena zera da: kitzikatzean, S_1 egoeratik PS hauek ez dira zuzenean oinarizko egoerara erlaxatzen; beste energia-maila bat dute eskuragarri, lehenengo tripletea hain zuzen (T_1), eta S_1 -etik T_1 -era pasa daitezke *intersystem crossing* (ISC) izenez ezagutzen den prozesua dela medio. Singleteak

eta tripleteak multiplizitate desberdina duten energia-mailak dira. PSak, triplete egoera kitzikatuan dagoelarik, desaktibatu edo erlaxatu baino lehen, inguruko oxigeno molekularrekin ($^3\text{O}_2$) talka egin dezake eta honi bere energia transferitu, oxigeno singlete ($^1\text{O}_2$) espeziea sortuz [4]. Oxigeno singlete espezie berri hori zuzenean detekta daiteke, banda fosforeszente karakteristikoa erakusten duelako 1.270 nm-ra. 1. irudian ikus daiteke, modu eskematikoan, zelan bihurtzen den oxigeno molekularra oxigeno singlete fotosentikortzailearen bidez. Irudian, espezie bakoitzaren (PSa eta oxigenoa) energia-mailak adierazi dira, eta bai energia-mailen artean gerta daitezkeen prozesuak ere. Prozesu horiek lehen aipatutako ISCa eta fluoreszentzia eta fosforeszentzia dira, erradiatzaileak direnak. Gezi urdinek PS kitzikatuaren eta oxigeno molekularren arteko talkaren ostean gertatzen den energia-transferentzia adierazten dute.

Terapia fotodinamikoan erabilgarriak diren fotosentikortzaileek zenbait ezaugarri izan behar dituzte. Iraungitze-koefiziente molar altuak behar dituzte leiho klinikoaren barnean (eremu elektromagnetikoaren eremu gorria, 650-800 nm). Horrek esan nahi du PSek argia xurgatzeko ahalmen handia izatea interesgarria dela, eta uhin-luzera horietan izateak gorputz-ehunetan sartzeko argiaren ahalmen handiagoa dakar. PSak oxigeno singletea efizienteki sortzea ere beharrezkoa da, eta baita hauek ilunpean zelulentzat gutxieneko toxikotasuna erakustea ere, albo-efektuak saihesteko.

Lehen aipatu den moduan, fotosentikortzaileek ISC prozesua jasan behar dute oxigeno singletea sortzeko. Dena den, gehienetan prozesu hori gertatzeko probabilitatea oso txikia da, baina badaude hori pizteko estrategiak. Adibidez, atomo pisutsuen eragina dela medio piztu daiteke. Hori dela eta, normalean trantsizio-metalen ioiak dituzten konplexuek $^1\text{O}_2$ -a modu efizientean sortzen dute [5,6]. Zentzu horretan, iridioa aplikazio biomedikoetarako interesgarria da, orokorrean oso geldoa eta egonkorra delako [7], baina hala ere, iridioa duten konplexu organometalikoaren inguruko lan gutxitan ikertzen da horien minbiziaren aurkako aktibitatea.

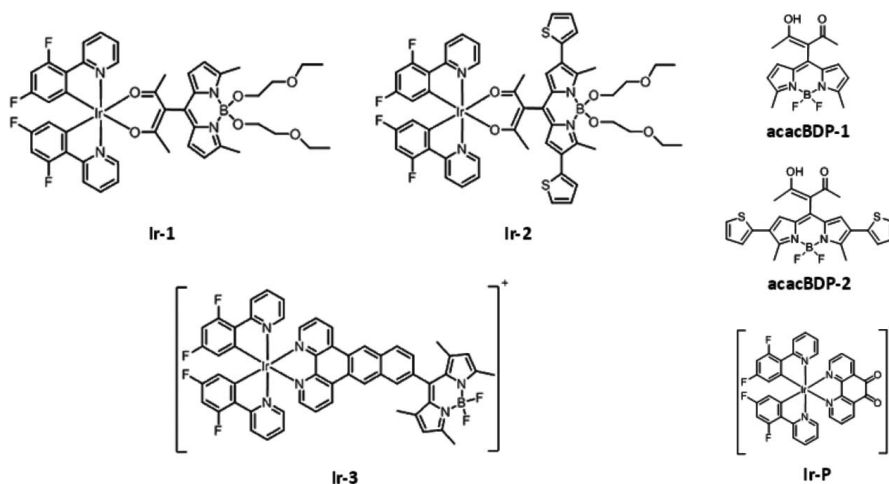
Bestalde, iridio (III) duten konplexuek normalean 2,2'-bipiridina eta horren antzeko ligandoak dituzte (2. irudia, a), eta nahiz eta honelako konposatuek argi-kitzikapenez oxigeno singletea sortzeko gaitasun handia izan, normalean bakarrik ultramore eremuan (UM) xurgatzen dute argia, eta horrek mugatu egiten du haiek aplikazio biologikoetan erabiltzea [5, 8]. Izan ere, eta lehen aipatu den moduan, interesgarriena da PSak argi gorriarekin kitzikatu ahal izatea, hau da, hauek argi gorria xurgatzea (leiho klinikoaren eremuan), gorputz-ehunetan sakonago barneratu daitezkeen argia baita (2. irudia, c). Kontuan izan beharra dago PS horiek erabiltzearen azken helburua dela ehun biologikoak tratatzea. Horregatik, ehunek xurgatzen dituzten uhin-luzerak saihestu behar dira, horrela argia PSetara heldu ahal izateko.



