

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

PROMOCIJAS DARBS

KĀRLIS PAJUSTE

**AMFIFILO KATJONO PIRIDĪNA ATVASINĀJUMU  
SINTĒZE JAUNU GĒNU TRANSPORTA FORMU IZVEIDEI**

Zinātniskie vadītāji:

Dr.ķīm. AIVA PLOTNIECE

Dr.ķīm. asociētā profesore ANDA PRIKŠĀNE

RĪGA

2010

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā un Kuopio Universitātes Farmācijas fakultātē laika posmā no 2005. gada līdz 2010. gadam.

Recenzenti: Dr.habil.ķīm, profesors **Andris Zicmanis**

Dr.ķīm.asociētā profesore **Jana Kreicberga**

Dr.ķīm. **Aigars Jirgensons**

Zinātniskie vadītāji: Dr.ķīm. **Aiva Plotniece**

Dr.ķīm. asociētā profesore **Anda Prikšāne**

Darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē

2010. gada 16.decembrī

Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē

Kr. Valdemāra ielā 48

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā, Kalpaka bulvārī 4.

## KOPSAVILKUMS

**Amfifilo katjono piridīna atvasinājumu sintēze jaunu gēnu transporta formu izveidei.** Pajuste K., zinātniskie vadītāji Dr.ķīm., Plotniece A., Dr. ķīm., asociētā profesore Prikšāne A. Promocijas darbs, 129 lappuses, 31 attēls, 8 tabulas, 268 literatūras avoti, 1 pielikums. Latviešu valodā.

KATJONIE 1,4-DIHIDROPIRIDĪNI, HANČA SINTĒZE, BROMĒŠANA, NUKLEOFILĀ BROMA AIZVIETOŠANA, PIRIDĪNA KVATERNIZĀCIJA, KATJONU 1,4-DIHIDROPIRIDĪNU OKSIDĒŠANA, NANOAGREGĀTI, GĒNU TRANSFEKCIJA, CITOTOKSICITĀTE, ATOMSPĒKU MIKROSKOPIJA, ELEKTRONMIKROSKOPIJA

Meklējot jaunus, aktīvākus gēnu transfekcijas aģentus, modificēts aktīvākais no zināmajiem katjonajiem amfifilajiem 1,4-dihidropiridīna klases savienojumiem - 1,1'-[(3,5-didodeciloksikarbonil-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija dibromīds, kuram variēti 2,6-piridīnija gredzena aizvietotāji ar dažādiem elektroniskajiem un stēriskajiem efektiem. No jauniegūtajiem 30 savienojumiem 9 izvirzīti padziļinātiem bioloģiskiem pētījumiem. Optimizēta garus alkilaizvietotājus saturošus 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu iegūšanas metode. Pētītas iegūto produktu nanoagegātu struktūras. Iegūti aktīvā savienojuma anjonu analogi. Noteikta sintezēto savienojumu gēnu transfekcijas aktivitāte un citotoksicitāte. Veikta katjonus aizvietotājus saturošu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšana. Dots sintezēto savienojumu fizikāli-ķīmiskais raksturojums.

## ABSTRACT

**The synthesis of amphiphilic cationic pyridinium derivatives for development of new forms of gene delivery.** Pajuste K., supervisors Dr. chem. Plotniece A., Dr. chem., assoc. prof. Priksane A. PhD thesis. 129 pages, 31 figure, 8 tables, 268 literature references, 1 appendix. In Latvian.

CATIONIC 1,4-DIHYDROPYRIDINES, HANTZSCH SYNTHESIS, BROMINATION, NUCLEOPHILIC SUBSTITUTION OF BROMINE, QUATERNIZATION OF PYRIDINE, OXIDATION OF CATIONIC 1,4-DIHYDROPYRIDINES, NANOAGGREGATES, GENE TRANSFECTION, CYTOTOXICITY, ATOM FORCE MICROSCOPY, ELECTRONMICROSCOPY

In order to find new more active gene trasfection agents the modifications of the most active compound of the class of cationic amphiphilic 1,4-dihydropyridines (DHP) - 1,1'-[(3,5-di(dodecyloxycarbonyl)-4-phenyl-1,4-dihydropyridin-2,6-diyl)-dimetylen]bispyridinium dibromide have been carried out. These modifications have included variations of substituents with different electronic effects of pyridinium ring at the position 2 and 6 of 1,4-DHP cycle. From 30 synthesised compounds 9 were selected for more detailed biological investigations. Method of synthesis of 1,4-DHP derivatives with long alkyl chains has been optimised. Nanoaggregates of obtained compounds have been studied. Gene transfection activity and citotoxicity synthesised compounds have been also tested. Oxidation of cationic substituents containing 1,4-DHP derivatives has been performed.

## SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS .....	9
1 LITERATŪRAS APSKATS .....	14
1.1 Gēnu terapija.....	14
1.1.1 Virālie vektori .....	15
1.1.2 Fizikālās metodes.....	16
1.1.3 Nevirālie vektori .....	16
1.1.4 Bioloģiskās barjeras gēnu tranfekcijā.....	20
1.2 Nevirālie gēnu transfekcijas aģenti.....	22
1.2.1 Lipidomimētiķu klase .....	23
1.2.2 Polimēri.....	36
1.2.3 Nanodaļiņas .....	38
1.2.4 Gēnu transfekcijas aģenti ar buferkapacitātes īpašībām.....	39
1.3 Dihidropiridīnu bioloģiskās īpašības .....	39
1.3.1 Farmakoforās īpašības .....	40
1.3.2 1,4-Dihidropiridīnu membranotropās īpašības .....	40
1.4 Katjonu amfifilu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu iegūšana .....	41
1.4.1 1,4-Dihidropiridīna 2,6-dimetilgrupu funkcionalizēšana .....	42
1.4.2 2,6-Bis(brommetil)-1,4-dihidropiridīna bromu nukleofila aizvietošana .....	45
1.4.3 Piridīna un tā atvasinājumu kvaternizācija ar halogēnalkāniem.....	46
1.4.4 1,4-Dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšana .....	47
1.5 Pašorganizējošos katjono amfifilo savienojumu veidoto nanoagregātu raksturošanas metodes .....	49
1.5.1 Gaismas mikroskopija .....	50
1.5.2 Elektronmikroskopija .....	50

1.5.3	Atomspēku mikroskopija.....	51
2	REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS .....	53
2.1	Katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu iegūšana.....	54
2.1.1	Acetetiķskābes dodecilestera un 3,5-alkoksikarbonil-1,4-dihidropiridīna atvasinājumu sintēzes.....	54
2.1.2	1,4-Dihidropiridīna un piridīna atvasinājumu 2,6-vietas modifikācijas .....	61
2.2	Katjonu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšana .....	75
2.3	Savienojumu fizikāli-ķīmiskais un bioķīmiskais raksturojums.....	79
2.3.1	pKa noteikšana.....	79
2.3.2	Katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu agregācijas pētījumi ar gaismas mikroskopiju .....	83
2.3.3	Katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīnu kompleksēšanās ar DNS.....	84
2.3.4	Citotoksicitāte .....	86
2.3.5	Gēnu transfekcija .....	88
2.3.6	Liposomu pētījumi ar atomspēku mikroskopiju.....	91
2.3.7	Liposomu pētījumi ar elektronmikroskopiju .....	96
3	EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA .....	99
3.1	Pielietotās metodes un aparatūra .....	99
3.2	Sintēžu apraksti.....	100
3.3	Pielietotās metodes .....	112
	Secinājumi.....	115
	Publikācijas .....	117
	Literatūras saraksts.....	119
	Pielikums.....	129

## Saīsinājumi

AEŠH - augstas efektivitātes šķidrumu hromatogrāfija

2-CIMPy - 2-hlor-1-metilpiridīnija jodīds

4-MBPY – 4-metil-1-butilpiridīnija bromīds

AcOH – etiķskābe

ASM - atomspēku mikroskopija

CNS - centrālā nervu sistēma

DBDMH - 1,3-dibrom-5,5-dimetilhidantoīns

DHP - dihidropiridīns

DMF - dimetilformamīds

DMSO - dimetilsulfoksīds

DNS - dezoksiribonukleīnskābe

DOTAP - N-(1-(2,3-dioleoiloksi)propil)-N,N,N-trimetilamonija metilsulfāts

DOTB - 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-ammonio)butanoil-glicerīns

DOTMA - dioleiloksipropil-trimetilamonija bromīds

DPPC - 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfatidilholīns

DSC - diferenciālā skenējošā kalorimetrija

EDTA - etilēndiamīntetraetiķskābe

EM - elektronmikroskopija

EtBr - etīdija bromīds, 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridīnija bromīds

EtOAc – etilacetāts

EtOH – etanols

HEPES - N-(2-hidroksietil)piperazīna-N'-2-etānsulfoskābe

JŠ – jonu šķidrums

KMR - kodolmagnētiskā rezonanse

MeOH – metanols

MES - 2-(N-morfolīn)etānsulfoskābe  
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds  
NBS - N-bromsukcinimīds  
ONPG - *o*-nitrofenilgalaktopiranozīds  
PBS - fosfāta buferis  
PEI - polietilēnimīns  
PLL - poli-L-lizīns  
Py - pīridīns  
RNA - ribonukleīnskābe  
SDS - nātrija dodecilsulfāts  
SEM - skenējošā elektronmikroskopija  
TEM - transmisijas elektronmikroskopija  
THF - tetrahidrofurāns  
UV/VIS - ultravioletā/ redzamā  
m% - masas procenti  
 $T_{\text{sad.}}$  - sadalīšanās temperatūra  
 $T_{\text{kuš.}}$  - kušanas temperatūra



## IEVADS

Pēdējās desmitgadēs, strauji attīstoties un veiksmīgi sadarbojoties vairākām zinātņu nozarēm, mūsdienu pētījumi ļauj izmantot unikālas iespējas, lai pietuvotos arvien sīkākiem un sīkākiem struktūras elementiem, nokļūstot nanopasaulē, pētot un cenšoties saprast tās uzbūvi līdz pat sīkākajiem pamatelementiem, par kuriem vēl dažas desmitgades atpakaļ nebija tik pilnīgu datu.

Akcentējot medicīnas un farmakoloģijas attīstību, jāuzsver, ka pagājušā gadsimta beigās, meklējot jaunas, netradicionālas iespējas dažādu slimību ārstēšanai un profilaksei, attīstoties tendencēm izmantot ģenētisko informāciju medicīnas praksē, liela uzmanība tika pievērsta gēnu transfekcijas aģentu meklējumiem. Slimības, kas saistītas ar gēnu darbības traucējumiem vai to rezultātā radušās problēmas, veiksmīgi varētu ārstēt mērķtiecīgi ievadot šūnā speciāli izveidotu, koriģētu ģenētisko materiālu. Turklāt, ģenētiskā materiāla nogādāšana noteiktās šūnās un šūnas kodolā ļautu ietekmēt ne tikai iedzimtus ģenētiskās darbības traucējumus, bet arī iejaukties un efektīvi labot patoloģiskus procesus, kā arī ietekmēt onkoloģiskās saslimšanas, sirds-asinsvadu un centrālās nervu sistēmas (CNS) slimības to simptomātikas parādīšanās sākumposmā. Pēdējo gadu zinātniskajā literatūrā īpaši uzsvērtā nevirālo gēnu transfekcijas aģentu attīstība, jaunu savienojumu meklējumi. Liela daļa no tiem ir sintētiskie katjoni amfifilie savienojumi (katjoni lipīdi, polimēri), kas spēj veidot nanoagregātus, kompleksēt dezoksiribonukleīnskābes (DNS) un nogādāt tās mērķšūnā; sintētiskie vektori ir stabilāki, daudziem no tiem piemīt buferkapacitāte, un tie nav imunogēni, salīdzinot ar virālajiem vektoriem. Literatūrā piedāvāts plašs klāsts šādu sintētisko katjono amfifilu. Diemžēl nevirālo gēnu transfekcijas aģentu efektivitāte pagaidām vēl ir zema, tādēļ tiek meklētas un pētītas jaunas sintētisku savienojumu grupas.

Kā viena no jaunākajām gēnu transfekcijas aģentu grupām pēdējā desmitgadē tiek piedāvāti Latvijas Organiskās sintēzes institūta Membrānaktīvu savienojumu un β-diketonu laboratorijā iegūtie katjoni amfifilie 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumi, kuriem molekulā ir konstants katjono fragmentu skaits un garas alkilķēdes saturoši aizvietotāji. Šie savienojumi ūdens šķīdumos spēj pašasociēties - spontāni veidot dažādus nanoagregātus. Tie ir uzrādījuši augstāku aktivitāti par dažiem praksē pielietotiem liposomālajiem un polimēru tipa gēnu transfekcijas

aģentiem. Tomēr pagaidām par šāda tipa polifunkcionāliem katjoniem 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem kā gēnu transfekcijas aģentiem un to īpašībām, kā arī par struktūras–aktivitātes sakarībām ir maz pētījumu.

Pēdējo trīsdesmit gadu laikā dabisko un sintētisko fizioloģiski aktīvo vielu vidū nozīmīgu vietu ieņem daļēji hidratētie azīni, no kuriem svarīgi ir 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi, jo tiem piemīt farmakoloģisko aktivitāšu daudzveidība. Kā uzsvēris Trigle (*Triggle*), 1,4-dihidropiridīna gredzens tiek uzskatīts par vienu no farmakoloģiski privilēģētām struktūrām. Detalizētāk ir izpētīta 1,4-DHP darbība uz sirds–asinsvadu sistēmu, bet šo savienojumu vidū ir arī vielas ar neuroprotektorām, pretvēža, antioksidantu, radioprotektīvām, antidiabēta un citām farmakoloģiskām īpašībām, tādēļ šādi savienojumi būtu interesanti kā potenciālo transportmolekulu struktūrelementi, jo tie ar savām īpašībām varētu pildīt ne tikai transportfunkciju, bet arī sekmēt organisma aizsardzību.

Tāpat, attīstoties mūsdienu tehnoloģijām un iespējām, rodas jaunas un pilnveidojas vecās metodes dažādu bioloģisko objektu analizēšanai, un savienojumu fizikāli-ķīmisko īpašību raksturošanai. Tas ļauj daudz ātrāk, precīzāk un īsākā laikā iegūt daudzpusīgus rezultātus par paraugu īpašībām, paralēli ļaujot analizēt arvien mazākus un mazākus objektus. Tā kā mūsu pētītie savienojumi uzrāda pašasociējošas īpašības, tad atomspēku mikroskopija (ASM) un arī elektronmikroskopija (EM) ir piemērotas metodes to pētīšanai. Mūsu savienojumu veidotie nanoagregāti nākotnē būtu svarīgi ne tikai gēnu, bet arī zāļu transportformu izveidei, tādēļ ļoti svarīgi pētīt ne tikai struktūras-aktivitātes, bet arī struktūras nanoagregātu formas-aktivitātes sakarības.

Mūsu pētījumu objekts ir potenciālie gēnu transfekcijas aģenti – katjoni amfifilie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi, to mērķtiecīgas modifikācijas, tādējādi saglabājot gan farmakoloģiski aktīvo 1,4-DHP ciklu, kurš būtu atbildīgs par citām bioloģiskajām aktivitātēm, piemēram, antioksidantu, antiradikālo, savienojuma buferīpašībām, kas būtu ļoti nozīmīgi ekperimentos šūnu līmenī, gan arī molekulas katjono daļu, kas ir būtiska, runājot par savienojumu spēju veidot liposomas vai citus nanoagregātus.

### **Darba mērķis:**

Sintezēt jaunus potenciālos gēnu transfekcijas aģentus, mērķtiecīgi mainot molekulas polārās daļas aizvietotājus aktīvākajam no līdz šim zināmajiem gēnu transfekcijas aģentiem dihidropiridīnu rindā 1,1'-[(3,5-didodeciloksikarbonil-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija dibromīdam, lai skaidrotu katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu struktūras-aktivitātes sakarības, pētītu struktūras – fizikāli ķīmisko parametru saistību, meklētu vēl aktīvākus savienojumus.

### **Augstāk izvirzītā mērķa sasniegšanai formulēti sekojoši darba uzdevumi:**

Attīstīt amfifilo 1,4-DHP atvasinājumu izejvielu iegūšanas metodes.

Sintezēt un raksturot jaunu oriģinālu katjono amfifilo 1,4-DHP savienojumu grupu.

Pētīt molekulas katjono centru aizvietotāju ietekmi uz potenciālo gēnu transfekcijas aģentu buferkapacitāti, sintezējot molekulas, kas 1,4-DHP cikla 2,6-vietās piridīnija ciklā satur dažādus elektroniskos efektus uzrādošus aizvietotājus; pārbaudot to buferīpašības; analizējot struktūras – aktivitātes sakarības.

Veidot aktīvā savienojuma *dvīņu* tipa atvasinājumu ar dubultu lipofilo un dubultu katjono aizvietotāju skaitu molekulā, lai skatītu struktūras-aktivitātes sakarības.

Realizēt katjono 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšanu, lai iegūtu iespējamus metabolītus un pētītu potenciālo gēnu transfekcijas aģentu ķīmiskās īpašības.

Iegūt līdz šim aktīvākā potenciālā gēnu transfekcijas aģenta anjonu analogus, lai pētītu struktūras-aktivitātes sakarības Hofmeistera sērijas anjoniem.

Veikt jaunsintezēto savienojumu farmakoloģisko īpašību pārbaudes, un to veidoto nanoagregātu raksturojumu.

### **Promocijas darba zinātniskā novitāte ir formulējama sekojoši:**

- iegūta virkne jaunu oriģinālu potenciālu katjonu amfifilu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu tālākiem struktūras-aktivitātes sakarību pētījumiem gēnu transfekcijā;
- pirmo reizi realizēta ķīmiska oksidēšana katjonu grupu saturošam 1,4-dihidropiridīna atvasinājumam;
- pirmo reizi raksturoti katjonu pašasociējošos 1,4-DHP atvasinājumu veidotie nanoagregāti ar ASM un EM metodēm;
- uzlabota izejvielu iegūšana amfifilu 1,4-DHP atvasinājumu sintēzei;
- pirmo reizi parādīta aizvietotāju ietekme molekulas katjonajā daļā uz gēnu transfekcijas aktivitāti 1,4-DHP atvasinājumiem.

Darba **praktiskā nozīme**: rezultātā tiks piedāvāti jauni sintētiskie nanoagregātus veidojošie katjonie amfifili kā nevirālie gēnu transfekcijas aģenti – standartvielas zinātniskajiem pētījumiem dažādu pasaules valstu universitāšu un pētniecisko institūtu laboratorijās, ar tālāku perspektīvu – gēnu terapijas klīniskajiem pētījumiem un ieviešanai medicīnas praksē.

Nākotnē šādi pašasociējošies nanoizmēru savienojumi būtu interesanti arī citās zinātnes nozarēs, piemēram, farmācijā, kā zāļu transporta formas; ķīmijā, lai pētītu dažādas reakcijas, tai skaitā stereospecifiskās, ko var realizēt micellās kā organizētos jonu šķidrums; materiālzinātnē, ļoti aktuāls ir uzdevums – iegūt molekulas ar iekodētu pašasociēšanās programmu nanoagregātu veidošanai.

Pētījuma rezultātu publikācija. Par darbā atspoguļotajiem rezultātiem ziņots 10 starptautiskās zinātniskās konferencēs. Pētījuma galvenais saturs apkopots 4 zinātniskos rakstos.

**Pateicība.** Visdziļāko pateicību vēlos izteikt promocijas darba vadītājiem Dr.ķīm. A.Plotniecei un Dr.ķīm., asociētai profesorei A.Priksānei. It sevišķi vēlos pateikties zinātniskā darba vadītājiem no Kuopio Universitātes Farmācijas fakultātes Dr. M.Ruponen un Dr. Z.Hyvönen. Liels paldies Latvijas Organiskās sintēzes institūta Membrānaktīvo un  $\beta$ -diketonu laboratorijas kolektīvam īpašs paldies tās vadītājam profesoram G.Duburam un kolēģiem Dr.ķīm A.Soboļevam, Dr.ķīm

B.Čekavičus, B.Skrīvelei un D.Kaldrem par zinātniskajām idejām un diskusijām. OSI Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijas pētniekiem Dr.fiz. S.Beļakovam par rengenstruktūras analīzēm un Dr.ķīm. B.Turovskai par elektroķīmisko oksidēšanu. Latvijas Universitātes Ķīmiskās fizikas institūta direktoram Dr.ķīm. Donātam Ertam un Pāvelam Birjukovam par iespēju veikt pētījumus ar atomspēku mikroskopu, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra pētniecēm Dr.habil.biol. V.Osei par elektronmikroskopiju un Dr.habil.biol. T.Kozlovskai par DNS paraugu sagatavošanu elektronmikroskopijai.

Atzīstot darba nozīmību un veicot doktorantūras studijas Latvijas Universitātē, tai finansiālu atbalstu sniedzis Eiropas sociālais fonds 2004/0001/VPD1/ESF/ PIAA/04/NP/3.2.3.1/0001/0001/0063 (LU ESS2004/3), 2009/0138/1DP/ 1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/004 (LU ESS2009/77), starptautisks projekts EUREKA ES 05-27 E! 3371 un Somijas Zinātņu Akadēmija grants (14127).

# 1 LITERATŪRAS APSKATS

Promocijas darbs veltīts jaunu sintētisko nevirālo gēnu transfekcijas aģentu iegūšanai, kuru molekulas pamatā ir 1,4-dihidropiridīna gredzens, šo savienojumu fizikāli ķīmisko, bioķīmisko īpašību raksturošanai, savienojumu spējai veidot nanoagregātus un šo agregātu pētījumiem. Eksperimentālā darba galvenais uzsvars tiek vērsts uz aktīvu molekulu sintēzi, struktūras-aktivitātes sakarību skaidrojumiem jauniegūtajiem katjonajiem amfifilajiem 1,4-DHP atvasinājumiem kā potenciālajiem gēnu transfekcijas aģentiem. Tādēļ svarīgi literatūras apskata sākumā analizēt ar gēnu terapiju saistītos jautājumus, izvērtēt literatūras avotos apskatīto –potenciālo gēnu transfekcijas aģentu struktūras-aktivitātes sakarības, analizēt molekulas uzbūvei nepieciešamās prasības.

## 1.1 Gēnu terapija

Gēnu terapija ir jauns medicīnas virziens, kas strauji sāka attīstīties pagājušā gadsimta pēdējās desmitgadēs, bet tā pirmsākumi meklējami 20.gs. 60.gados. Zinātniskie pētījumi parādīja, ka dzīvnieku un cilvēku šūnas spēj saistīt eksogēnos DNS fragmentus savā genomā un ekspresēt tos. Kopš tā laika ir veikti daudzi pētījumi, lai palielinātu transfekcijas efektivitāti. Paralēli attīstoties biomedicīnas zinātne ir pierādījusi, ka vairāku simtu slimību rašanās cēloņi ir saistīti ar normālu gēnu darbības traucējumiem, kurus būtu iespējams novērst, labojot bojāto gēnu, ievadot šūnā modificētu, speciāli izveidotu ģenētisko materiālu. Šāda pieeja ļautu ne tikai cīnīties ar slimību izraisītiem simptomiem, bet arī novērst slimību cēloņus, labot patoloģiskos procesus, kas rodas vīrusu infekcijas, onkoloģisku vai citu saslimšanu gadījumos. Gēnu terapijā izmanto dažādus nesējus, kas sekmē terapeitiskā DNS nokļūšanu šūnās. Nesēju veidoto nanodaliņu šķērsriezumi ir no dažiem desmitiem līdz pāris simtiem nanometru. Līdz ar to gēnu terapiju var uzskatīt par nanozinātnes nozari, kas veiksmīgi attīstījusies uz dažādu nozaru robežām un kas ietver sevī vairākus zinātnes virzienus: ķīmiju, bioloģiju, farmāciju, fiziku. Jāatzīmē, ka gēnu terapija īpaši strauji attīstās pēdējos gados, cenšoties izprast nanoizmēru daļiņu īpašības [1].

Gēnu terapija ir šūnas DNS fragmenta aizstāšana ar citu terapeitisku gēnu – līdz ar to terapeitiskais DNS fragments ir jānogādā līdz mērķšūnas kodolam, kurā ir nepieciešams koriģēt ģenētisko informāciju. Gēnu terapijā galvenokārt izmanto trīs metodes, lai nogādātu DNS šūnā:

- virālos vektorus (retrovīrusi, adenovīrusi, adenoasociētie vīrusi);
- fizikālās metodes (ultraskaņa, mikroinjekcija, elektroporācija);
- nevirālos vektorus (lipidomimētiķi, polimēri, nanoagregāti u.c.).

Tomēr katram no piedāvātajiem gēnu transfekcijas veidiem ir gan priekšrocības, gan trūkumi [2,3]. Literatūras apskatā lielāka uzmanība tiks pievērsta nevirālajiem vektoriem, jo pie tiem pieder katjonie amfifilie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi.

Sākotnēji īsumā apskatīsim virālos vektorus un fizikālās metodes, ko izmanto gēnu terapijā.

### **1.1.1 Virālie vektori**

Ģenētiskā materiāla nogādāšana šūnā, izmantojot virālo sistēmu, kas ir veidota uz dažādiem rekombinētiem vīrusiem, iekļaujot tajos terapeitiskās DNS fragmentu, ir pagaidām efektīvākais transfekcijas veids. Šim nolūkam biežāk pielieto tādus vīrusus kā retrovīrusus, adenovīrusus, adenoasociētos vīrusus un herpes simpleksa vīrusus [4-8]. To spēja iekļaut savā struktūrā terapeitisko DNS, pasargāt to no imūnsistēmas reakcijas un enzīmu spējas to degradēt, specifiski inficēt šūnas un nodrošināt tiešu terapeitiskā DNS transportu uz šūnas kodolu, padara virālos vektorus par līdz šim labāko metodi gēnu transfekcijas eksperimentos [9]. Tomēr eksistē vairāki faktori, kas darbojas pret šīs metodes izmantošanu. Piemēram, retrovīrusi ir mutagēni, jo terapeitiskā gēna piesaistīšanās var notikt jebkurā šūnas genoma vietā, kas, savukārt, var izraisīt ļaundabīga audzēja attīstīšanos. Atkārtotas adenovīrusu izmantošanas gadījumā samazinās transfekcijas efektivitāte imūnsistēmas atbildes reakcijas ietekmē. Vēl būtiskas virālo vektoru izmantošanas problēmas ir ģenētiskā materiāla iekļaušanas daudzuma limits, iespējamo transficējamo šūnu veidi, kuras iespējams inficēt, kā arī dārgās izmaksas šādu preparātu lielu daudzumu ražošanā

[10-17]. Augstāk aprakstītās problēmas un šķēršļi ir iemesls, lai meklētu alternatīvas transfekcijas metodes.

### 1.1.2 Fizikālās metodes

Fizikālās metodes vairāk balstās uz tiešu terapeitiskā DNS nogādāšanu šūnā, izmantojot dažādus tehniskus paņēmienus, kā, piemēram, mikroinjekcijas, elektroforēzi, sonoforēzi, gēnu bombardēšanu, magnetoforēzi u.c. [18].

Mikroinjekcijas ir vistiešākā DNS nogādāšana šūnas citoplazmā vai šūnas kodolā, izmantojot ļoti tievu stikla adatu. Bet metodes mīnuss ir tas, ka katra šūna ir jāapstrādā atsevišķi [19].

Ar ultraskaņas iedarbību (tikai *in vitro* vai maziem dzīvniekiem) tiek īslaicīgi destabilizēta šūnas membrāna, kas ir pietiekami, lai eksogēnais DNS spētu iekļūt šūnā [20].

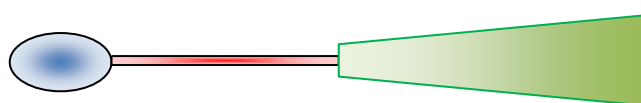
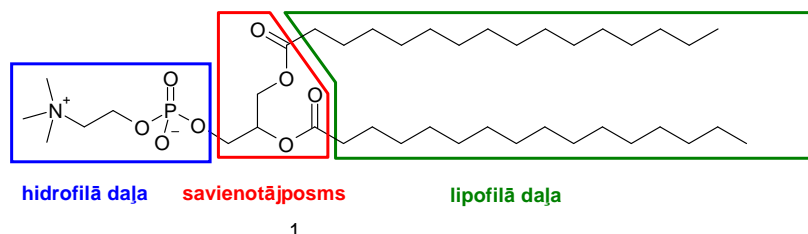
Bombardēšana ar nanodaļiņām jeb tā sauktais biobalistiskais daļiņu transports spēj nogādāt DNS vairākās šūnās vienlaikus. Šajā metodē ar DNS pārklātas mikrodaļiņas (zelts vai volframs) tiek paātrinātas līdz milzīgam ātrumam, lai spētu iespieties šūnas membrānā [21-23]. Bombardēšana tiek plaši pielietota DNS vakcinācijā, lai DNS nogādātu epidermā vai muskuļšūnās [24]. Šai metodei ir vāja ekspresija, tomēr tā ir pietiekama, lai sasniegtu nepieciešamo imūnreakciju un organisms sāktu izstrādāt antivielas [25,26].

### 1.1.3 Nevirālie vektori

Nevirālie vektori jeb sintētiskie vektori arī ir transporta sistēma, kas nodrošina terapeitiskā DNS vai ribonukleīnskābes (RNS) nogādāšanu līdz mērķšūnas kodolam. Nevirālie vektori pārsvarā ir lipidomimētiķi - lipīdiem līdzīgi polāri amfifili savienojumi, kuri ūdens šķīdumos veido nanoagregātus, piemēram, micellas, liposomas un/vai citus nanoasociātus, un spēj veidot kompleksus ar DNS. Šādu nanoagregātu kompleksus ar DNS sauc par lipopleksiem. Alternatīva lipidomimētiķiem ir polimēri, kuri tāpat kā polārie amfifilie savienojumi spēj saistīties ar DNS ūdens šķīdumos veidojot asociātus. Polimēru un DNS asociātus



dēvē par polipleksiem. Sākotnēji tika atrasts, ka par nevirālajiem vektoriem veiksmīgi var izmantot glicerolipīdu atvasinājumus. Vēlāk atklājās, ka arī citi sintētiski iegūtie savienojumi, kuru molekulas uzbūvē ir tādas sastāvdaļas, kā polārā daļa un lipofilā daļa, kas ir savstarpēji saistītas ar savienotājposmu jeb „linkeri”, var kalpot par gēnu transfekcijas aģentiem (skatīt 1.1. attēlu) [27].



1.1.att. Lipīdveida gēnu transfekcijas aģentu molekulas uzbūve [28]

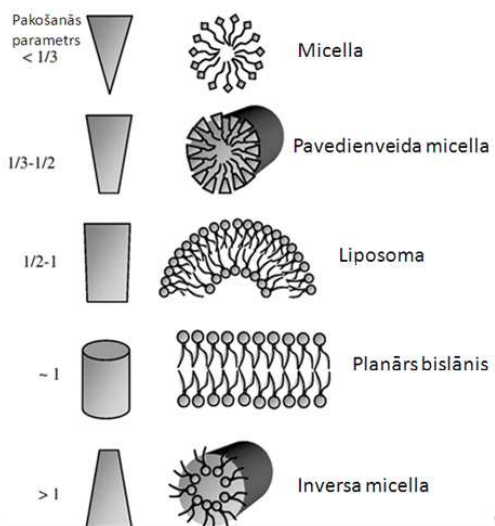
Meklējot jaunus aktīvākus sintētiskos transfekcijas aģentus, ir iegūti un literatūrā aprakstīti arī daži izņēmumi. Viens no šādiem izņēmumiem ir katjonie amfifilie amonija sāļi, kuriem lipofilā daļa tieši piesaistīta polārajai daļai [29,30], bet ir zināmi arī gadījumi, kad polārā daļa vienlaicīgi ir savienotājposms, piemēram, katjonie amfifilie piridīnija atvasinājumi [31].

Polāri amfifili savienojumi nonākot ūdens vidē sākotnēji šķīst, bet sasniedzot noteiktu koncentrāciju, kuru dēvē par kritisko micellu koncentrāciju un kas ir atkarīga no savienojuma struktūras, savienojumi sāk pašasociēties, veidojot dažādus nanoagregātus: micellas, liposomas, daudzslāņainas liposomas, vai cita veida nanodaļiņas. Micellas ir sfēriski veidojumi, kurās monomēra polārā daļa veido micellas ārējo virsmu, bet lipofilā daļa aizpilda tās centru. Liposomas ir sfēriski veidojumi ar ieslēgumu tās centrā, kuru no apkārtējās vides norobežo membrāna, kas ir analoga šūnas membrānai. Membrānā monomēri ir novietojušies bislānī ar lipofilajām daļām viens pret otru, bet polārā daļa veido liposomas ārējo un iekšējo virsmu. Asociātu struktūras ir atkarīgas no savienojuma uzbūves, polārās un lipofilās molekulas daļas attiecības, ko raksturo ar pakošanās parametru  $p$  un apraksta vispārīgā veidā Israelašvili (*Israelachvili*) vienādojums [32].

$$p = \frac{v}{a \times l}$$

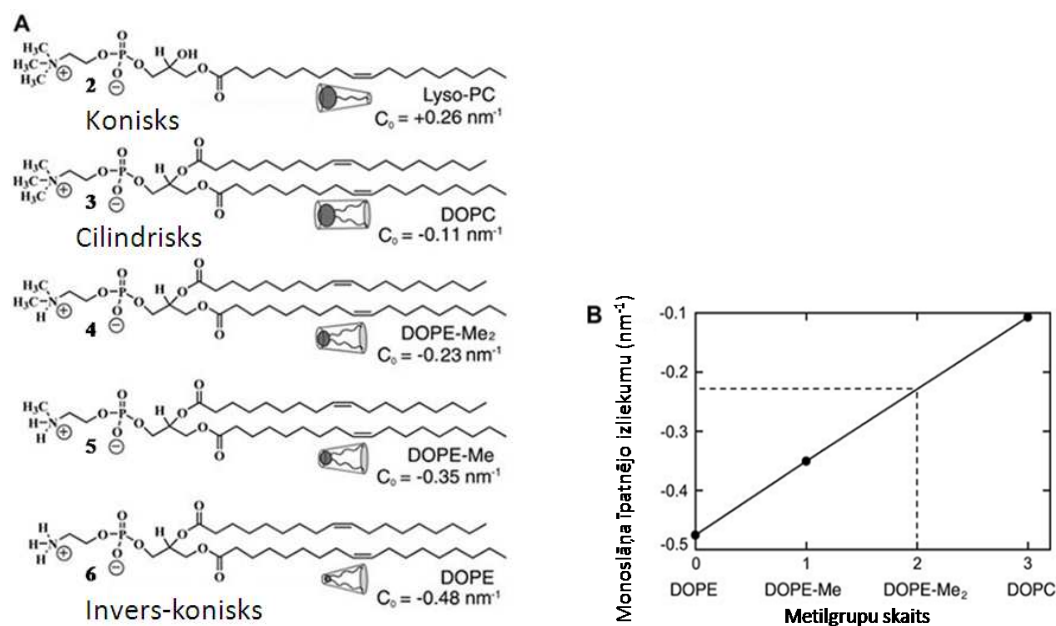
kur  $l$  – hidroforās alkilķēdes garums  
 $v$  – tilpums, ko aizņem molekulas hidroforā daļa  
 $a$  – molekulas polārās daļas šķērsriezuma laukums

Attēlojot savienojuma uzbūvi ar ģeometriskām figūrām, var uzskatāmi parādīt iespējamās nanoagregātu struktūras. Piemēri apskatāmi 1.2. attēlā: ja  $p < 1/3$ , tad savienojums ūdens šķīdumos veido micellas; palielinoties pakošanās parametra vērtībai  $1/3 < p < 1/2$ , savienojums var veidot „pavediņveida” vai burtiski tulkojot no angļu valodas „tārpveida” - *wormlike* micellas; turpinot palielināt pakošanās parametra vērtību  $1/2 < p = 1$  veidojas liposomas, bislāņaini sfēriski veidojumi, savukārt, ja  $p > 1$ , tad veidojas apgrieztās micellas jeb inversās micellas. Līdz ar to, modelējot molekulas struktūras arhitektūru, var optimizēt vēlamā nanoagregāta formu [33].



1.2.att. Nanoagregātu formas atkarībā no pakošanās parametra vērtības [34]

Schematiski labi šādu molekulas uzbūves arhitektūras un iespējamo lipīdu formas sakarību attēlojis Hamai (*Hamai*) un līdzautori, izmantojot glicerolipīdus, variējot tajos metilgrupu skaitu pie kvaternārā slāpekļa atoma un lipofilo oleilaizvietotāju skaitu (1.3. attēls). Novērota lineāra likumsakarība starp metilgrupu skaitu pie N atoma un  $C_0$  vērtībām, kas raksturo savienojuma veidotā monoslāņa īpatnējo izliekumu. Ideālā gadījumā, ja savienojums veido plakānu slāni, tad  $C_0=0$ , ja  $C_0>0$ , tad tiek veidotas micellas, savukārt, ja  $C_0<0$ , tad veidojas apgrieztas micellas [35].

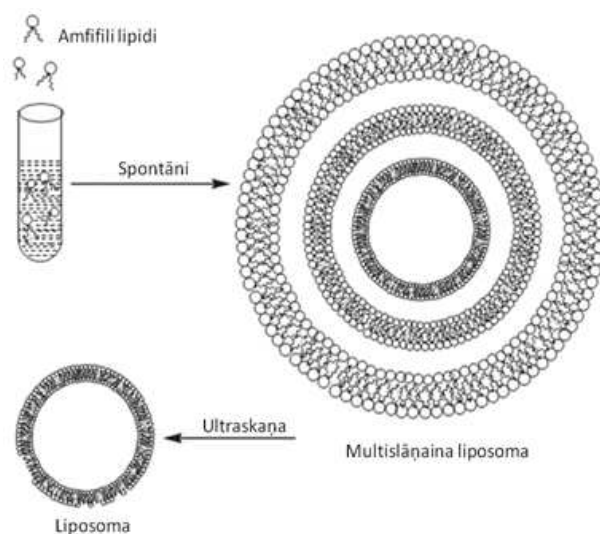


1.3.att. A: Ķīmiskās struktūras, ģeometriskās uzbūves un  $C_0$  vērtība. B: Lipidomimētiķu 2-6 lineāra sakarība starp metilgrupu skaitu pie slāpekļa atoma un  $C_0$  vērtību [35]

Līdz ar to, veidojot nanoagregātus, ir iespējams ar palīglipīdiem modelēt dažādus parametrus, piemēram, liposomu izmērus. Palīglipīdi ir amfifili savienojumi ar citu molekulas uzbūvi, ar kuriem var mainīt liposomu fizikāli-ķīmiskos un bioķīmiskos parametrus [36], koriģēt nanoagregāta virsmas lādiņu, ietekmējot mijiedarbību ar DNS, kā arī lipopleksa adsorbciju uz šūnas virsmas [37], optimizēt fāzu pārejas gēlu-šķidro kristālu temperatūras.

Pašasociācijas laikā lipīdveida savienojumi sākotnēji veido lielus daudzslāņainus agregātus – multislāņainas liposomas (1.4. attēls), bet apstrādājot šķīdumus ar ultraskaņu vai „ekstrūderi” (lielo multislāņaino daļiņu sistēmu daudzkārtīgi filtrējot caur noteikta izmēra sietiem, parasti 100 nm) no daudzslāņainām liposomām var iegūt liposomas, kuras veidotas no viena lipīdu bislāņa.

Alternatīva lipīdveida transfekcijas aģentiem ir amfifilie polimēru atvasinājumi, kuri arī tiek plaši pētīti. Par tiem zinātniskajā literatūrā ir atrodami vairāki apjomīgi apskatraksti. Amfifilie polimēri ūdens šķīdumos veido nanoagregātus un veido asociātus ar DNS [38,39].