2. irudia. (a) Iridio (III) konposatu organometaliko ziklometalatu baten egitura orokorra. (b) BODIPY baten egitura molekular orokorra. BODIPY muinaren posizioak seinalatu eta zenbakitu dira IUPAC sistemaren arabera. (c) Uhin-luzera desberdinetako argiak larrazalean barneratzeko duen gutxi gorabeherako ahalmena. Ehunek gehien xurgatzen duten uhin-luzera gutxien barneratzen dena da.

Araza honi aurre egiteko, horrelako ziklo organometalikoei koloratzaile organikoak lotzea estrategia egokia izan daiteke; horrela, euren argia xurgatzeko gaitasuna gorrirantz zabaltzea lortzen da (leiho klinikora heldu arte, 650-800 nm) [5, 9-11]. Zentzu horretan, BODIPY izenez eza-gutzen diren koloratzaileak (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indazenoak, 2. irudia, b) erakargarriak dira; izan ere, iraungitze-koefiziente altuak azaltzen dituzte ikusgaiaren eremuan eta gogorrak dira fotodegradazioaren aurrean [12]. Horretaz gain, oso erraza da sintesi-prozesuan horien egitura muinaren inguruan aldaketa hautakorrak egitea, eta, horrela, koloratzailearen ezaugarriak modula daitezke unearen beharren arabera [13, 14]. Era horretan erabilera anitzetarako interesgarriak diren BODIPYak prestatu dira. Adibidez, sentore kimiko eta laser-koloratzaile gisa erabilgarriak diren BODIPYak aurki genitzake, besteak beste [13, 14]. Hala eta guztiz ere, orokorrean BODIPY koloratzaileak ezagunak dira haien errendimendu kuantiko fluoreszente altua dela eta. Errendimendu kuantiko fluoreszente altua izateak esan nahi du kitzikapenean xurgatzen dituzten fotoi ia guztiak igorpen fluoreszente gisa askatzen direla molekularen erlaxazio-prozesuan. Horrek oxigeno singletearen sorkuntzaren aurka jokatzen du, igorpen fluoreszente intentsua izateak tripleterako trantsizioa ia baliogabea dela esan nahi duelako [15].

Lan honetan, aipatutako bi sistema horiek konbinatuz (iriodun konposatu organometaliko eta BODIPY koloratzaileak), eremu ikusgaiaren argia xurgatzen duten fotosentikortzaile eraginkorrak aurkitzea dugu helburu. Sistema horien egokitasuna frogatzeko, bai prestatutako konplexuen eta baita konposatu aitzindarien karakterizazio fotofisikoa egin da (3. irudia), eta baita kalkulu teorikoak ere, esperimentalki lortutako emaitzei erantzuna aurkitu nahian.



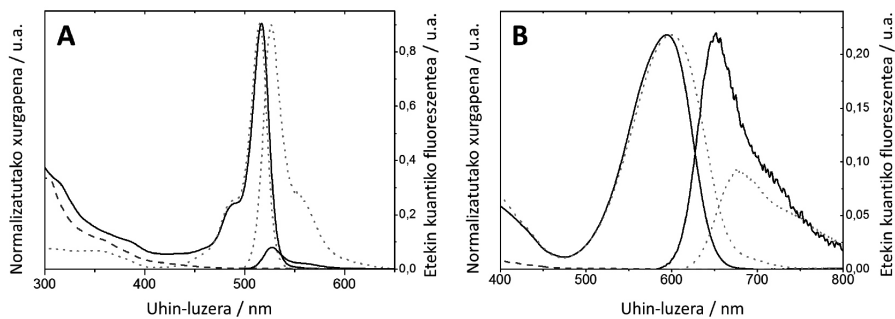
3. irudia. Ikertuko diren konposatu organometalikoaren egiturak (Ir-1, Ir-2 eta Ir-3), eta baita iridiodun aitzindariarena (Ir-P) eta BODIPY librearenak (acacBDP-1 eta acacBDP-2) ere.