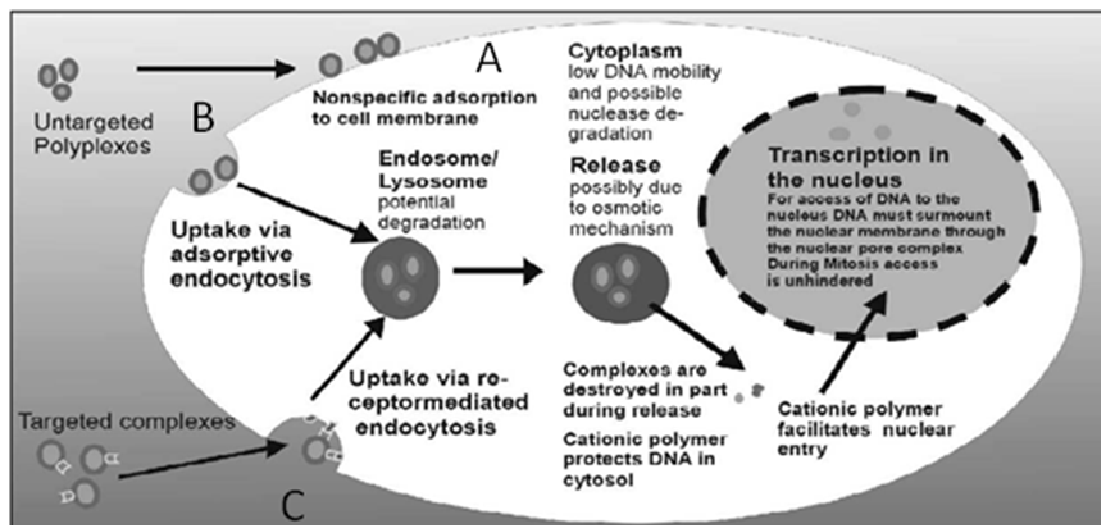
1.4.att. Liposomu iegūšanas ceļš [27]

Nevirālie vektori tiek veidoti no daudzām atsevišķām molekulām vai amfifiliem polimēriem, kas pēc savas struktūras ir daudz vienkāršāki par vīrusiem, tos ir iespējams sintezēt lielos daudzumos un tie ir stabilāki uzglabājot. Vēl kā ļoti būtisku priekšrocību jāmin zemā imunogēnitāte. Tomēr pagaidām nevirālie vektori uzrāda zemāku transfekcijas aktivitāti un vājāku gēnu ekspresiju nekā virālie vektori. Tieši minēto nepilnību dēļ, ļoti daudzi pētījumi attīstās šai virzienā, meklējot jaunas gēnu transfekcijas aģentu molekulu struktūras [40].

#### 1.1.4 Bioloģiskās barjeras gēnu tranfekcijā

Ļaundabīga audzēja ārstēšanai ideālā gadījumā būtu orāli jāuzņem ārstējošā medikamentu deva, tomēr organisma gremošanas sistēma ir pārāk destruktīva nevirālajiem vektoriem un audzēja šūnas sintētiskais vektors ar DNS nerasniedz. Alternatīvs variants ir intravenoza vai intramuskulāra nevirālā vektora ievadīšana pēc iespējas tuvāk audzēja vietai, lai samazinātu bioloģiskās barjeras terapeitiskā DNS ceļu uz patoloģisko šūnu kodolu [41]. Svarīgi, lai gēns tiktu nogādāts tikai mērķšūnās. Augstāk aprakstītais ataino vēlamo preparātu uzņemšanas veidu, tomēr, meklējot jaunus gēnu transfekcijas aģentus, ir jāskatās no pēdējā posma – DNS nokļūšanas šūnā un tās kodolā. Jānosaka nevirālo vektoru transfekcijas aktivitāti šūnu

līnijās. Tāpēc mazliet sīkāk aplūkosim iespējamus mehānismus lipopleksa nokļūšanai šūnā un DNS atbrīvošanai tālākam transportam uz šūnas kodolu (1.5. attēls).



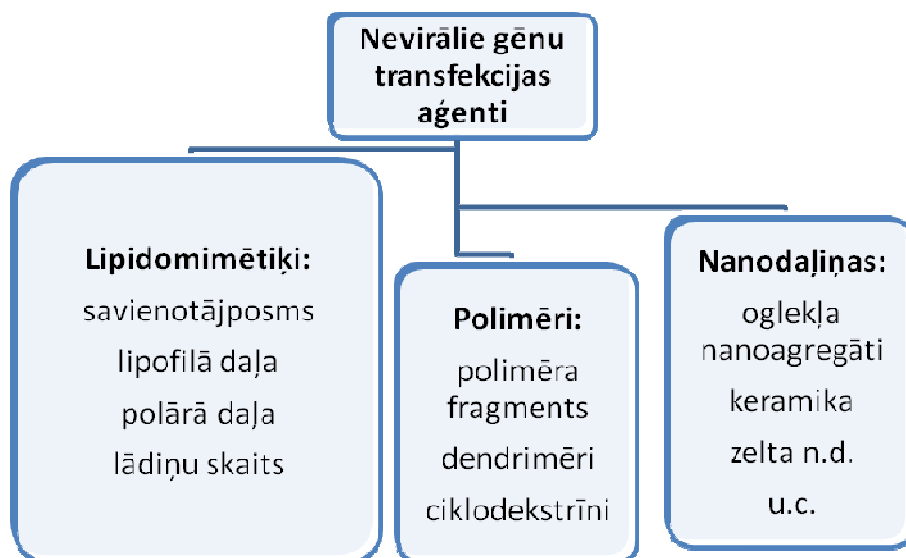
1.5.att. Iespējamie mehānismi gēnu transfekcijai ar nevirālajiem vektoriem [42]

Pirmais solis - potenciālajiem gēnu transfekcijas aģentiem jāizveido komplekss ar DNS - lipoplekss. Nākamais - lipopleksam ir jābūt stabilam asinsrites sistēmā, kur kompleksus var deaktivizēt organisma aizsargsistēma, tas attiecas uz *in vivo* eksperimentiem, kuros izmanto dzīvniekus. Pozitīvi lādēto nanoagregāta virsmu var saistīt, piemēram, imunoglobulīns M, komplekss C3 un citi asins plazmā esošie proteīni: albumīns, lipoproteīns un citi. Lai pēc iespējas veiksmīgāk pārvarētu organisma imūnaizsargsistēmu un organisms neatpazītu lipopleksu kā svešķermeni, būtisks ir lipopleksa izmērs. Tam jābūt pēc iespējas mazākam, kā arī lipopleksa virsmas lādiņam jābūt pēc iespējas neitrālākam. Nākamais solis *in vivo*, gan arī *in vitro* pētījumos ir lipopleksa adsorbēšana uz mērķšūnas virsmas un tās šķērsošana. Šobrīd vēl ir daudz neskaidrību un tiek pieļauti vairāki iespējamie veidi DNS kompleksa iekļūšanai šūnā, kā arī paralēli pastāvoši ceļi. Galvenie no iespējamajiem variantiem attēloti 1.5. attēlā. Nespecifisks ceļš (A 1.5. attēls) – nanoagregāts adsorbējas uz šūnas virsmas un caurplūst caur šūnas lipīdu membrānu saglabājot savu uzbūvi. Endocitozes ceļā (B 1.5. attēls) – lipoplekss šūnā nokļūst, sākotnēji adsorbējoties šūnas membrānā izveidojušajos iedobumos un tālāk ieslēguma veidā nokļūstot šūnā [43]. Viens no daudzsolīgākajiem šūnas membrānas šķērsošanas veidiem ir lipopleksa saistīšanās pie receptoriem (C 1.5. attēls). To var panākt

veidojot nevirālos vektorus ar specifiskiem ligandiem [44,45]. Makropinocitozes ceļā ir iespējama lielāku lipopleksu vai polipleksu nokļūšana šūnā, to var salīdzināt ar baktēriju šūnas membrānas šķērsošanu [46]. Nevirālajam vektoram – lipopleksam vai polipleksam nonākot šūnas citoplazmā sākumā veidojas „jaunā” endosoma, kura pie veiksmīgas transfekcijas vēlāk pārtop „vēlajā” jeb „vecajā” endosomā un notiek iekļautās plazmīdas atbrīvošana. Literatūrā tiek piedāvātas divas hipotēzes DNS molekulas atbrīvošanas mehānismam. Polipleksu gadījumā endosoma veicina *ATFāzes* enzīma darbību, kas pastiprināti nogādā protonus endosomā, kur tos saista protonēties spējīgās polimēra aminogrupas. Osmozes izraisītā endosomas uzbriešana veicina polipleksa un tālāk DNS molekulas atbrīvošanu citoplazmā, kurā plazmīdai vēl ir jānokļūst līdz šūnas kodolam [41]. No augstāk minētā secinām, ka, meklējot jaunus nevirālos vektorus, sākotnēji jāpārbauda to spēja veidot kompleksus ar DNS un jānoskaidro, vai savienojumi spēj nogādāt DNS līdz šūnas kodolam, lai varētu notikt transfekcija.

## 1.2 Nevirālie gēnu transfekcijas aģenti

Promocijas darbs veltīts jaunu nevirālo vektoru sintēzei, primāriem bioķīmiskiem testiem un struktūras - aktivitātes sakarību pētījumiem. Mūsu izvirzīto darba uzdevumu sasniegšanai jāveic literatūras datu sistematizēšana, lai būtu vieglāk pārskatāms plašais literatūras informācijas piedāvājums un būtu sagrupēti jau sintezētie un zinātniskajās institūcijās pētītie nevirālie gēnu transfekcijas aģenti. Literatūrā aprakstītos savienojumus iedalīsim pēc to molekulu struktūras klasēs un apakšklasēs (1.6. attēls). Šāds sadalījums šobrīd vairs nav tik viegli veicams, jo arvien grūtāk ir sistematizēt savienojumus, pieskaitot tos kādai konkrētai grupai. Mūsdienu tendences gēnu transfekcijas aģentu molekulas arhitektūras izveidē piedāvā savienojumus, kas satur vairākas funkcionālās grupas, kuras nodrošina, piemēram, buferīpašības fizioloģiskajā pH apgabalā, piešķirot mērķšūnas adresi u.c. Tomēr veiksīm savienojumu sistematizēšanu, izdalot trīs galvenās grupas. Sīkāk aplūkosim lipidomimētiķus un to iedalījumu pēc molekulas uzbūves, jo mūsu mērķprodukti pieder pie šīs klases savienojumiem, bet par divām pārējām klasēm tiks dots vispārējs ieskats.



1.6.att. Nevirālo gēnu transfekcijas aģentu shematisks iedalījums

Vispirms nevirālos gēnu transfekcijas aģentus grupējam trijās lielās klasēs: lipidomimētiķi, polimēru atvasinājumi un nanodaļiņas (1.6. attēls), pēc tam katru grupu iedalām sīkākās apakšklasēs pēc molekulas struktūras. Šāds iedalījums ir nepieciešams, lai labāk varētu salīdzināt dažādus literatūrā aprakstītos sintētiskos vektorus, akcentējot tikai daļu no molekulas struktūras.

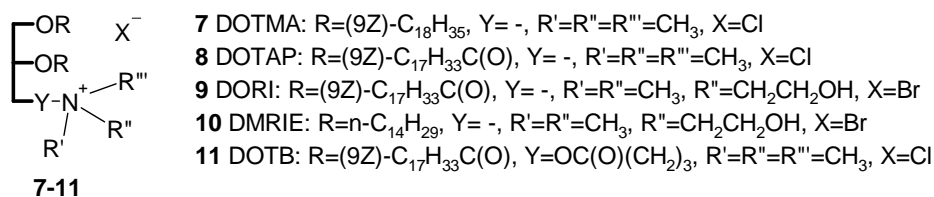
### 1.2.1 Lipidomimētiķu klase

Kā parāda klases nosaukums, pie šīs klases savienojumiem pieder lipīdiem līdzīgie savienojumi. Lipidomimētiķu gēnu transfekcijas aģentu molekulas struktūru var iedalīt trīs daļās: lipofilā daļa, hidrofilā daļa un savienotājposms (1.1. attēls). Sintētiskos gēnu transfekcijas aģentus grupēsim apakšklasēs pēc iepriekš minētā sadalījuma un īsumā apskatīsim katras apakšklases raksturīgākos pārstāvjus.

#### 1.2.1.1 Savienotājposms

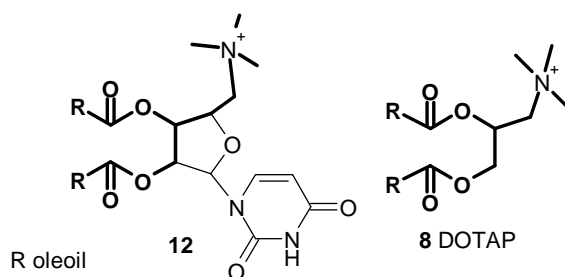
Vēsturiski pirmie gēnu transfekcijas aģenti tika veidoti uz glicerīna bāzes un ar to palīdzību ir izdevies realizēt plazmīdu DNS un RNS transportu eikariotu šūnās. Glicerīnam divas hidroksilgrupas ir acilētas ar taukskābju halogēnanhidrīdiem, iegūstot savienojumus **8**, **9** un **11**, savukārt, savienojumus **7** un **10** iegūst veidojot ētera saiti, bet trešā hidroksilgrupa ir aizvietota ar trimetilamonija grupu (savienojumi

**7-10)** vai aizvietota ar trimetilamonija propilkarboksigrupu (savienojums **11**). Šajos eksperimentos veiksmīgi veikta transfekcija ar pSV2cat un pSV2neo plazmīdu (CV-2 un 3T3) zīdītāju šūnu līnijās [47-49].



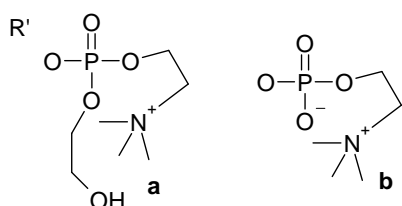
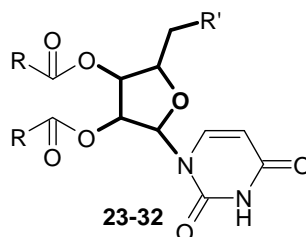
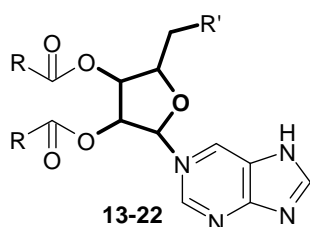
Lai arī savienojumu **7-11** grupa bija pirmā, DOTMA (**7**) un DOTAP (**8**) vēl joprojām tiek pētīti gēnu transfekcijas eksperimentos un lietoti kā standartvielas vai piedevas jaunu nevirālo vektoru gēnu transfekcijas aktivitātes pētījumos [50].

Savienotājposms veic ne tikai statistisku funkciju starp molekulas polāro un lipofilo daļu, bet arī ietekmē saistīšanos ar DNS. Šabo (*Chabaud*) un līdzautori pētījuši sintētiskos transfekcijas aģentus, kuriem kā savienotājposms izmantots nukleozīds. Šādiem savienojumiem ir būtiska priekšrocība: veidojot lipopleksus, kompleksēšanos nodrošina ne tikai lipidomimētiķa polārā daļa, bet arī savienotājposma veidotās ūdeņraža saites un uridīna gredzena  $\pi$ - $\pi$  elektronu tipa sadarbība ar DNS (savienojums **12**). Nevirālajiem vektoriem, kuriem par savienotājposmu izmantots uridīns, ir saskatāms glicerolipīdu struktūras fragments – savienojums **8**. Šie eksperimenti parāda savienotājposma ietekmi gēnu transfekcijas eksperimentos. Autori salīdzina sintētisko vektoru **12** ar DOTAP (**8**), kuru var uzskatīt par tuvu tā analogu. Aplūkojot savienojumu struktūras **12** un **8**, redzam, ka savienotājposma fragments starp lipofilo un polāro daļu ieslēgts tetrahidrofurāna ciklā, tādējādi fiksējot lipofilās un polārās daļas novietojumu telpā savienojumam **12**, savukārt, DOTAP iespējama savienotājposma brīva rotācija. Uridīna atvasinājums **12** uzrādīja transfekcijas aktivitātes maksimumu pie citām vielas daudzuma attiecībām pret DNS, salīdzinot ar DOTAP (**8**) HeLa un MCF-7 šūnu līnijās [51].





Uz nukleotīdu bāzes veidotie gēnu transfekcijas aģenti **12-32** ir vieni no jaunākajiem literatūrā aprakstītajiem. Šajos savienojumos ribozes gredzenā variēta polārā daļa un lipofilo grupu atrašanās vieta, bet pirimidīna gredzens vai purīna cikls saglabāti nemainīgi.



R: (R'=a)

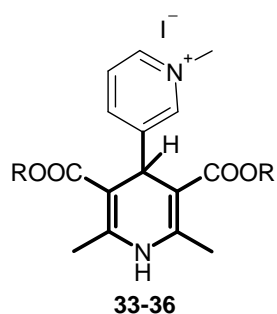
**13/23** oleoil  
**14/24** miristoil  
**15/25** stearoil  
**16/26** palmitoil  
**17/27** arahidoil

R: (R'=b)

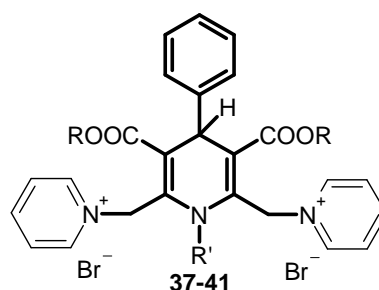
**18/28** oleoil  
**19/29** miristoil  
**20/30** stearoil  
**21/31** palmitoil  
**22/32** arahidoil

Eksperimenti ir veikti vairākās šūnu līnijās (HeLa, MCF-7 un CHO), kur augstāku aktivitāti uzrādīja O-etilfosfatidilholīna fragmentu **a** saturošais savienojums **15**. Jāpiezīmē, ka gēnu transfekciju uzrādošajās koncentrācijās šie savienojumi nebija citotoksiski [51-55].

Latvijas Organiskās sintēzes institūta Membrānaktīvo savienojumu un  $\beta$ -diketonu laboratorijā ir sintezēti gēnu transfekcijas aģenti, kuriem par savienotājposmu starp polāro un lipofilo daļām ir izmantots 1,4-dihidropiridīna gredzens. Ir sintezētas divas savienojumu grupas, variējot polārā fragmenta un lipofilo daļu novietojumu pie savienotājposma.



**33** R=C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>  
**34** R=C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>  
**35** R=C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>  
**36** R=(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCOC<sub>15</sub>H<sub>31</sub>

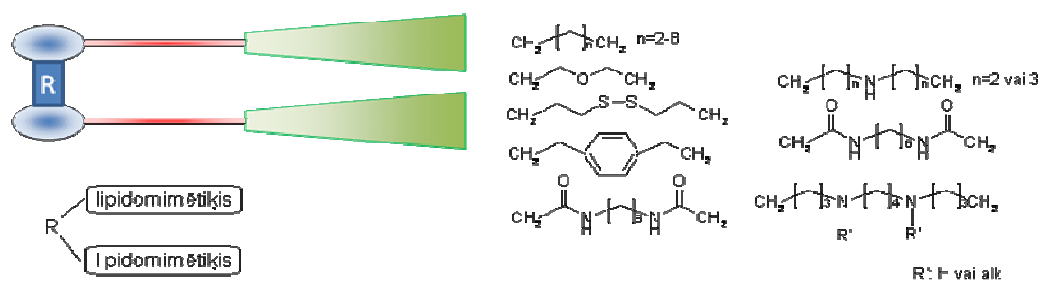


**37** R=C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>, R'=H  
**38** R=C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>, R'=H  
**39** R=C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>, R'=H  
**40** R=C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>, R'=H  
**41** R=C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>, R'=CH<sub>3</sub>

Autori parāda, ka, pārbaudot augstāk minēto savienojumu **33-36** un **37-41** spēju pārnest  $\beta$ -galaktozidāzes plazmīdu CV1-P un D 407 šūnu līnijās, atrasts, ka augstāka aktivitāte ir divus piridīnija gredzenus saturošajiem 1,4-DHP atvasinājumiem **33-36**. Aktīvākais savienojums **38** uzrādīja labāku gēnu transfekcijas aktivitāti nekā DOTAP (**8**) vai PEI 25 (polietilēnimīns 25 kDa) [56].

Attīstot pētījumus par vēl aktīvāku sintētisko gēnu transfekcijas aģentu meklēšanu, literatūrā ir minēti piemēri, kuros vienā molekulā apvienotas divas aktīvas struktūras, tiek veidots aktīvās molekulas dimērs. Šādus savienojumus literatūrā dēvē par *dvīņu* (gemini) savienojumiem. Sākotnēji tie tika veidoti no katjonajiem amfifilajiem amonija vai piridīnija atvasinājumiem, bet šobrīd *dvīņu* veida savienojumi plaši pētīti, variējot savienotājposmus, kā arī pārējās molekulas daļas.

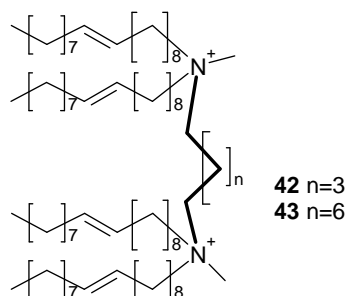
*Dvīņu* savienojumu struktūras, salīdzinot ar klasiskajiem transfekcijas aģentiem, kuros savienotājposms atrodas starp polāro daļu un lipofilo daļu, satur vēl vienu papildus savienotājposmu, kas apvieno vienā molekulā divus lipidomimētiķu fragmentus (1.7. attēls).



1.7.att. *Dvīņu* gēnu transfekcijas aģentu molekulas shematiska uzbūve

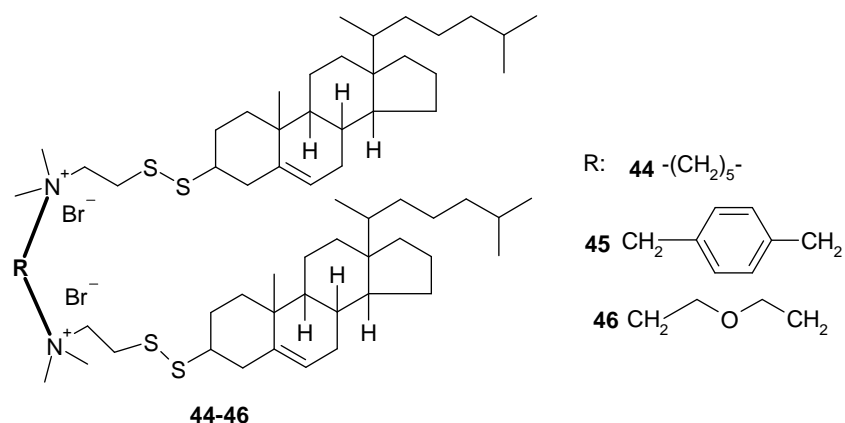
Bieži literatūrā, aprakstot *dvīņu* savienojumu struktūru, tiek apspriests savienotājposms starp lipidomimētiķiem, bet otram savienotājposmam, kas savieno polāro daļu ar lipofilo daļu, netiek pievērsta tik liela uzmanība. Darbā, runājot par *dvīņu* tipa savienojumiem, ar terminu savienotājposms saprotam savienotājposmu starp diviem monomēriem (fragments R, 1.7. attēls) Vairāki autori ir variējuši savienotājposma alkilķēdes garumu, gan arī ievēduši tajā funkcionālas grupas. Biežāk sastopamās - aminoestera grupas, viena vai vairākas otrējā vai trešējā amīna grupa, bet ir arī darbi, kuros pētīti savienotājposmi ar ditioestera, ētera vai fenilēngrupām [57-60].

Pētījumā par alkilķēdes garumu starp amonija katjonajiem centriem savienojumos **42** un **43**, augstāku transfekcijas aktivitāti, pārbaudot uz BHK šūnām, uzrādīja savienojums **43** ar 6 metilēngrupām savienotājposmā, salīdzinot ar atvasinājumu **42**, kam ir savienotājposms ar 3 metilēngrupām.



Gošerons (*Gaucheron*) uzskata, ka savienojums **43** labāk var veidot bislāni, un attālums starp katjonajiem centriem savienojumā ir optimālākais atbilstošais attālumam starp DNS molekulas anjonajiem centriem, tie ir elektrostātiski saderīgāki nekā savienojuma **42** gadījumā [61].

Pētījumu par trīs dažādu savienotājposmu izmantošanu tiholesterīna *dvīņu* atvasinājumiem **44-46** un to ietekmi uz transfekcijas aktivitātes rezultātiem aprakstījis Bajajs (*Bajaj*) un līdzautori, parādot, ka uz dažādām šūnu līnijām savienotājposms iedarbojas atšķirīgi. Darbā salīdzinātas: pentilgrupa, kas ir lokana un ļauj nedaudz variēt attālumu starp katjoniem, bet neveido saites ar DNS; etoksietilgrupa – tik pat lokana kā pentilgrupa, bet skābekļa atoms var veidot ūdeņraža saites ar DNS molekulu un 1,4-dimetifenilēngrupa – „ciets”, nelokans savienotājposms, kas saglabā nemainīgu attālumu starp katjonajiem centriem. Eksperimenti tika veikti trīs šūnu līnijās HeLa, HT1080, PC3AR pārnesot pEGFP-c3 plazmīdu un tika noskaidrots, ka transfekcijas aktivitāte ir atkarīga no šūnu līnijas. Piemēram, HeLa šūnu līnijā savienojumi **44** un **45** bija aktīvāki par savienojumu **46**, bet HT1080 šūnu līnijā savienojumi sarindojās pēc aktivitātes **46**>**44**>**45**. Jāatzīmē, ka abās šajās šūnu līnijās 10% seruma klātienē transfekcijas aktivitāte saglabājās 40-50% apmērā. Grūti transfecējamās šūnās PC3AR labākos rezultātus sasniedza ar savienojumu **45** [59].



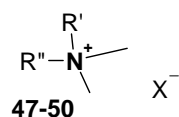
Īsi apkopojot galveno par savienotājposmu ietekmi uz gēnu transfekciju, jāsecina, ka strukturāli vienkāršākie savienotājposmi, piemēram, alkilēngrupa vairāk ietekmē liposomu vai lipopleksu fizikāli-ķīmiskos parametrus, bet sarežģītāku struktūru saturošie, piemēram, savienotājposmi ar funkcionālām grupām, var piedalīties arī bioķīmiskajos procesos – inhibēt šūnas augšanas faktoru [62]. Savukārt, gēnu transfekcijas aģentiem ar diviem vai vairāk katjonajiem centriem molekulā, piemēram, *dvīņu*, savienotājposms nosaka attālumu starp katjoniem. Vairākos pētījumos noskaidrots, ka optimālākais ir sešu C-C saišu attālums [59,61].

### 1.2.1.2 Polārā daļa

Liposomālos gēnu transfekcijas aģentus var arī iedalīt pēc to polārās daļas: katjonu centra - viena vai vairākiem; stipri hidrofilie aizvietotājiem, piemēram, cukuriem vai molekulas fragmentiem, kuri spēj koordinatīvi saistīt metālu jonu, tādā veidā iegūstot lādiņu molekulā.

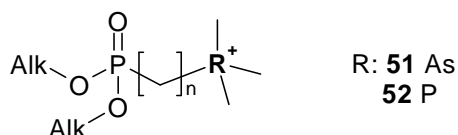
Visplašāk pielietotās katjonu grupas liposomālajiem vektoriem ir mono-, di-, tri- vai tetraaizvietoti amonija katjoni.

Vieni no strukturāli vienkāršākajiem savienojumiem, kas tiek lietoti gēnu transfekcijā, ir alkilamonija sāļi. Tos izmanto kā papildvielas komplekso liposomu sastāvā, lai paaugstinātu transfekcijas aktivitāti. Lielākā šo savienojumu priekšrocība ir salīdzinoši vienkārša iegūšana, sintezējot mono-, di- un trialkilamonija sāļus ar nepieciešamo lipofilās daļas attiecību pret polāro daļu [29,30,63-67].

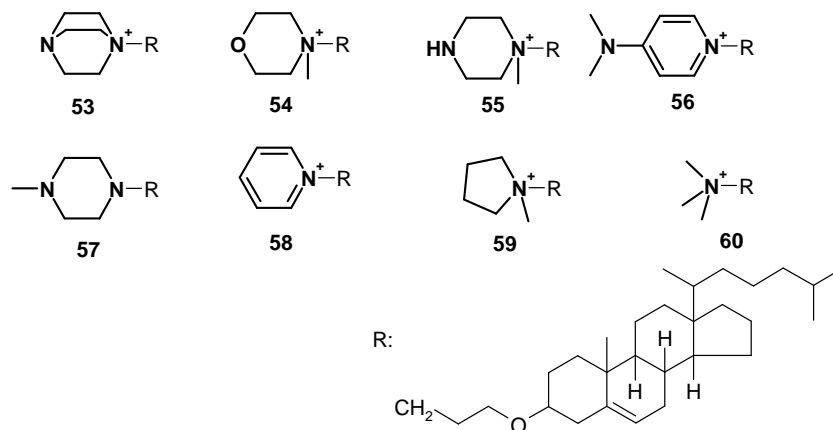


**47/48** DDAB/DDAC: R'=R''= n-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>, X=Cl/Br  
**49/50** DODAC/DODAB: R'=R''=(9Z)-C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>, X=Cl/Br

Literatūrā aplūkotajiem savienojumiem, galvenokārt, polārā daļa ir amonija sāļi, kā arī slāpekli saturošas heterocikliskas sistēmas – piridīnijs vai imidazolijs [68]. Tiek uzskatīts, ja par katjonu ienesošo grupu izmanto heteroaromātisku ciklisku sistēmu, tas samazina savienojuma toksicitāti. Tomēr slāpekļa atoms nav vienīgais, kas tiek lietots par katjono centru. Izmanto arī citus elementus kā katjono centru ienesošu atomu, piemēram, fosforu vai arsēnu [69,70]. Savienojumu **51** un **52** gēnu transfekcijas aģentu aktivitāte bija pārbaudīta uz vairākām šūnu līnijām - CHO, HeLa un CF un to aktivitāte salīdzināta ar DOTAP (**8**). Savienojumi **51** un **52** caurmērā uzrādīja par 20-30% augstāku transfekcijas aktivitāti, bet visaugstāko aktivitāti uzrādīja savienojums **51**, kam polārā daļa ir arsēnija katjons, bet lipofilā daļa satur stearylgrupas [70].



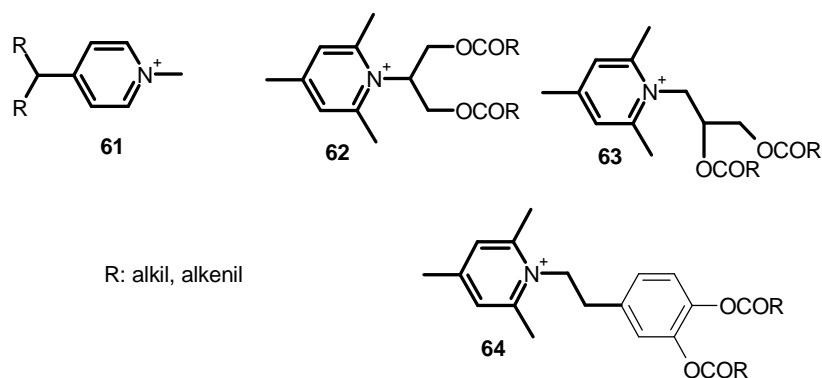
Literatūras apskatā piridīniju saturošiem gēnu transfekcijas aģentiem veltīta pastiprināta uzmanība, jo vairākos gadījumos piridīniju saturošie savienojumi uzrādīja zemāku toksicitāti salīdzinot ar analogiem amonija grupu saturošiem atvasinājumiem, tādējādi paaugstinot interesi par piridīnija kā katjonās grupas izmantošanu gēnu transfekcijā [31].



Literatūrā aprakstīti kvaternāros slāpekļa atomus saturoši gēnu transfekcijas aģenti ar holesterīna fragmentu. Katjoni holesterīna atvasinājumi ir plaši analizēta savienojumu grupa gan kā tiešie gēnu transfekcijas aģenti, gan kā palīgvielas, veidojot daudzkomponentu liposomas, kas satur vairāk kā vienu sintētisko vektoru.

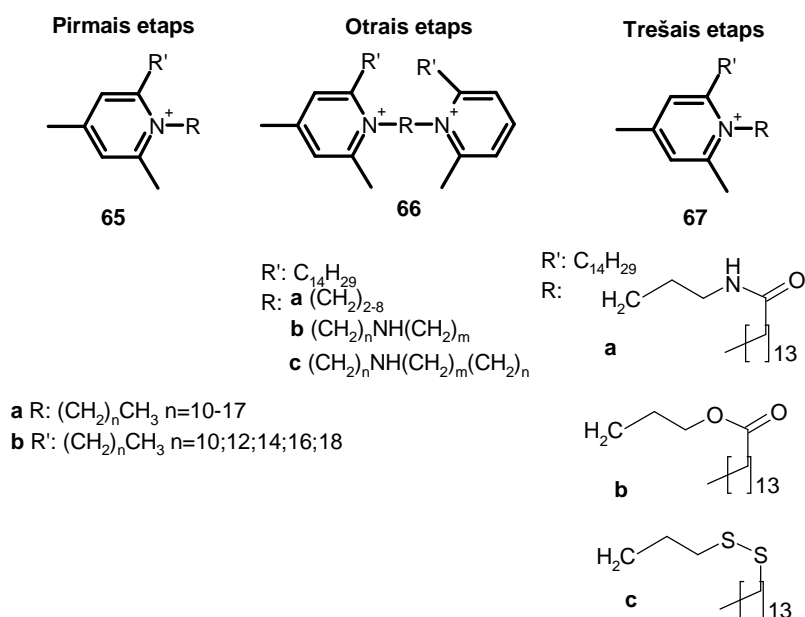
Šajā pētījumā Bajajs (*Bajaj*) un līdzautori parāda to, cik liela nozīme ir savienojuma polārajai daļai, jo tā nodrošina asociēšanos ar DNS, izveidotā nanoagregāta veidu un tā virsmas īpašības, kā arī, kompleksam nonākot šūnas citoplazmā, veicina kompleksētās DNS atbrīvošanu. Augstāku gēnu transfekcijas aktivitāti sasniedza savienojumi ar piridīnija **58**, 4-dimetilaminopiridīnija **56** un trimetilamonija grupu **60** bezseruma vidē. Veicot eksperimentus uz HeLa šūnām, aktīvākais seruma klātienē bija 4-dimetilaminopiridīniju saturošais holesterīna atvasinājums **56**. Savienojums **58**, kas satur piridīnija gredzenu, uzrādīja augstāku aktivitāti par trimetilamonija fragmentus saturošu savienojumu **60** [71]. Interesanti, ka savienojuma **60** analogs – N-neaizvietots holesterīna atvasinājums ir uzrādījis augstāku transfekcijas aktivitāti seruma klātienē nekā bez seruma vidē HeLa šūnu līnijās [72].

Akcentējot lielāku uzmanību uz piridīniju saturošajiem nevirālajiem vektoriem, tālāk aplūkosim katjonos amfifilos piridīnija atvasinājumus. Pirmā publikācija par šāda tipa savienojumiem parādījās jau 1997. gadā. Tajā aprakstīta liela savienojumu grupa, kas iegūta no 4-pikolīna, modificējot to par amfifiliem piridīnija atvasinājumiem **61**. Sākotnēji variēti alkilaizvietotāji piridīnija 4-vietas metilgrupai, bet slāpekklis piridīnija gredzenā alkilēts ar metiljodīdu. Šāda veida savienojumus dēvē par SAINT (Synthetic Amphiphile INTeraction) [73].

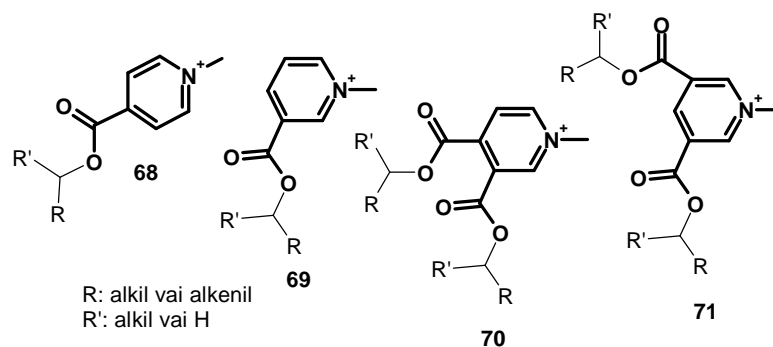


Tālāk, veicot pētījumus par SAINT gēnu transfekcijas aģentu struktūras-aktivitātes skaidrojumiem, sintezēti savienojumi **62-64** un pārbaudīti COST-7, CV-1, BHK, 36C2.21 un HeLa šūnu līnijās. Augstākā gēnu transfekcija sasniegta, ja R ir oleil- vai stearylgrupa, bet labākais no apskatītajiem ir savienojums **63** [31,73,74].

Ilies (*Ilies*) ar līdzautoriem veikuši apjomīgu pētījumu trijos etapos, variējot aizvietotājus piridīnija gredzena 1- un 2-vietās (savienojumu grupa **65**). Pirmajā etapā labāko rezultātu uzrādīja savienojums **65**, kad piridīnija 1- un 2-vietas ir aizvietotas ar tetradecilgrupām, būtiski uzlabojot iepriekšējos gados iegūto savienojumu uzrādīto transfekcijas aktivitāti, ja salīdzina ar sākotnēji sintezētajiem piridīnija atvasinājumiem **61**, kuriem aizvietotāji pārsvarā tika variēti 1- un 4-vietās [31,74]. Otrajā etapā modifikācijas veiktas pie slāpekļa atoma piridīnija gredzenā, iegūstot tikai *dvīņu* tipa piridīnija atvasinājumus **66a-c**. Autori atzīmē, ka visaugstāko aktivitāti uzrādošais savienojums **66a**, kuram par savienotājposmu izmanto etilēngrupu, salīdzinot ar pirmajā etapā sintezētajiem savienojumiem **65a-b**, tomēr uzrāda zemāku aktivitāti. Trešajā etapā *dvīņu* struktūrā viens piridīnija gredzens aizstāts ar polāru grupu: amīda, estera vai ditioētera. Šī pētījuma rezultātā līdersavienojuma **67a** gēnu transfekcijas aktivitāte NCI-H23 šūnu līnijā tika palielināta sešas reizes, salīdzinot ar savienojumu **65a**. Jāatzīmē, ka savienojuma **65a** aktivitāte ir divas reizes augstāka nekā DOTAP (**8**) [75].

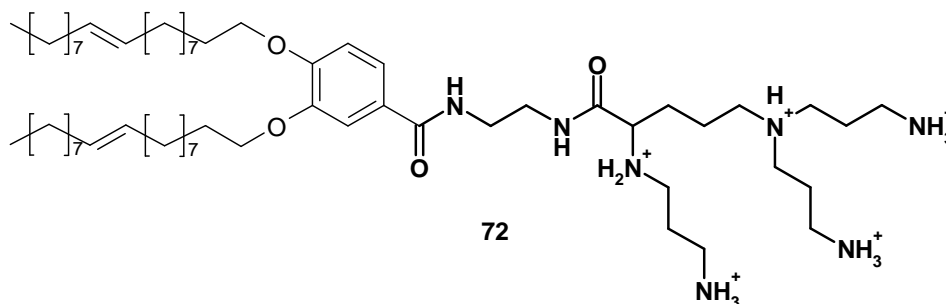


Citos pētījumos, lai paaugstinātu savienojumu biodegradāciju, Pijpers (*Pijper*), Roosjens (*Roosjen*) un līdzautori sintezējuši 3-, 4-mono, 3,4- un 3,5-dialkoksikarbonilpiridīnija atvasinājumus **68-71** un pārbaudījuši transfekcijas aktivitāti COS-7 un HepG-2 šūnu līnijās. Visi iegūtie savienojumi COS-7 šūnu līnijā uzrādīja salīdzinoši līdzīgus rezultātus, bet HepG-2 šūnās 1-metil-3,5-di(tetradecil-11-ēniloksikarbonil)piridīnija hlorīds (**71**) uzrādīja aptuveni 4 reizes augstāku transfekcijas aktivitāti salīdzinot ar savienojumiem **68** [76-78].



Katjonā amfifilā bipiridīnija atvasinājuma gadījumā (savienojumu **66a-c** grupa) mēs apskatām jau nākošo iedalījuma veidu – pēc katjono centru skaita molekulā. Tos varētu iedalīt monokatjonajos, kas pārsvarā jau tika aprakstīti augstāk, dikatjonajos, kā, piemēram, *dvīņu* savienojumi **66a-c** vai 1,4-DHP atvasinājumiem **37-41**, un multikatjonajos sintētiskajos vektoros [79].

Pēdējos gados publicēti vairāki darbi, kuros pētīti savienojumi ar polārajā daļā izmantotiem gan lineāriem, gan sazarotiem alkilamonija fragmentiem, variējot ogļūdeņražu ķēdes posma garumu starp slāpekļa atomiem no C2 līdz C5 un alkilgrupas garumu. Tādējādi vienā molekulā apvienoti lipidomimētiķa un polimēra struktūras fragmenti - savienojums **72** [79,80].

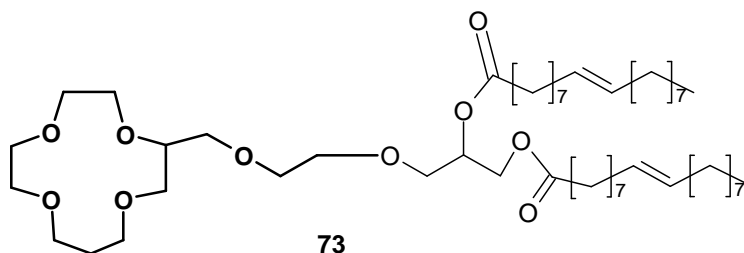


Savienojums **72** savā struktūrā ietver arī plaši lietotā polimēra tipa gēnu transfekcijas aģenta polietilēnimīna (PEI) fragmentu, kas pat tiek dēvēts par „zelta



standartu". PEI 25 ir universāls gēnu transfekcijas aģents un darbojas daudzās šūnu līnijās [81].

Jaunu pieeju sintētisko vektoru polārajai daļai piedāvā Bruni (*Bruni*), ierosinot tradicionālo katjonu nevirālā vektora molekulā aizstāt ar ciklisku ēteri, kas koordinatīvi var saistīt metālu jonus, iegūstot pozitīvu lādiņu molekulā [82]. Formāli šāda veida savienojums **73** mūsu klasifikācijas shēmā ir pieskaitāms pie savienojumu **2-6** grupas, jo modifikācija ir veikta tikai molekulas polārajā daļā.



No augstāk minētā varam secināt, ka visvairāk lietotais katjonu ienesošais elements potenciālo gēnu transfekcijas aģentu molekulā ir kvaternizētais slāpekļa atoms, savukārt, kā grupu var minēt trimetilamoniju vai piridīniju. Piridīniju saturošie gēnu transfekcijas aģenti vairākos pētījumos parādījuši zemāku citotoksicitāti salīdzinot ar trimetilamonija grupu saturošajiem.

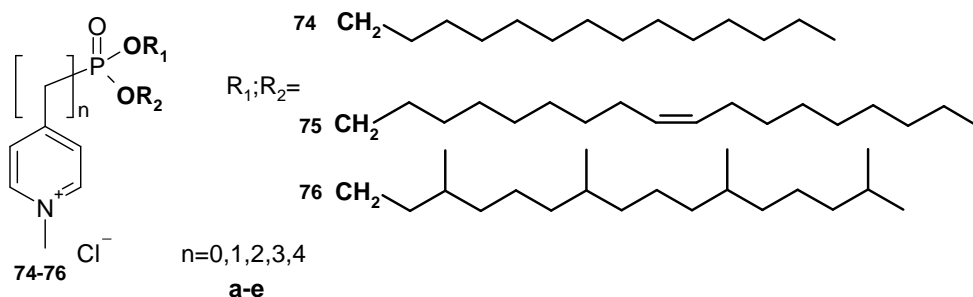
Runājot par polārās daļas nozīmi gēnu transfekcijas aģentu molekulā, nevar nepieminēt arī anjona ietekmi. Par to ir salīdzinoši maz pētījumu, bet ir konstatēts, ka anjonu maiņa ietekmē daudzus savienojumu fizikāli-ķīmiskos parametrus, piemēram, kušanas temperatūru, šķīdību, elektrostatisko mijiedarbību, kritisko micellu koncentrāciju un citus [83,84]. Lipidomimētiķiem ir zināma līdzība ar jonu šķīdriem, tie ir katjoni amfifili savienojumi. Savukārt, jonu šķīdriem gadījumos parādīta anjona ietekme uz dažādām reakcijām, piemēram, *lipāzes* katalizētu polimerizācijas reakciju vinilacetātam un reakcijā ar 2-fenil-1-propanolu, kur atkarībā no jonu šķīdriem izmantotā anjona mainījās enzīma aktivitāte [85,86]. Gēnu transfekcijas pētījumos savienojumu anjonu maiņa un tās ietekme uz aktivitāti apskatīta fragmentāri. Dažiem no vairāk pētītajiem sintētiskajiem vektoriem ir konstatēta atbilstība Hofmeistara anjonu sērijai, piemēram, DOTAP (**8**) pētījumos:  $\text{HSO}_4^- > \text{CF}_3\text{SOO}^- \approx \text{I}^- \approx \text{Br}^- \approx \text{H}_2\text{PO}_4^- \approx \text{Cl}^- \approx \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-}$  [49], SAINT savienojumu **61-71** gadījumā  $\text{ClO}_4^- > \text{PF}_6^- > \text{Cl}^- > \text{BF}_4^- > \text{I}^-$  [87]. Katram konkrētajam

savienojumam ir optimālais pretjons, ar kuru var sasniegt maksimālo transfekcijas aktivitāti.

### 1.2.1.3 Lipofilā daļa

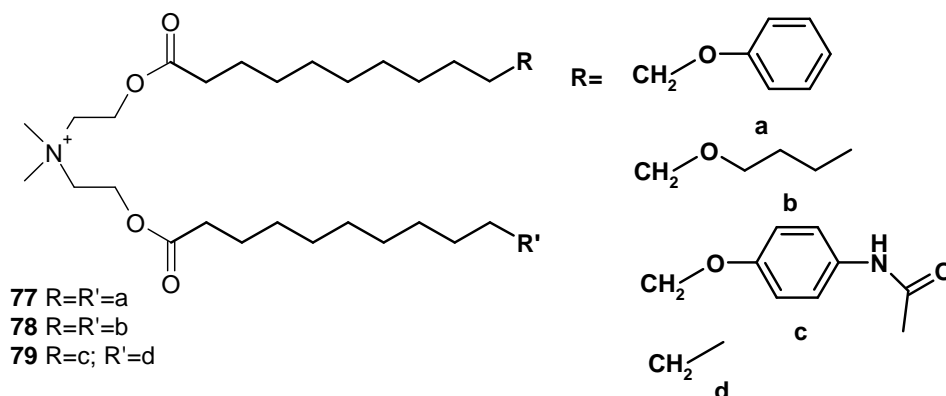
Klasificējot savienojumus pēc lipofilās daļas tie iedalās divās grupās: piesātinātu vai nepiesātinātu ogļūdeņraža fragmentu saturošos un holesterīna grupu saturošos sintētiskajos vektoros, lai gan bieži holesterīnu saturošie nevirālie vektori tiek izdalīti kā atsevišķa klase [38,39,88].

Alkilgrupu saturošiem transfekcijas aģentiem oglekļa atomu skaits alkilķēdē svārstās no C12 līdz C18 atkarībā no tā, kas tiek izmantots par savienotājposmu un polāro daļu. Uz glicerīna bāzes veidotajiem liposomālajiem vektoriem **7-11** augstāka transfekcijas aktivitāte ir sasniegta ar stearil- vai oleilgrupām [48,49]. Turpretī savienojumiem **38-40** ar diviem katjonajiem centriem molekulā, kas ir veidoti uz 1,4-DHP bāzes, transfekcijas aktivitāte samazinās, pieaugot alkilķēdes garumam no C12 līdz C16 [56]. Retāk ir atrodama literatūra, kur gēnu transfekcijas aģents saturētu sazarotu alkilaizvietotāju. Savienojumu **74-76** gadījumā vēlos akcentēt, ka alkilķēdes, tai skaitā arī sazarotas, ir piesaistītas pie fosfonija grupas. Diemžēl autori nav izvērtējuši lipofilās daļas ietekmi uz transfekcijas aktivitāti, bet parādījuši, ka augstākā transfekcijas aktivitāte sasniegta ar savienojumu **74e**, ja n ir 4, kopā ar DOPE (**6**) [89].



Ir aprakstīti pētījumi, kad liposomālajiem gēnu transfekcijas aģentiem **77-79** ir modificēts lipofilās daļas beigu posms, kas ietekmē savienojuma fizikāli-ķīmiskās īpašības, saglabājot nemainīgu elektrostatisko mijiedarbību ar DNS. Piemēram,

Subramanians (*Subramanian*) un līdzautori modificēja alkilķēžu galus, iegūstot fluorescentus savienojumus ar samazinātu hidrofobitāti lipofilajā daļā [90].



Gošerons (*Gaucheron*) un līdzautori savā pētījumā vairākiem komerciāliem transfekcijas aģentiem DOTMA (7), DMRIE (10) un DPPC (1) alkilķēdes galā pēdējiem ogļūdeņražu posmiem piedāvā ūdeņraža atomus aizstāt ar fluoru. Viņi uzsver, ka iegūtie savienojumi ir daudzsolīši kandidāti tālākiem gēnu transfekcijas pētījumiem [91].

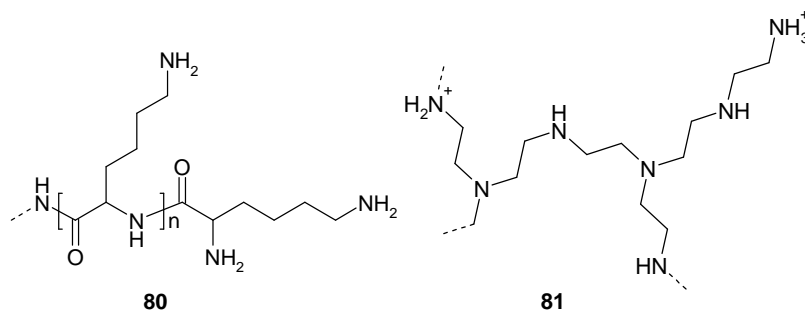
Pārsvārā literatūrā aprakstītajiem nevirālajiem transfekcijas aģentiem dominē divas alkilķēdes (skatīt iepriekš minētos piemērus), bet ir gadījumi, kad vairāk, piemēram, *dvīņu* savienojumi ar četrām alkilgrupām. Tas skaidrojams ar optimālāko pakošanās parametru, kas ir  $p=1/2-1$ , lai, nonākot ūdens vidē, tie veidotu noteikta izmēra nanoagregātus [52,61,74,92].

Noslēdzot pirmās apakšklases raksturojumu, varam secināt, ka lipodomimētiķi kā nevirālie transfekcijas aģenti ir salīdzinoši komplicēti pēc savas uzbūves un funkcijām, jo tie satur ļoti plašu funkcionālo grupu klāstu, kas ietekmē transfekcijas aktivitāti. Sintētiskā nevirālā vektora polārā daļa nodrošina kompleksēšanos ar DNS, nosaka lipopleksa virsmas lādiņu, nodrošina saistīšanos ar šūnas virsmu u.c. Savienotājposms atkarībā no tā ķīmiskās struktūras nosaka lipofilās un polārās daļas novietojumu telpā, var piedalīties DNS kompleksēšanā, piešķirt gēnu transfekcijas aģentam kādas specifiskas īpašības, piemēram, buferkapacitāti u.c. Lipofilā daļa nodrošina liposomu vai citu nanoagregātu veidošanos ūdenī, līdzību ar dabas izcelsmes lipīdiem, kas nepieciešams ģenētiskā materiāla nogādāšanai šūnā, u.c. Apvienojot augstāk minēto tiek iegūtas struktūras, kuras ir iespējams ķīmiski modelēt aktīvāku gēnu transfekcijas aģentu iegūšanai un pētīšanai.

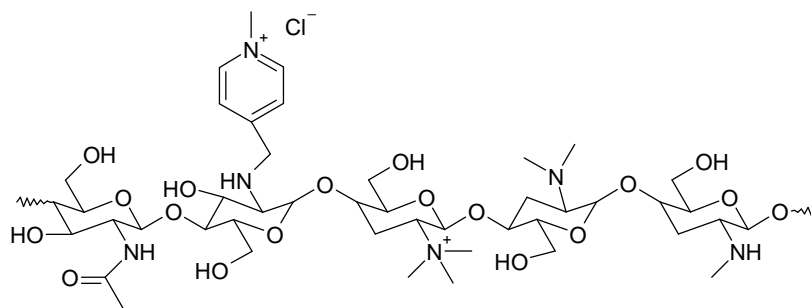
## 1.2.2 Polimēri

Polimēra veida savienojumu izmantošana par nevirālajiem gēnu transfekcijas aģentiem ir ļoti plaši pētīta. Par to liecina zinātniskajā literatūrā atrodamie apskatraksti [39,93]. Lai arī šī savienojumu klase ir ļoti plaša, tiks dots tikai ieskats un nedaudzi piemēri par polimēru gēnu transfekcijas aģentiem un iedalījuma iespējām, jo mūsu mērķmolekulas nav šīs savienojumu klases pārstāvji.

Jau 1975.gadā tika pierādīts, ka poli(L-lizīns) (**80**) spēj kondensēt DNA, līdz pagāja 12 gadi, kad tika publicēti pirmie rezultāti par gēnu transfekciju, variējot lizīna lineārā polimēra molekulmasu [94,95]. Šobrīd viens no izplatītākajiem polimērveida gēnu transfekcijas aģentiem ir polietilēnimīns, kurš ir visplašāk pielietotā standartviela. Vairākos pētījumos ir parādīts, ka gan lineārā, gan sazarotā polietilēnimīna forma ir aktīva. Par standartvielām visbiežāk tiek izmantotas PEI 25 (**81**) (sazarotā forma) un PEI 22 (lineārā forma). Ar skaitli aiz saīsinājuma PEI apzīmē tā molekulmasu, piemēram, 25 kDa vai 22 kDa. Šie ir tikai divi piemēri no lielā polimēru savienojumu klāsta. Tāpat pētījumos var izmantot polisaharīdus – ciklodekstrīnu vai citozānu, dendrimērus, dažādus kopolimērus un bionoārdāmus polimērus, lai novērstu polimēru uzkrāšanos organismā u.c. [96].



Meklējot jaunas struktūras un cenšoties uzlabot polimēru savienojumu gēnu transfekcijas aktivitāti, iegūti un pētīti polimēru atvasinājumi ar holesterīna, piridīnija, spermidīna un citiem aizvietotājiem [97,98]. Tāpat pētīti polimēru atvasinājumi, kas būtu līdzīgāki dabas izcelsmes polimēriem – policukuriem, vai arī tie būtu bionoārdāmi polimēri [99].



82

Biežāk pētījumos pielietotie ir dekstrīna vai citozīna **82** atvasinājumi, kā arī dekstrīna cikliskā forma. Piemēram, ir noskaidrots, ka A549 šūnu līnijās pieaug gēnu transfekcijas aktivitāte citozīna **82** polimēram palielinot tā molekulmasu no 7 līdz 540 kDa [100]. Tāpat polimērā tiek variēti aizvietotāji pie slāpekļa atomiem, optimizējot virsmas lādiņu, uzlabojot buferkapacitātes īpašības un mazinot agregācijas spēju, tādējādi uzlabojot gēnu transfekcijas aktivitāti [101-103].

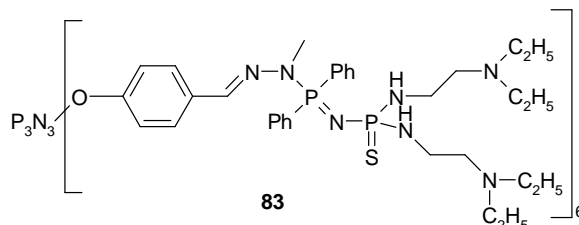
Savukārt, biodegradācija ir nepieciešama, lai polipleksam nonākot šūnā sāktos polimēra sabrukšana, atbrīvojot kompleksēto DNS molekulu un samazinātu polimēra toksicitāti. Biežāk pielietotie biodegradablie fragmenti polimēru ķēdē vai sānu atzaros ir bisulfīdu fragments,  $\beta$ -aminoesteri, poli(4-hidroksi-1-prolīna esteri) [99,104-106].

### Dendrimērveida transfekcijas aģenti

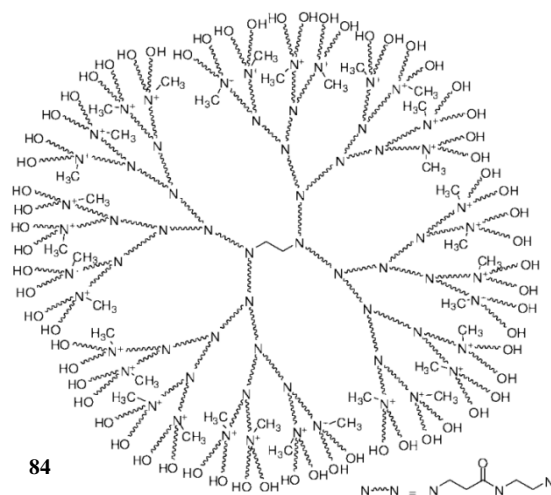
Šo savienojumu nosaukums ir cēlies no grieķu valodas „*dendron*” – koks, „*meros*” – daļa. Un tiem ir ļoti liela līdzība ar stipri sazarotiem polimēriem, tomēr būtiski atšķiras to iegūšana. Dendrimēra kodols var būt gan viens atoms, gan arī sarežģītākas uzbūves molekula, no kuras tālāk atzarojās divi vai vairāki zari. Zarus veidojot slāni pa slānim, ko dēvē par paaudzēm, iespējams iegūt trīsdimensionālus nanoagregātus ar noteiktiem izmēriem.

Gēnu transfekcijas pētījumos ir atklājies, ka būtiskākais ir, kuras paaudzes dendrimērs tiek izmantots transfekcijai. Dendrimēriem ar mazu paaudzes kārtu ir zems virsmas lādiņš un līdz ar to tie vāji saistās ar DNS, turpretī dendrimēri ar lielu paaudzes kārtu labi saistās ar DNS, bet to molekulas izmēru pieaugums samazina gēnu transfekcijas efektivitāti [107]. Dendrimērus iedala līdzīgi kā polimērus pēc lietotā monomēra. Sākotnēji bija pēc struktūras vienkāršāki savienojumi, piemēram, poliamidoamīda, polipropilēnimīna dendrimēri. Meklējot efektīvākus transfekcijas

aģentus ir sintezēti komplicētākas struktūras dendrimēri, piemēram, pirmās paaudzes poliaminofosfīna dendrimēri **83** [108].



Ir noskaidrojies, ka ļoti liela nozīme ir tieši ārējam slānim, kas veido makromolekulas virsmu. Tiek veiktas dažādas modifikācijas, lai uzlabotu vai vismaz saglabātu tajā pašā līmenī transfekcijas aktivitāti, bet samazinātu dendrimēra toksicitāti. Piemēram, tiek piedāvāts ārējā slāņa amonija grupās ūdeņraža atomus aizvietot ar metil- vai hidroksietilgrupām, lai uzlabotu transfekcijas aktivitāti (savienojums **84**) [109].



### 1.2.3 Nanodaļiņas

Attīstoties nanozinātnei arvien vairāk tiek izmantotas zelta, dzelzs, silīcija un citu elementu nanodaļiņas [110,111]. Kā DNS nesējus izmanto oglekļa nanovadus, fullerēnus [112]. Jāpiezīmē, ka bieži nanodaļiņas izmanto kopā ar liposomālajiem vai polimēru transfekcijas aģentiem vai arī to struktūras ķīmiski modificē, lai

savienojumi spētu saistīties ar DNS un būtu stabili šķīdumos [113], piemēram, oglekļa nanošķiedras modificētas ar amfifiliem aizvietotājiem [114].

#### **1.2.4 Gēnu transfekcijas aģenti ar buferkapacitātes īpašībām**

Ļoti svarīgi, lai eksperimenta laikā, katjonajai liposomai šķērsojot šūnas endosomālo daļu, netiktu mainīts endosomas vides pH, kas skābas vides gadījumā var novest pie DNS degradācijas. Tāpēc meklē sintētiskos vektorus, kas uzrāda buferkapacitātes īpašības fizioloģiskajā pH apgabalā 5,5 līdz 7. Tādi sintētiskie vektori ir atrodamī gan starp lipīdveida, gan polimēru transfekcijas aģentiem. Buferkapacitāti savienojumiem nodrošina viena vai vairākas protonēties/deprotonēties spējīgas grupas. Polietilēnimīni, pateicoties daudzajām aminogrupām polimērā, tiek uzskatīti par labākajiem nemainīgas vides pH nodrošinātājiem šūnā. Nevirālais vektors PEI 25 (**81**) tiek dēvēts pat par protonu „sūkli” [81,115], jo labi spēj saglabāt nemainīgu vides pH vērtību. Tomēr, lai samazinātu savienojuma toksicitāti, bet saglabātu buferkapacitātes īpašības, aminogrupu iesaka aizstāt ar heterociklisku sistēmu, piemēram, imidazola grupu, jo tā spēj gan protonēties, gan deprotonēties un iegūtais lādiņš tiek delokalizēts imidazola ciklā [116]. Divus katjonos centrus saturošie dihidropiridīna atvasinājumi **37-40** uzrāda buferīpašības fizioloģiskajā pH apgabalā, bet vienu katjono centru saturoši dihidropiridīna atvasinājumi **33-36** buferīpašības neuzrāda. Lai arī vienu un divus katjonos centrus saturošiem 1,4-DHP atvasinājumiem **33-36** un **37-40** atšķiras katjona novietojums molekulā, iespējams, ka tieši savienojumu grupai **37-40** 1,4-DHP NH protona kustīgums padara tos par augstāku gēnu transfekcijas aktivitāti uzrādošiem savienojumiem salīdzinot ar monokatjonajiem 1,4-DHP atvasinājumiem **33-36** [56].

### **1.3 Dihidropiridīnu bioloģiskās īpašības**

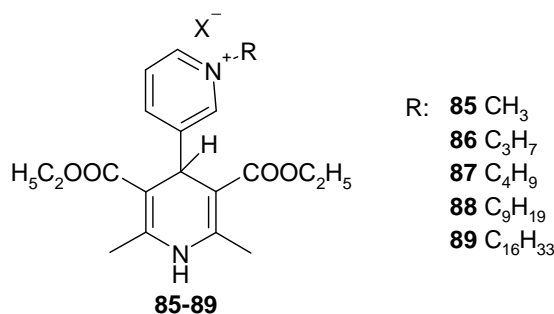
Mūsu sintezēto mērķproduktu struktūras ietver 1,4-dihidropiridīna fragmentu, kura atvasinājumi ir potenciāli farmakofori, tāpēc šajā nodaļā aplūkosim 1,4-DHP bioloģiskās aktivitātes, kādas varētu uzrādīt mūsu sintezētie savienojumi, tādējādi veicot ne tikai transportfunkciju, bet pildot vēl kādu citu funkciju.

### 1.3.1 Farmakoforās īpašības

1,4-Dihidropiridīna atvasinājumi ieņem ļoti nozīmīgu vietu medicīnas ķīmijā un biomedicīnā [117]. Tie ir plaši pazīstami kā kalcija kanālu modulatori kardiovaskulāru slimību gadījumos [118-120]. Kā jau minēts ievadā, tad 1,4-DHP molekula ir viena no farmakoloģiski privilīģētām struktūrām, kurai, variējot un modificējot aizvietotājus, var iegūt 1,4-DHP atvasinājumus ar dažādām bioloģiskām īpašībām. Tie var iedarboties uz dažādiem receptoriem un jonu kanāliem [121-123]. Ir zināmi 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi ar antioksidantu [124-126], pretiekaisuma [127,128], radioprotektīvām [129,130], pretvēža [131,132], antidiabēta [133,134], imunomodulatorām [135], neiroprotektīvām [136,137], antibakteriālām [138,139], antivirālām [140,141], multirezistenci noņemošām [142,143] īpašībām. Pierādīts, ka katjonie amfifilie 1,4-DHP atvasinājumi uzrāda arī augstu gēnu transfekcijas aktivitāti [56,144]. Iepriekš uzskaitītās 1,4-DHP atvasinājumu bioloģiskās īpašības ir jāzina, jāvar prognozēt, lai, veidojot potenciālo gēnu transfekcijas aģentu molekulas arhitektūru, varētu pastiprināt vēlamo vai izvairīties no nevēlamās farmakoloģiskās aktivitātes. Idealizējot iepriekš rakstīto, jāmēģina iegūt transportmolekulas, kas vienlaicīgi būtu gēnu transfekcijas aģenti ar augstu transfekcijas aktivitāti un papildus vēl uzrādītu citas farmakoloģiskās īpašības, kas piemīt 1,4-DHP atvasinājumiem, piemēram, neiroprotektīvas, antimutagēnas, pretvēža un antimetastatiskas īpašības [145,146].

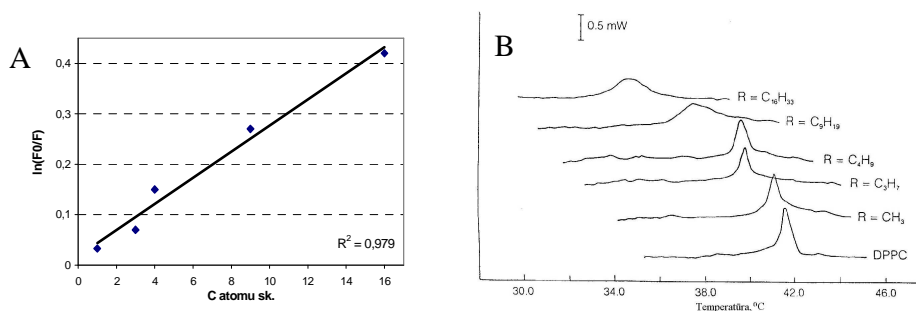
### 1.3.2 1,4-Dihidropiridīnu membranotropās īpašības

Nevirālajiem vektoriem, lai nogādātu ģenētisko materiālu šūnās līdz kodolam, ir jāšķērso šūnas membrāna. Savienojumu **33-36**, kuriem ir noteikta gēnu transfekcijas aktivitāte, tuviem analogiem **85-89** ir pārbaudītas membranotropās īpašības. Literatūrā aprakstīta 4-N-alkilpiridil-1,4-DHP atvasinājumu **85-89** spēja inkorporēties fosfolipīdu **1** modeļmembrānās.





Noskaidrots, ka, palielinot alkilķēdes garumu pie kvaternizētā slāpekļa piridīnija gredzenā, pieaug savienojumu spēja inkorporēties fosfolipīdu modeļmembrānās. Šī sakarība izpildās ar augstu korelācijas koeficientu  $R^2=0,979$  (A, 1.8. attēls). Rezultāti liecina, ka modeļmembrānās vislabāk inkorporējas 1,4-DHP atvasinājums **89**, kam N-aizvietotāja alkilķēdes garums ir C16 (A, 1.8. attēls) [147].



1.8.att. **A:** *N*-Alkilpiridil-1,4-DHP **85-89** atvasinājumu inkorporēšanās modeļmembrānās atkarībā no alkilķēdes garuma pie kvaternizētā piridīnija *N*-atoma. **B:** DPPC liposomu DSK termogrammas 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu **85-89** klātbūtnē [147]

Literatūrā dots ieskats par savienojumu **85-89** ietekmi uz membrānu fluiditāti, nosakot gēlu–šķidro kristālu fāzu pārejas temperatūru ar diferenciālās skenējošās kalorimetrijas (DSK) metodi dipalmitoilfosfatidilholīna (**1**) liposomām piridīnija atvasinājumu **85-89** klātbūtnē (B, 1.8. attēls). Pētījumā noskaidrots, ka fāzu pārejas temperatūras nobīde palielinās, pagarinoties alkilgrupas aizvietotājam pie slāpekļa atoma [147].

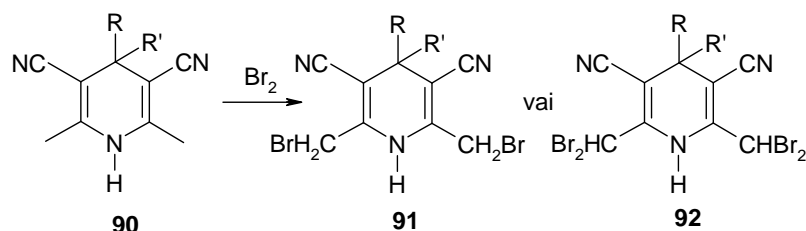
## 1.4 Katjonu amfifilu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu iegūšana

Ir pagājuši gandrīz 130 gadi kopš pirmo reizi tika sintezēti pirmie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi, bet vēl joprojām sintētiķiem ir plašs darba lauks pie jaunu 1,4-DHP atvasinājumu sintēzēm. Šādu nepārtraukti jaunu savienojumu meklējumi daļēji hidrētu slāpekli saturošu heterociklu rindā ir izskaidrojami ar to lielo lomu bioloģiskajos procesos. 1,4-DHP gredzenam ir iespēja dažādot aizvietotājus septiņās vietās, kas palielina iespējamo struktūru variāciju skaitu un ļauj iegūt 1,4-DHP atvasinājumus ar daudzām farmakoforām īpašībām [122]. Tā kā 1,4-

DHP sintēze nav darba primārais uzdevums, bet tikai metode pamatizejvielu iegūšanai, literatūras apskatā šo jautājumu padziļināti neapskatīsim.

#### 1.4.1 1,4-Dihidropiridīna 2,6-dimetilgrupu funkcionalizēšana

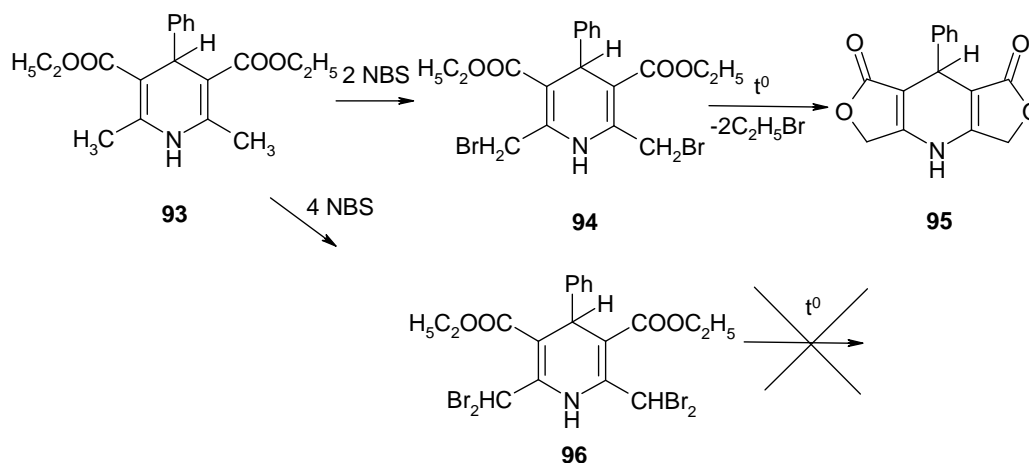
Viena no iespējām, lai tālākās reakcijās iegūtu katjonus 1,4-DHP atvasinājumus, ir veikt dažādas modifikācijas 1,4-DHP atvasinājumu 2,6-dimetilgrupās. Šī metode ir galvenais sintētiskais ceļš, ko mēs izmantosim katjonu amfifilu 1,4-DHP atvasinājumu iegūšanai. Sākotnēji veicot 2,6-dimetilgrupu halogenēšanu, izmanto bromējošos aģentus. Literatūrā ir aprakstīti vairāki reaģenti un apstākļi, kā veikt halogenēšanas reakciju heterocikliskas sistēmas sānu ķēdēs [148-150]. Tomēr darbu, kuros būtu aprakstīta selektīvi veikta 1,4-DHP atvasinājumu 2,6-dimetilgrupu halogenēšana, ir salīdzinoši maz. Pagājušā gadsimta astoņdesmito gadu beigās pirmo 1,4-DHP 2,6-vietu bromēšanu veica Kaca (*Kau*). Iedarbojoties uz 4,4-dialkilaizvietotu-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridīnu **90** ar bromu hloroformā vai dioksāndibromīdu dioksānā tika iegūti 1,4-DHP bis(brommetil)atvasinājumi **91**. Savukārt, ja broms tiek ņemts pārākumā un reakcija veikta ledus etiķskābē, rodas bis(dibrommetil)atvasinājumi **92** [151-153].



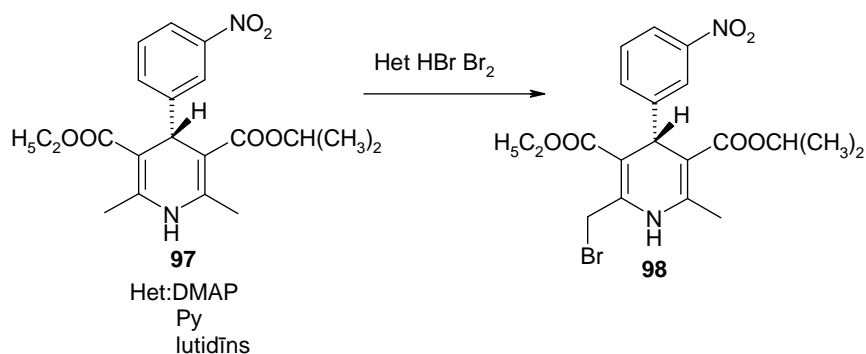
- a R CH<sub>3</sub>, R' CH<sub>3</sub>
- b R CH<sub>3</sub>, R' C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>
- c R C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R' C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>
- d R,R' -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-
- e R,R'-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-

2,6-Dimetil-1,4-dihidropiridīna atvasinājuma metilgrupu funkcionalizēšanai kā bromējošo aģentu var izmantot N-bromsukcinimīdu (NBS) [154-157]. Atkarībā no bromējošā reaģenta daudzuma un reakcijas apstākļiem, iespējams iegūt gan 1,4-DHP bis(brommetil)atvasinājumus **94**, gan bis(dibrommetil)atvasinājumus **96**. Jāatzīmē, ka iegūtie brommetilatvasinājumi ir termiski nestabili, ja 3,5-vietās ir estera grupas, no tiem pie paaugstinātas temperatūras eliminējas alkilbromīds un notiek laktona cikla

saslēgšanās par atbilstošo furo-1,4-dihidropiridīnu **95**, bet dibrommetilatvasinājumi tajos pašos apstākļos ir stabili [154].



Vēl 2,6-dimetil-1,4-dihidropiridīna atvasinājumu metilgrupas bromēšanai iesaka lietot piridīnija perbromīdu ( $PyH^+Br_3^-$ ), reakcijā iegūst produktu, kurš veido monobrommetilatvasinājumu [158,159]. Pētījumā par enantiotīru 1,4-DHP atvasinājuma **97** 2,6-metilgrupu selektīvu bromēšanu, izmantojot dažādus piridīnija perbromīda atvasinājumus, lai reakcija notiktu pie mazāk stēriski apgrūtinātās metilgrupas iegūstot produktu **98**, noskaidrots, ka bromēšanas reakcijā augstāka regioselektivitāte sasniegta ar lutidīna perbromīdu, zemāka bija dimetilaminopiridīna perbromīdam un tikai pēc tam piridīnija perbromīdam.

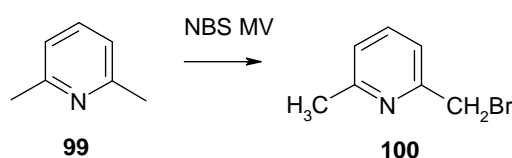


Regioselektivitāte noteikta reakcijas maisījumam izmantojot augstas efektivitātes šķīdumu hromatogrāfijas (AEŠH) metodi, bet izdalītā produkta iznākums ir no 56 – 65% [160].

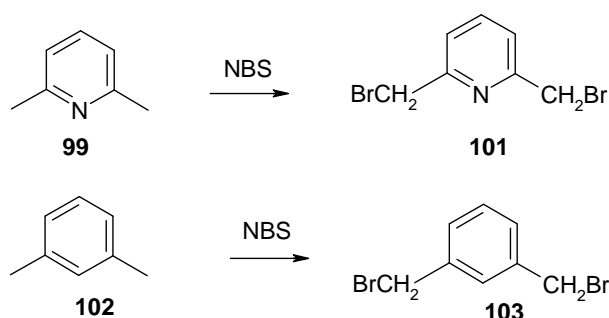
Ļoti bieži 2-brommetil- vai 2,6-bis(brommetil)-1,4-dihidropiridīna atvasinājumi nav gala produkti, bet tos izmanto kā izejvielas tālākām molekulas modifikācijām, piemēram, veicot broma nukleofilu aizvietošanu.

### 1.4.1.1 Piridīna sānu ķēžu bromēšana

Nedaudz aplūkosim 2,6-dimetilpiridīna bromēšanu, jo mūs interesēja iegūt analogu modeļsavienojumu - 1,4-dihidropiridīna atvasinājuma oksidēto formu. Viens no sintētiskajiem ceļiem ir līdzīgi kā 1,4-DHP gadījumā - 2,6-metilgrupu bromēšana. Jāatzīmē fakts, ka šajā gadījumā halogenēšanas reakcijas sānu ķēdēs notiek grūtāk. Lai iegūtu atbilstošos di(brommetil)atvasinājumus, reakcijas veic bargākos apstākļos, kā, piemēram, ar N-bromsukcinimīdu, reakcijas maisījumu apstrādājot ar mikroviļņiem. Reakciju veicot molārās attiecībās 1:1 iegūst produktu **100** ar 40% iznākumu. Gosvami (*Goswami*) un līdzautori veica analogus eksperimentus ar citiem metilaizvietotiem piridīna, pirazīna un benzola atvasinājumiem. Iegūtie brommetilēnproduktu iznākumi svārstījās no 25 – 40% [161].

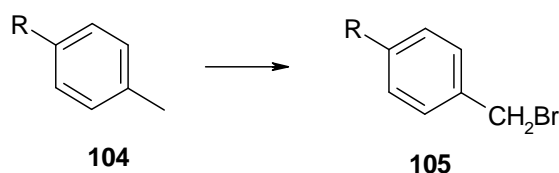


Literatūrā apskatīta pikolīna atvasinājumu (tai skaitā 2,6-lutidīna (**99**)) un toluola atvasinājumu (tai skaitā 1,3-ksilola (**102**)) metilgrupu bromēšana ar NBS. Pie vienādiem reakcijas apstākļiem izdalītie piridīna atvasinājumi **101** iegūti ar augstākiem iznākumiem nekā benzola atvasinājumi **103**. Salīdzinot reakcijas iznākumus, novērojama likumsakarība, ka elektronakceptoru aizvietotāju atrašanās ciklā (pikolīna vai toluola) dod zemākus metilgrupas bromēšanas reakcijas iznākumus nekā elektrondonoru aizvietotāju saturošu aromātisku atvasinājumu gadījumā [162,163].



Literatūrā aprakstītajos pētījumos aplūkotas arī citu metilaizvietotu aromātisko sistēmu metilgrupu bromēšanas reakcijas [164,165]. Pēdējos gados tiek piedāvāts reakcijas maisījumu apstarot ar mikroviļņiem [150,166].

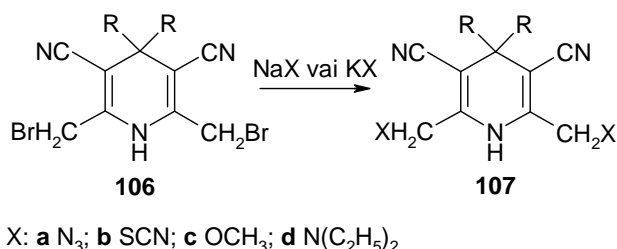
Podgorseka (*Podgorsek*) un līdzautori veica dažādu 4-aizvietotu toluola atvasinājumu **104** bromēšanu ar NBS ūdens šķīdumā ievērojot zaļās ķīmijas principus. Iegūti benzilbromīda atvasinājumi **105** ar ļoti augstiem iznākumiem [167]. Šī pati pētnieku grupa, veicot paralēlu pētījumu par bromējošo aģentu izmantojot HBr ūdens vidē, noskaidroja, ka labākās molārās attiecības izejvielai pret H<sub>2</sub>O/HBr *para-terc*-butiltoluola gadījumā ir 1 mols izejvielas, 2 moli H<sub>2</sub>O un 1,1 mols HBr.



Dotās bromēšanas reakcijas notiek pēc radikāļu mehānisma, tāpēc bieži tiek lietoti dažādi radikāļu iniciatori - benzoilperoksīds, azobisizobutironitrils, ultravioletā gaisma, kā arī ultraskaņa (US) vai mikroviļņi (MV). Literatūrā minēts piemērs, ka metil aizvietotu aromātisku sistēmu bromējot ar N-bromsukcinimīdu, reakcija notika regioselektīvi atkarībā no apstākļiem - US vai MV. Par iniciatoru izmantojot ultraskaņu notika reakcijas aromātiskajā sistēmā, turpretī mikroviļņos reakcija notika sānu ķēdēs – metilgrupās [168].