2. KONPOSATU ORGANOMETALIKOEN SINTESIA

Konposatu organometaliko koloratzailearen (3. irudia) sintesia M.^a José Ortiz irakaslearen taldeak eraman zuen aurrera, Madrileko UCMan (*Universidad Complutense de Madrid*) [16]. Laburbilduz, acacBDP-1 lortu zuten Peña-Cabrera et al.-ek [17] deskribatutako prozedurari jarraituz. acacBDP-1 hori N-iodosukzinimidarekin (NIS) iodatu ostean, Suzuki erreakzioaren bitartez erreakzionarazi zen azido 2-tienilboronikoarekin acacBDP-2 kromoforoa lortzeko. BODIPY oxigenodunak (*O*-BODIPY) dituzten Ir^{III} konposatu ziklometalatuak lortzeko (Ir-1 eta Ir-2) Thomson et al.-ek [18] deskribatutako prozedurari jarraitu zioten, non bi nukleoko konposatu aitzindari bat ($[\text{Ir}(\text{dfppy})_2\text{Cl}]_2$) [19] dagokion BODIPYarekin erreakzionarazten den. Pauso horretan, ez zen BODIPYa zentro metalikoari lotzea bakarrik lortu, baita BODIPYaren fluor atomoak disolbatzailearekin ordezkatzea (2-etoxietanola) ere; horrela, BODIPY oxigenodunak lortuz. Funtzionalizazio-osagarri hori ere interesgarria da *O*-BODIPYek fotoegonkortasun altuagoa azaldu dutelako laser-aplikazioetarako [20] eta uretako disolbagarritasun hobea ere aplikazio biologikoetarako [21]. Ir-3 konposatua lortzeko fenantrodiona erreakzionarazi zen $[\text{Ir}(\text{dfppy})_2\text{Cl}]_2$ rekin, Ir-P aitzindaria lortuz. Azken konposatu hori diamino-BODIPY batekin kondentsatu zen [22], Ir-3a lortu zen emaitza gisa.

3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

Konposatu guztien karakterizazio fotofisikoa azetonitrilotan eraman zen aurrera, giro-tenperaturan. Lehenengo, konposatuaren xurgapen-espektroak erregistratu ziren (4. irudia). Espektrorietan antzeman zen lehenengo gauza izan zen Ir-P konposatuak ez duela argirik xurgatzen eremu ikusgai (400 nm-tik gora, 4. irudia A). Bestalde, Ir-1 konposatuak banda intentsua azaltzen du 517 nm-ra (4. irudia A). Banda hau BODIPY kromoforoari dagokio, acacBDP-1 konposatuaren espektroak agerian uzten duen moduan. Azken honen bandak aldaketarik jasan ez duenez Ir-dun zentroari lotzean, esan daiteke oinarritzko egoeran ez dagoela akoplamendu elektronikorik bi unitateen artean. Bestela, bandetan aldaketak eta desplazamenduak ikusiko lirateke. Dena den, fluoreszentiari dagokionez, nahiz eta acacBDP-1 konposatuak igorpen oso bizia erakutsi (etekin kuantiko fluoreszentea, ϕ_f : 0,90), Ir-1 konposatuak giro-tenperaturan oso igorpen ahula azaltzen du (ϕ_f : 0,08). Fluoreszentzia-ahalmenaren jaitziera hori singletetik tripleterako ISC prozesua sustatu delako gerta daiteke. Izan ere, Ir-1 konplexuak modu eraginkorrean sortzen du oxigeno singlete espeziea (oxigeno singletearen sorkuntzako etekin kuantikoa, Φ_Δ : 0,86) argi ikusgaiz kitzikatu ostean (kitzikapen uhin luzera, λ_{kitz} : 530 nm), acacBDP-1 kromoforoak ez bezala. Konposatuak fotosentikortzaile gisa duten ahalmena, hau da, oxigeno singletea sortzeko duten gaitasuna, espezie zitotoxikoaren banda fosforeszentea erregistratuz (1270 nm-ra) zehazten dugu laborategian, eta gure intereseko konposatuak kitzikatuz lortzen den banda erreferentziako molekula batekin lortzen denarekin konparatzen.