#### 1.4.2 2,6-Bis(brommetil)-1,4-dihidropiridīna bromā nukleofila aizvietošana

Lai tālāk variētu 1,4-DHP 2-6-vietas, iegūstot dažādus aizvietotājus saturošus savienojumus, literatūrā plašāk aplūkotas ir 2,6-bis(brommetil)grupu halogēna nukleofilās aizvietošanas reakcijas. Pirmie eksperimenti veikti ar bromatvasinājumu **106**, kura nukleofilās aizvietošanas reakcijā ar otrējiem amīniem, nātrija metilātu, nātrija azīdu u.c. savienojumiem, iegūti 1,4-DHP atvasinājumi **107** [169].



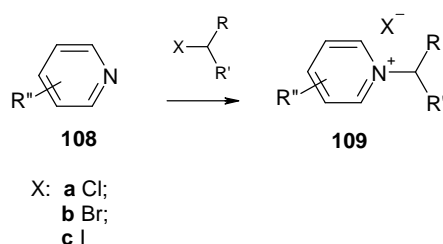
Aprakstīta arī bromā atoma nukleofila aizvietošana ar piperidīnu, piperazīna atvasinājumiem, cikloheksilamīnu, piridīnu, imidazolu, morfolīnu, tiourīnvielu,

tiofenolu un tā atvasinājumiem. Reakcijas produkti ar piridīnu un tiourīnvielu izdalīti sāļu veidā [158,170,171]. Tāpat, izmantojot šādu reakcijas shēmu, Membrānaktīvo savienojumu un  $\beta$ -diketonu laboratorijā sintezēti potenciālie gēnu transfekcijas aģenti - savienojumu grupa **37-41** [56,172,173].

### 1.4.3 Piridīna un tā atvasinājumu kvaternizācija ar halogēnalkāniem

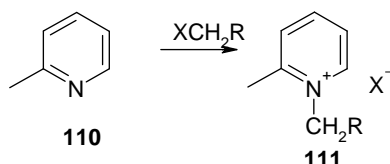
Analizējot polifunkcionālo katjono gēnu transfekcijas aģentu struktūras, nepieciešams īsumā aplūkot piridīna kvaternizācijas reakcijas, akcentējot iepriekš apskatīto bromā nukleofilo aizvietošanu no nukleofilā reaģenta klasifikācijas viedokļa, lai noskaidrotu galvenās likumsakarības. Lai no piridīna iegūtu piridīnija atvasinājumus, biežāk lieto kvaternizācijas reakcijas.

Piridīna kvaternizācijas reakcijas ar alkilhalogēnīdiem ir pazīstamas un samērā daudz pētītas [174-176]. Piridīnija sāļu iznākums un reakcijas laiks ir atkarīgs gan no aizvietotājiem piridīna ciklā, gan arī no aizvietotāja halogēnalkānā, tā elektroniskās un stēriskās dabas [177-179].



Ja reakciju veic ar piridīnu, 3-metil- vai 4-metilpiridīnu un metiljodīdu, iegūst produktu **109c** ar gandrīz kvantitatīviem iznākumiem un īsā reakcijas laikā, tomēr pagarinot alkilķēdes garumu alkiljodīdā, reakcijas iznākumi samazinās. Uzskata, ka kvaternizācijas reakcija notiek pēc bimolekulārās nukleofilās aizvietošanās mehānisma [180]. Reaģētspēja palielinās halogēnalkānu rindā  $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$  [174,175]. N-Kvaternizētu sāļu veidošanās gaitu nosaka arī alkilējošā reaģenta uzbūve, ja halogēnalkāns satur elektronakceptorus aizvietotājus reakcijas notiek ātrāk un ar labākiem iznākumiem, salīdzinot ar elektrondonorus aizvietotājus saturošiem halogēnalkāniem. Piridīna, hinolīna vai izohinolīna reakcija ar bromacetonu, fenacilbromīdu, hloracetonitrilu,  $\alpha$ -halogēnskābju esteriem notiek sausā acetonā, istabas temperatūrā, veidojot N-kvaternizētus sāļus ar augstiem iznākumiem [177,178].

Būtiska ietekme uz piridīnija sāls iznākumu ir stēriskajiem un elektroniskajiem efektiem. Tā, piemēram, 2-metilpiridīna **110** N-kvaternizēšana norit daudz grūtāk, un produktu iznākumi ir zemāki, salīdzinot ar neaizvietotu piridīnija sāļu iznākumiem [180]. Lai samazinātu reakcijas laiku un palielinātu reakcijas iznākumus, piridīna N-alkilēšanas reakcijas piedāvā veikt mikroviļņos, kur bez šķīdinātāja īsā laikā iegūti 1-metilimidazolijs un piridīnija sāļi ar ļoti augstiem iznākumiem 89-98% [181].



R: a COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, b CONH<sub>2</sub>, c COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, d CN,  
 e C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, f p-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>  
 X=Br, Cl

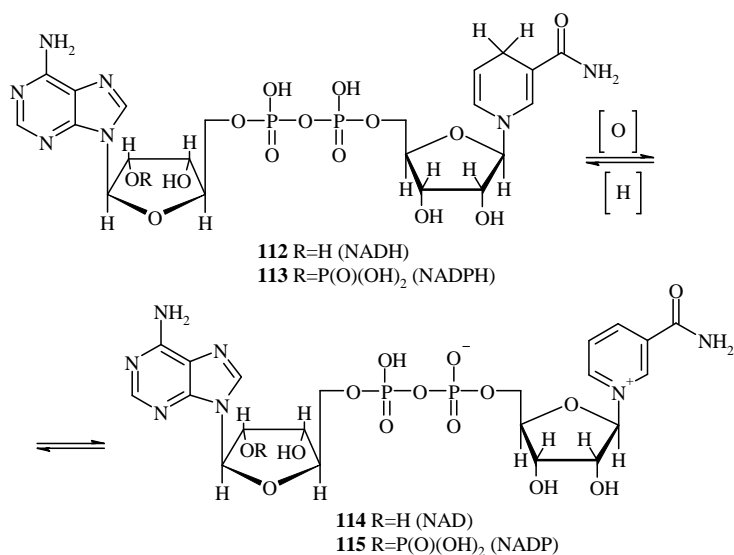
Apskatot SAINT savienojumus lielākā daļa no N-metilpiridīnija atvasinājumiem ir iegūti alkilējot atbilstošos piridīna atvasinājumus ar metiljodīdu. Šajās reakcijās alkilējošais reaģents ņemts pārākumā molu attiecībās no 1:5 līdz 1:20 – piridīns:metiljodīds. Piridīna atvasinājumi ar gariem alkilaizvietotajiem 4-vietā deva gandrīz kvantitatīvus reakcijas iznākumus stundas laikā. Savukārt, ja alkilgrupa pie piridīna gredzena piesaistīta caur karboksilgrupu reakciju iznākumi samazinājās līdz 50% no gaidītā. Tā 3,5-dialkoksikarbonilpiridīnu N-alkilēšanas reakcijai, lai iegūtu savienojumu **71**, reakcijas maisījums bija vārīts 24 stundas un metiljodīds lietots 20 kārtīgā pārākumā, tomēr produktu iznākumus izdevās sasniegt tikai 50% apmērā [76,77].

Piridīnu N-alkilēšanas reakcijas apstākļi aprakstīti vairākos darbos [177,178, 182,183], iesakot piridīnu apstrādāt ar alkilējošu aģentu acetonā, etanolā, etilacetātā, acetonitrilā. Literatūrā [184,185] tiek piedāvāts 2,4-dimetil-3-nitropiridīnu vai 2,4-dimetil-5-nitropiridīnu kvaternizēt ar bromacetonu etilmetilketonā vai acetonitrilā.

#### 1.4.4 1,4-Dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšana

Pēdējos gados 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi literatūrā tiek galvenokārt apskatīti kā fizioloģiski un bioloģiski aktīvas vielas. Šīs īpašības tika apskatītas iepriekš (1.3.1. nodaļa).

Tomēr ne mazāk svarīgs pētījumu virziens 1,4-DHP ķīmijā ir to spēja oksidēties – par atbilstošajiem piridīna atvasinājumiem. Šiem pētījumiem nav tikai teorētiska interese, tā ir pamatreakcija dzīvības procesos, kas saistīta ar nikotīnamīda adenīna dinukleotīdu un to fosfātu transformācijām ( $\text{NADH} \leftrightarrow \text{NAD}$ ;  $\text{NADPH} \leftrightarrow \text{NADP}$ ), kas ir galvenie metabolisma un šūnu enerģijas ieguves procesi [186].



Jorojām pēta un diskutē par 1,4-dihidropiridīnu iespējamo oksidēšanās reakcijas mehānismu [186,187]. NADH oksidēšanās par  $\text{NAD}^+$  ietver divu elektronu un viena protona pārnese un CH saites šķelšanu. Literatūrā tiek piedāvāti un apskatīti divi fundamentāli atšķirīgi mehānismi: vienas stadijas (vienlaicīga) vai vairāku stadiju (pakāpeniska) elektronu un ūdeņraža pārnese, vai vēlākajos gados – elektrona-ūdeņraža vai divu elektronu-protona pārnese [186,188].

Guengeriča (*Guengerich*) grupas pētījumi rāda, ka viens no galvenajiem bioloģiski aktīvo 1,4-DHP atvasinājumu metabolisma ceļiem varētu būt to oksidēšanās par piridīna atvasinājumiem ar Citohromu P450 (CYP) kā katalizatoru [189,190].

Tāpat plaši tiek pētīta arī dažādu 1,4-DHP atvasinājumu elektroķīmiskā oksidēšana [191-194]. Jāuzsver, ka literatūras datu klāstā ir atrodami atsevišķi darbi par katjonus aizvietotājus saturošu 1,4-DHP atvasinājumu elektroķīmisko oksidēšanu, kas realizēta Latvijas Organiskās sintēzes institūtā. Elektroķīmiski oksidējot katjonos aizvietotājus saturošos 1,4-DHP atvasinājumus iegūti atbilstošie katjonos aizvietotājus saturoši piridīna atvasinājumi [191,195].



Kā apliecina literatūras analīze, interese par 1,4-dihidropiridīnu oksidēšanu nav mazinājusies. Pēdējos gados tiek meklēti un pētīti arvien jauni 1,4-DHP aromatizācijas varianti gan ķīmiski, gan elektroķīmiski [196,197]. Nedaudz apskatīsim ķīmisko oksidētāju variantus – vēsturiski pirmie tika lietoti slāpekļskābe [198,199] vai reakcijas vidē ģenerēts slāpekļa oksīds [200,201]. Vēlākajos gados 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšanai tika piedāvāti daudzi jauni neorganiski reaģenti un reakcijas shēmas, piemēram,  $I_2$  [202] neorganiskās skābes: oksons,  $HIO_3$ ,  $HIO_6$  [203], dažādi hroma atvasinājumi [204,205],  $KMnO_4$  [206],  $Zr(NO_3)_4$  [207],  $Bi(NO_3)_3$  [208],  $Mn(OAc)_3$  [209],  $Pb(OAc)_4$  [210],  $RuCl_3$  [211],  $Fe(ClO_4)_3/AcOH$  [212] u.c. Tāpat tiek pētīta 1,4-DHP atvasinājumu oksidēšana par piridīna atvasinājumiem, reakciju veicot mikroviļņos [213]. Īpaši gribētos atzīmēt arī 1,4-DHP izmantošanu kā videi draudzīgus un drošus reaģentus (Brønsted skābes) dažādu organisko savienojumu grupu reducēšanai [214,215].

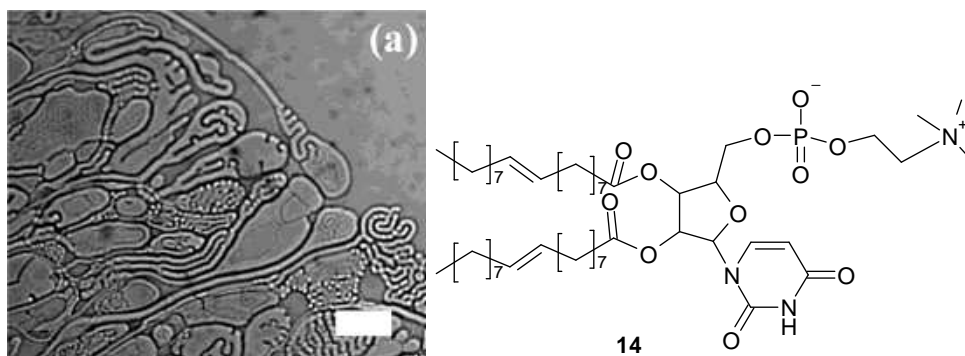
Tomēr jāatzīmē, ka, lai gan literatūrā daudz tiek pētītas 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšanas iespējas, tomēr praktiski nav datu par katjonus aizvietotājus saturošu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ķīmisku oksidēšanu.

## **1.5 Pašorganizējošos katjono amfifilo savienojumu veidoto nanoagregātu raksturošanas metodes**

Amfifilo katjono gēnu transfekcijas aģentu veidoto liposomu vai cita veida nanostruktūru raksturošanai un pētīšanai literatūrā piedāvātas dažādas metodes, piemēram, gaismas mikroskopija [216], elektronmikroskopija (EM) [217], *krio*-elektronmikroskopija [218], atomspēku mikroskopija (ASM) [219], šaura leņķa rentgendifraktometrija [220], kodolmagnētiskā rezonanse [221] u.c. Sīkāk aplūkosim metodes, kuras izmantotas darbā iegūto nanodaļiņu raksturošanai. Elektronmikroskopija un *krio*-elektronmikroskopija dod iespēju raksturot asociātu formas un izmērus divās dimensijās [222,223]. Gaismas izkliedes mikroskopija ļauj spriest par nanoagregātu izmēriem un liposomas virsmas lādiņu [224]. Atomspēku mikroskopija, savukārt, dod iespēju noteikt liposomu izmērus trijās dimensijās un vizualizēt parauga virsmu [219].

### 1.5.1 Gaismas mikroskopija

Vienkāršākā un vēsturiski vecākā no minētajām metodēm ir gaismas mikroskopija. Zināmi vairāki piemēri, kad ar gaismas mikroskopu ir redzams, ka savienojumi ūdens šķīdumos veido lielus agregātus. Kā vienu no minētajiem gadījumiem var atzīmēt šādu supermolekulu asociātu veidošanos, kas novērota amfifiliem uridīna fosfatidilholīna **14** analogiem, kuri ūdens šķīdumā veidojuši multilamellāras sistēmas (1.9. attēls) [53].



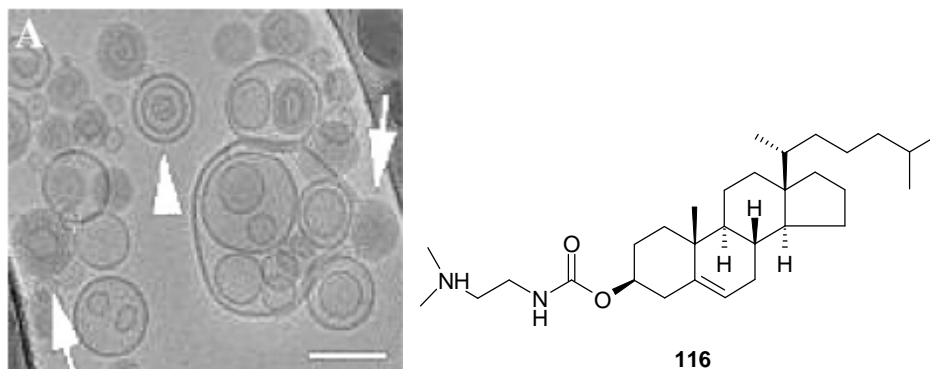
1.9.att. Savienojuma **14** asociāti ūdens šķīdumā, attēli iegūti ar gaismas mikroskopu, baltais nogrieznis 30  $\mu\text{m}$  [53]

Katjoni amfifilie 1,4-DHP atvasinājumi **33-36** un **37-41** veido līdzīgus agregātus ūdens šķīdumos. Šādus primāros eksperimentus bija veikusi Huvonena (*Hyvönen*) savā disertācijā [225], pārbaudot, vai savienojumi veido liposomas un vai tos izvēlēties tālākiem pētījumiem. Tomēr šī metode nav piemērotākā liposomu pētījumiem, jo gaismas mikroskopa izšķirtspēja neļauj apskatīt sīkus objektus, kuru izmēri ir daži simti nanometri, bet iespējams tikai reģistrēt pašagregāciju.

### 1.5.2 Elektronmikroskopija

Vēsturiski no gaismas mikroskopa 20.gadsimta 30.gados tika radīta caurejošā starojuma elektronmikroskopija (TEM) no kuras vēlāk 60.gados tālāk attīstījās skenējošā elektronmikroskopija (SEM). Abas šīs mikroskopijas metodes gan TEM, gan SEM deva iespēju aplūkot daudz sīkākus objektus, iegūstot divdimensionālus attēlus ar izšķirtspēju līdz pat dažiem nm. Attīstoties tehnoloģijām tika izveidots zemas temperatūras elektronmikroskops (*krio*-TEM), kas deva iespēju uzņemt attēlus

sasaldētiem paraugiem [226]. Šīs metodes priekšrocība - liposomas šādos paraugos saglabā savu struktūru.

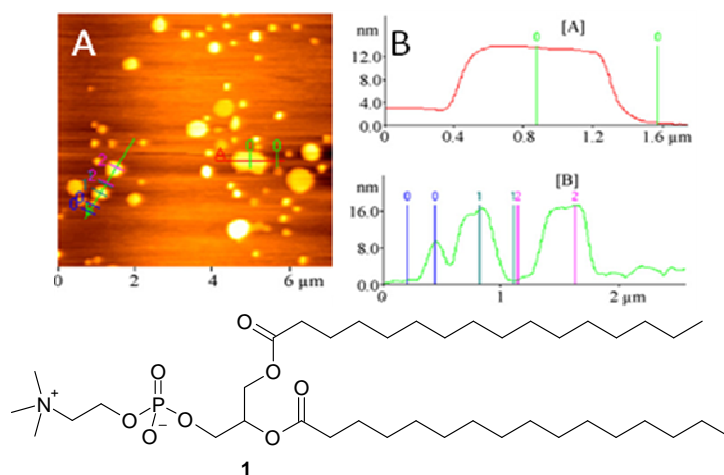


1.10. att. Savienojuma **116** veidoto liposomu krio-TEM attēls, baltais nogrieznis 100 nm [227]

Piemēram, 1.10. attēlā redzamas holesterīna lipīda **116** gan multislāņainas, gan vienkāršas liposomas. Šajā metodē būtiskākais ir, ka tā dod iespēju aplūkot nanodaļiņu agregātus šķīdumā. Salīdzinot ar klasiskajām elektronmikroskopijas metodēm paraugi netiek žāvēti, jo tas var ietekmēt daļiņu formu gala attēlā.

### 1.5.3 Atomspēku mikroskopija

Pagājušā gadsimta 80. gados tika radīts jauns mikroskopijas paveids – atomspēku mikroskopija, kura strauji attīstījās un šobrīd jau ir plaši pielietota mikroskopijas metode. To var izmantot pētījumos par nanodaļiņu izmēriem, porainību, abrazivitāti, tīrību, koroziju, metālu pārklājuma, kā arī materiālu virsmas analīzēs [219,228-234]. Zemāk parādīta (1.11. attēls) savienojuma **1** liposomu vizualizācija uz vizlas ar atomspēku mikroskopu iegūstot analizējamās virsmas topogrāfiju (A, 1.11. attēls) un blakus (B, 1.11. attēls) parādīts analizējamās virsmas profils pa izvēlētajiem nogriežņiem.



1.11. att. A: Fosfatidilholīna **1** liposomu ASM attēls uz vizlas; B: fosfatidilholīna **1** liposomu šķērsriezuma profils pa nogriežņiem (sarkano un zaļo) [219]

Atomspēku mikroskopija liposomu (nanodaļiņu) pētījumiem tiek izmantota arvien vairāk [235,236]. Tā dod iespēju iegūt informāciju par parauga morfoloģiju, izmēriem, kā arī mehānisko izturību.

Bieži liposomu pētījumiem lieto vairākas metodes (gan ASM, gan SEM u.c.) paralēli, lai precīzāk raksturotu paraugu un iegūtu maksimālo nanoagregāta raksturojošo informāciju [237].

## 2 REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Membrānaktīvo savienojumu un  $\beta$ -diketonu laboratorijā iepriekš bija sintezēti katjonus aizvietotājus saturoši 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi, variējot katjonu skaitu molekulā (vienu vai divus) un lipofilo aizvietotāju garumu un vietu. No pārbaudītajiem savienojumiem **33-41** visaugstāko gēnu transfekcijas aktivitāti bija uzrādījis 1,1'-[(3,5-didodeciloksikarbonil-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis-piridīnija dibromīds **38**, kā jau bija minēts literatūras apskatā 1.2.1. nodaļā [56,172].

Par promocijas darba mērķi izvirzījām jaunu, potenciāli aktīvāku gēnu transfekcijas aģentu meklējumus: jaunu potenciālo gēnu transfekcijas aģentu sintēzi, mērķtiecīgi mainot molekulas polārās daļas aizvietotājus aktīvākajam no līdz šim zināmajiem gēnu transfekcijas aģentiem - savienojumam **38**, lai skaidrotu katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu struktūras-aktivitātes sakarības, pētītu struktūras – fizikāli ķīmisko parametru saistību, meklētu vēl aktīvākus savienojumus.

Tādējādi promocijas darbā tika izvirzīti uzdevumi, kas ļautu sasniegt izvirzītos mērķus: attīstīt amfifilo 1,4-DHP atvasinājumu izejvielu iegūšanas metodes; sintezēt un raksturot jaunu oriģinālu katjono amfifilo 1,4-DHP savienojumu grupu; pētīt molekulas katjono centru aizvietotāju ietekmi uz potenciālo gēnu transfekcijas aģentu buferkapacitāti, sintezējot molekulas, kas 1,4-DHP cikla 2,6-vietās piridīnija ciklā satur dažādus elektroniskos efektus uzrādošus aizvietotājus; pārbaudīt to buferīpašības; analizēt struktūras – aktivitātes sakarības; veidot aktīvā savienojuma *dvīņu* tipa atvasinājumu ar dubultu lipofilo un dubultu katjono aizvietotāju skaitu molekulā, lai skatītu struktūras-aktivitātes sakarības; realizēt katjono 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšanu, lai iegūtu iespējamus metabolītus un pētītu potenciālo gēnu transfekcijas aģentu ķīmiskās īpašības; iegūt līdz šim aktīvākā potenciālā gēnu transfekcijas aģenta anjonu analogus, lai pētītu struktūras-aktivitātes sakarības Hofmeistera sērijas anjoniem; veikt jaunsintezēto savienojumu farmakoloģisko īpašību pārbaudes, un to veidoto nanoagregātu raksturojums.

## 2.1 Katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu iegūšana

### 2.1.1 Acetetiķskābes dodecilestera un 3,5-alkoksikarbonil-1,4-dihidropiridīna atvasinājumu sintēzes

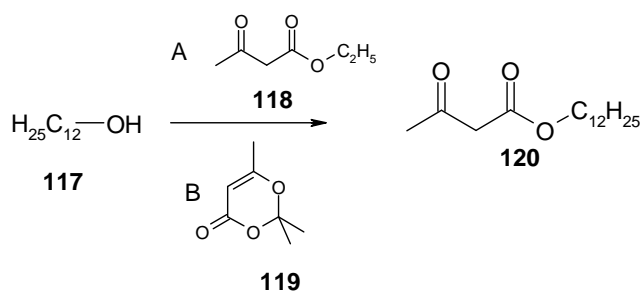
No literatūras ir zināms, ka sintētisko vektoru vidū, kuriem par savienotājposmu starp lipofilo un polāro daļu izmantots 1,4-DHP gredzens, augstāko gēnu transfekcijas aktivitāti uzrādīja savienojums **38**. Minētais savienojums lipofilajā daļā satur divas dodeciloksikarbonilgrupas, kas ir optimālākais alkilķēžu garums, salīdzinot ar savienojuma **38** analogiem **37**, **39** un **40**, kuros variēts alkilgrupas garums un pētīta tā ietekme uz gēnu transfekcijas aktivitāti [56]. Tāpēc, plānojot darba uzdevumus jaunu savienojumu sintēzei, izvēlējamies saglabāt savienojuma **38** lipofilās daļas garumu.

Dodeciloksikarbonilgrupu saturošu 1,4-dihidropiridīnu iegūšanai vajadzīgās izejvielas nav komerciāli pieejamas, tāpēc bija nepieciešams tās sintezēt. Acetetiķskābes dodecilestera (**120**) sintēzei tika izmēģināti divi iegūšanas ceļi:

**A metode.** Sākumā veicām acetetiķskābes etilestera (**118**) pāresterificēšanas reakciju ar dodekanolu (**117**). Reakcijas maisījumu pie normāla spiediena karsējām 110<sup>0</sup>C atdestilējot etanolu, pēc tam, kad vairāk nenovērojām etanola izdalīšanos, reakcijas maisījumu atdzesējām un veicām vakuumdestilāciju iegūstot trīs frakcijas. Kā pirmā frakcija destilējas neizreāģējušais etilesteris **118** pie 9,7 10<sup>-2</sup> mbar spiediena un 30<sup>0</sup>C, nākamā frakcija - dodekanols (**117**) pie 8,6 10<sup>-2</sup> mbar spiediena un 95<sup>0</sup>C, bet kā trešā frakcija destilējas gaidītais produkts **120** pie 8,6 10<sup>-2</sup> mbar un 115-118<sup>0</sup>C.

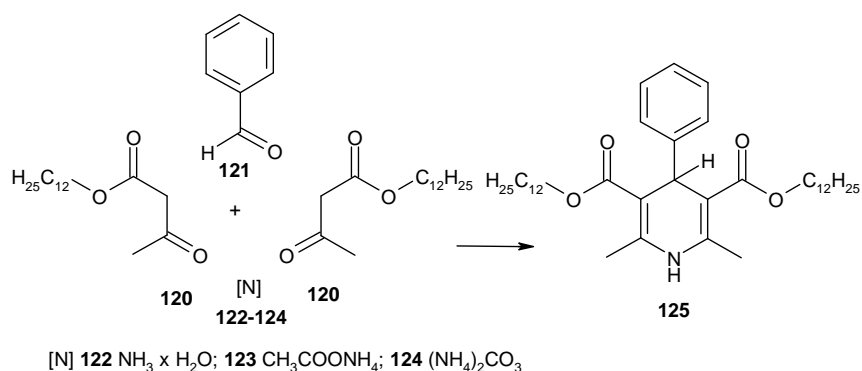
**B metode.** Lai uzlabotu reakcijas iznākumu, izmantojām alternatīvu acetetiķskābes dodecilestera (**120**) iegūšanu no diketēna acetona adukta **119** un dodekanola (**117**), pēc literatūras [238] metodes, kas aprakstīta līdzīgu esteru iegūšanai. Reāģentus izšķīdinājām toluolā un tad kolbu ar reakcijas maisījumu iegremdējām līdz 140<sup>0</sup>C uzkarstētā eļļas vannā un atdestilējām acetonu līdz vairs nenovērojām acetona izdalīšanos, tad vakuumā ietvaicējām toluolu. Tālāk līdzīgi kā pāresterificēšanās reakcijā veicām vakuumdestilāciju. Destilējas divas frakcijas: neizreāģējušais dodekanols (**117**) un atbilstošais acetetiķskābes dodecilesteris (**120**) analogos apstākļos, kā aprakstīts A metodē.

Būtisks parametrs vakuumdestilācijas laikā ir pazeminātais spiediens, tam destilācijas sistēmā jābūt zemākam par  $10^{-2}$  mbar, jo acetetiķskābes esteri nav stabili augstākā temperatūrā par  $150^{\circ}\text{C}$ . Reakcija ar acetona aduktu **119** un dodekanolu (**117**) deva labāku produkta iznākumu - 78% (literatūrā analogā veidā iegūts acetetiķskābes oktilesteris ar 83% iznākumu [238]), salīdzinot ar pāresterifikācijas metodi, kad ieguvām produktu ar 53% iznākumu. Tas varētu būt skaidrojams, ka pāresterifikācijas reakcija ir atgriezeniska, savukārt, ar acetona aduktu **119** notiek cikla atvēršana un acetona molekulas izšķelšana. Vēl kā būtiska nianse jāmin tas, ka vēlams destilācijas sistēmu nomainīt pret citu pirms sāk destilēties acetetiķskābes dodecilesteris (**120**), jo, atdestilējot dodekanolu (**117**), tas kristalizējas dzesinātājā. Jaunas destilācijas sistēmas izmantošana ļauj pilnībā atbrīvoties no neizreagējušā spirta **117**, un tas netiek ieskalots uztvērējkolbā no dzesinātāja.



Simetrisku 3,5-dialkoksikarbonil-1,4-DHP atvasinājumu iegūšanai parasti izmanto klasisko Hanča metodi: reakciju starp acetetiķskābes alkilesteri, benzaldehīdu (**121**) un amonjaka ūdens (**122**) šķīdumu vārot etanolā. Sākotnēji šādu pieeju 1,4-DHP atvasinājuma **125** iegūšanai izvēlējamies arī mēs, jo tā bija aprakstīts literatūrās [56,172] vajadzīgo izejvielu sintēzei, un ieguvām produktu **125** ar 21% iznākumu. Taču šobrīd ir zināmi vairāki darbi, kuros gan katalizatoru klātienē, gan izmantojot amonjaka ūdens (**122**) šķīduma vietā citus slāpekļa avotus Hanča sintēzei, piemēram, amonija karbonātu (**124**) vai amonija nitrātu, ir iespējams iegūt 3,5-dietoksikarbonil-4-fenilaizvietotu 1,4-DHP atvasinājumu **93** ar augstiem vai gandrīz kvantitatīviem iznākumiem [239,240]. Tā kā izmantojot klasisko metodi savienojums **125** iegūts ar zemu iznākumu - 21%, tika meklēti citi reakcijas apstākļi. Literatūrā piedāvā amonjaka ūdens šķīdumu (**122**) aizstāt ar amonija karbonātu (**124**) iegūstot 2,6-dimetil-3,5-dietoksikarbonil-4-fenil-1,4-dihidropiridīnu (**93**), reakciju veicot  $60^{\circ}\text{C}$  ūdenī produkts iegūts ar 99% iznākumu, bet par reakcijas vidi lietojot 50% etanola/ūdens maisījumu savienojumu **93** iegūst ar 97% iznākumu, savukārt reakciju

veicot etanolā produktu izdalīja ar 90% iznākumu [239]. Atkārtojām literatūrā piedāvātās metodes reakcijās acetīksskābes etilesteri (**118**) aizstājot ar acetīksskābes dodecilesteri (**120**). Reakcijas maisījumu sildījām 60<sup>0</sup>C ūdenī, pēc 6 stundām no reakcijas maisījuma izdalījām β-aminokrotonskābes dodecilesteri **126**. Realizējot reakciju 50% metanola/ūdens maisījumā sildot 60<sup>0</sup>C ar plānslāņa hromatogrāfiju (PSH) detektējām fluorescējoša punkta parādīšanos, kas atbilst 1,4-DHP atvasinājumam **125**, tomēr pēc 6 stundu maisīšanas pēc kristalizēšanas izolējām tikai krotonskābes dodecilesteri **126**, acīmredzot atbilstošais 1,4-DHP atvasinājums **125** bija veidojies niecīgā daudzumā. To skaidrojam ar krotonskābes estera **126** vājo šķīdību reakcijas vidē, kas, savukārt, samazina ciklizācijas produkta 1,4-DHP atvasinājuma **125** rašanos. Reakciju veicot etanolā arī pēc 6 stundu karsēšanas 60<sup>0</sup>C ar PSH pierādījām lielu daudzumu neizreaģējušo izejvielu, tāpēc reakcijas laiku pagarinājām vēl par 10 stundām. Pēc tam pievienojām vēl spirtu reakcijas maisījumam un kristalizējām, šādi izdevās iegūt 3,5-didodeciloksikarbonil-1,4-DHP atvasinājumu **125** ar 55% iznākumu.

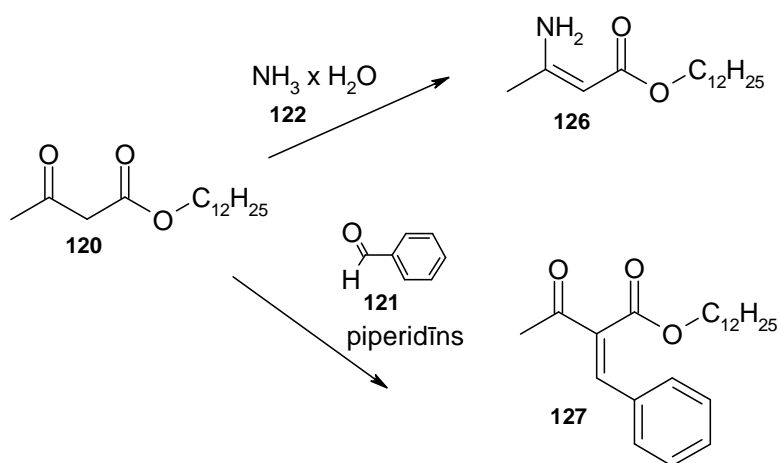


Savukārt, kā slāpekļa avotu izmantojot 1 ekvivalentu amonija acetāta (**123**) Hanča reakcijā ar 2 ekvivalentiem acetīksskābes dodecilestera (**120**) un 1 ekvivalentu benzaldehīda (**121**) bezšķīdinātāja vidē reakcijas maisījumu karsējām 1 stundu 60<sup>0</sup>C, tad kristalizējām no etanola. Kristāliskajai vielai uzņēmām <sup>1</sup>H KMR spektru, kurā novērojām piemaisījumu signālus, kas atbilst 1,4-DHP atvasinājuma oksidētajai formai. Pagarinot reakcijas laiku līdz 24 stundām palielinājās oksidētā produkta signālu intensitāte. Pārkristalizējot reakcijas maisījumu no etanola ieguvām produktu **125** ar 37% iznākumu.

Tā kā izmantojot klasiskās Hanča reakcijas apstākļus, kā arī vairākas variācijas gan amonjaka ūdens šķīdumu (**122**) aizstājot ar amonija karbonātu vai



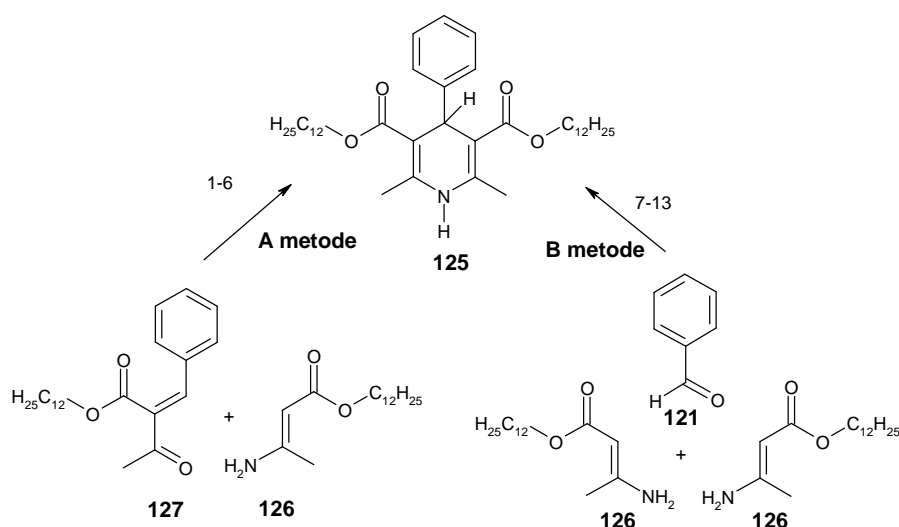
amonija acetātu kā slāpekļa avotu, gan reakcijas šķīdinātāju maiņa nedeva būtiskus reakcijas iznākuma uzlabojumus, meklējām vēl citas reakcijas metodes, lai paaugstinātu 1,4-DHP iznākumu. Literatūrā ir aprakstītas vairākas 1,4-DHP ciklosaslēgšanās reakcijas, piemēram, ciklosaslēgšanās reakcija starp 3-oksi-2-[1-fenilmetilidēn]-butilskābes dodecilesteri (**127**) un  $\beta$ -aminokrotonskābes dodecilesteri **126** [241] vai divu ekvivalentu  $\beta$ -aminokrotonskābes estera **126** reakcija ar benzaldehīdu (**121**) [242]. Lai izvēlētos optimālāko iegūšanas metodi, izmēģinājām vairākus 1,4-dihidropiridīna iegūšanas ceļus, kā arī variējām reakcijas apstākļus. Tāpēc bija nepieciešams veikt vēl papildus reakcijas, lai sintezētu nepieciešamās izejvielas. No acetetiķskābes dodecilestera (**120**) ar 3 ekvivalentu pārākumu amonjaka ūdens šķīdumu (**122**) vārot etanolā ieguvām  $\beta$ -aminokrotonskābes dodecilesteri (**126**) ar 58% iznākumu. Literatūrā veikta alternatīva sintēze ar acetetiķskābes etilesteri un iegūts produkts ar 65% iznākumu [243]. Savukārt, 2-benzilidēnacetetiķskābes dodecilesteri (**127**) ieguvām ar 60% iznākumu benzaldehīda (**121**) un acetetiķskābes estera **120** Knēvenāgela kondensēšanas reakcijā, to veicot izopropanolā 10 mol% piperidīna acetāta kā katalizatora klātienē, uzlabojot literatūrā aprakstītās reakcijas iznākumu: literatūrā šo reakciju veica bezšķīdinātāju vidē un par katalizatoru lietoja piperidīnu [244].



Tāpēc pielietojām 1,4-DHP atvasinājumu iegūšanas metodi, ko galvenokārt izmanto nesimetrisku 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumu sintēzē, lai iegūtu savienojumu **125** ar augstāku iznākumu. Izmantojot iegūtās izejvielas **126** un **127** realizējam 1,4-DHP ciklizācijas reakciju. Variējot reakcijas apstākļus un katalizatorus zemāk apskatītajās A un B metodēs, no reakcijas vides izdalījām produktu **125** ar

dažādiem iznākumiem (2.1. tabula), kas liecina par reakcijas apstākļu ietekmi uz produkta **125** rašanos.

Literatūrā ir dati par jonu šķidrums pielietošanu 1,4-DHP atvasinājumu sintēzē [245]. Parādīts, ka 4-metil-1-butilpiridīnija bromīdu (4-MBPy) lietojot par fāzu pārnese katalizatoru, uzlabojas cikloalkilacetāta enzimatiskā hidrolīze [246], bet 2-hlor-1-metilpiridīnija jodīdu (2-CIMPy) lieto kā aktivatoru esterifikācijas un amīdu veidošanās reakcijās [247]. Tāpēc izvēlējamies abus šos piridīnija sāļus kā katalizatorus savienojuma **125** iegūšanas reakcijā, lai pārbaudītu to ietekmi uz ciklokondensācijas reakcijas gaitu.



2.1. tabula

#### 1,4-Dihidropiridīna **125** iegūšanas apstākļi

Nr.	Reaģ. Nr. (ekv.)	Piridīnija sāls (daudzums)	Šķīdinātājs	Laiks st., (temp. °C)	Izn., %
1.	<b>127</b> (1): <b>126</b> (1)	4-MBPy (10 mol%)	Dietilēnglikols	8 (80)	72
2.	<b>127</b> (1): <b>126</b> (1)	-	Dietilēnglikols	8 (80)	46
3.	<b>127</b> (1): <b>126</b> (1)	2-CIMPy. (10 mol%)	Dietilēnglikols	8 (80)	49
4.	<b>127</b> (1): <b>126</b> (1)	4-MBPy (10 mol%)	-	8 (80)	47
5.	<b>127</b> (1): <b>126</b> (1)	4-MBPy (6 ekv.)	-	2 (150)	38
6.	<b>127</b> (1): <b>126</b> (1)	2-CIMPy (6 ekv.)	-	2 (220)	Sad.
7.	<b>126</b> (2): <b>121</b> (1)	-	MeOH/AcOH (4:1)	8 (58)	64
8.	<b>126</b> (2): <b>121</b> (1)	-	Dietilēnglikols	8 (80)	29
9.	<b>126</b> (2): <b>121</b> (1)	4-MBPy (10 mol%)	Dietilēnglikols	8 (80)	31
10.	<b>126</b> (2): <b>121</b> (1)	2-CIMPy (10 mol%)	Dietilēnglikols	8 (80)	33
11.	<b>126</b> (2): <b>121</b> (1)	4-MBPy (10 mol%)	-	8 (80)	16
12.	<b>126</b> (2): <b>121</b> (1)	4-MBPy (6 ekv.)	-	2 (150)	8
13.	<b>126</b> (2): <b>121</b> (1)	2-CIMPy (6 ekv.)	-	2 (220)	Sad.