4. irudia. Normalizaturiko xurgapen-espektroak eta igorpen-espektroak etekin kuantikoaren baliora normalizatuak. (A) Ir-1: lerro jarraituak; acacBDP-1: puntuak; Ir-P: lerro etena. (B) Ir-2: lerro jarraituak; acacBDP-2: puntuak.

Portaera interesgarriagoa hauteman da Ir-2 konplexua neurtzerakoan. acacBDP-2 kromoforo librea hartzen badugu, ikusten da haren banda espektralak gorriantz desplazatuta daudela acacBDP-1ekin konparatuta

Ir-3 konposatuak, non BODIPYrako lotura era desberdinean egin den, Ir-1 eta Ir-2 konposatuekin konparatuta, xurgapen banda intentsuak ematen ditu eremu ikusgai (5. irudia), baina ia ez du emititzen, eta, gainera, ez du oxigeno singleterik sortzen argi ikusgaiarekin kitzikatu ostean (λ_{kitz} : 515 nm). Oxigeno singletea sortzeko aukera bakarra konposatu hori argi ultramoz kitzikatzea da (λ_{kitz} : 370 nm, Φ_{Δ} : 0,51). Hau da, zuzenean zentro metalikoa kitzikatu behar da (UM eremuan xurgapenaren arduraduna unitate hori baita). Beraz, Ir-3 konposatuan erabilitako ziklo metalikoaren eta kromoforo organikoaren arteko lotura hori (2. irudia) ez da egokia eremu ikusgai kitzika daitezkeen fotosentikortzaileak lortzeko.

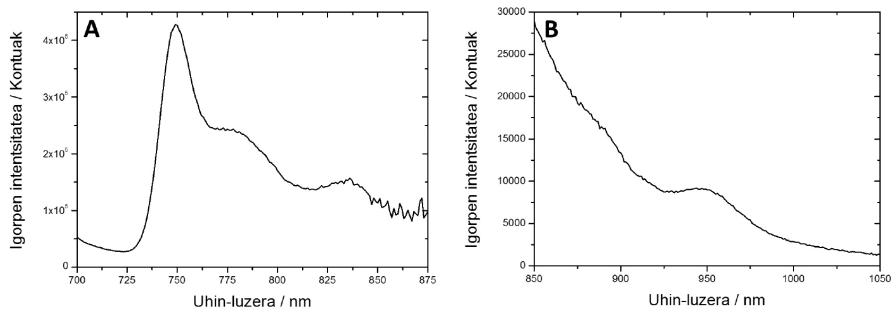
Aipatutako emaitza guztiak 1. taulan bildu dira:

1. taula. Aztertutako konposatuen ezaugarri fotofisikoak azetonitrilotan eta giro-temperaturan, 10^{-5} M-reko kontzentrazioan: xurgapen eta igorpen fluoreszentearen uhin-luzera maximoak (λ_{xur} and λ_{fl}), etekin kuantiko fluoreszentea (ϕ_{fl}) eta oxigeno singletea sortzeko etekina (Φ_{Δ}). Azken hori neurtzeko, hurrenez hurren, 530, 605 eta 370 nm-ko kitzikapen-argia erabili da Ir-1, Ir-2 eta Ir-3arentzat.

Konposatua	λ_{xur} / nm	λ_{fl} / nm	ϕ_{fl}	Φ_{Δ}
acacBDP-1	515	526	0,90	0,00
acacBDP-2	600	677	0,09	0,00
Ir-1	517	528	0,08	0,86
Ir-2	597	652	0,22	0,60
Ir-3	502	546	0,01	0,51

Baina oraindik ez dakigu beste bi konposatu organometalikoaren fotosentikortzaile-aktibitatea konplexuaren zein zatiri dagokion: zentro metalikoari (energia-transferentzia kromoforoak argia xurgatu ostean) edo BODIPYari (zeinen ISC prozesua areagotu den Ir-aren atomo pisutsu efektua dela eta). Horren inguruan gehiago jakiteko asmoz, konposatuen lumineszentzia-propietateak aztertu ziren 77K-ean etanoletan, fosforeszentzia neurtzeko, igorpen hori molekulen triplete-egoera kitzikatutik baitator. Ir-1 konposatuaren kasuan fosforeszentzia-banda ahula erregistratu zen 749 nm-an (6. irudia A), eta uhin-luzera honetan 2,4 ms-ko erdibizitza denbora neurtu zen. Horrelako erdibizitza-denbora luzeak erregistratu ohi dira konposatu organikoentzat [10]; beraz, fosforeszentzia horren arduraduna konposatu organiko puru bat dela esan dezakegu. Izan ere, fosforeszentzia zentro metalikotik etorriko balitz, igorpen fosforeszentea 700 nm-tik behera agertu beharko litzateke, eta erdibizitza-denbora askoz laburragoak azalduko litzake [10,24]. Ir-2ari dagokionez, bere fosforeszentzia-banda 948 nm-ra agertzen da, uhin-luzera oso altuetan. BODIPY

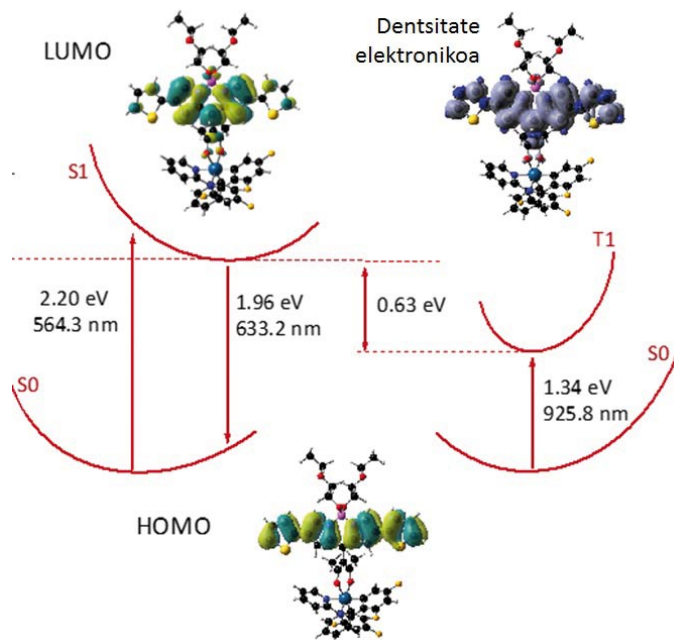
askeen kasuan (acacBDP-1 eta acacBDP-2), fosforeszentzia lehenengoaren kasuan bakarrik detektatu da.



6. irudia. Ir-1aren (A) eta Ir-2aren (B) fosforeszentzia bandak, etanoletan eta 77K-era neurtuta.

Beraz, emaitza hauek ikusita, esan daiteke konposatu horietan BODIPYen ISC-prozesua (triplete-egoerara) piztu dela. ISC-prozesu horri iridio atomo pisutsuak gertu egoteak laguntzen dio, beste autore batzuek antzeko konposatuentzat azaldu duten spin-orbita akoplamendua dela eta [9, 10, 25].

Emaitza esperimenterak bermatzeko asmoz, Hegoi Manzano Doktoarek (UPV/EHU) kalkulu teorikoak egin zituen. Ir-2aren ezaugarri fotofisikoak analizatu ziren teorikoki DFT bitartez (Density Functional Theory). Ir-2aren oinarritzko egoerako geometria optimizatuan (7. irudia) ikus daiteke BODIPY unitatea zentro metalikoarekin duen loturarekiko modu perpendikularrean kokatzen dela; beraz, ez da espero π -konjugaziorik unitateen artean (akoplamendu elektronikorik). Bestalde, tieniloak BODIPY egituraren muinarekiko guztiz lerrokatuta daude, eta beraz, horretan bai, π -konjugazioa hedatuta dago, zeinek Ir-1ekiko gorriranzko espektro-banden desplazamendua azaltzen duen. Xurgapeneko uhin-luzera kalkulatu zen Frank-Condon trantsizio bertikalak onartuz, eta 564 nm-ko balioa kalkulatu zen, esperimenteralki lortutako baliotik gertukoa. Trantsizio horretan HOMO eta LUMO orbitalak daude sartuta (HOMO: *Highest Occupied Molecular Orbital*; LUMO: *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), eta bietan dentsitate elektronikoa BODIPY unitatean dago kokatuta (7. irudia). Kalkulatutako fluoreszentzia-igorpenaren uhin-luzera 633 nm izan zen, esperimenteralki neurtutako baliotik gertukoa; eta, beraz, kalkulaturako Stokes-desplazamendua ere bat dator esperimenterarekin (69 nm kalkuluan, eta 55 nm esperimenteralki).