Izmantojot **A metodi**, augstāko produkta iznākumu (72%) sasniedzām reakciju veicot dietilēnglikolā 80°C 8 stundas 10 mol% 4-MBP<sub>y</sub> klātienē (2.1. tabula Nr 1). Veicot reakciju bez katalizatora tādos pat apstākļos, produkta iznākums samazinājies uz pusi 46% (2.1. tabula Nr 2). Savukārt, reakciju realizējot katalītiskā 4-MBP<sub>y</sub> klātienē 80°C vai piridīnija sāli lietojot pārākumā kā šķīdinātāju, izdalījām produktu ar 47% un 38% iznākumu atbilstoši (2.1. tabula Nr 4 un Nr 5). 2-Hlor-1-metilpiridīnija jodīda (Mukajama reaģents) izmantošana katalītiskā daudzumā dietilēnglikolā būtiski neiespaido reakcijas iznākuma uzlabošanos, salīdzinot ar reakciju tīrā dietilēnglikolā bez katalizatora (2.1. tabula Nr 2 un Nr 3).

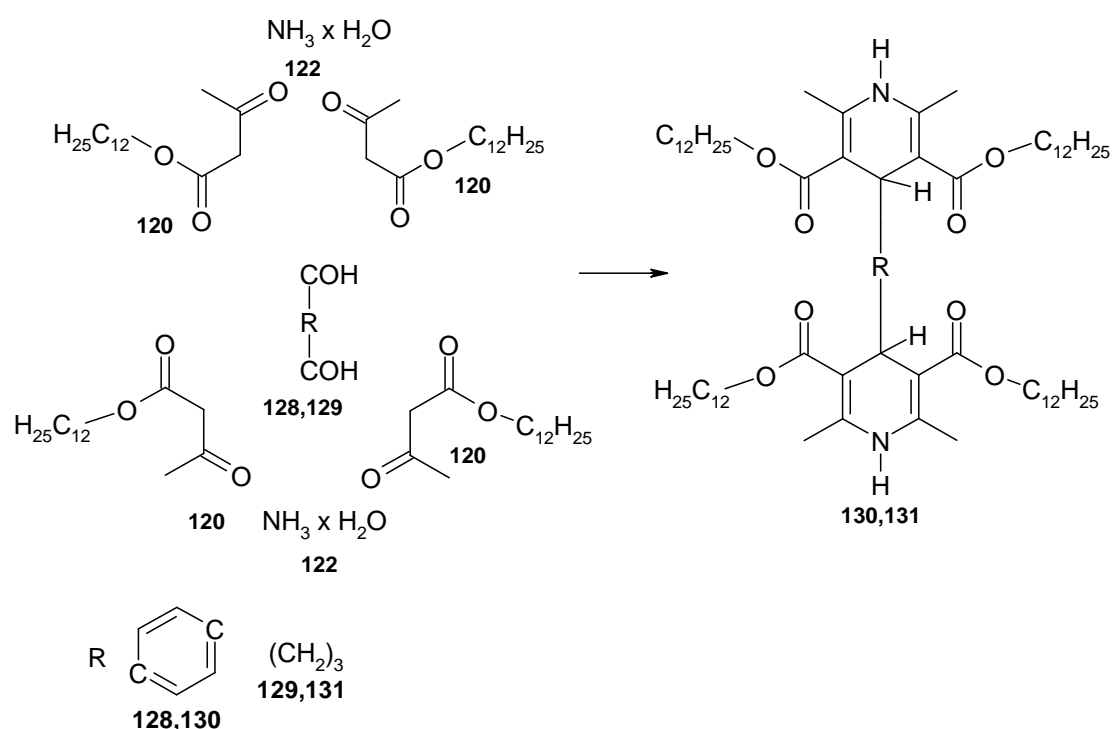
Izmantojot **B metodi** 1,4-dihidropiridīna **125** iegūšanai, no 2 ekvivalentiem krotonskābes dodecilestera **126** un 1 ekvivalenta benzaldehīda (**121**) (2.1. tabula Nr 7-13), labāko reakcijas iznākumu 64% sasniedzām reakciju realizējot etiķskābes/metanola šķīdumā 1:4 attiecībās (2.1. tabula Nr 7). Savukārt reakciju veicot dietilēnglikolā vai dietilēnglikolā 10 mol% 4-MBP<sub>y</sub> vai 2-CIMP<sub>y</sub> katalizatoru klātienē, reakcijas produktu izdalījām ar iznākumu no 29-33% (2.1. tabula Nr 8-10). Realizējot ciklizēšanās reakciju, piridīnija sāļus lietojot kā katalizatorus vai šķīdinātāju, produktu **125** izdalījām ar vēl zemākiem iznākumiem - attiecīgi 16% un 8% (2.1. tabula Nr 11-13).

Analizējot datus par 3,5-didodeciloksikarbonil-2,6-dimetil-4-fenil-1,4-dihidropiridīna (**125**) iegūšanu noskaidrojām, ka optimālākā metode ir divkomponentu ciklizācijas reakcija (metode A) izmantojot β-aminokrotonskābes dodecilesteri (**126**) un 2-benzilidēnacetetiķskābes dodecilesteri (**127**) reakciju veicot dietilēnglikolā 10 mol% 4-MBP<sub>y</sub> klātienē. Iegūta viegli iedzeltena kristāliska viela **125** ar 72% iznākumu (kopējais produkta iznākums 42%, rēķinot no savienojuma **126**), kas ir augstāks nekā līdz šim lietotajā Hanča reakcijā. Neskatoties uz papildus stadijām savienojuma **125** iegūšanā, pielietotā divkomponentu ciklizācijas reakcija ir piemērotāka lipofilus aizvietotājus saturošu 1,4-DHP sintēzei, jo atvieglo produkta izdalīšanu un attīrīšanu.

Attīstot pētījumus par izejvielu iegūšanu tālākām modifikācijām, uzdevums bija sintezēt *dvīņu* tipa nevirālos vektorus, kas molekulā ietvertu savienojuma **38** struktūras fragmentus. Literatūrā ir aprakstīti *dvīņu* tipa nevirālie vektori, kuriem gēnu transfekcijas aktivitāte ir augstāka nekā dimēru veidojošajam monomēram [59].

Mūsu pētāmās struktūras ir pateicīgas šādu *dvīņu* savienojumu iegūšanai, jo benzaldehīdu (**121**) viegli var aizstāt ar savienotājposmu, kas satur divas aldehīdgrupas. Par šādu savienotājposmu izvēlējamies gan tereftālaldehīdu (**128**), kas būtu statisks savienotājposms, gan glutāraldehīdu (1,5-pentāndiāls) (**129**), kas veidotu kustīgu savienotājposmu starp 1,4-DHP gredzeniem. Līdzīgi savienotājposmi bija literatūrā pētīti savienojumiem **44-46**, lai novērtētu to ietekmi uz gēnu transfekcijas aktivitāti un salīdzinātu to trīs šūnu līnijās [59]. Mūsu gadījumā šādi *dvīņu* tipa savienojumi varētu ietekmēt nanoagregātu uzbūvi un īpašības, kā arī uzrādīt atšķirīgas fizikālās un bioloģiskās īpašības salīdzinot ar monomēriem.

Veicot šādu 1,4-DHP sintēzi tikai tereftālaldehīda (**128**) gadījumā ieguvām gaidīto produktu **130** reakciju realizējot analogi klasiskajai Hanča sintēzei savienojuma **125** ieguvei, vienīgi pagarinot reakcijas laiku līdz 72 stundām, produktu **130** ieguvām ar 30% iznākumu. Tā kā glutāraldehīda (**129**) gadījumā dialdehīds bija pieejams tikai kā 8% ūdens šķīdums, ko lietojām sintēzē, tas varēja būt par iemeslu reakcijas apgrūtināšanai, kā rezultātā neveidojās gaidītais *dvīņu* 1,4-DHP atvasinājums **131**.



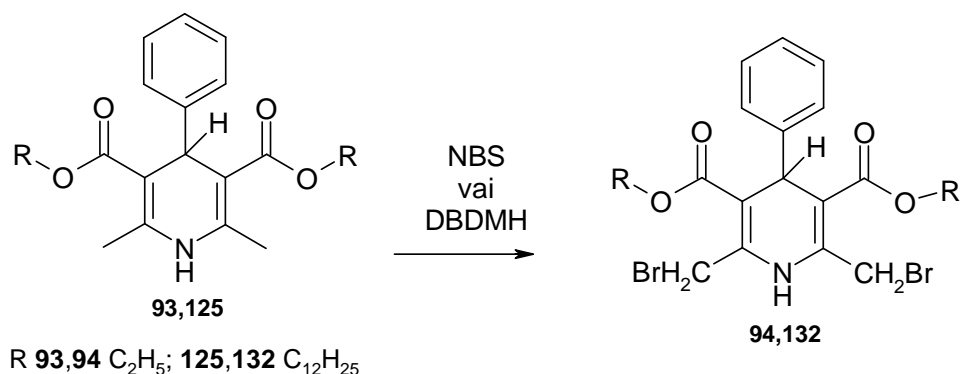
## 2.1.2 1,4-Dihidropiridīna un piridīna atvasinājumu 2,6-vietas modifikācijas

### 2.1.2.1 1,4-Dihidropiridīna un piridīna atvasinājumu 2,6-dimetilgrupu bromēšana

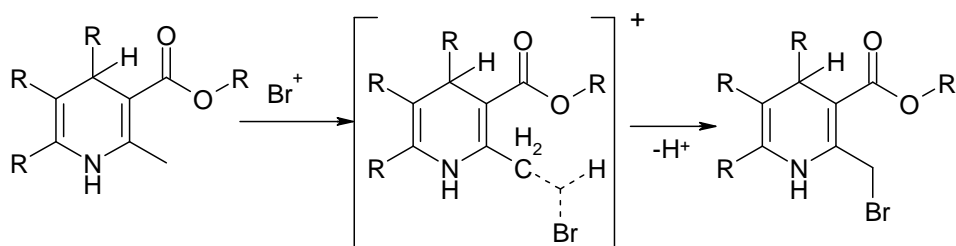
Zinātniskajā literatūrā neizdevās atrast datus, kad tiešā ceļā iegūti 1,4-dihidropiridīna vai piridīna atvasinājumi, kuri molekulā 2,6-vietās saturētu katjonus aizvietotājus. Tāpēc ceļā uz mērķproduktu jāveic vēl viena starpstadija, jāiegūst 2,6-bis(brommetil)-1,4-dihidropiridīna vai piridīna atvasinājumi tālākai bromā nukleofilai aizvietošanai ar piridīnu vai tā atvasinājumiem.

Iegūtajam 2,6-dimetil-1,4-dihidropiridīna atvasinājumam **125** un Latvijas Organiskās sintēzes institūta Membrānaktīvo savienojumu un  $\beta$ -diketonu laboratorijā sintezētajam savienojumiem **93** un 4-fenil-3,5-dietoksikarbonil-2,6-dimetilpiridīnam (tiks apskatīts tālāk darbā) veicām tālāku molekulu modificēšanu: 2,6-metilgrupas bromējām ar N-bromsukcīnimīdu (NBS) metanolā savienojumiem **93** un **125** vai  $\text{Br}_2$ /etiķskābē atbilstošajam piridīna atvasinājumam. 1,4-DHP gadījumā (savienojumiem **93** un **125**) sākotnēji substrātam 30 min. laikā pa nelielām porcijām pievienojām NBS un pēc tam turpinājām maisīt istabas temperatūrā līdz veidojas kristāliskas nogulsnes (vidēji 24 stundu laikā), kuras pēc tam filtrējām un mazgājām ar ūdeni uz filtra, lai atbrīvotos no sukcinimīda. Jāuzsver, ka šīs reakcijas jāveic lielā atšķaidījumā, jo tas atvieglo produkta izdalīšanu kristāliskā veidā. Realizējot reakciju mazākā atšķaidījumā veidojas eļļai līdzīga masa, kuru pēc tam jāapstrādā papildus, lai iegūtu kristālisku vielu. Salīdzinot mūsu reakcijas apstākļus savienojuma **125** iegūšanai ar literatūrā [56] dotajiem bromēšanas reakcijas apstākļiem analogam savienojumam, kur jau pēc 40 minūtēm reakciju pārtrauc pievienojot ūdeni, iegūstot eļļainu bis(brommetil)atvasinājumu **132**, kuru, apstrādājot ar heksānu, iegūst dibromīdu kristāliskā veidā, mūsu gadījumā savienojumu **132** kristāliskā veidā izdala uzreiz no reakcijas vides un nav nepieciešama tā tālāka attīrīšana. Iespējams, ka literatūrā aprakstītā produkta papildus apstrāde ir iemesls atvasinājuma **132** zemajam iznākumam. Līdz ar to mūsu piedāvātie reakcijas apstākļi ļāva uzlabot produkta iznākumu no 34% [56] līdz 72%. Analogi ieguvām savienojumu **94** ar 78% iznākumu, literatūrā iegūts ar 41% iznākumu [156]. Lai salīdzinātu NBS un kādu citu bromējošo aģentu ietekmi, darbā izmantojām arī 1,3-dibrom-5,5-dimetilhidantoīnu

(DBDMH). Reakciju veicot analogos apstākļos kā bromējot ar NBS, savienojuma **125** gadījumā **132** produktu izdalījām ar līdzīgu iznākumu 70%.



Lielākoties šāda veida bromēšanas reakcijas notiek pēc radikāļu mehānisma, tomēr tiek uzskatīts, ka savienojumu **125** un to analogu bromēšanas reakcijas ar NBS notiek pēc S<sub>N</sub>2 mehānisma, bromīda katjons izveido trīscentru pievienošanās pārejas produktu un pēc tam tiek izšķelts protons [248].

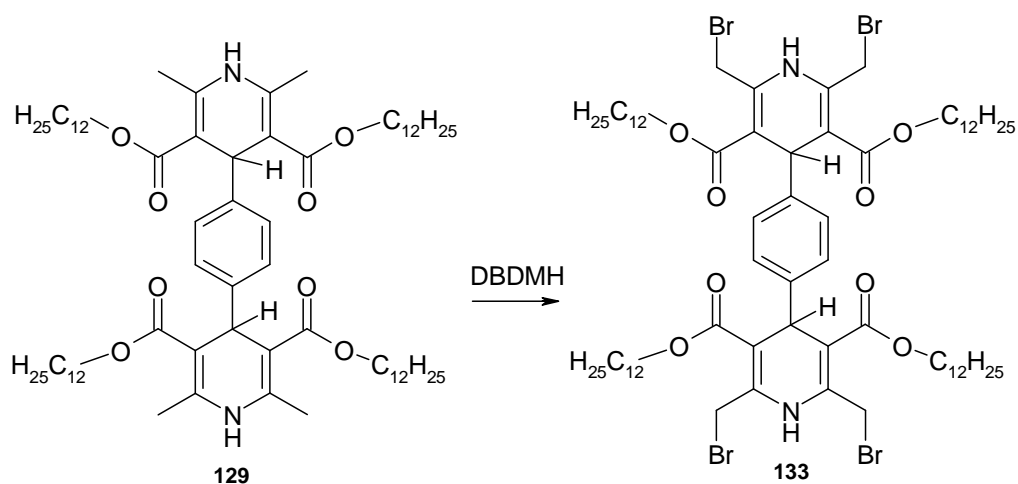


Jāatzīmē, ka bromējot ar NBS notika tikai 2,6-metilgrupu bromēšanās un nenovērojām 1,4-DHP cikla oksidēšanos, pretstatā literatūrā [249] novērotajai reakcijai, kad savienojuma **93** reakcijā ar NBS pēc 5 min. autori ieguva atbilstošo oksidēto formu ar 70% iznākumu.

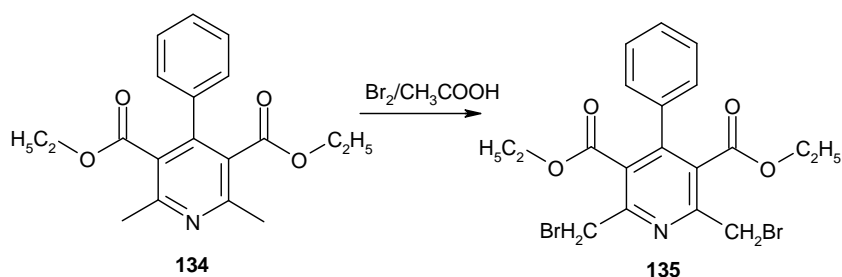
Iegūtie bis(brommetil)-1,4-dihidropiridīna atvasinājumi **94** un **132** ir termiski nestabili, un, kā jau bija minēts literatūras apskatā, karsējot tie var ciklizēties, izšķeļot alkilbromīdu. Šī iemesla dēļ ir apgrūtināta savienojumu attīrīšana, jo jāizvairās no savienojumu sildīšanas kristalizējot vai ietvaicējot vakuumā. Tāpēc mūsu piedāvātie reakcijas apstākļi nozīmīgi uzlaboja izdalītā produkta iznākumu izdalot 2,6-bis-(brommetil)-1,4-DHP atvasinājumu **132** kristāliskā veidā uzreiz no reakcijas

maisījuma. Balstoties uz augstāk aprakstīto varam secināt, ka, lai uzlabotu reakcijas iznākumu un kristāliska produkta izdalīšanu no reakcijas vides savienojumu **94** un **132** gadījumā, sintēze jāveic lielā atšķaidījumā: 1 g substrāta 70 ml vai pat līdz 100 ml metanola.

Analogi kā 4-fenilaizvietotu 1,4-DHP atvasinājumu **93** un **125** gadījumā, lai vēlāk iegūtu katjonus aizvietotājus saturošus *dvīņu* tipa savienojumu, veicām 2,6-metilgrupu modificēšanu savienojumam **129**. *Dvīņu* 1,4-DHP atvasinājuma **129** bromēšana ar NBS izdevās ar zemāku iznākumu, tikai 20%, ja salīdzinām ar 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu **125**, kas 4-vietā ir aizvietots ar fenilgrupu. Savukārt, bromējot ar DBDMH uzlabojām gaidītā produkta **133** iznākumu līdz 49%.



Piridīna atvasinājuma **134** 2,6-metilgrupas tika bromētas, izmantojot bromu etiķskābē [169], iegūstot savienojumu **135** ar 54% iznākumu.

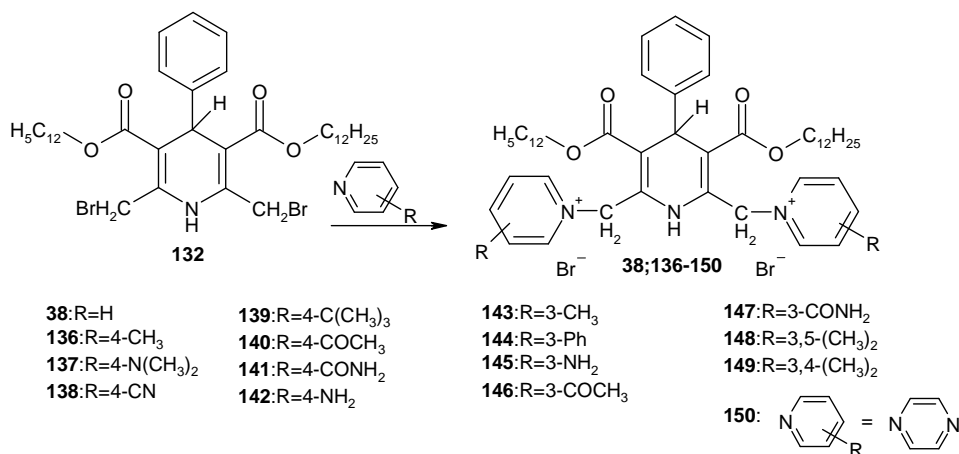


Kā jau tika minēts literatūras apskatā, metilaizvietotu piridīna atvasinājumu metilgrupu bromēšana notiek bargākos apstākļos, salīdzinot ar 2,6-dimetil-1,4-DHP atvasinājumiem. Neizdevās iegūt bis(brommetil)piridīna atvasinājumu **135**, bromējot savienojumu **134** ar NBS, NBS/benzoilperoksīdu vai 1,3-dibrom-5,5-

dimetilhidantoīnu metanolā. Piridīna 2,6-dimetilgrupu zemākā reaģētspēja ir salīdzināma ar spēcīgas elektronakceptoras grupas saturošiem savienojumiem, piemēram, 3,5-diciāno-2,6-dimetil-1,4-DHP atvasinājumiem, par kuriem literatūrā ir dati, ka tie bromējas daudz grūtāk. Attiecīgie 3,5-diciāno-2,6-bis(brommetil)-1,4-DHP atvasinājumi iegūti tikai bromējot ar bromu/etiķskābē [169].

### 2.1.2.2 2,6-Di(brommetil)grupu broma nukleofila aizvietošana

Meklējot jaunus, aktīvākus gēnu transfekcijas aģentus, turpinājām 1,4-DHP atvasinājumu 2,6-vietu modifikācijas. Iepriekš jau noskaidrots, ka savienojumu **37-40** rindai (divus piridīnija gredzenus saturošie 1,4-DHP atvasinājumi ar dažāda garuma 3,5-dialkoksikarbonilgrupām) DHP cikla NH protona „kustīgums” var saglabāt nemainīgu šūnas vides pH vērtību gēnu tranfekcijas eksperimentos, kas savukārt pasargā ienesto DNS no degradācijas. Mērķtiecīgi ievadot kvaternāro slāpekļa atomu saturošu heterociklisku grupu, ieguvām katjonu amfifilu 1,4-dihidropiridīna savienojumu **38**, **136-151** rindu, kurā 1,4-DHP-2,6-vietās kā aizvietotājs ir gan piridīnijs, kas aizvietots ar dažādām elektronakceptorām vai elektrondonorām grupām, gan pirazīnijs **150** vai izohinolīnijs **151**. Sākotnēji viens no mērķiem bija ar dažādo katjono grupu palīdzību ietekmēt 1,4-DHP NH protona pKa vērtību, ko noteiktu piridīnija atvasinājuma aizvietotāja elektroniskais efekts. Tāpat variējot aizvietotājus piridīnija gredzenā, mainot to stērisko dabu, tiktu mainīta katjono amfifilo 1,4-DHP atvasinājumu savienojumu lipofilās un polārās daļas attiecība, kas tālāk varētu ietekmēt dažādu nanoagregātu veidošanos (micellas, liposomas vai pavedienveida micellas).





Šajā reakcijā notiek broma nukleofila aizvietošana ar piridīnu, tā atvasinājumiem, vai pirazīnu.

2.2.tabula

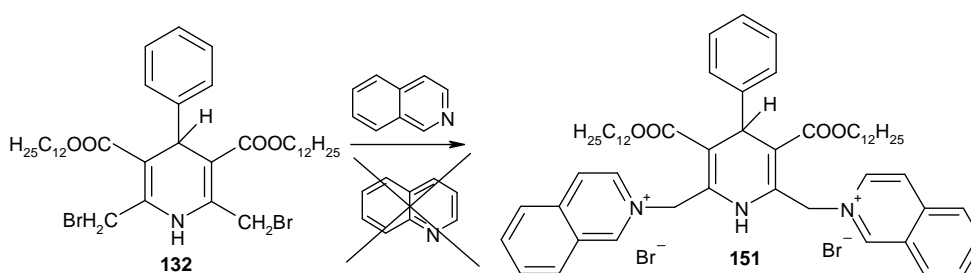
Katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu raksturojums.

Sav. Nr.	R	Izn., % (st)	Bruto formula	T <sub>sad.</sub> °C	Elementanalīze Aprēķinātais C; N; H Noteiktais C; N; H
<b>38</b>	H	78 (24)	C <sub>49</sub> H <sub>71</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	157	61,18; 7,86; 4,37 61,42; 7,85; 4,25
<b>136</b>	4-CH <sub>3</sub>	68 (24)	C <sub>51</sub> H <sub>75</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × 3,8H <sub>2</sub> O	135	64,21; 7,92; 4,40 64,21; 7,61; 4,28
<b>137</b>	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	65 (24)	C <sub>53</sub> H <sub>81</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × 3H <sub>2</sub> O	115	59,71; 8,22; 6,57 59,69; 8,17; 6,48
<b>138</b>	4-CN	34 (48)	C <sub>51</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	150	61,63; 7,20; 7,05 61,98; 7,18; 7,27
<b>139</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	30 (48)	C <sub>57</sub> H <sub>87</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	120	64,82; 8,49; 3,98 64,82; 8,56; 3,87
<b>140</b>	4-COCH <sub>3</sub>	35 (48)	C <sub>53</sub> H <sub>75</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Br <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	240	60,86; 7,61; 4,02 60,91; 7,44; 3,94
<b>141</b>	4-CONH <sub>2</sub>	45 (48)	C <sub>51</sub> H <sub>73</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> Br <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	156	59,47; 7,34; 6,80 59,37; 7,36; 6,59
<b>142</b>	4-NH <sub>2</sub>	50 (24)	C <sub>49</sub> H <sub>73</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × 0,5H <sub>2</sub> O	213	60,99; 7,73; 7,22 61,12; 7,71; 7,20
<b>143</b>	3-CH <sub>3</sub>	65 (24)	C <sub>51</sub> H <sub>75</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × 3H <sub>2</sub> O	160	60,73; 7,77; 4,11 60,77; 8,10; 4,17
<b>144</b>	3-Ph	60 (48)	C <sub>61</sub> H <sub>79</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub>	183	67,96; 7,39; 3,90 67,88; 7,45; 3,86
<b>145</b>	3-NH <sub>2</sub>	54 (24)	C <sub>49</sub> H <sub>73</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × 1,5H <sub>2</sub> O	198	59,87; 7,79; 7,12 59,71; 7,76; 6,87
<b>146</b>	3-COCH <sub>3</sub>	36 (48)	C <sub>53</sub> H <sub>75</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Br <sub>2</sub>	155	63,03; 7,48; 4,16 62,86; 7,46; 4,07
<b>147</b>	3-CONH <sub>2</sub>	52 (48)	C <sub>51</sub> H <sub>73</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> Br <sub>2</sub>	170	60,53; 7,27; 6,92 60,53; 7,27; 6,82
<b>148</b>	3,5-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	64 (24)	C <sub>53</sub> H <sub>79</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	140	63,85; 8,19; 4,11 63,66; 8,16; 4,20
<b>149</b>	3,4-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	47 (24)	C <sub>53</sub> H <sub>79</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	172	63,75; 8,10; 4,16 63,66; 8,16; 4,20
<b>150</b>	pirazīns	17 (48)	C <sub>47</sub> H <sub>69</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	185	59,68; 7,57; 7,40 59,89; 7,46; 7,31
<b>151</b>	izohinolīns	34 (48)	C <sub>57</sub> H <sub>75</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O	165	65,57; 7,43; 4,02 65,50; 7,24; 4,38

Augstāk minēto reakciju veicām istabas temperatūrā, atkarībā no aizvietotāja elektroniskās dabas (elektronakceptors vai elektrondonors) un aizvietotāja vietas piridīnija gredzenā, mainījās reakcijas ilgums. Izdalīto produktu iznākumi (broma nukleofilā aizvietošana ar piridīna atvasinājumiem, izohinolīnu un pirazīnu) un to fizikāli ķīmiskie raksturlielumi apkopoti 2.2. tabulā. Reakcijas ar piridīnu, kam ir elektrondonori aizvietotāji, notika ātrāk un ar labākiem iznākumiem 64-78% (2.2. tabula savienojumi **38**, **136**, **137**, **143** un **148**), savukārt ar elektronakceptorām grupām aizvietotu piridīnu gadījumā reakcijas produkta iznākumi samazinājās līdz 17-52% (2.2. tabula savienojumi **38**, **138**, **140**, **141**, **147** un **150**).

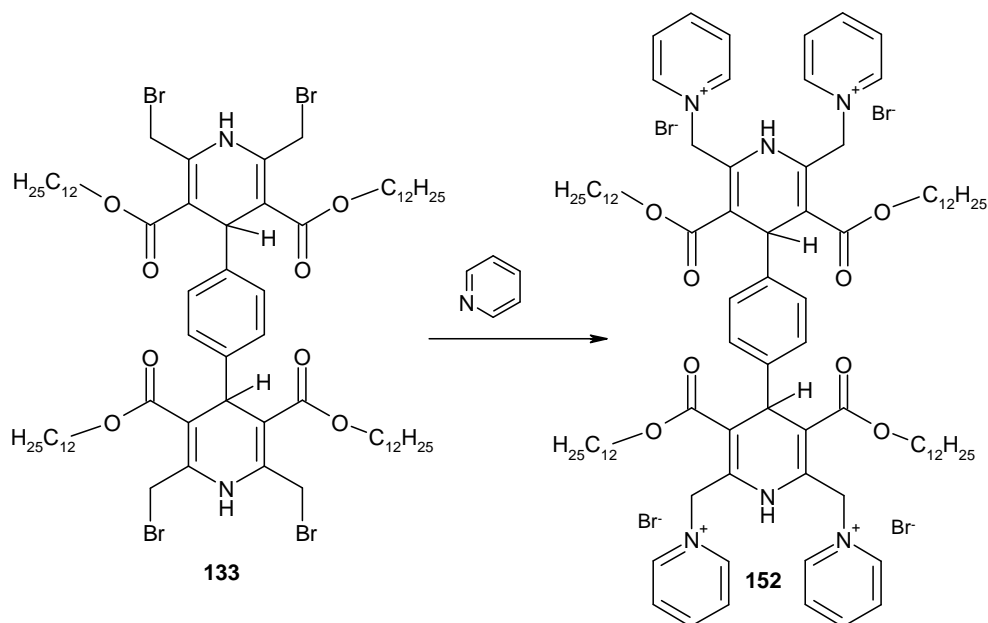
Iegūtie katjonie amfifilie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi ir higroskopiski, tie saista gaisa mitrumu. Vienīgi savienojumu **144**, **146** un **147** gadījumā izdevās izdalīt vielas bez kristalizācijas ūdens, pārējie savienojumi (2.2. tabula) pat pēc ilgstošas žāvēšanas augstvakumā neatbrīvojas no kristalizācijas ūdens.

Analizējot iegūtos rezultātus redzam, ka reakcijas gaitu apgrūtina 2- un/vai 6-vietas aizvietotāji piridīna gredzenā, salīdzinājumā ar 3-, 4-, 5-vietu aizvietotājiem. Salīdzinot trīs savienojumus, kas savā starpā atšķiras ar metilgrupas atrašanās vietu piridīna gredzenā (2-, 3- vai 4-vietā), secinām, ka metilgrupas atrašanās piridīna gredzenā 3- vai 4-vietā reakcijas gaitu maz ietekmē, produktus izdalījām ar iznākumu 68% un 65% (2.2. tabula savienojumi **136** un **143**), savukārt, ja metilgrupa atrodas 2-vietā, tad reakcija vairs nenotiek. To varētu skaidrot ar stēriskiem traucējumiem, ko rada šī metilgrupa. Literatūrā šādu stēriski apgrūtinātu piridīnu kvaternizācijas reakcijas piedāvā veikt paaugstinātā temperatūrā vai mikroviļņos, diemžēl mēs to nevaram izmantot, jo izejviela **132** ir termiski nestabila [154]. Analogu eksperimentu veicām ar izohinolīnu un hinolīnu, kurā katjonu saturošu 1,4-DHP atvasinājumu ieguvām tikai ar izohinolīnu, bet ar hinolīnu reakcija nenotika. Hinolīna gadījumā oglekļa atoms, kas atrodas blakus slāpeklim, satur telpiski mazāku aizvietotāju nekā 2-metilpiridīns, tomēr stēriskie traucējumi ir pietiekoši lieli, lai reakcija nenotiktu.

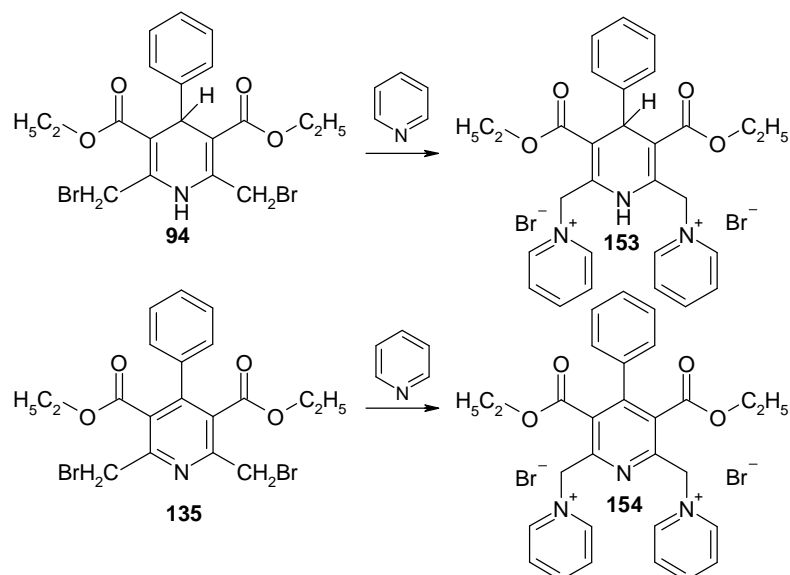


Apkopojot augstāk rakstīto varam secināt, ka 1,4-DHP 2,6-di(brommetil)grupās broma nukleofilā aizvietošana ar 3- vai 4-vietās elektrondonoru aizvietotāju saturošiem piridīna atvasinājumiem notiek labāk salīdzinot ar piridīniem, kas satur elektronakceptorus aizvietotājus 3- vai 4-vietās.

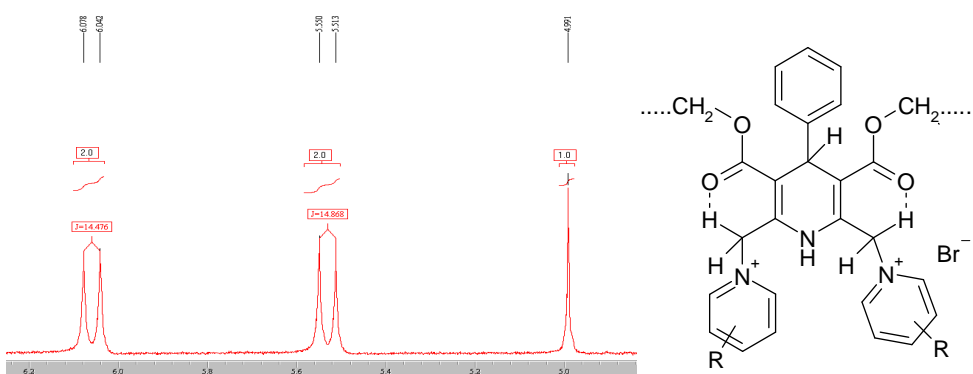
Dvīņu veida katjonu amfifilu 1,4-DHP atvasinājuma **152** iegūšanu veicām pēc analogijas kā iegūts savienojums **125**, veicot broma aizvietošanu ar piridīnu.



2,6-Di(brommetil)piridīna **135** un 1,4-DHP atvasinājumam **94** broma aizvietošanas reakciju ar piridīnu realizējām analogi kā 3,5-didodeciloksi-1,4-DHP atvasinājumam **132**. Salīdzinot 2,6-di(brommetil)piridīna **135** un 1,4-DHP **94** reakcijas produktu iznākumus pēc 3 stundu maisīšanas acetonā istabas temperatūrā, jāsecina, ka piridīna kvaternizācija ar 2,6-di(brommetil)-1,4-DHP atvasinājumu **94** notiek mazliet vieglāk, izdalījām produktu **153** ar 78% iznākumu, turpretī produktu **154** ieguvām ar 57% iznākumu analogos apstākļos.



Jāatzīmē, ka 1,4-dihidropiridīna 2,6-vietas metilēngrupas signāls  $^1\text{H}$  KMR spektrā parādās AB-kvarteta tipa, nevis singleta veidā, kas liecina par savienojuma diastereotopiju. Šo parādību skaidrojam ar iespējamu iekšmolekulāras ūdeņraža saites veidošanos starp karbonilgrupām un 2,6-metilēngrupu vienu no ūdeņraža atomiem, līdz ar to metilēngrupas ūdeņraža atomi nav identiski un  $^1\text{H}$  KMR spektrā novēro dažādas ķīmiskās nobīdes. Savienojuma **38** paraugu sagatavojot DMSO- $\text{D}_6$  un pievienojot deitērija oksīdu,  $^1\text{H}$  KMR spektrā novērojām 1,4-DHP NH signāla intensitātes samazināšanos, bet paraugam atkārtoti reģistrējot spektru, novērojām arī 2,6-dimetilēngrupu protonu signālu samazināšanos. Savukārt, savienojuma **154** gadījumā 2,6-metilēngrupu protonu signāli  $^1\text{H}$  KMR spektrā parādās singleta veidā, kas liek domāt, ka 1,4-DHP atvasinājuma **153** oksidēšanās gadījumā vairs neveidojas ūdeņraža saites starp 2,6-dimetilēngrupu vienu no protoniem un 3,5-dikarbonilgrupu skābekļa atomiem oksidētajā formā.



2.1. att. 1,4-DHP 2,6-dimetilgrupu AB-kvartets  $^1\text{H}$  KMR spektrā

Salīdzinot iegūto savienojumu **38**, **143-150** rindu  $^1\text{H}$  KMR redzam, ka atkarībā no aizvietotāja elektroniskās dabas piridīnija gredzenā novērojama 2,6-metilēngrupas protonu AB-kvarteta signālu ķīmiskā nobīde vai nu uz stiprākiem vai vājākiem laukiem. Sarindojot savienojumus pēc piridīnija gredzena 4-vietas aizvietotāja elektrondonorā efekta, novērojām likumsakarīgu AB-kvarteta signālu ķīmiskās nobīdes virzību uz stipro lauku pusi (2.3. tabula). Šī nobīde korelējas ar aizvietotāja Hammeta konstanti  $\sigma$ , kas raksturo aizvietotāja elektrondonorās-akceptorās īpašības [250], parādot, ka  $^1\text{H}$  KMR spektros raksturīgās 2,6-metilēngrupu ķīmiskās nobīdes, pieaugot elektrondonorajam efektam, piemēram,  $4\text{-CN}(0,66) < 4\text{-COCH}_3(0,50) < 4\text{-CONH}_2(0,36) < 4\text{-H}(0) < 4\text{-CH}_3(-0,17) < 4\text{-C}(\text{CH}_3)_3(-0,20) < 4\text{-N}(\text{CH}_3)_2(-0,83) < 4\text{-NH}_2(-0,66)$  (2.3. tabula). Tomēr bija arī izņēmumi: savienojuma **142** gadījumā 1,4-DHP-2,6-dimetilēngrupu protonu signālu ķīmiskās nobīdes vērtība vairs neatrodos starp savienojumu **137** un **139**, kā tas bija gaidīts, jo savienojuma **142** piridīnija 4-vietas aizvietotāja (aminogrupa) Hammeta konstantes vērtība atrodas starp dimetilamino- un *terc*-butilgrupu Hammeta konstantes vērtībām (2.3. tabula). Tāpat arī ar elektronakceptoriem aizvietotājiem likumsakarību vairs nenovērojām.

### 2.3.tabula

Piridīnija 4-vietas aizvietotāja ietekme uz 1,4-DHP-2,6-dimetilēngrupu protonu signālu AB-kvartetu ķīmisko nobīdi  $^1\text{H}$  KMR spektros DMSO- $\text{D}_6$  istabas temperatūrā.

Sav. Nr.	Aizvietotājs piridīnija gredzenā	2,6-CH <sub>2</sub> AB-kvarteta ķīmiskā nobīde	Hammeta kanstante, $\sigma$ [250]
<b>137</b>	4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,45-5,82	-0,83
<b>142</b>	4-NH <sub>2</sub>	5,11-5,58	-0,66
<b>139</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	5,62-5,94	-0,20
<b>136</b>	4-CH <sub>3</sub>	5,84-6,24	-0,17
<b>38</b>	H	5,89-6,40	0,00
<b>141</b>	4-CONH <sub>2</sub>	5,66-6,05	0,36
<b>140</b>	4-COCH <sub>3</sub>	5,66-6,10	0,50
<b>138</b>	4-CN	6,10-6,33	0,66

Līdzīgas 1,4-DHP-2,6-dimetilēngrupu protonu signālu ķīmiskās nobīdes likumsakarības novērojām arī 3-aizvietotiem piridīnija atvasinājumiem (2.4. tabula).

Hammeta konstantes korelācija ar 2,6-metilēngrupas protonu ķīmiskajām nobīdēm izpildās vienīgi ar elektrondonoriem aizvietotājiem (2.4. tabula).

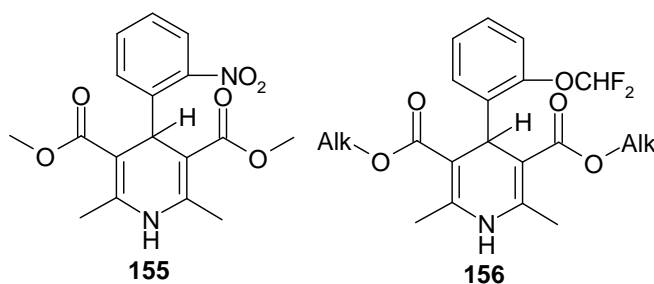
2.4.tabula

Piridīnija 3-vietas aizvietotāja ietekme uz 1,4-DHP-2,6-dimetilēngrupu protonu signālu AB-kvartetu ķīmisko nobīdi  $^1\text{H}$  KMR spektros DMSO- $\text{D}_6$  istabas temperatūrā.

Sav. Nr.	Aizvietotājs piridīnija gredzenā	2,6-CH <sub>2</sub> AB-kvarteta ķīmiskā nobīde	Hammeta kanstante, $\sigma$ [250]
145	3-NH <sub>2</sub>	5,34-5,94	-0,16
143	3-CH <sub>3</sub>	5,52-6,07	-0,07
38	H	5,89-6,40	0,00
144	3-Ph	5,67-6,18	0,06
146	3-COCH <sub>3</sub>	5,73-6,15	0,28
147	3-CONH <sub>2</sub>	5,61-6,13	0,28

### 2.1.2.3 Modifikācijas polārajā daļā

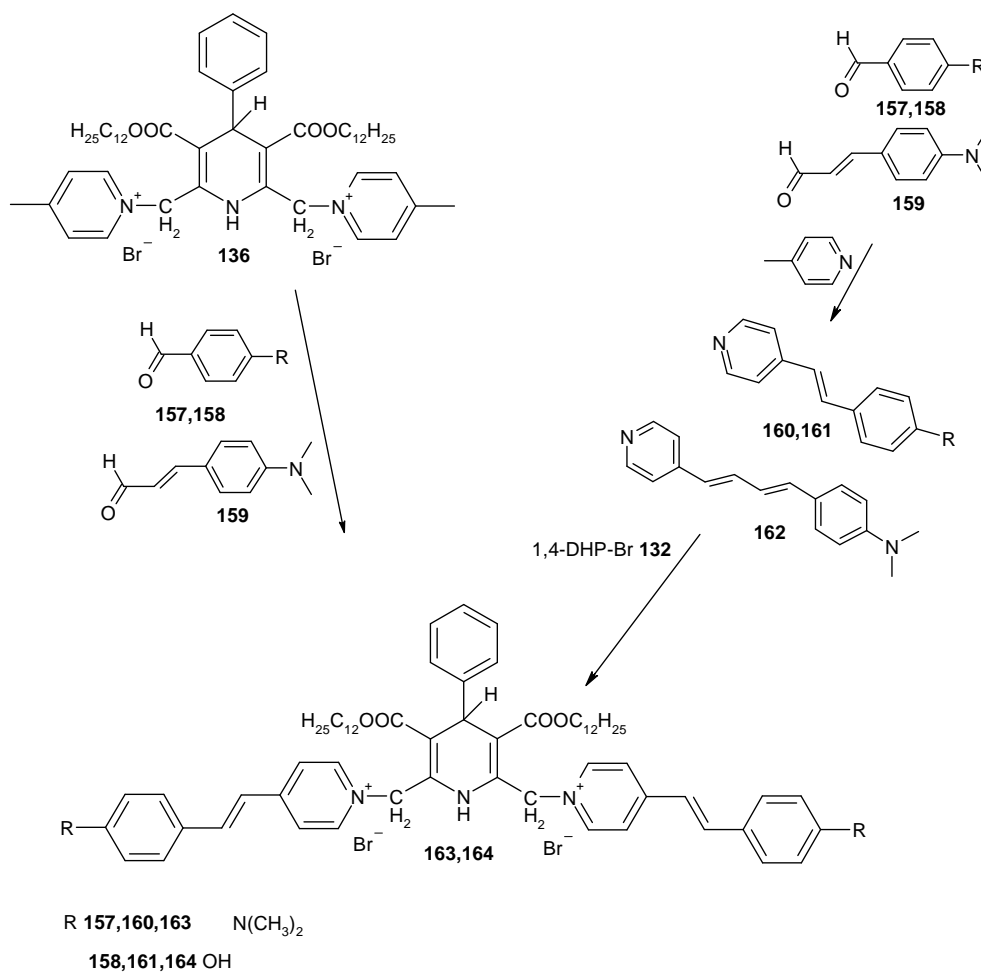
Literatūrā aprakstīti piemēri, kad bioloģiskajos pētījumos lipopleksiem tiek pievienotas speciālas fluorescentās zondes, lai varētu izsekot lipopleksu lokalizācijai dzīvajos organismos vai šūnu eksperimentos un skaidrot lipopleksa darbības mehānismus [251]. Mūsu mērķprodukti paši par sevi satur fluorescējošu struktūras fragmentu - 4-aizvietotu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu. Šādu fragmentu satur arī savienojumi **155** un **156**, kas uzrādījuši fluorescenci un tas ir ļāvis skaidrot to iespējamus bioķīmiskos procesus fosfatidilholīna (**1**) modelmembrānās [252-254].



Latvijas Organiskās sintēzes institūta Membrānaktīvo savienojumu un  $\beta$ -diketonu laboratorijā ir sintezētas un pētītas fluorescentās zondes – stirilpiridīnija atvasinājumi, kas iegūti no 4-pikolīnija un *para*-aizvietotiem aldehīdiem [255,256]. Lai turpinātu

pētījumus par fluorescējošu gēnu transfekcijas aģentu iegūšanu, saglabājot aktīvākās molekulas – savienojuma **38** uzbūvi un ievestu struktūrā vēl papildus fluorescējošus aizvietotājus, nolēmām apvienot vienā molekulā aktīvāko no līdz šim zināmajiem gēnu transfekcijas aģentiem un stirilpiridīnija fragmentu.

Izvērtējot mūsu sintezēto savienojumu struktūras redzējām, ka pastāv iespēja palielināt fluorescējošo fragmentu skaitu molekulā, pagarinot konjugācijas ķēdi 1,4-DHP atvasinājuma 2,6-vietās. Šim nolūkam izvēlējamies savienojumu **136**, kas satur 4-metilpiridīnija grupas, kuras iespējams tālāk modificēt. Konjugācijas ķēdes pagarināšanai izvēlējamies 4-dimetilaminobenzaldehīdu (**157**), 4-hidroksi-benzaldehīdu (**158**) un 4-dimetilaminokanēļaldehīdu (**159**). Reakciju veicām vārot metanolā 16 stundas piperidīna kā katalizatora klātienē. Īsā laikā reakciju maisījumu krāsa no viegli dzeltenas mainījās uz tumši sarkanu, kas liecināja par iespējamā produkta rašanos. Šādu krāsojumu var dot stirilpiridīna atvasinājumi [255].



Veiktajās reakcijās ar 4-hidroksibenzaldehīdu (**158**) vai 4-dimetilaminokanēļdehīdu (**159**) gaidītos produktus izdalīt neizdevās. Reakcijā ar 4-hidroksibenzaldehīdu (**158**) izdalījām dzeltenus kristālus ar kušanas temperatūru 190<sup>0</sup>C, tomēr <sup>1</sup>H KMR spektros konstatējām nepietiekošu aromātisko protonu signālu intensitāti un elementanalīzē vairāk par 5% oglekļa atoma iztrūkumu. Tā kā savienojuma kristālus rentgenstruktūras analīzēm iegūt nav izdevies, tad pagaidām savienojuma struktūra nav pierādīta. 4-Dimetilaminokanēļaldehīda (**159**) gadījumā no reakcijas vides neizdevās izdalīt gaidīto produktu, reakcijas maisījums kļuva brūns. Iespējams, ka to varētu skaidrot ar reakcijas maisījumā notiekošo polimerizāciju, un veidojas nesadalāms polimēru maisījums. Iegūtajā savienojumā **164** stirilpiridīnija fragmentā piridīnija un benzola gredzeni pie dubultsaites atrodas *trans*-stāvoklī. Par to liecina dubultsaites protonu sadarbības konstante 16,1 Hz, ko novēro <sup>1</sup>H KMR spektros.

Realizējot augstāk minētajos apstākļos 4-pikolīna kondensācijas reakciju ar aldehīdiem **158**, **159** stirilpiridīna veidošanās nenotiek. Acīmredzot šādos apstākļos nekvaternizēta pikolīna metilgrupas protoni nav pietiekoši kustīgi, lai notiktu benzilidēntipa pievienošanās. Lai risinātu radušos problēmu un iegūtu savienojumus, kas vienlaicīgi varētu būt gan gēnu transfekcijas aģenti, gan fluorescentās zondes, meklējam alternatīvus variantus stirilpiridīnija fragmentu saturošu 1,4-DHP atvasinājumu iegūšanai. Sākotnēji veicot 4-pikolīna metilgrupas modifikāciju ar atbilstošajiem benzaldehīda atvasinājumiem **157**, **158** un 4-dimetilaminokanēļaldehīdu (**159**), ieguvām 4-aizvietotus piridīna atvasinājumus ar pagarinātu konjugētu ķēdi (savienojumi **160-162**). Reakciju veicām pēc literatūras analogijas reakcijas maisījumu etiķskābes anhidrīdā 20 stundas karsējot 140<sup>0</sup>C. Sintēzes uzsākot reakcijas maisījumi krāsojas sarkanā krāsā un pēc 20 stundām novērojām tumši sarkanu kristālisku vielu veidošanos. Reakcijas maisījumu izlējām uz ledus un etiķskābes anhidrīdu neitralizējām ar 40% NaOH šķīdumu [257]. Pēc tam filtrējām un kristalizējām no metanola. Tomēr pārbaudot savienojumu tīrību ar PSH (eluents – metilēnhlorīds), novērojām vairākus signālus: R<sub>f</sub> 0,95 neizreaģējušā aldehīda signāls, R<sub>f</sub> 0,40 produktu signāls un R<sub>f</sub> 0,0 neidentificēts signāls, kas adsorbējas uz silikagēla un lietotajā eluenta sistēmā nepārvietojas. Stirilpiridīna atvasinājumu **160**, **161** un arī savienojuma **162** tālāku attīrīšanu veicām ar preparatīvo šķidrums hromatogrāfu, par eluentu izmantojot metilēnhlorīdu, lai atdalītu neizreaģējušo aldehīdu (atbilstoši **157-159**), tad pastiprinot eluējošās sistēmas polaritāti ar etilacetātu (70% metilēnhlorīds:



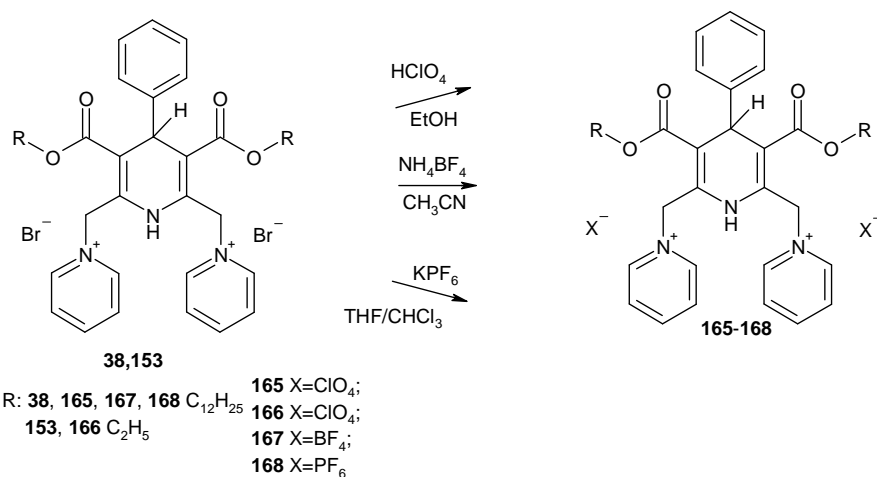
30% etilacetāts) veicot gradienta hromatogrāfiju izdala produktu, kuru vēlāk kristalizējām no etanola. 4-Dimetilaminokanēļaldehīda (**159**) un 4-dimetilamino-benzaldehīda (**157**) gadījumā ieguvām tumši sarkanas kristāliskas vielas - savienojumus **160** un **162**, bet produkta **161** gadījumā izolējām dzeltenu kristālisku vielu. Jāpiezīmē, ka iegūtie savienojumi izdalīti kā *trans*-izomēri, ko pierādījām ar <sup>1</sup>H KMR spektriem, nosakot dubultsaites protonu sadarbības konstantes (16,1 Hz).

Savukārt, katjonu konjugētu fluorescējošu fragmentu saturošu 1,4-DHP atvasinājumu sintēzi veicām analogi kā piridīna un aizvietotu piridīnu gadījumā - 2,6-bis(brommetil)-1,4-DHP atvasinājumu **132** un iegūto piridīna atvasinājumu **160-162** maisot acetonā istabas temperatūrā. Atšķirībā no stēriski mazāku aizvietotāju saturošiem piridīna atvasinājumiem, ar kuriem iegūta savienojumu rinda **136-148**, šajā gadījumā reakcijas laiku pagarinājām līdz 72 stundām. Pēc kristalizēšanas no etanola ieguvām savienojumus **163** un **164** ar iznākumiem attiecīgi 17% un 39%, bet gaidīto produktu ar piridīna atvasinājumu **162** šādā veidā iegūt neizdevās.

Iegūtajiem savienojumiem **163** un **164** varētu sagaidīt fluorescences pastiprināšanos salīdzinot ar savienojumu **38**. Ir zināms, ka fluorescējoši savienojumi vidē ar augstāku viskozitāti uzrāda spēcīgāku fluorescenci nekā vidē ar zemāku viskozitāti [255]. Tātad varētu sagaidīt, ka savienojumi uzrādīs augstāku fluorescenci šūnās, nekā ūdenī vai organiskos šķīdinātājos.

#### 2.1.2.4 Anjona apmaiņas reakcijas

Kā jau tika minēts literatūras apskatā, tad savienojumu fizikālās un arī bioloģiskās īpašības daudzos gadījumos ir atkarīgas arī no pretjona [87]. No literatūras bija zināms, ka SAINT savienojumu **61-71** Hofmeistara anjonu sērija  $\text{ClO}_4^- > \text{PF}_6^- > \text{BF}_4^-$  uzrādīja dažādu gēnu transfekcijas aktivitāti [87]. Lai pārbaudītu pretjona ietekmi mūsu savienojumu gadījumā, nolēmām veikt bromīda jonu maiņu līdz šim augstāko gēnu transfekcijas aktivitāti uzrādījušam 1,4-DHP atvasinājumam - 1,1'-[(3,5-didodeciloksikarbonil-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija dibromīdam (**38**), lai iegūtu tā analogus **165**, **167** un **168**. Līdz šim visi savienojumi **37-41** bija iegūti un pētīti kā bromīdi, variējot molekulas lipofilo daļu. Anjona apmaiņa tika veikta arī modeļvielai **153**, lai pārbaudītu reakcijas apstākļus.

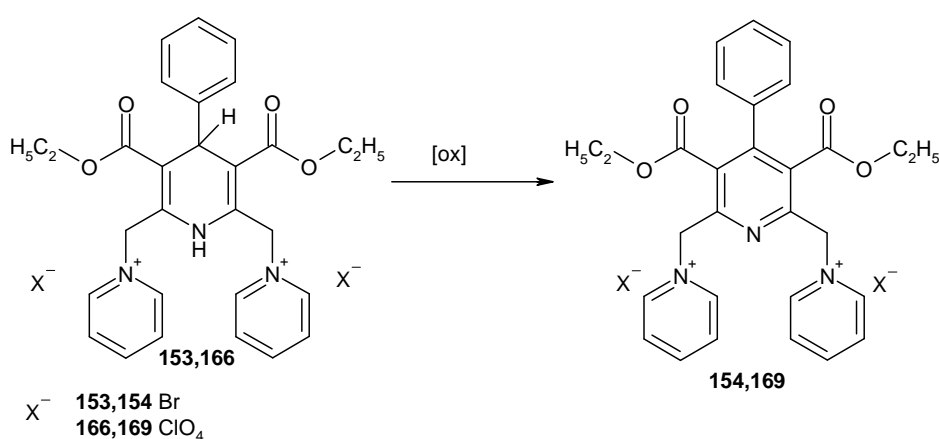


Sākotnēji veicām Br<sup>-</sup> nomaiņu pret ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, lai iegūtu savienojumu **165**. Sintēzi realizējām pēc literatūrā [258] aprakstītās metodes nedaudz modificējot to. Respektīvi, siltam bromīda šķīdumam etanolā pievienojām HClO<sub>4</sub> pārākumā, maisījām 3 stundas, tad atdzesējām un filtrējām iegūtos kristālus, uz filtra skalojām ar etanolu un ēteri, ieguvām produktu **165** ar 73% iznākumu. Līdzīgi iegūti arī modeļvielas 3,5-dietiloksi-1,4-DHP **166** perchlorāti. Jāatzīmē, ka bromīdu apmaiņa par perchlorātiem notiek samērā viegli un ar labiem iznākumiem virs 60%, īsākas alkilķēdes saturošā 1,4-DHP atvasinājuma **166** zemāko iznākumu salīdzinājumā ar savienojuma **165** skaidrojam ar produkta labāku šķīdību etanolā produkta attīrīšanas laikā. Savienojumus **167** un **168** ieguvām pēc literatūras analogijas, kur tiek veikta anjonu maiņa imidazolija tipa jonu šķīdumiem [86]. Jāatzīmē, ka mūsu gadījumā reakcija nenotika tik viegli, bija nepieciešami ilgāki reakcijas laiki - 60 un 72 stundas atbilstoši, un produktus izdalījām ar 69% un 75% iznākumu attiecīgi. Par to, ka šķīdumā nav palikuši bromīdioni, pārliccinājāmies apstrādājot iegūto sāļu **165**, **167** un **168** ūdens šķīdumus ar sudraba nitrāta šķīdumu, sudraba bromīds neizgulsnējās. Nākotnē būtu vēlams pētīt sīkāk reakcijas gaitu un apstākļus, kas to ietekmē, lai radītu optimālus apstākļus šādu bipiridīnija atvasinājumu anjonu rindas iegūšanai, kā arī meklēt metodes citu anjonu apmaiņai, lai varētu pētīt plašāku anjonu Hofmeistera sēriju un arī struktūras-aktivitātes sakarības. Salīdzinot savienojumu **165-168** <sup>1</sup>H KMR spektrus, redzam, ka anjons ietekmē 2,6-metilēngrupas AB-kvarteta protonu ķīmisko nobīdi, piemēram, savienojumam **165** tā ir 5,56 un 6,08 m.d. savienojumam **166** 5,46 un 6,07 m.d., savienojumam **167** 5,47 un 6,06 m.d., savienojumam **168** 5,51 un 6,07 m.d. attiecīgi.

## 2.2 Katjonu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšana

Kā jau tika minēts literatūras apskatā, tad neskatoties uz bagātu literatūras datu klāstu par dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšanas iespējām, izmantojot plašu oksidētāju spektru, tomēr nav informācijas par katjonu aizvietotājus saturošu 1,4-DHP atvasinājumu ķīmiskās oksidēšanas iespējām. Jāatzīmē, ka literatūrā [259] doti savienojumu grupas **33-36** oksidētie analogi, tomēr tie iegūti sākotnēji oksidējot izejvielu - atbilstošo 4-piridil-1,4-dihidropiridīna atvasinājumu, tad kvaternizējot piridīna aizvietotāju, vai arī iegūti katjonu aizvietotājus saturoši piridīna atvasinājumi, elektroķīmiski oksidējot 1,4-DHP atvasinājumus.

Tādējādi mūsu darba uzdevums bija veikt mūs interesējošo objektu – 2,6-vietās katjonu aizvietotājus saturošu 1,4-DHP atvasinājumu oksidēšanu, lai iegūtu atbilstošos katjonu piridīna atvasinājumus gan kā iespējamus metabolisma produktus, gan, lai nākotnē pētītu struktūras-aktivitātes sakarības oksidētajām formām. Izvēlējamies potenciālo gēnu transfekcijas aģentu modeļvielas – atbilstošo 3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidropiridīna katjonu atvasinājumus – bromīdu **153** un perhlorātu **166**. Šādi anjoni izvēlēti, lai varētu prognozēt potenciālā gēnu transfekcijas aģenta īpašības: perhlorāts, lai varētu salīdzināt ar elektroķīmiskajā oksidēšanā iegūto vielu [258]. Mūsu darbā pētījām un salīdzinājām dažādu oksidējošo aģentu izmantošanu katjonu grupu saturošu 1,4-DHP atvasinājumu oksidēšanas reakcijās.



Mūsu pirmais mēģinājums oksidēt katjono 1,4-DHP atvasinājumu **153** ar klasisko neitrālus 1,4-dihidropiridīnus oksidējošu reaģentu - *in situ* ģenerētu slāpekļa oksīdu pēc literatūrā [260] aprakstītās metodes bija neveiksmīgs. Reakcijas rezultātā

notika izejvielas **153** destrukcija, ko novērojām <sup>1</sup>H KMR spektros. Šis neveiksmīgais eksperiments lika meklēt citus oksidētājus, kas pirms tam veiksmīgi tikuši izmantoti neitrālu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšanai, piemēram, tetrahlor-*p*-benzohinons (*p*-hloranils) [259], 10% Pd/C [261] vai SeO<sub>2</sub> [262]. Tāpat izvēlējamies N-bromsukcīnimīdu (NBS), kas arī literatūrā minēts kā labs oksidējošais aģents dažādu heterociklisku sistēmu aromatizēšanai [263]. Eksperimentu rezultāti doti 2.5. tabulā.

2.5.tabula.

Savenojumu **153** un **166** ķīmiskās oksidēšanas apstākļi.

Nr.	Sav.	Oksidētājs	Šķīdinātājs	Laiks, st	T, °C	(DHP:Py), % <sup>*</sup>	Py <sup>#</sup> %
1.	<b>153</b>	2,6 ekv. NBS	MeOH	10	70	0:100	48
2.	<b>166</b>	2,6 ekv. NBS	MeOH	10	70	0:100	63
3.	<b>153</b>	100m% 10% Pd/C	EtOAc/MeCN (3:1)	60	80	50:50	-
4.	<b>166</b>	100m% 10% Pd/C	EtOAc/MeCN (3:1)	60	80	0:100	37
5.	<b>153</b>	4 ekv. SeO <sub>2</sub>	AcOH	5	50	0:100	32
6.	<b>166</b>	4 ekv. SeO <sub>2</sub>	AcOH/EtOH (5:1)	5	50	70:30	-
7.	<b>153</b>	1 ekv. <i>p</i> -hloranils	THF/EtOH (1:1)	6	60	75:25	-
8.	<b>166</b>	1 ekv. <i>p</i> -hloranils	THF/EtOH (1:1)	6	60	95:5	-

\* Attiecība tika noteikta izmantojot AEŠH un <sup>1</sup>H KMR spektroskopijas datus

#Izdalītā produkta iznākums oksidētājai formai

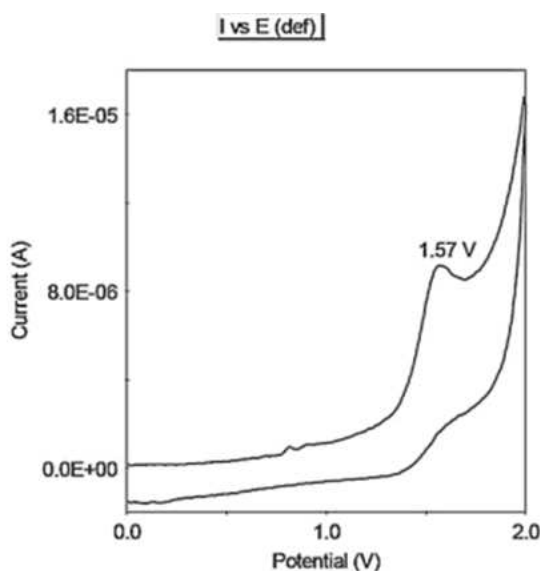
Pētīti dažādi reakcijas apstākļi. No 2.5. tabulā attēlotajiem datiem varam secināt, ka vislabākais rezultāts katjonā 1,4-dihidropiridīna oksidēšanai gan bromīdam **153**, gan perhlorātam **166** tika iegūts par oksidētāju izmantojot NBS (2.5. tabula Nr 1 un Nr 2), reakciju veicot metanolā. Izdalītie katjonie piridīnija atvasinājumi iegūti ar 48% un 63% iznākumu, atbilstoši.

Salīdzinot ar literatūras datiem [261], kuros dots piemērs, ka neitrāla 1,4-DHP atvasinājuma oksidēšana ar 10% pallādiiju uz ogles, kas ņemts 20 m% attiecībā pret 1,4-DHP, etiķskābē 80<sup>o</sup>C notiek 2 stundu laikā. Realizējot katjonā 1,4-DHP atvasinājuma bromīda **153** oksidēšanu tādos pat apstākļos pēc 21 stundas reakcijas maisījumā ir tikai 23% oksidētās formas. Pilnīgi katjono 1,4-DHP perhlorātu **166** izdevās nooksidēt tikai pēc 60 stundām reakcijas maisījumu sildot pie 80<sup>o</sup>C, izmantojot 100 m% Pd/C (10%), kamēr bromīda **153** gadījumā tādos pat reakcijas

apstākļos reakcijas maisījums satur 1,4-DHP un piridīnu vienādos daudzumos, oksidēšanās notikusi tikai par 50% (2.5. tabula Nr 4 un Nr 3).

Tāpat, balstoties uz literatūras [262] datiem - neitrālus 4-fenilaizvietotus 1,4-dihidropiridīnus veiksmīgi var oksidēt istabas temperatūrā ar 1 ekvivalentu  $\text{SeO}_2$  stundas laikā. Veicot katjono 4-fenil-1,4-DHP atvasinājumu oksidēšanu analogos apstākļos, 1,4-DHP aromatizācija nenotiek. Tikai karsējot reakcijas maisījumu  $50^\circ\text{C}$  3 stundas, bromīda **153** oksidēšanās notiek apmēram par 30%. Lai pilnīgi oksidētu atbilstošos katjonos 1,4-DHP atvasinājumus bromīda **153** gadījumā jāņem 4 ekvivalenti  $\text{SeO}_2$  (oksidētā produkta iznākums 32%, (2.5. tabula Nr 5)), kamēr perhlorāta **166** oksidēšanās nenotiek pilnīgi, iespējams šķīdinātāju maiņas dēļ. Tomēr šķīdinātāju maiņa šajā gadījumā - etiķskābe **153** gadījumā un etiķskābes - etanola maisījums (5:1) perhlorāta **166** gadījumā ir pamatota, jo uzlabo izejvielu šķīdību, kaut arī literatūras [262] dati rāda, ka neitrālu 1,4-DHP gadījumā etanols kā šķīdinātājs šajā reakcijā nav ieteicams. Tāpat neizdevās atbrīvoties no metāliska Se piejaukuma reakcijas produktā (2.5. tabula Nr 6).

Mūsu iegūtie rezultāti rāda, ka *p*-hloranila kā oksidējoša aģenta lietošana nav efektīva katjono 1,4-DHP aromatizācijai. Savienojuma **153** gadījumā tā notika tikai par 25%, bet perhlorāta **166** gadījumā tikai par 5%. Jāatzīmē, ka pagarinot reakcijas laiku, oksidētās formas iznākums nepaaugstinās (2.5. tabula Nr 7 un Nr 8).

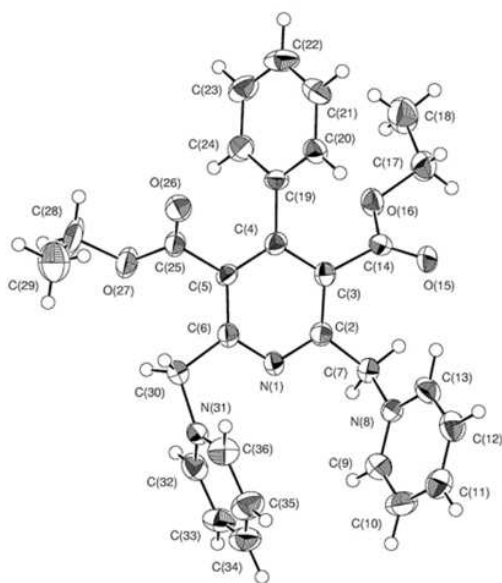


2.2. att. Cikliskā voltagramma savienojumam **166** ( $c=5 \times 10^{-4} \text{M}$ )  
noteikts ar stacionāro Pt diska elektrodu MeCN/0,1M NaClO<sub>4</sub>

Latvijas Organiskās sintēzes institūta Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijā veica savienojuma **166** elektroķīmisko oksidēšanu (Dr.ķīm. Baiba Turovska), izmantojot ciklisko voltometriju (CV) un hronoamperometriju. Aprotonos šķīdinātajos CV savienojums **166** uzrāda inversu oksidēšanās gaitu (2.2. attēls). Divu stipru elektronakceptoru grupu klātbūtne molekulā nobīda oksidācijas potenciālu uz 1,7 V, kamēr neitrāliem 4-fenilaizvietotiem 1,4-dihidropiridīniem tas ir 1V [264-266].

Katjonajam 1,4-DHP perhlorāta atvasinājumam **166** veikta kontrolētā potenciāla elektrolīze pie 1,70 V degazētā MeCN. Savienojuma **166** elektroķīmiskās oksidēšanas laikā, veicot kulonometriskus mērījumus, noskaidrots, ka oksidēšanās notiek kā divu elektronu process. Atsaucoties uz literatūru [267], pirmo elektronu zaudējušais katjonais radikālis ir daudz skābāks par neitrālo 1,4-DHP atvasinājumu. Domājams, ka 2,6-vietu piridīnija katjoni ietekmē 1,4-dihidropiridīna NH protonu, padarot to skābāku [258]. Mūsu pieņēmums ir, ka pēc pirmā elektrona atraušanas, tai seko ātra NH protona izšķelšana un tikai pēc tam – otra elektrona un protona izšķelšana. Šādu elektroķīmisku oksidēšanas mehānismu dēvē par ECEC (E electron transfer; C proton transfer) mehānismu.

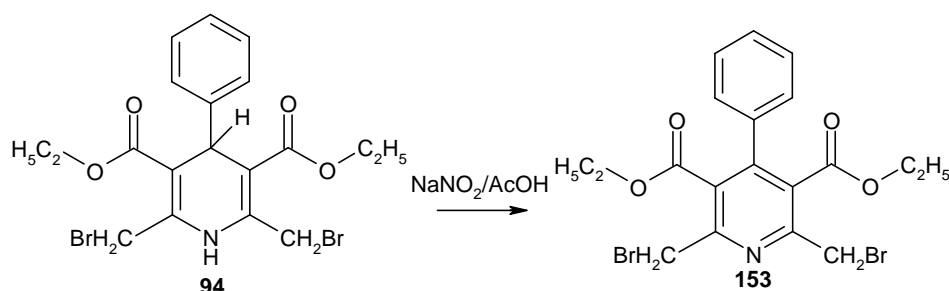
Savienojumam **169** tika iegūti monokristāli, kuriem Latvijas Organiskās sintēzes institūta Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijā (Dr.fiz. Sergejs Beļakovs) veica rentgenstruktūras analīzi, lai apstiprinātu savienojuma struktūru (2.3. attēls).



2.3. att. Savienojuma **169** rentgenstruktūra

Rezūmējot augstāk uzrakstīto, var secināt, ka darbā pirmo reizi veikta katjono 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ķīmiskā oksidēšana. Gan ķīmiski, gan elektroķīmiski oksidējot katjonos aizvietotājus saturošus 1,4-DHP atvasinājumus, tika iegūti atbilstošie katjonos aizvietotājus saturoši piridīna atvasinājumi kā potenciālie gēnu transfekcijas aģenti, vai iespējamie metabolisma produkti jau pētītajiem gēnu transfekcijas aģentiem. No apskatītajiem oksidējošajiem aģentiem visefektīvākā metode izrādījās lietojot NBS kā oksidētāju, reakciju veicot metanolā. Mūsu iegūtie rezultāti parādīja, ka, salīdzinot neitrālu 4-fenilaizvietotu 1,4-dihidropiridīnu oksidēšanu – gan ķīmisko, gan elektroķīmisko ar katjonos aizvietotājus saturošu 4-fenilaizvietotu 1,4-DHP atvasinājumu oksidēšanu, pēdējā notiek grūtāk.

Alternatīva modeļsavienojuma **166** iegūšana ir savienojuma **94** oksidēšana, lai tālākās stadijās veiktu bromo nukleofilo aizvietošanu ar piridīnu.



Šajā gadījumā izmantots klasiskais 1,4-DHP oksidētājs – NaNO<sub>2</sub>/etiķskābē 50<sup>0</sup>C 5 min., tad 1,5 stundas maisot istabas temperatūrā iegūst produktu **153** ar 60% iznākumu. Ja reakciju veic temperatūrā virs 50<sup>0</sup>C vai ja reakciju šajā temperatūrā veic ilgāk, novēro savienojuma laktonizāciju [156], kā jau tika minēts literatūras apskatā.

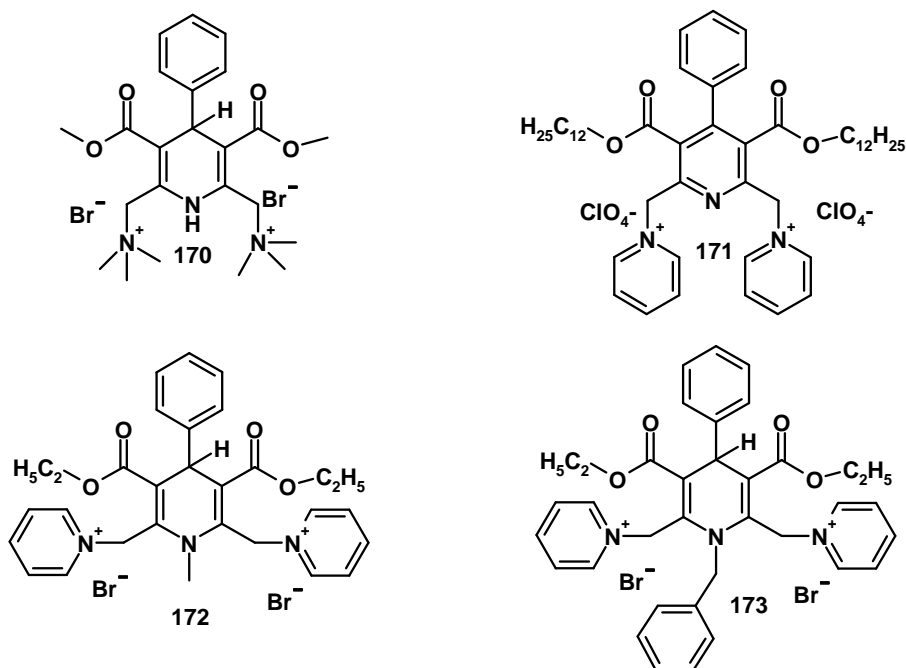
## 2.3 Savienojumu fizikāli-ķīmiskais un bioķīmiskais raksturojums

### 2.3.1 pK<sub>a</sub> noteikšana

No literatūras ir zināms, ka katjonu liposomām, šķērsojot šūnas endosomālo daļu, vēlams būtu nemainīt vides pH, jo skābas vides gadījumā var notikt DNS sagraušana [115]. Tātad, ir svarīgi, lai potenciālie gēnu transfekcijas aģenti katjonie amfifilie 1,4-DHP atvasinājumi spētu saglabāt nemainīgu apkārtējas vides pH. Tāpēc bija būtiski pārbaudīt, vai jauniegūtajiem savienojumiem arī piemīt buferkapacitāte, un kāda tā ir salīdzinājumā ar savienojuma **38** buferkapacitāti, kā arī salīdzināt tagad

sintezēto savienojumu un Membrānaktīvo un  $\beta$ -diketonu laboratorijā iepriekš sintezēto savienojumu uzrādītās buferīpašības.

Izvēlējamies arī citus Membrānaktīvo savienojumu un  $\beta$ -diketonu laboratorijā sintezētos savienojumus **170-173**, kas paplašinātu pētāmo savienojumu rindu, lai iegūtu informāciju par katjono 1,4-DHP atvasinājumu NH protona pKa vērtībām struktūras-aktivitātes sakarības pētījumiem.



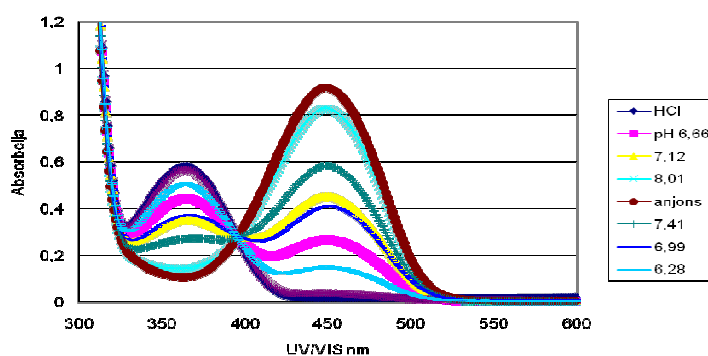
Izmantojām pKa vērtības noteikšanai divas metodes: UV/VIS spektrofotometriju un skābes titrēšanu ar bāzi. Membrānaktīvo un  $\beta$ -diketonu laboratorijā iepriekš sintezētajam un literatūrā aprakstītajam savienojumam **38** ir pētīta buferkapacitāte, tā ir salīdzināta ar DOPE un PEI 25 [56], pēdējo mēdz dēvēt arī par „protonu sūkli”, pateicoties daudzajām protonētās un deprotonētās spējīgām aminogrupām. Savienojumu rindai **38, 93, 136, 137, 140-144, 147, 150, 170-173** noteicām pKa vērtības izmantojot UV/VIS spektrofotometriju, iegūtos datus apkopojām 2.6.tabulā.



1,4-DHP atvasinājumu pKa vērtības, noteiktas UV/VIS spektrofotometriski

Savienojuma Nr.	pKa
38	5,99 ±0,08
93	9,36 ±0,06
136	6,18 ±0,04
137	7,11 ±0,05
140	-
141	-
142	7,03 ±0,09
143	6,06 ±0,05
144	-
147	-
150	-
170	10,69 ±0,22
171	-
172	Neveidojas anjons
173	Neveidojas anjons

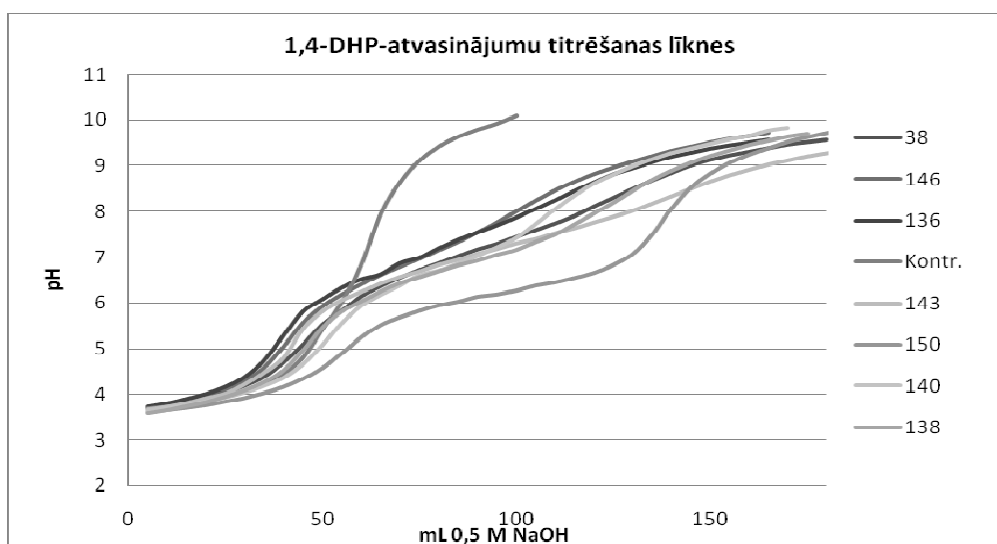
Vairākos gadījumos pēc izvēlētās metodes nebija iespējams noteikt pKa vērtību, jo UV absorbcijas maksimums skābā vidē pie 365 nm un UV absorbcijas maksimums bāziskā vidē pie 454 nm proporcionāli nesamazinās vai nepieaug, absorbcijas līknēm pie dažādām pH vērtībām veidojot kopīgu krustpunktu, kā to novērojām, piemēram, savienojuma **137** un citu savienojumu gadījumos (2.4. attēls), kas ir līdzīgi savienojuma **137** absorbcijas spektriem.