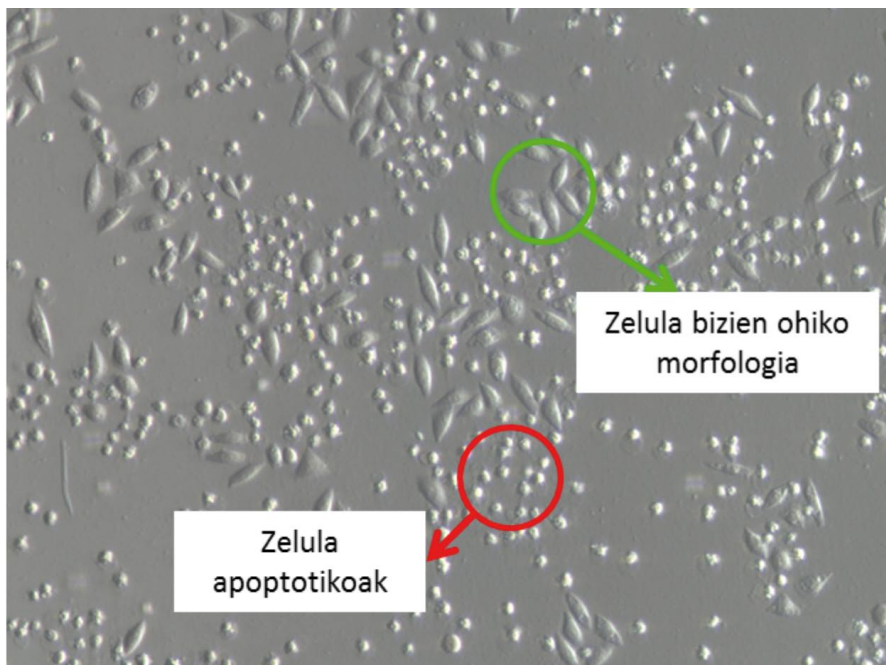


7. irudia. Ir-2 konposatuarentzako prozesu fotofisikoen irudikapen eskematikoa. Geziek trantsizio bakoitzaren norabidea adierazten dute, dagokien energia eta uhin-luzerarekin. S₀, S₁ eta T₁ egoerek oinarrizko egoera eta lehenengo singlete- eta triplete-egoera kitzikatuak adierazten dituzte, hurrenez hurren. HOMO eta LUMO orbital atomikoen kokapen espaziala eta dentsitate elektronikoen emaitzak ere adierazi dira.

Optimizatutako oinarrizko egoeraren eta triplete-egoera kitzikatuaren arteko energia-diferentzia ere (926 nm) bat dator esperimentalki lortutako fosforeszentzia-bandaren kokapenarekin, eta tripletean ere BODIPYan kokatuta dago dentsitate elektronikoa. Beraz, hau guztia ikusita, esan daiteke kalkuluek emaitza esperimentaletatik ikusita ateratako ondorioak bermatzen dituztela, hau da, BODIPYaren tripletearen populatzea sustatu dela zentro metalikoari lotzean eta populatze hori dela oxigeno singletearen sorreraren erantzulea.

Orain, konposatuak terapia fotodinamikorako egokiak diren ikusteko, hau da, zelulak hiltzeko ahalmena duten frogatzeko, *in vitro* zitotoxizitate-esperimentuak egin zituzten Ángeles Villanueva irakaslearen taldeko kideek (UAM, Universidad Autónoma de Madrid). Erabili ziren HeLa zelulak fotosentikortzaileekin inkubatu ziren 24 orduz. Lehenengo eta behin aipatu beharra dago konposatuak ez direla toxikoak zelulentzat argirik ez dagoenean, ilunpean. Hori oso garrantzitsua da material bat terapia fotodinami-

koan erabili nahi denean. Inkubatu ostean, fototoxizitate-esperimentuak aurrera eramán ziren, argi berdearekin kitzikatuz Ir-1aren kasuan, eta gorriarekin Ir-2aren kasuan. Bi kasuetan, HeLa zeluletan fotosentikortzaileek fototoxizitatea eragiten zutela ikusi zen; izan ere, morfologia apoptotikoak ikusi ziren tratamendu fotodinamikoaren ostean (inkubazioa eta irradiazioa, 8. irudia). Horrek esan nahi du zelulak apoptosi bidez hil direla gure PSeK sortutako oxigeno singletea dela medio, behin zelula-kultiboa argiztatuta.



8. irudia. Ir-2arekin eta kitzikapen argi gorriarekin egindako tratamendu fotodinamikoaren osteko HeLa zelulen irudia, *Differential Interference Contrast* (DIC) mikroskopia bidez lortua.