2.4. att. Savienojuma **137** UV/VIS absorbcijas līknes dažādās pH vērtībās

Noskaidrojām, ka N-aizvietoti savienojumi ūdens šķīdumos anjonu neveido, kas ir likumsakarīgi, jo šādos 1,4-DHP atvasinājumos nav kustīgā ūdeņraža atoma pie

slāpekļa, bet, lai deprotonētu kādu citu grupu molekulā, jābūt daudz bāziskākai videi. Piemēram, fenacilpiridīnija atvasinājumiem metilēngrupu iespējams deprotonēt vidē, kur  $\text{pH} > 20$ . Mūsu gadījumā arī savienojumi satur deprotonētus spējīgu metilēngrupu pie kvaternizētā slāpekļa atoma. Tomēr nenovērojām protona atraušānu no 1,4-DHP 2,6-metilēngrupām pat tajos gadījumos, kad 1,4-DHP slāpekļa atoms bija aizvietots ar metil- **172** vai benzilgrupu **173**.



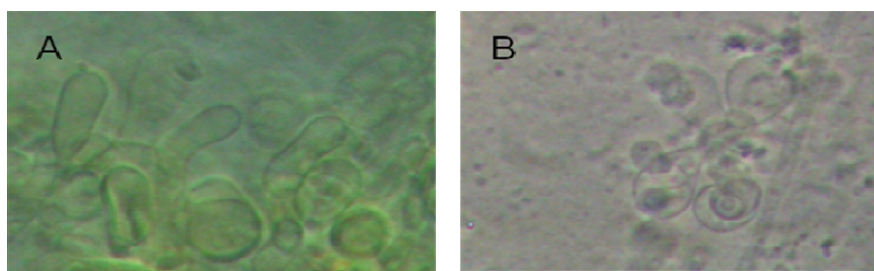
2.5. att. Katjono amfifilo 1,4-DHP atvasinājumu titrēšanas līknes

Veicām alternatīvu  $\text{pK}_a$  vērtības noteikšanu: skābes titrēšanu ar bāzi līdzīgi kā autori to bija pētījuši ar katjonajiem amfifilajiem 1,4-DHP atvasinājumiem **33-41** [56]. Bufertkapacitātes noteikšanai paraugu izšķīdinājām 5 ml HCl ūdens šķīdumā  $\text{pH}=3,5$  tā, lai gala koncentrācija paraugam būtu 0,22 mM. Tad titrējām ar 0,5 M nātrija hidroksīda šķīdumu pievienojot pa 10  $\mu\text{l}$  un nolāsit šķīduma  $\text{pH}$  vērtību, kad ir iestājies reakcijas līdzsvars (2.5. attēls). Šī metode nav īsti piemērota mūsu paraugiem, jo brīdī, kad deprotonējas 1,4-DHP NH grupa, reakcijas līdzsvars iestājas vismaz 15-20 minūšu laikā, iespējams pat vēl lēnāk, tāpēc mērījumi var būt neprecīzi, jo nav sagaidīta reakcijas līdzsvara iestāšanās. Analizējot titrēšanas līknes var secināt, ka aizvietotāja elektronakceptorais vai elektrondonorais efekts piridīnija gredzenā praktiski neietekmē 1,4-DHP NH protona  $\text{pK}_a$  vērtību. Tomēr, aizstājot aizvietotās piridīnija grupas ar elektronegatīvāko pirazīnija grupu, novērojām savienojuma **150**  $\text{pK}_a$  vērtības samazināšanos salīdzinot ar savienojumu **38** (2.5.attēls).

### 2.3.2 Katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu agregācijas pētījumi ar gaismas mikroskopu

Lai veiktu savienojumu gēnu transfekcijas aktivitātes pētījumus, iegūtajiem savienojumiem jāpārbauda to spēja saistīties ar DNS – lipopleksu izveide. Visbiežāk literatūrā liposomas pagatavo ar filmas metodi: nepieciešamo vielas daudzumu izšķīdinot hloroformā, tad ietvaicē šķīdinātāju ar slāpekli. Iegūto plēvīti žāvē vakuumā, lai atbrīvotos no organiskā šķīdinātāja, tad suspendē dejonizētā ūdenī, sonificē, līdz šķīdums kļūst dzidrs. Vairākos gadījumos ir minēts, ka dažkārt ir nepieciešama suspensijas karsēšana, lai iegūtu dzidru šķīdumu [56].

Lai gūtu priekšstatus par savienojumu spēju veidot nanoagregātus, sākotnēji gaismas mikroskopā aplūkojām, kas notiek ar katjonajā amfifilā 1,4-dihidropiridīna atvasinājuma kristāliem ūdenī. Novērojām, ka kristāliem nonākot ūdenī, tie sāk šķīst, un ap tiem rodas makromolekulāri veidojumi, kā redzams 2.6. attēlā. Šie novērojumi liecina, ka mūsu savienojumiem piemīt pašagregēšanās spēja.



2.6. att. Savienojuma **136** (A) un **145** (B) makromolekulārie asociāti ūdenī

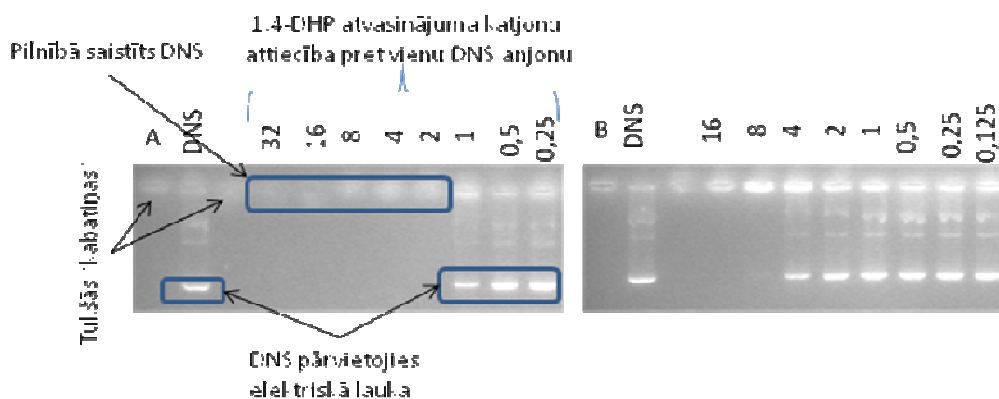
Tālākiem bioķīmiskiem pētījumiem savienojuma **38** liposomu pagatavošanai mēs izmantojām augstāk aprakstīto metodi, bet jauniegūto savienojumu liposomu šķīdumus, kā arī savienojuma **38** liposomu šķīdumu atkārtotiem eksperimentiem ieguvām, veicot nelielu metodes modifikāciju. Atšķirībā no iepriekš aprakstītās filmas metodes, tagad liposomas pagatavojām savienojumu šķīdinot ūdenī, sildot un apstrādājot ar ultraskaņu līdz šķīdums kļūst dzidrs. Kā parādīja tālākie gēnu transfekcijas aktivitātes eksperimenti, salīdzinot savienojuma **38** gēnu transfekcijas aktivitātes literatūras datus [56] un eksperimentāli iegūtos datus, varam secināt, ka liposomu pagatavošanai varam lietot mūsu piedāvāto metodi, jo rezultāti ir salīdzināmi. Savienojumu koncentrācija bioloģiskajiem eksperimentiem liposomu pagatavošanai izvēlēta analoga literatūrai, respektīvi, 1,25 mM [56], piemeklētā

sākuma koncentrācija ir optimāla. Vairumam no savienojumiem tālākiem eksperimentiem bija iespējams pagatavot stabilus šķīdumus šajā koncentrācijā. Savienojumiem ar zemāku šķīdību, (**140, 146, 165** un citi) sākuma koncentrāciju samazinājām četras reizes, lai iegūtu stabilus šķīdumus un savienojumi neizgulsnētos līdz tālāko eksperimentu uzsākšanai. Lai iegūtie rezultāti būtu savstarpēji salīdzināmi, mazāk šķīstošo savienojumu sākuma koncentrācijas piemeklējām 1,25 mM samazinot uz pusi, ja arī 0,67 mM koncentrācija bija par augstu, vēlreiz uz pusi samazinājām šķīdumu koncentrāciju līdz 0,33 mM. Pagatavotie šķīdumi tālāk izmantoti gan bioloģiskiem, gan mikroskopijas pētījumiem.

### **2.3.3 Katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīnu kompleksēšanās ar DNS**

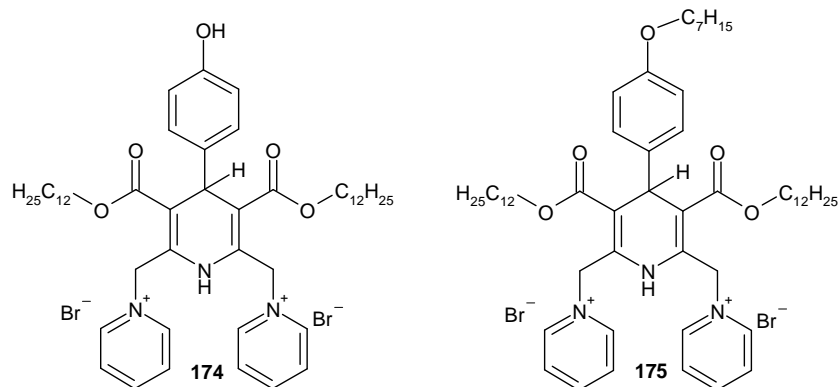
Gēnu transfekcijas aģentu pamatzdevums ir nogādāt ģenētisko materiālu mērķšūnas citoplazmā. Tāpēc potenciālajiem transfekcijas aģentiem sākotnēji jāizveido lipopleksi. Lai tas būtu iespējams, savienojumiem sākotnēji jāveido asociāti ar DNS – jāveido liposomas ar iekļautu DNS fragmentu, kuru dēvē arī par lipopleksu. DNS un liposomu kompleksēšanas eksperimentos nosaka pie kādas DNS anjonu un katjonā gēnu transfekcijas aģenta katjona ekvivalenta attiecības tiek pilnībā neitralizēta DNS molekulas negatīvā virsma un tā vairs nepārvietojas agarozes gēlā, elektriskā laukā. Lai lipopleksi būtu redzami, gēlu pēc elektroforēzes attīsta 0,002% etīdija bromīda (EtBr) ūdens šķīdumā, kuru pēc tam vizualizē fotografējot UV kamerā. Katjonu : anjonu ekvivalentu attiecību dēvē arī par „lādiņu” attiecību. Šādi noteicām savienojumu spēju veidot kompleksus ar DNS. Dažādās „lādiņu” attiecības kompleksiem pagatavojām sekojoši: sākumā septiņos no astoņiem testa plāksnītes lauciņiem iepilda 75 µL MES-HEPES NaCl buferšķīduma pH 7,4, tad brīvajā lauciņā iepilda 150 µL iepriekš pagatavotā liposomu šķīduma. Tālāk pusi 75 µL izejas šķīduma pārnes lauciņā ar buferšķīdumu, 20 reizes ar pipeti samaisa un pārnes nākamajā lauciņā ar 75 µL buferšķīduma un atkal 20 reizes ar pipeti samaisa. Šo procedūru atkāto līdz astoņi platītes lauciņi satur liposomu šķīdumus ar dažādām koncentrācijām, pirmajā 1,25 mM un katrā nākamajā 2 reizes zemāku koncentrāciju nekā iepriekšējā. Blakus kolonā astoņos brīvajos lauciņos iepilda 75 µL MES-HEPES NaCl DNS šķīdumu, lai katrā no lauciņiem būtu iepildīts 0,8 µg DNS, tālāk pārnes pagatavotos šķīdumus lauciņos ar DNS, viegli samaisa un atstāj uz 20 min.

Lipopleksus ar dažādu DHP/DNS attiecību, kā arī DNS, iepilda 0,9% agarozes gēlā izveidotās „kabatiņās” un gēlu ar paraugiem ievieto elektriskajā laukā (65 V) uz 3 stundām. Elektroforēzes datus par savienojumu spēju kompleksēt DNS iegūst, kā minēts augstāk.



2.7. att. DNA kompleksēšanās ar katjonajiem 1,4-DHP atvasinājumiem: **136** (A); **144** (B)

No 2.7. attēla redzams, ka vietās, kur DNS elektriskā lauka ietekmē ir pārvietojies agarozes gēlā, nav veidojies savienojuma un DNS kompleksa. Tā, piemēram, 2.7. attēlā novērojams, ka savienojuma **136** gadījumā pilnībā saistīta DNS plazmīda ir līdz katjona/anjona attiecībai 1, turpretī savienojuma **144** gadījumā - līdz katjona/anjona attiecībai 2. Šādi mēs noteicām, pie kādas lādiņu attiecības DNS ir pilnībā saistīts lipopleksā, nolasot pēdējo lādiņu attiecību, pie kuras bija pilnībā saistīts DNS. Pārbaudīto savienojumu klāstu papildinājām arī ar Membrānaktīvo savienojumu un  $\beta$ -diketonu laboratorijā sintezētiem 1,4-DHP atvasinājuma **38** analogiem savienojumiem **174** un **175**, lai iegūtu vairāk datus par katjoniem amfifiliem 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem tālākiem struktūras-aktivitātes pētījumiem.



Savienojumiem, kuriem šķīdība un liposomu šķīdumu sākuma koncentrācija bija zemāka, lipopleksu pagatavoja attiecīgi pie zemākas lādiņu attiecības pirmajā lauciņā. Datus apkopojām 2.7. tabulā, pārbaudītie savienojumi, kas ir katjonie amfifilie 1,4-DHP atvasinājumi, uzrādīja spēju saistīties ar negatīvi lādēto DNS. Pārsvārā savienojumi jau bija pilnībā saistījuši DNS pie lādiņu attiecības 2 un 1.

Aplūkojot datus 2.7. tabulā secinām, ka savienojumi **38, 136, 137, 142, 143, 145, 148, 149, 152, 165, 167, 174** un **175** ar elektrondonoriem aizvietotājiem piridīnija gredzenā pilnībā saista DNS pie mazākām „lādiņu” attiecībām 1 vai 2, turpretī savienojumi **138, 140, 141, 156, 147** un **150** ar elektronakceptoriem aizvietotājiem piridīnija gredzenā pilnībā DNS saista pie „lādiņu” attiecības 4. Savukārt, divos gadījumos ar savienojumiem **146** un **168** precīzu saistīšanos attiecību ar DNS neieguvām, tāpēc darbā pierakstīts, ka tie saistās no 2 līdz 4.

2.7. tabula

1,4-DHP atvasinājumu un DNS kompleksēšanās noteikta ar elektroforēzes metodi

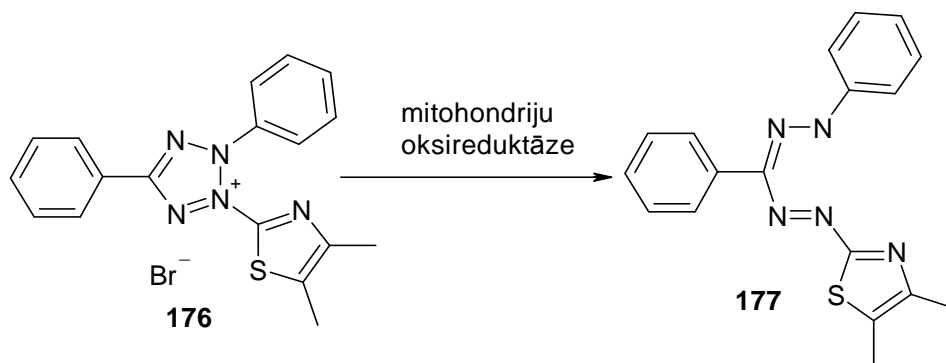
Sav.	El.f	Sav.	El.f
<b>38</b>	2	<b>146</b>	4/2
<b>136</b>	1	<b>147</b>	4
<b>137</b>	2	<b>148</b>	2
<b>138</b>	4	<b>149</b>	2
<b>139</b>	2	<b>150</b>	4
<b>140</b>	4	<b>152</b>	1
<b>141</b>	4	<b>165</b>	1
<b>142</b>	1	<b>167</b>	2
<b>143</b>	1	<b>168</b>	4/2
<b>144</b>	4	<b>174</b>	1
<b>145</b>	1	<b>175</b>	2

El.f. pirmā katjonu - anjonu attiecība DHP:DNS pie kuras vairsta pilnībā nav kompleksēts DNS

### 2.3.4 Cītotoksicitāte

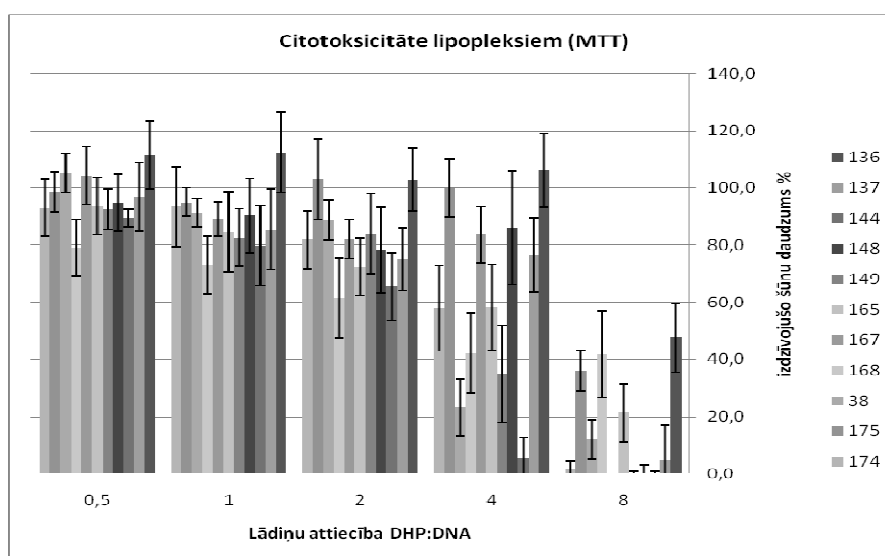
Veicot savienojumu bioloģiskās pārbaudes svarīgi noskaidrot savienojumu kompleksu cītotoksicitāti, jo tas ir būtiski, lai savienojumi izmantotajās

koncentrācijās nebūtu toksiski. Tāpat citotoksicitātes dati ir nepieciešami gēnu transfekcijas eksperimentu skaidrošanai, lai saprastu, vai gēnu transfekcija nav notikusi tāpēc, ka savienojumam nepiemīt gēnu transfekcijas īpašības, vai savienojums ir citotoksisks un šūnas aiziet bojā pirms notiek transfekcija. Citotoksicitātes noteikšanai izmantojām MTT testu pērtiķa fibroblastu šūnu līnijā (CV1-P) [268], šī testa pamatā ir (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīda (**176**) un mitohondriju oksireduktāžu darbība.



Ja viela ir toksiska un šūnām ir traucēta normāla darbība, tiek daļēji vai pilnībā inhibēta MTT **176** reducēšana par 1-(4,5-dimetiltiazolil)-3,5-difenilformazānu (**177**), kas ir violetā krāsā. Pēc tam ar UV spektrometru pie 570 nm mēra paraugu absorbciju un izsaka procentos pret kontroles grupu.

Citotoksicitātes noteikšanai CV1-P šūnas uzsējām augšanas vidē 96 lauciņu platītē, katrā lauciņā 20000 šūnas. Dienu vēlāk nomainām augšanas vidi uz bezseruma vidi un pievienojām 1,4-DHP atvasinājumu un DNS kompleksu, kurus pagatavojām kā aprakstīts iepriekšējā nodaļā par savienojumu kompleksēšanos ar DNS. Bez seruma vidi lietojām, lai izvairītos no lipopleksu agregācijas ar augšanas vides olbaltumvielām [144]. Pēc 5 stundu inkubēšanas atmazgājām ar šūnām nesaistījušos lipopleksus un atkal pievienojām augšanas vidi ar serumu, inkubējām 2 dienas. Tad nomainām vidi pret bezseruma vidi, pievienojām 10  $\mu$ l MTT, inkubējām 2 stundas, pievienojām (20% SDS un 50% DMF, pH 4,7), inkubējām 24 stundas un mērījām absorbciju pie 570 nm. Mirušo šūnu skaitu izteicām procentos no dzīvo šūnu skaita pret kontroles grupu.



2.8. att. Lipopleksu citotoksicitātes dati noteikti ar MTT testu

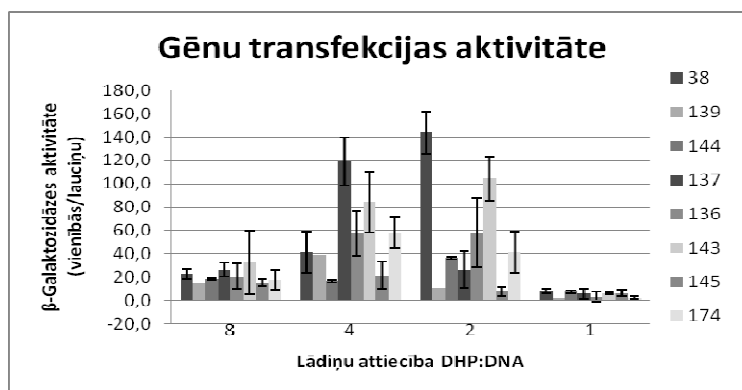
No iegūtajiem citotoksicitātes rezultātiem secinām, ka savienojumi, kuru kompleksiem noteicām citotoksicitāti pie lādiņu attiecības DHP/DNS 2, 1 vai mazāka, uzrāda minimālu toksicitāti - ap 80% izdzīvojušo šūnu, savukārt pie lādiņu attiecības 4 tie sāk kļūst toksiski, bet pie lādiņu attiecības 8 vai lielākas šūnas iet bojā. Pie lādiņu attiecības 4 1,4-DHP atvasinājumi, kuri satur piridīnija ciklus ar elektronakceptoriem aizvietotājiem, uzrādīja zemāku toksicitāti nekā analogi savienojumi ar elektrondonoriem aizvietotājiem piridīnija gredzenā. No šiem datiem varam secināt, ka savienojumu lipopleksi mazās koncentrācijās nav toksiski un, salīdzinot aktīvā savienojuma **38** lipopleksu citotoksicitātes datus pie lādiņu attiecības 4 ar pārējiem savienojumiem, vairums ir pat mazāk toksiski. Augstāku citotoksicitāti uzrādīja vienīgi savienojums **148**, kurā katjonu ienesošā grupa ir 3,5-dimetilpiridīnijs, attiecīgi **38** 28% un **148** 6%. Mazāk citotoksiski pie šīs lādiņu attiecības bija savienojumi **136**, **137**, **148**, **167**, **174** un **175**, jo 80% robežās saglabājās izdzīvojušo šūnu daudzums salīdzinot ar kontroles grupu.

### 2.3.5 Gēnu transfekcija

Mūsu darba mērķis bija iegūt jaunus potenciālus katjonus amfifilus 1,4-DHP atvasinājumus, variējot 1,4-DHP cikla 2,6-vietās esošos piridīnija gredzena aizvietotājus ar dažādiem elektroniskajiem efektiem, un meklēt struktūras-aktivitātes likumsakarības gēnu transfekcijas aktivitātes eksperimentos savienojumu **38**, **136**-



152, 166, 167 rindai. Noteicām savienojumu spēju pārnest  $\beta$ -galaktozidāzes plazmīdu šūnās ar ONPG metodi. Metodes pamatā tiek noteikta enzīma eksistence transfecētājās šūnās, kas nodrošina, *o*-nitrofenilgalaktopiranozīda hidrolīzi par galaktopiranozi un *o*-nitrofenilu. Tālāk ar UV/VIS spektrofotometriski nosaka *o*-nitrofenola daudzumu šūnās, jo intensīvāks krāsojums, jo vairāk šūnas satur enzīmu.



2.9. att. Gēnu transfekcijas aktivitāte katjonajiem amfifilajiem 1,4-DHP atvasinājumiem

Gēnu transfekcijas eksperimentus uzsāk analogi kā citotoksicitātes testu līdz brīdim, kad šūnas tiek inkubētas 2 dienas, pēc nesaistīto lipopleksu atmazgāšanas augšanas vidi noņemām, pievienojām 2% Tritona 100 šķīdumu, lai izjauktu šūnu membrānas, un paraugus sasaldējām  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pēc atkausēšanas spektrofotometriski mēra hidrolizētā ONPG daudzumu pie 405 nm, standartlīknes konstruēšanai lietojot attīrītu  $\beta$ -galaktozidāzi no *E.coli*, lai aprēķinātu  $\beta$ -galaktozidāzes vienību daudzumu transfecētājās šūnās [47]. Savienojumi ar augstāku transfekcijas aktivitāti jau dažu minūšu laikā deva dzeltenu krāsojumu, kas bija pat vizuāli novērojams, savukārt, savienojumi ar zemu aktivitāti iekrāsojās tikai pēc 2 stundām. Dažādos spektrofotometriskos mērījumu laikus izvēlējamies, lai mērījumu rezultāti atrastos standartlīknes vidusdaļā, tāpēc tos veicām pēc 3, 10, 30, 60 un 120 minūtēm.

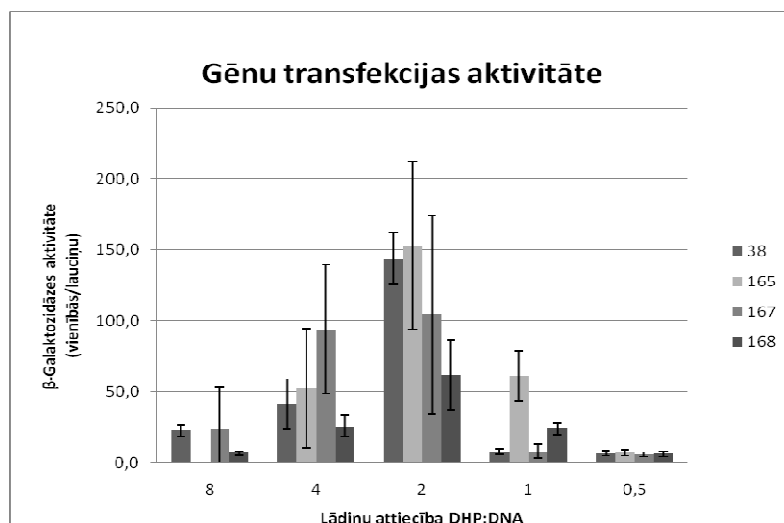
Darbā pārbaudīti vairāk kā 30 dažādi 1,4-DHP atvasinājumi, bet šajā nodaļā atspoguļoti tikai savienojumi, kuri uzrādīja augstāku gēnu transfekcijas aktivitāti par 20  $\beta$ -galaktozidāzes vienībām uz lauciņu. (2.9. attēls). No pārbaudītajām vielām tika atrasti vairāki savienojumi, kas uzrādīja vērā ņemamu gēnu transfekcijas aktivitāti CV1-P šūnu līnijā, tomēr neatradām savienojumu, kas būtu uzrādījis augstāku aktivitāti par savienojumu **38** (2.9. attēls). No iegūtajiem rezultātiem varam secināt,

ka tomēr liela ietekme uz gēnu transfekcijas aktivitāti ir piridīnija gredzena aizvietotājiem. Salīdzinot 1,4-DHP atvasinājumu piridīnija gredzena aizvietotāju elektronisko dabu, jāsecina, ka savienojumi ar elektrondonoriem aizvietotājiem caurmērā uzrādīja augstāku gēnu transfekcijas aktivitāti nekā savienojumi ar elektronakceptoriem aizvietotājiem. Gēnu transfekcijas aktivitāte ir atkarīga arī no aizvietotāja vietas piridīnija ciklā, piemēram, 3-metilpiridīnija atvasinājums **143** ir aktīvāks par 4-metilpiridīni **136** saturošo 1,4-DHP atvasinājumu, bet 3,5-dimetil-**148** vai 3,4-dimetilpiridīnija **149** aizvietotāju saturoši 1,4-DHP atvasinājumi uzrādīja vēl zemāku aktivitāti par savienojumu **136**.

Tāpat svarīgi bija noteikt gēnu transfekcijas aktivitāti savienojumiem, kuriem katjonā daļa saglabāta nemainīga, bet variēts anjons. Iegūtie primārie rezultāti liecina, ka bromīdu apmaiņa pret  $\text{PF}_6$ ,  $\text{BF}_4$  vai  $\text{ClO}_4$  anjoniem ietekmē transfekcijas aktivitāti. Vienādu aktivitāti uzrāda  $\text{Br}$  un  $\text{ClO}_4$  anjonus saturošie 1,4-DHP atvasinājumi (attiecīgi **163** un **38**) pie dažādām lādiņu attiecībām (2.10. attēls), bet zemāku transfekcijas aktivitāti uzrādīja  $\text{PF}_6$  **168** un  $\text{BF}_4$  **165** anjonus saturošie 1,4-DHP savienojumi. Tomēr šie ir tikai pirmie dati par anjona ietekmi uz transfekcijas aktivitāti 1,4-DHP atvasinājumiem un būtu jāmodificē eksperimenta apstākļi vai jādomā par komponentu liposomu pagatavošanu, lai uzlabotu šķīdumu stabilitāti. Papildus eksperimenti būtu nepieciešami arī, lai korektāk varētu salīdzināt savienojumus **38**, **165**, **167** un **168**, jo transfekcijas eksperimenta laikā, kad tiek veidoti kompleksi 1,4-DHP/DNA, novērojām savienojuma agregēšanos un izgulsnēšanos  $\text{ClO}_4$  **165** un  $\text{BF}_4$  **167** gadījumā. Līdz ar to nav precīzu datu par šo savienojumu patieso koncentrāciju šķīdumā un nav īsti korekti salīdzināt savienojumu **165** un **168** uzrādītās gēnu transfekcijas aktivitātes.

Lai arī vairums savienojumu uzrādīja spēju veidot kompleksus ar DNS, gēnu transfekcijas aktivitāti uzrādīja tikai nedaudzi. To skaidrojam, ka pēc lipopleksu izveidošanās, tiem ir jāšķērso šūnu membrāna, kas būtiski var ietekmēt DNS fragmenta transportu uz šūnas kodolu. Arī nākamās bioloģiskās barjeras var būtiski ietekmēt gēnu transfekcijas aktivitāti, kā, piemēram, endosomas izveide, kas neatbrīvojot lipopleksu var novest pie lizosomas izveides un tālākas DNS degradācijas, tāpat var tikt traucēta DNS molekulas atbrīvošanās no lipopleksa. Eksperimentāli nav pierādīts, kura no barjerām samazina transfekcijas efektivitāti. Tomēr

varam domāt, ka jau šajos pirmajos soļos kāds no nosacījumiem netiek izpildīts, bet tas neizslēdz arī citus iemeslus, kas varētu samazināt transfekcijas aktivitāti.



2.10. att. Anjona ietekme uz gēnu transfekcijas aktivitāti savienojumiem 38, 165, 167 un 168

Atgriežoties pie citotoksicitātes datiem, redzam, ka pie lādiņu attiecības 4, 2 vai 1, kur lipopleksi uzrādīja transfekcijas aktivitāti, savienojumi nav citotoksiski. Tas ir ļoti nozīmīgs secinājums, lai turpinātu tālākus pētījumus ar aktīvākajiem savienojumiem. Aplūkojot citotoksicitātes rezultātus un transfekcijas aktivitātes datus, kas apskatīti darbā iepriekš, nedaudz augstāka toksicitāte bija savienojumiem, kas uzrādīja augstāku transfekcijas aktivitāti.

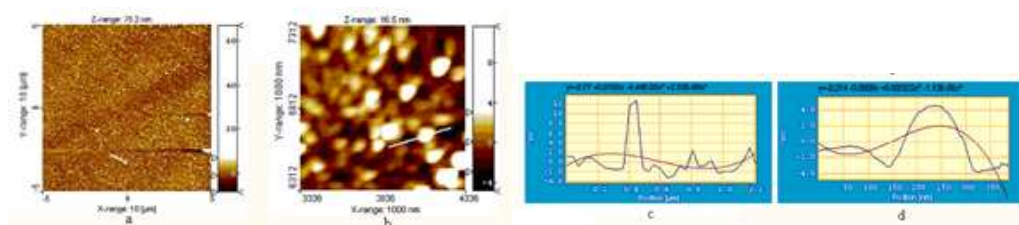
### 2.3.6 Liposomu pētījumi ar atomspēku mikroskopiju

Ne mazāk svarīgi struktūras-aktivitātes sakarību pētījumi ir par katjono amfifilo 1,4-DHP atvasinājumu piridīnija gredzenu aizvietotāju ietekmi uz to veidoto nanoagregātu struktūru. Būtiski saprast, cik lieli un kāda veida nanoagregāti ir veidojušies un kā mainās nanoagregātu struktūras savienojumiem kompleksējoties ar DNS.

Kā jau ievadā tika minēts, viena no pēdējām un modernākajām liposomu pētīšanas un raksturošanas metodēm ir atomspēku mikroskopija, kuru arī pielietojām mūsu paraugu analizēšanai.

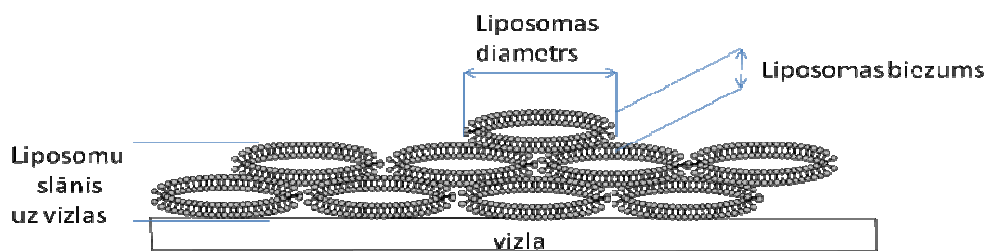
Kā zināms no literatūras, tad polāri amfifili savienojumi ūdens vidē var pašagregēties - veidot nanostruktūras, kuru šķērsgriezumi mērāmi nanometru skalā [34]. Meklējot jaunas iespējas mūsu sintezēto savienojumu nanostruktūru fizikāli ķīmisko īpašību raksturošanai, izmantojām atomspēku mikroskopijas kontaktmetodi, kā arī punktēšanas metodi, kas ir labāk piemērota mīkstu paraugu pētīšanai. Ar šo metožu palīdzību raksturojām agregātu izmērus, kā arī pagatavošanas apstākļu ietekmi uz nodaļiņu izmēriem.

Tas savukārt ļāva salīdzināt literatūras datus par lipopleksu izmēriem, kuri iegūti ar gaismas izkliedes mikroskopu [56] ar eksperimentāli iegūtajiem ASM un EM datiem savienojuma **38** veidotajiem nanoagregātiem.



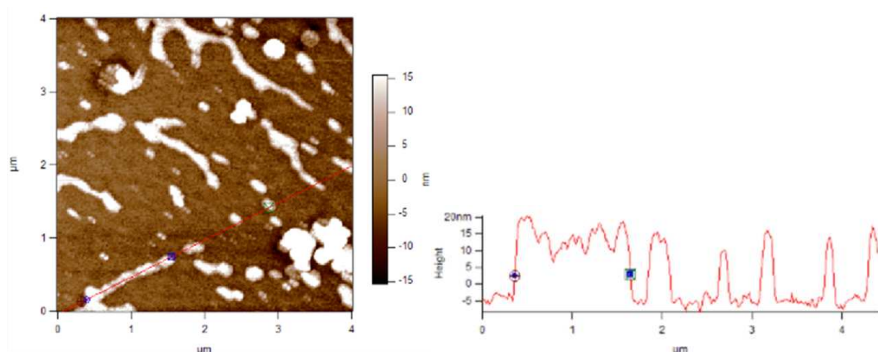
2.11. att. ASM 2D attēls savienojuma **38** veidotajām liposomām uz vizlas (a,b) un to šķērsgriezumi (c,d)

Šajā nodaļā parādīti attēli, kuri iegūti, skenējot parauga virsmu gan ar ASM kontaktmetodi, gan ar punktēšanas metodi. Analizējot ASM datus, jo gaišāks punkts attēlā, jo uz virsmas ir augstāks izcilnis. Lai varētu noteikt atsevišķo liposomu lielumu, apstrādājot iegūtos datus ar datorprogrammas palīdzību, ir iespējams iegūt virsmas šķērsgriezumu pa brīvi izraudzītu nogriezni. Kā redzams ar ASM iegūtajā 2.11. attēlā, liposomu diametru izmēri ir ap 130 nm, kas ir līdzīgi tiem, kas aprakstīti fosfolipīdiem literatūrā [219]. Vēl novērojām, ka savienojuma **38** nanoagregāti ir veidojuši blīvu liposomu slāni, vienīgi nav zināms, vai tas ir mono- vai multiliposomu slānis. Liposomu adsorbciju uz vizlas shematiski varētu attēlot kā parādīts 2.12. attēlā, kurā uz vizlas veidojušies blīvi liposomu slāņi un atsevišķas liposomas virsējā slānī. Tā kā liposomu paraugi gan ASM, gan EM tiek žāvēti, tad tās maina savu formu - lodveida forma deformējas un veidojas saplacinātas lodes formas liposomas.



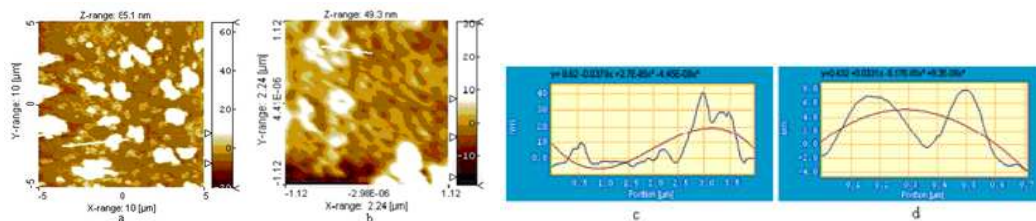
2.12. att. Liposomu adsorbciija uz vizlas un liposomu atspoguļoto izmēru shematisks attēlojums

Atsevišķos eksperimentos novērojām, ka savienojums **38** ir veidojis pavedienveida micellas (2.13. attēls).



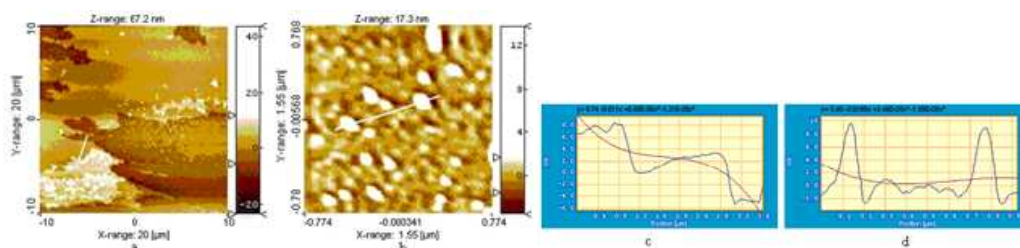
2.13. att. Savienojuma **38** pavedienveida micellas vizualizētas ar ASM punktēšanas metodi

Lai pārbaudītu jaunsintezēto savienojumu spēju veidot liposomas un noteiktu to izmērus, analogi sagatavojām paraugus ar savienojumiem **136**, **137** un **138**, kā aprakstīts 2.3.2. nodaļā.