Bi fotosentikortzaileek inkubatutako zelulen % 85 inguru hiltzeko gai dira haientzat ilunean toxikoak ez diren kontzentrazioetan. Hau da, PSak ez dira kaltegarriak zelulentzat erabilitako kontzentrazioetan, argiztatu eta kitzikatzen diren arte. Horrela, ehun biologikoetan erabiliz gero, intereseko eremua selektiboki argiztatzen bada, beste gune osasuntsuak kaltetzea saihestu dezakegu.

Beraz, bi sistema egoki diseinatu dira terapia fotodinamikoan erabilgarriak izateko, zeintzuek oxigeno singletea efizienteki sortzen duten eremu ikusgaiko argiarekin kitzikatu ostean.

4. ONDORIOAK

Lan honetan diseinu arrazional baten bidez aplikazio biologikoetarako erakargarriak diren fotosentikortzaile efizienteak lor daitezkeela frogatu da, haien xurgapen-eremua ikusgaira zabalduz. Ir-1 eta Ir-2 konposatuak fotosentikortzaile efizienteak dira, oxigeno singletea Φ_{Δ} : 0,86 eta Φ_{Δ} : 0,60ko etekinarekin sortzeko gai direnak, hurrenez hurren. Ondorio hau, zentro metalikoaren eta BODIPY kromoforoaren arteko lotura egokiarekin, koloratzailearen estatu kitzikatuen arteko ISC prozesua areagotzearen emaitza zuzena da. Gainera, argia jasotzeko ahalmena eremu gorrirantz hedatu da, leiho klinikotik oso gertu egonik Ir-2 konposatuaren kasuan. Azken honetan ere oreka erakargarria lortu da igorpen fluoreszentearen eta fotosentikortzaile-ahalmenaren artean, eta, beraz, konposatu aproposa da bai fluoreszentiako irudiak lortzeko eta bai terapia fotodinamikoan, hurrenez hurren. Terapia fotodinamikorako aktibitatea *in vitro* esperimenduekin frogatu egin da, non ilunpean konposatuek zelulentzat toxizitate baxua erakutsi duten, eta argi egokiarekin kitzikatuz gero, toxizitate altua. Beraz, esan daiteke lortutako konposatuak plataforma baliotsuak direla teragnosirako material aurreratuarik garatzeko.

5. ESKER ONAK

Lan honek Eusko Jaurlaritza (IT912-16) ikerketa-proiektuaren diru-laguntza izan du.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] DEROSA, M.C., CRUTCHLEY, R. 2002. «Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications». *Coord. Chem. Rev.*, **233-234**, 351-371.
- [2] OGILBY, P.R. 2010. «Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun». *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 3181-3209.
- [3] WILKINSON, F., HELMAN, W.P., ROSS, A.B. 1993. «Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution». *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **22**, 113-262.
- [4] OLIVEROS, E., SUARDI-MURASECCO, P., AMINIAN-SAGHAFI, T., BRAUN, A.M., HANSEN, H.J. 1991. «1H-Phenalen-1-One: Photophysical Properties and Singlet-Oxygen Production». *Helv. Chimica Acta*, **74**, 79-90.
- [5] ZHAO, J., WU, W., SUN, J., GUO, S. 2013. «Triplet Photosensitizers: From Molecular Design to Applications». *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 5323-5351.
- [6] YOU, Y., NAM, W. 2012. «Photofunctional Triplet Excited States of Cyclometalated Ir(III) Complexes: Beyond Electroluminescence». *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 7061-7084.

- [7] LIU, Z., SADLER, P.J. 2014. «Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts». *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1174-1185.
- [8] GELDMACHER, Y., OLESZAK, M., SHELDRIK, W.S. 2012. «Rhodium(III) and iridium(III) Complexes as Anticancer Agents». *Inorganica Chim. Acta*, **393**, 84-102.
- [9] RACHFORD, A.A., ZIESSEL, R., BURA, T., RETAILLEAU, P., CASTELLANO, F.N. 2010. «Boron Dipyromethene (Bodipy) Phosphorescence Revealed in [Ir(ppy)₂(bpy-C≡C-Bodipy)]⁺ ». *Inorg. Chem.*, **49**, 3730-3736.
- [10] GALLETTA, M., CAMPAGNA, S., QUESADA, M., ULRICH, G., ZIESSEL, R. 2005. «The Elusive Phosphorescence of Pyromethene-BF₂ Dyes Revealed in New Multicomponent Species Containing Ru(II)-Terpyridine Subunits». *Chem. Commun.*, 4222-4224.
- [11] SUN, H., GUO, H., WU, W., LIU, X., ZHAO, J. 2011. «Coumarin Phosphorescence Observed with N^N Pt(II) Bisacetylide Complex and Its Applications for Luminescent Oxygen Sensing and Triplet-triplet-Annihilation Based Upconversion». *Dalt. Trans.*, **40**, 7834-7841.
- [12] YOGO, T., URANO, Y., ISHITSUKA, Y., MANIWA, F., NAGANO, T. 2005. «Highly Efficient and Photostable Photosensitizer Based on BODIPY Chromophore». *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12162-12163.
- [13] ULRICH, G., ZIESSEL, R., HARRIMAN, A. 2008. «The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed». *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **47**, 1184-1201.
- [14] LOUDET, A., BURGESS, K. 2007. «BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties». *Chem. Rev.*, **107**, 4891-4932.
- [15] PAVLOPOULOS, T.G. 2002. «Scaling of Dye Lasers with Improved Laser Dyes». *Prog. Quantum Electron.*, **26**, 193-224.
- [16] PALAO, E., SOLA-LLANO, R., TABERO, A., MANZANO, H., AGARRA-BEITIA, A.R., VILLANUEVA, A., LÓPEZ-ARBELOA, I., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, V. ORTIZ, M.J. 2017. «AcetylacetonateBODIPY-Biscyclometalated Iridium(III) Complexes: Effective Strategy towards Smarter Fluorescent Photosensitizer Agents». *Chem. Eur. J.*, **23**, 10139-10147.
- [17] GUTIÉRREZ-RAMOS, B.D., BAÑUELOS, J., ARBELOA, T., LÓPEZ ARBELOA, I., GONZÁLEZ-NAVARRO, P.E., WROBEL, K., CERDÁN, L., GARCÍA-MORENO, I., COSTELA, A., PEÑA-CABRERA, E. 2015. «Straightforward Synthetic Protocol for the Introduction of Stabilized C Nucleophiles in the BODIPY Core for Advanced Sensing and Photonic Applications». *Chem. Eur. J.*, **21**, 1755-1764.
- [18] LAMANSKY, S., DJUROVICH, P., MURPHY, D., ABDEL-RAZZAQ, F., KWONG, R., TSYBA, I., BORTZ, M., MUI, B., BAU, R., THOMPSON, M.E. 2001. «Synthesis and Characterization of Phosphorescent Cyclometalated Iridium Complexes». *Inorg. Chem.*, **40**, 1704-1711.
- [19] COPPO, P., PLUMMER, E.A., DE COLA, L. 2004. «Tuning iridium(III) phenylpyridine complexes in the «almost blue» region». *Chem. Commun.*, 1774-1775.

- [20] DURÁN-SAMPEDRO, G., AGARRABEITIA, A.R., CERDÁN, L., PÉREZ-OJEDA, M.E., COSTELA, A., GARCÍA-MORENO, I., ESNAL, I., BAÑUELOS, J., LÓPEZ ARBELOA, I., ORTIZ, M.J. 2013. «Carboxylates versus Fluorines: Boosting the Emission Properties of Commercial BODIPYs in Liquid and Solid Media». *Adv. Funct. Mater.*, **23**, 4195-4205.
- [21] POIREL, A., RETAILLEAU, P., DE NICOLA, A., ZIESSEL, R. 2014. «Synthesis of Water-Soluble Red-Emitting Thienyl-BODIPYs and Bovine Serum Albumin Labeling». *Chem. Eur. J.*, **20**, 1252-1257.
- [22] GABE, Y., URANO, Y., KIKUCHI, K., KOJIMA, H., NAGANO, T. 2004. «Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe». *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3357-3367.
- [23] CHEN, Y., ZHAO, J., GUO, H., XIE, L. 2012. «Geometry Relaxation-Induced Large Stokes Shift in Red-Emitting Borondipyrromethenes (BODIPY) and Applications in Fluorescent Thiol Probes». *J. Org. Chem.*, **77**, 2192-2206.
- [24] JURIS, A., BALZANI, V., BARIGELLETI, F., CAMPAGNA, S., BELSER, P., VON ZELEWSKY, A. 1988. «Ru(II) Polypyridine Complexes: Photophysics, Photochemistry, Electrochemistry, and Chemiluminescence». *Coord. Chem. Rev.*, **84**, 85-277.
- [25] SUN, J., ZHONG, F., YI, X., ZHAO, J. 2013. «Efficient Enhancement of the Visible-Light Absorption of Cyclometalated Ir(III) Complexes Triplet Photosensitizers with Bodipy and Applications in Photooxidation and Triplet-Triplet Annihilation Upconversion». *Inorg. Chem.*, **52**, 6299-6310.