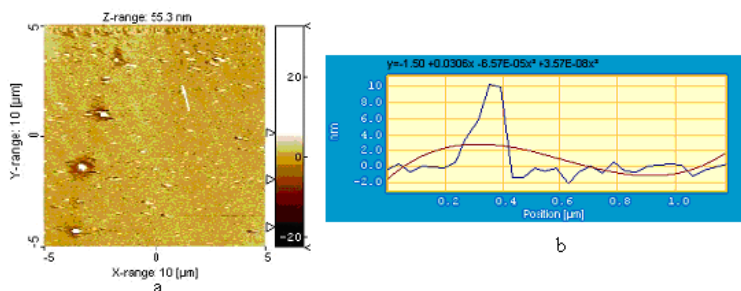
2.14. att. ASM 2D attēls savienojuma **136** veidotajām liposomām uz vizlas (a,b) un to šķērsgriezumi (c,d)

Salīdzinot jaunsintezēto savienojumu iegūtos ASM attēlu rezultātus ar savienojuma **38** datiem, redzam, ka visi paraugi ir 100% pārklājuši vizlu ar blīvu liposomu slāni, uz kura ir redzamas atsevišķas adsorbējušās liposomas, kas ļauj spriest par to izmēriem. Savienojuma **136** veidotās liposomas ir adsorbējušās uz liposomu blīvā slāņa gan atsevišķu liposomu veidā, gan kā vairākas liposomas, kas saistījušās kopā (2.14. attēls).



2.15. att. ASM 2D attēls savienojuma **137** veidotajām liposomām uz vizlas (a,b) un to šķērs griezumi (c,d)

Savienojuma **137** gadījumā novērojām nevienmērīgu liposomu slāņa veidošanos uz vizlas un 2.15. attēlā ir redzams, ka liposomas ir adsorbējušās vairākos slāņos, un ka liposomu monoslāņa biezums ir 10 nm, kas vienāds ar atsevišķo liposomu biezumu. Varam secināt, ka atsevišķo liposomu noteiktais augstums atbilst reālajam liposomu augstumam.



2.16. att. ASM 2D attēls savienojuma **138** veidotajām liposomām uz vizlas (a) un to šķērs griezums (b)

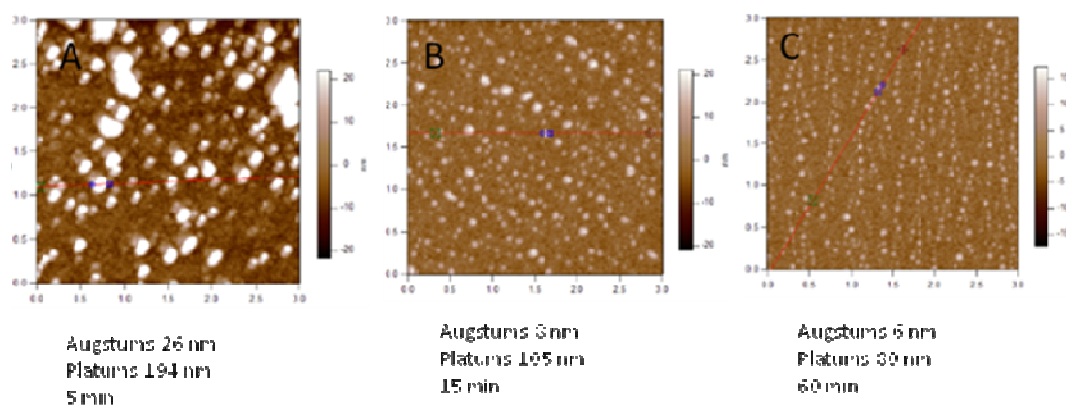
Savienojuma **138** gadījumā liposomas bija veidojušās salīdzinoši viendabīgu blīvu slāni uz vizlas virsmas, bet liposomas bija veidojušās ar lielāku diametru – vidēji 180 nm izmēri (2.16. attēls).

Noteiktie liposomu vidējo diametru izmēri atspoguļoti 2.8. tabulā.

Savienojumu **38**, **136**, **137** un **138** liposomu izmēri

Sav.Nr.	Liposomu vidējie diametru izmēri, nm
<b>38</b>	130
<b>136</b>	110
<b>137</b>	150
<b>138</b>	180

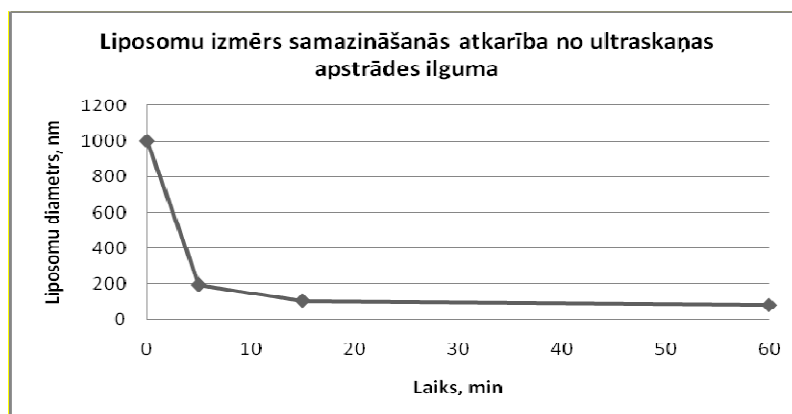
No iegūtajiem rezultātiem par liposomu izmēru atkarību no piridīnija aizvietotāja var novērot, ka, mainoties piridīnija 4-vietas aizvietotājam, mainās savienojumu veidoto liposomu izmēri, liposomas pagatavojot vienādos apstākļos. Tas būtu skaidrojams ar polārās daļas šķērsriezuma laukuma izmaiņu pret lipofilās daļas tilpumu.



2.17. att. ASM 2D attēls savienojuma **38** veidotajām liposomām uz vizlas, variējot sonifikācijas laiku, kurā tiek apstrādāts paraugs

Nanoagregātu pētījumu laikā novērojām, ka liposomu izmēri ir atkarīgi no apstrādes ilguma ar ultraskaņu. Tāpēc veicām eksperimentu ar savienojumu **38**, lai noskaidrotu, kā mainās tā veidoto liposomu izmēri laikā, apstrādājot paraugus ar ultraskaņu. Tātad sākotnēji vielai nonākot ūdenī tā veido multislāņainas liposomas, kuras novērojām pat ar gaismas mikroskopu, tālāk paraugu apstrādājot 5 minūtes ar ultraskaņu ieguvām liposomas vidēji 26 nm augstas un 194 nm platas (2.17. A attēls). Pagarinot ultraskaņas apstrādes laiku līdz 15 minūtēm ieguvām liposomas - 8 nm augstas un 105 nm platas (2.17. B attēls), savukārt, pēc 60 minūšu apstrādes ar

ultraskaņu vairs novērojām būtisku liposomu samazināšanos, vidējie izmēri bija 6 nm augstumā un 80 nm diametrā (2.17. C attēls). Izmantojot iegūtos ASM datus par liposomu šķērsriezumu diametriem no 2.17. A, B un C attēliem un pieņemot, ka ar ultraskaņu neapstrādātu paraugu liposomu izmēri būtu  $\geq 1000$  nm, veidojam grafisku attēlu: uz  $y$  ass atliekot liposomu vidējo diametru (nm), bet uz  $x$  ass laiku (min), cik ilgi paraugi apstrādāti ar ultraskaņu (2.18. attēls).



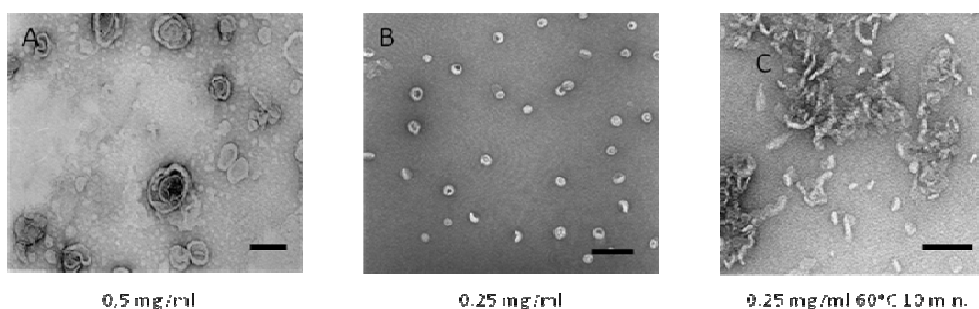
2.18. att. Savienojuma **38** liposomu diametru izmēra izmaiņas atkarībā no paraugu apstrādes ilguma ar ultraskaņu

No iegūtajiem datiem varam secināt, ka savienojumam **38** pastāv minimālā liposomu izmēra robeža. Tāda varētu būt visiem iegūtajiem savienojumiem, un minimālais izmērs būtu atkarīgs no savienojuma pakošanās parametra.

### 2.3.7 Liposomu pētījumi ar elektronmikroskopiju

Lai gūtu pilnīgāku priekšstatu par savienojuma veidotajām nanoagregātu struktūrām, sadarbojoties ar Dr.biol. Veltu Osi no Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra, uzņemti transmisijas-elektronmikroskopijas attēli savienojuma **38** veidotajām liposomām. Liposomu šķīdumus sagatavojām tieši tāpat kā ASM pētījumiem. Pēc iegūtajiem pirmajiem attēliem (2.19. attēls) redzam, ka ir veidojušies dažādas formas nanoagregāti, kas varētu atbilst gan liposomām, gan pavedienvēda, gan daudzslāņainām liposomām.

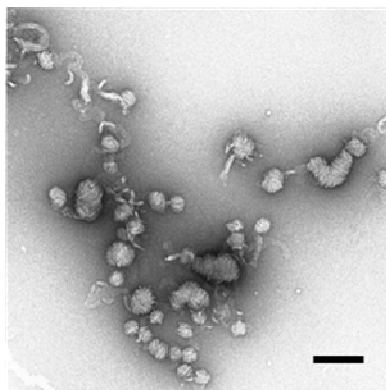




2.19. att. EM attēli savienojuma **38** veidotajiem nanoagregātiem.  
Nogrieznis 100 nm.

Samazinot savienojuma koncentrāciju līdz 0,25 mg/ml novērojām, ka svaigi pagatavotam šķīdumam lielākoties ir pavedienvēda struktūras, bet, ja paraugam EM attēlu uzņem pēc vienas nedēļas, tad novērojām liposomām atbilstošas struktūras. Analizējot tikai EM datus varētu domāt, ka savienojuma kristāliem nonākot ūdenī, tie spontāni veido dažādas formas un veidu liposomas, bet šķīdumu apstrādājot ar ultraskaņu un sildot, agregāti tiek sašķelti mazos fragmentos, kuri no sākuma veido pavedienvēda liposomas, bet ilgākā laika posmā tie tiecas veidot liposomas. Tomēr šāds skaidrojums nesaskan ar ASM iegūtajiem rezultātiem, kuros tikai vienā gadījumā novēroja pavedienvēda struktūras.

Līdz šim 1,4-DHP saturošo gēnu transfekcijas aģentu asociātu struktūras ūdenī bija vizualizētas bez DNS, bet svarīgākais ir - tieši kādas struktūras veido lipoplekss – nevirālais vektors ar DNS, tāpēc pagatavojām savienojuma **38** kompleksu ar DNS plazmīdu tālākiem EM pētījumiem. Kā redzams 2.20. attēlā, tad ir palikušas nedzauz nesaistītas 1,4-DHP atvasinājuma veidotās pavedienvēda micellas, kā arī apaļi veidojumi, kas varētu būt lipopleksi. No literatūras ir zināms, ka savienojums **38**, veidojot kompleksus ar DNS, saista to lipopleksa iekšienē, jo apstrādājot lipopleksus ar etīdija bromīdu pie lādiņu attiecības 4 nenovēro fluorescenci [56]. Ja šķīdumā DNS molekula atrastos brīvā veidā vai saistījusies uz liposomu virsmas, tad EtBr molekula varētu brīvi saistīties (interhalēties) DNS struktūrā.



2.20. att. EM attēls savienojuma 38 un DNS plazmīdas kompleksam.  
Nogrieznis 100 nm.

Salīdzinot ar ASM iegūtajiem datiem par nanoagregātu formu, rodas virkne jautājumu un galvenais no tiem, kādas struktūras nanoagregātus savienojumi veido šķīdumos, jo abās no pielietotajām metodēm EM un ASM paraugi tiek ietvaicēti un nanoagregātus varam aplūkot tikai adsorbējušos uz virsmas.

Rezumējot augstāk aprakstītos datus par nanoagregātu pētījumiem ar mikroskopijas metodēm, varam secināt, ka ASM un EM ir pielietojamas metodes katjono amfifilo 1,4-DHP atvasinājumu veidoto nanoagregātu struktūru pētījumiem, tomēr būtu nepieciešams izmantot arī citas metodes precīzākai nanoagregātu struktūras raksturošanai.

### 3 EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

#### 3.1 Pielietotās metodes un aparatūra

Darbā izmantoti firmu Acros, Alfa Aesar, Sigma, Aldrich un Fluka reaģenti bez papildus attīrīšanas.

Reakcijas norisei sekots un savienojumu tīrības kontrole veikta izmantojot plānslāņa hromatogrāfiju uz Silica gel 60 F254 Alumīnija matricas 20 x 20 cm (Merck) plāksnītēm. Hromatogrammas detektētas ar UV lampu UVLS-28 EL pie 254 un 365 nm.

<sup>1</sup>H KMR spektri reģistrēti ar spektrometru Varian Mercury 200BB (200 MHz) (ASV) - deiterohloroforma (CDCl<sub>3</sub>) vai deiterodimetilsulfoksīda (DMSO-D<sub>6</sub>) šķīdumā, ķīmiskās nobīdes izteiktas miljonajās daļās (m.d.) pret iekšējo standartu heksametildisiloksānu (HDMSO) ( $\delta=0,05$ ). Multiplicitāte apzīmēta: s-singlets, d-dublets, t-triplets, kv-kvartets, kvin-kvintets, m-multiplets, pl-plats; sadarbības konstantes izteiktas hercos (Hz). Reģistrētie spektri apstrādāti ar datorprogrammu MestRe-C 2.3a.

Kušanas temperatūras noteiktas ar „OptiMelt” (SRS Stanford Reseach Systhems, ASV).

Elementanalīze veikta ar automātisko analizatoru „EA 1106” (Carlo Erba Instruments, Itālija) Latvijas Organiskās sintēzes institūta Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijā.

Savienojumu buferkapacitātes noteikšanai izmantoti: pH-metrs ORION 410A mērdiapazons 0 ÷ 14 pH ( $\pm 0,02$ ) un spektrofotometrs UV/Vis Camspec M501, vienstaru aparāts, mērīšanas diapazons 195 nm – 1100 nm. Datu apstrādei izmantota programma UV-VIS Analyst.

Nanoagregātu pagatavošanai izmantota Ultraskaņas iekārta Ultrasonic Processor Cole Parmer© CPX130.

Nanoagregātu struktūras pētītas ar atomspēku mikroskopu (ASM) MFP-3D-BIO.

Nanoagregātu elektronmikroskopijas attēlus ieguva Dr.habil.biol. Velta Ose ar transmisijas elektronmikroskopu JEM 100C Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

Agarozes gēla elektroforēze vizualizēta UV transluminātorā un fotografēta izmantojot programmu Video documentation system (Biometra, bio-Doc II/NT, Göttingen, Vācija).

Gēnu transfekcijas aktivitāte un citotoksicitāte noteikta spektrofotometriski ar automātisko mikroplašu lasītāju ELx 800 (bio-Tek Instruments, Winooski, VT, ASV).

## 3.2 Sintēžu apraksti

### Acetetiķskābes dodecilesteris (120)

*A metode.* Pie 10 ml (0,075 mol) acetetiķskābes etilestera (**118**) pievieno 13,98 g (0,075 mol) dodekanola (**117**). Reakcijas maisījumu karsē 110<sup>0</sup>C eļļas vannā, atdestilējot etanolu. Tad reakcijas maisījumu atdzesē un destilē vakuumā, produktu iegūst kā frakciju pie 8,6 10<sup>-2</sup> mbar un 115-118<sup>0</sup>C. Iegūst 10,45 g (53%) bezkrāsaina šķidrums.

*B metode.* Pie 18,5 ml (0,14 mol) 2,2,6-trimetil-4H-1,3-dioksīn-4-ona (acetona adukta) pievieno 26,08 g (0,14 mol) dodekanola (**117**) un 20 ml toluola. Reakcijas maisījumu iegremdē 140<sup>0</sup>C uzkarstētā eļļas vannā, atdestilē acetonu. Vakuumā ietvaicē toluolu un destilē vakuumā, produktu izdala kā frakciju pie 8,2 10<sup>-2</sup> mbar un 113-117<sup>0</sup>C. Iegūst 29,50 g (78%) bezkrāsaina šķidrums.

<sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,86 (t, 3H, 6,2 Hz); 1,20-1,36 (m, 18H); 1,62 (kvīn, 2H, 6,6 Hz); 2,25 (s, 3H); 3,43 (s, 2H); 4,11 (t, 2H, 6,9 Hz) m.d.

### β-Aminokrotonskābes dodecilesteris (126)

10,00 g (0,037 mol) acetetiķskābes dodecilestera (**120**) šķīdina 50 ml etanola un pievieno (0,11 mol) 15 ml 25 % amonjaka ūdens šķīduma, vāra 4 stundas, atdzesē, filtrē un kristalizē no etanola. Iegūst 5,80 g (58 %) bezkrāsainas kristāliskas

vielas,  $T_{\text{kuš.}}$  88-89<sup>0</sup>C. <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,87 (t, 3H, 6,2 Hz); 1,19-1,36 (m, 18H); 1,61 (kvīn, 2H, 6,59 Hz); 1,90 (s, 3H); 4,03 (t, 2H, 6,5 Hz); 4,52 (s, 1H); 7,87 (pl.s., 2H) m.d.

### **3-Oksi-2-[1-fenilmetilidēn]-butilskābes dodecilesteris (127)**

0,78 g (7,40 mmol) benzaldehīda un 2,00 g (7,40 mmol) acetetiķskābes dodecilestera šķīdina 15 ml izopropanola un 0,10 g (10 mol%) piperidīda acetāta klātienē 24 stundas maisa istabas temperatūrā. Tad ietvaicē šķīdinātāju vakuumā, atlikumu izlej H<sub>2</sub>O un ekstrahē ar CHCl<sub>3</sub> (3x20 ml). CHCl<sub>3</sub> ekstraktus apvieno, mazgā ar H<sub>2</sub>O un piesātinātu NaCl šķīdumu. Žāvē ar b/ū MgSO<sub>4</sub>, nofiltrē un ietvaicē šķīdinātāju vakuumā, iegūst 1,59 g (60%) bezkrāsainas vielas. <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,75 (t, 3H, 6,2 Hz); 1,10-1,56 (m, 20H); 2,26 (s, 3H); 4,16 (t, 2H, 6,2 Hz); 7,26-7,54 (m, 5H); 7,76 (s, 1H) m.d.

### **2,6-Dimetil-3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīns (125)**

*A metode.* Pie 20,00 g (0,074 mol) acetetiķskābes dodecilestera (**120**) pievieno 3,8 ml (0,037 mol) benzaldehīda (**121**) un 4,0 ml (0,110 mol) 25% amonjaka ūdens šķīduma (**122**). Pielej 40 ml etanola un vāra 16 stundas. Pēc tam atdzesē līdz 20<sup>0</sup>C, nofiltrē un 2 reizes kristalizē no etanola, iegūst 11,27 g (21%) viegli dzeltenas kristāliskas vielas,  $T_{\text{kuš.}}$  54-56<sup>0</sup>C.

*B metode.* 5,00 g (0,018 mol) acetetiķskābes dodecilestera (**120**), 1,1 ml (0,009 mol) benzaldehīda (**121**) un 0,86 g (0,009 mol) amonija karbonāta (**124**) izšķīdina 10 ml etanola. Reakcijas maisījumu silda 60<sup>0</sup>C 16 stundas, tad atdzesē līdz 20<sup>0</sup>C, filtrē un 2 reizes kristalizē no etanola. Iegūst 3,02 g (55%) viegli dzeltenas kristāliskas vielas,  $T_{\text{kuš.}}$  54-56<sup>0</sup>C.

*C metode.* 1,00 g (0,004 mol) acetetiķskābes dodecilestera (**120**), 0,2 ml (0,002 mol) benzaldehīda (**121**) un 0,15 g (0,002 mol) amonija acetāta (**123**) izšķīdina 10 ml etanola. Reakcijas maisījumu silda 60<sup>0</sup>C 24 stundas, pievieno vēl 7 ml etanola, atdzesē līdz 20<sup>0</sup>C, filtrē un 2 reizes kristalizē no etanola. Iegūst 0,65 g (37%) viegli dzeltenas kristāliskas vielas,  $T_{\text{kuš.}}$  54-56<sup>0</sup>C.

*D metode.* 360 mg (1,00 mmol) 3-oksi-2-[1-fenilmetilidēn]-butilskābes dodecilestera (**127**) un 270 mg (1,00 mmol) β-aminokrotonskābes dodecilestera (**126**) šķīdina 5,0 ml dietilēnglikola, pievieno 18 mg (0,10 mmol) 4-metil-1-butilpiridīnija bromīda. Reakcijas maisījumu karsē 80<sup>0</sup>C 8 stundas, tad izlej uz ledus un ekstrahē ar

etilacetātu (3x20 ml). Organisko slāni žāvē ar b/ū MgSO<sub>4</sub>, tad ietvaicē vakuumā un kristalizē no etanola. Iegūst 440 mg (72%) viegli dzeltenīgas kristāliskas vielas, T<sub>kuš</sub> 54-56<sup>0</sup>C. Pārējās metodes modifikācijas, kuras deva zemākus produkta iznākus, skatīt 2.1. tabulā (Nr 2-6).

*E metode.* 10,80 g (39,9 mmol) β-aminokrotonskābes dodecilestera (**126**) un 2,16 g, (20,40 mmol) benzaldehīda (**121**) šķīdina 40 ml metanola un 10 ml etiķskābes maisījuma, vāra 8 stundas, tad atdzesē un nogulsnes filtrē, kristalizē no etanola. Iegūst 7,80 g (64%) viegli dzeltenas kristāliskas vielas, T<sub>kuš</sub>. 54-56<sup>0</sup>C. Pārējās metodes modifikācijas, kuras deva zemākus produkta iznākus, skatīt 2.1. tabulā (Nr 8-13).

<sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,88 (t, 6H, 6,2 Hz); 1,18-1,34 (m, 36H); 1,50-1,65 (m, 4H); 2,33 (s, 6H); 4,02 (t, 4H, 6,2 Hz); 4,99 (s, 1H); 5,56 (s, 1H); 7,10-7,30 (m, 5H) m.d. C<sub>39</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>4</sub> Aprēķināts: C 76,80; H 10,41; N 2,30%. Noteikts: C 76,78; H 10,50; N 2,27%.

#### **1,4-Bis-(3',5'-didodeciloksikarbonil-2',6'-dimetil-1',4'-dihidropiridīn)-benzols (130)**

5,00 g (0,018 mol) acetetiķskābes dodecilestera (**120**) un 0,62 g (0,005 mol) tereftālskābes dialdehīda (**128**) izšķīdina 30 ml etanola un vāra 78 stundas. Sākumā pievieno 5,0 ml 25% amonjaka ūdens šķīduma (**122**) un tad ik pēc 2 stundām vēl divas reizes pa 2,0 ml 25% amonjaka ūdens šķīduma. Atdzesē, filtrē, kristalizē 3 reizes no etanola. Iegūst 1,58 g (30%) viegli dzeltenas kristāliskas vielas, T<sub>kuš</sub>. 79-81<sup>0</sup>C. <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,83 (t, 12H, 7,3 Hz); 1,14-1,29 (m, 72H); 1,40-1,52 (m, 8H); 2,20 (s, 12H); 3,80-3,92 (m, 8H); 4,76 (s, 2H); 6,93 (s, 4H); 8,78 (pl.s, 2H) m.d. C<sub>72</sub>H<sub>120</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> x 3H<sub>2</sub>O. Aprēķināts: C 72,32; H 10,62; N 2,34%. Noteikts: C 72,74; H 10,83; N 2,45%.

#### **2,6-Di(brommetil)-3,5-di(etoksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīns (94),**

#### **2,6-di(brommetil)-3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīns (132)**

0,001 mol atbilstošā 2,6-dimetil-3,5-di(alkoksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīna šķīdina 70 ml metanola, atdzesē līdz 0<sup>0</sup>C, maisot pa nelielām porcijām pievieno 0,36 g (0,002 mol) N-bromsukcīnimīda, pēc 1 stundas dzesēšanu pārtrauc un

turpina maisīt 24 stundas istabas temperatūrā. Atzdesē līdz 4<sup>0</sup>C, filtrē un uz filtra nogulsnes mazgā ar aukstu ūdeni.

**94:** iznākums 78%, T<sub>kuš.</sub> 122-123<sup>0</sup>C (Lit. dati. 41% T<sub>kuš.</sub> 121-123<sup>0</sup>C [156]). <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,14 (t, 6H, 7,0 Hz); 3,99 (kv, 4H, 7,0 Hz); 4,55 un 4,65 (AB-kv, 4H, 9,4 Hz); 4,87 (s, 1H); 7,09-7,23 (m, 5H); 5,65 (pl.s, 1H) m.d.

**132:** iznākums 72%, T<sub>kuš.</sub> 87-90<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,88 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,21-1,33 (m, 36H); 1,61-1,67 (m, 4H); 4,00 (t, 4H, 6,6 Hz); 4,62 un 4,91 (AB-kv, 4H, 11,4 Hz); 5,02 (s, 1H); 6,57 (s, 1H); 7,17-7,30 (m, 5H) m.d. C<sub>39</sub>H<sub>61</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>4</sub> Aprēķināts: C 61,02; H 8,01; N 1,82%. Noteikts: C 61,23; H 8,04; N 1,73%.

#### **1,4-Bis[1,4-dihidro-2,6-di(brommetil)-3,5-di(dodeciloksikarbonil)-piridin-4-il]benzols (133)**

1,94 g (1,70 mmol) 1,4-bis-(3',5'-didodeciloksikarbonil-2',6'-dimetil-1',4'-dihidropiridīn)benzola (**130**) suspensijai 100 ml metanola maisot pa porcijām pievieno 7,80 mmol atbilstošā bromējošā aģenta (N-bromsukcīnimīda (*A metode*) vai 1,3-dibrom-5,5-dimetilhidantoīna (*B metode*)) istabas temperatūrā. Maisa 100 stundas, 2/3 metanola ietvaicē, pievieno 20 ml ūdens līdz maisījums sāk duļķoties, ūdeni un metanolu dekantē. Iegūto eļļu žāvē. Iegūst dzeltenīgus, nestabilus kristālus, kas viegli saista mitrumu, pārvēršas eļļā un sabrūk, vielai kļūstot tumšākai. Iegūst 0,49 g (20% - *A metode*) vai 1,21 g (49% - *B metode*) eļļveidīgu vielu. <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,88 (t, 12H, 6,2 Hz); 1,22-1,28 (m, 72H); 1,53-1,61 (m, 8H); 4,05 (m, 8H); 4,56 un 4,93 (AB-kv, 8H, 11,4 Hz); 4,98 (s, 2H); 6,48 (pl.s, 2H); 7,06 (s, 4H) m.d.

#### **2,6-Di(brommetil)-4-fenil-3,5-dietoksikarbonilpiridīns (135)**

*A metode.* 0,19 g (0,60 mmol) 2,6-Dimetil-4-fenil-3,5-dietoksikarbonilpiridīna (**134**) izšķīdina 10 ml etiķskābes un pievieno 0,06 ml (1,2 mmol) broma. Reakcijas maisījumu karsē 50<sup>0</sup>C 5 stundas, atzdesē līdz istabas temperatūrai un pievieno 20 ml H<sub>2</sub>O un ekstrahē ar CHCl<sub>3</sub> (3x10 ml). Apvienoto organisko fāzi žāvē ar b/ū MgSO<sub>4</sub> un ietvaicē vakuumā, kristalizē no etanola. Iegūst 0,15 g (54%) bezkrāsainas kristāliskas vielas.

*B metode.* 0,20 g (0,40 mmol) 2,6-Di(brommetil)-3,5-di(etoksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīna (**94**) izšķīdina 10 ml līdz 50<sup>0</sup>C uzsildītas etiķskābes, karsēšanu pārtrauc un maisot pievieno 0,17 g (2 mmol) nātrija nitrāta 4 porcijās. Pēc 90 min. reakcijas maisījumu izlej ledus ūdenī un ekstrahē ar CHCl<sub>3</sub> (3x10 ml). Apvienoto organisko fāzi žāvē ar b/ū MgSO<sub>4</sub> un ietvaicē vakuumā, tad kristalizē no etanola. Iegūst 0,12 g (60%) bezkrāsainas kristāliskas vielas.

T<sub>kuš.</sub> 80-81<sup>0</sup>C. <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,88 (t, 6H, 7,1 Hz); 4,01 (kv, 4H, 7,1 Hz); 4,09 (s, 4H); 7.25-7.38 (m, 5H) m.d. C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>4</sub> Aprēķināts: C 47,02; H 3,95; N 2,89%. Noteikts: C 47,07; H 3,85; N 2,89%.

**1,1'-[(3,5-Di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija dibromīds (38),**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-metilpiridīnija) dibromīds (136),**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-dimetilaminopiridīnija) dibromīds (137),**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-cianopiridīnija) dibromīds (138),**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-tert-butilpiridīnija) dibromīds (139),**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-acetilpiridīnija) dibromīds (140)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-karbamoilpiridīnija) dibromīds (141)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-aminopiridīnija) dibromīds (142)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3-metilpiridīnija) dibromīds (143)**



**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3-fenilpiridīnija) dibromīds (144)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3-aminopiridīnija) dibromīds (145)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3-acetilpiridīnija) dibromīds (146)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3-karbamoilpiridīnija) dibromīds (147)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3,5-dimetilpiridīnija) dibromīds (148)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3,4-dimetilpiridīnija) dibromīds (149),**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispirazīnija dibromīds (150)**

**1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bisizohinolīnija dibromīds (151)**

0,41 mmol 2,6-di(brommetil)-3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīna (**132**) izšķīdina 3,0 ml acetona, pievieno 0,82 mmol atbilstošā piridīna atvasinājuma, maisa 24-48 stundas istabas temperatūrā, atdzesē līdz  $-20^{\circ}\text{C}$ , nogulsnes filtrē, mazgā ar acetonu, kristalizē no etanola. Reakcijas laikus un savienojumu elementanalīzes datus skatīt 2.2. tabulā.

**38:** iznākums 78%,  $T_{\text{sad.}} 135^{\circ}\text{C}$  (Lit. dati. 41%  $T_{\text{sad.}} 157^{\circ}\text{C}$  [54]),  $^1\text{H}$  KMR spektrs ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,88 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,22-1,30 (m, 36H); 1,62 (t, 4H, 6,6 Hz); 4,04 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,10 (s, 1H); 5,89 un 6,40 (AB-kv, 4H, 13,5 Hz); 7,17-7,40 (m, 5H); 8,27 (d.d, 4H, 6,4 un 6,4 Hz); 8,60 (t, 2H, 6,4 Hz); 9,34 (d, 4H, 6,4 Hz); 10,95 (pl.s, 1H) m.d.

**136:** iznākums 68%,  $T_{\text{sad.}} 135^{\circ}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  KMR spektrs ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,88 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,22-1,30 (m, 36H); 1,62 (t, 4H, 6,6 Hz); 2,71 (s, 6H); 4,04 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,08

(s, 1H); 5,84 un 6,24 (AB-kv, 4H, 13,7 Hz); 7,17-7,32 (m, 5H); 8,00 (d, 4H, 6,3 Hz); 9,06 (d, 4H, 6,3 Hz); 10,88 (pl.s, 1H) m.d.

**137:** iznākums 65%,  $T_{\text{sad.}}$  115<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,87 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,16-1,35 (m, 36H); 1,51-1,71 (m, 4H); 3,22 (s, 12H); 4,04 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,04 (s, 1H); 5,45 un 5,82 (AB-kv, 4H, 13,6 Hz); 8,01 (d, 4H, 8,1 Hz); 7,18-7,31 (m, 5H); 8,36 (d, 4H, 8,1 Hz); 10,61 (pl.s, 1H) m.d.

**138:** iznākums 34%,  $T_{\text{sad.}}$  150<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,88 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,23-1,32 (m, 36H); 1,63 (t, 4H, 6,6 Hz); 3,99 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,04 (s, 1H); 6,10 un 6,33 (AB-kv, 4H, 13,9 Hz); 7,15-7,32 (m, 5H); 8,43 (d, 4H, 6,5 Hz); 9,78 (d, 4H, 6,5 Hz); 10,78 (pl.s, 1H) m.d.

**139:** iznākums 30%,  $T_{\text{sad.}}$  120<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,83 (t, 6H, 6,3 Hz); 1,16-1,23 (m, 36H); 1,34 (s, 18H); 1,40-1,55 (m, 4H); 3,96 (t, 4H, 5,9 Hz); 4,97 (s, 1H); 5,62 un 5,94 (AB-kv, 4H, 14,7 Hz); 7,14-7,23 (m, 5H); 8,14 (d, 4H, 6,6 Hz); 8,93 (d, 4H, 6,6 Hz); 10,39 (pl.s, 1H) m.d.

**140:** iznākums 35%,  $T_{\text{sad.}}$  156<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,83 (t, 6H, 6,2 Hz); 1,16-1,27 (m, 36H); 1,42-1,50 (m, 4H); 2,72 (s, 6H); 3,96 (t, 4H, 5,9 Hz); 4,99 (s, 1H); 5,66 un 6,10 (AB-kv, 4H, 14,7 Hz); 7,16-7,34 (m, 5H); 8,41 (d, 4H, 6,6 Hz); 9,17 (d, 4H, 6,6 Hz); 10,32 (pl.s, 1H) m.d.

**141:** iznākums 45%,  $T_{\text{sad.}}$  240<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,15-1,25 (m, 36H); 1,40-1,52 (m, 4H); 3,95 (t, 4H, 6,6 Hz); 4,98 (s, 1H); 5,66 un 6,05 (AB kv, 4H, 14,7 Hz); 7,22-7,27 (m, 5H); 8,31 un 8,70 (2xpl.s, 2x2H); 8,38 (d, 4H, 5,1 Hz); 9,16 (d, 4H, 5,1 Hz); 10,33 (pl.s, 1H) m.d.

**142:** iznākums 50%,  $T_{\text{sad.}}$  213<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,82 (t, 6H, 5,9 Hz); 1,20-1,23 (m, 36H); 1,47-1,52 (m, 4H); 3,97 (t, 4H, 5,9 Hz); 4,96 (s, 1H); 5,11 un 5,58 (AB-kv, 4H, 14,6 Hz); 6,74 (d, 4H, 6,8 Hz); 7,16-7,23 (m, 5H); 8,07 (d, 4H, 6,8 Hz); 8,13 (pl.s., 4H); 10,01 (pl.s, 1H) m.d.

**143:** iznākums 65%,  $T_{\text{sad.}}$  160<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,21-1,23 (m, 36H); 1,41-1,56 (m, 4H); 2,43 (s, 6H); 3,98 (t, 4H, 5,9 Hz); 5,00 (s, 1H); 5,52 un 6,07 (AB-kv, 4H, 14,6 Hz); 7,19-7,32 (m, 5H); 7,98 (d.d, 2H,

8,1 un 5,8 Hz); 8,42 (d, 2H, 8,1 Hz); 8,78 (d, 2H, 5,9 Hz); 8,81 (s, 2H); 10,22 (pl.s, 1H) m.d.

**144:** iznākums 60%,  $T_{\text{sad.}}$  183<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,16-1,27 (m, 36H); 1,38-1,54 (m, 4H); 4,00 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,04 (s, 1H); 5,67 un 6,18 (AB-kv, 4H, 13,3 Hz); 7,19-7,32 (m, 3H); 7,53-7,59 (m, 7H); 7,72-7,79 (m, 5H); 8,01-8,08 (m, 2H); 8,77-8,87 (m, 4H); 9,34 (s, 2H); 10,34 (pl.s, 1H) m.d.

**145:** iznākums 54%,  $T_{\text{sad.}}$  198<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,20-1,26 (m, 36H); 1,48-1,58 (m, 4H); 4,00 (t, 4H, 5,9 Hz); 5,03 (s, 1H); 5,34 un 5,96 (AB-kv, 4H, 14,6 Hz); 6,67 (pl.s, 4H); 7,21-7,28 (m, 5H); 7,51-7,65 (m, 4H, pārklājas); 7,97 (d, 2H, 5,1 Hz); 8,03 (s, 2H); 10,17 (pl.s, 1H) m.d.

**146:** iznākums 36%,  $T_{\text{sad.}}$  155<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,2 Hz); 1,13-1,30 (m, 36H); 1,42-1,60 (m, 4H); 2,71 (s, 6H); 3,98 (t, 4H, 5,9 Hz); 4,99 (s, 1H); 5,73 un 6,15 (AB-kv, 4H, 14,7 Hz); 7,18-7,31 (m, 5H); 8,2 (d.d, 2H, 8,1 un 6,6 Hz); 9,02 (d, 2H, 8,1 Hz); 9,09 (d, 2H, 6,6 Hz, pārklājas); 9,11 (s, 2H, pārklājas); 9,84 (pl.s, 1H) m.d.

**147:** iznākums 52%,  $T_{\text{sad.}}$  170<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 5,9 Hz); 1,14-1,28 (m, 36H); 1,42-1,52 (m, 4H); 3,97 (t, 4H, 5,9 Hz); 4,99 (s, 1H); 5,61 un 6,14 (AB-kv, 4H, 14,7 Hz); 7,21-7,31 (m, 5H); 8,16 (d.d, 2H, 6,6 un 8,1 Hz); 8,20 un 8,57 (2xpl.s, 2x2H); 8,92 (d, 2H, 8,1 Hz); 9,00 (d, 2H, 6,6 Hz); 9,34 (s, 2H); 10,12 (pl.s, 1H) m.d.

**148:** iznākums 64%,  $T_{\text{sad.}}$  140<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,22-1,30 (m, 36H); 1,43-1,60 (m, 4H); 2,38 (s, 12H); 3,98 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,00 (s, 1H); 5,88 un 6,03 (AB-kv, 4H, 13,5 Hz); 7,18-7,33 (m, 5H); 8,31 (s, 2H); 8,65 (s, 4H); 10,21 (pl.s, 1H) m.d.

**149:** iznākums 47%,  $T_{\text{sad.}}$  172<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,2 Hz); 1,16-1,27 (m, 36H); 1,40-1,56 (m, 4H); 2,33 (s, 6H); 2,48 (s, 6H, pārklājas); 3,96 (t, 4H, 5,9 Hz); 4,99 (s, 1H); 5,45 un 5,94 (AB-kv, 4H, 14,7 Hz); 7,18-7,34 (m, 5H); 7,85 un 8,61-8,71 (m, 4H); 8,69 (m, 2H); 10,20 (pl.s, 1H) m.d.

**150:** iznākums 17%,  $T_{\text{sad.}}$  185<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,88 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,23-1,32 (m, 36H); 1,42-1,58 (m, 4H); 3,98 (t, 4H, 6,2 Hz); 4,99 (s, 1H);

5,62 un 6,18 (AB-kv, 4H, 15,0 Hz); 7,18-7,33 (m, 5H); 9,14 (d, 4H, 4,4 Hz); 9,54 (d, 4H, 4,4 Hz); 10,13 (pl.s, 1H) m.d.

**151:** iznākums 34%,  $T_{\text{sad.}}$  165<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,83 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,06-1,21 (m, 36H); 1,38-1,52 (m, 4H); 3,99 (t, 4H, 5,8 Hz); 5,08 (s, 1H); 5,58 un 6,28 (AB-kv, 4H, 15,0 Hz); 7,17-7,41 (m, 5H); 7,87-8,01 (m, 2H); 8,10-8,19 (m, 4H); 8,30-8,38 (m, 4H); 8,54 (d, 2H, 7,3 Hz); 9,82 (s, 2H); 10,18 (pl.s, 1H) m.d.

**1,4-Bis[1,4-dihidro-2,6-di(piridīn-1-iummetil)-3,5-di(dodeciloksi-karbonil)-piridīn-4-il]benzola tetrabromīds (152)**

0,02 g (0,14 mmol) 1,4-Bis[1,4-dihidro-2,6-di(brommetil)-3,5-di(dodeciloksi-karbonil)-piridīn-4-il]benzola (**130**) izšķīdina 10 ml acetona, pievieno 0,05 ml (0,60 mmol) piridīna, maisa 72 stundas istabas temperatūrā, atdzesē līdz -4 °C, iegūtās nogulsnes filtrē, uz filtra mazgā ar aukstu acetonu, kristalizē no acetona. Iegūst 0,08 g (30%) dzeltenīgas kristāliskas vielas,  $T_{\text{sad.}}$  186<sup>0</sup>C. <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,83 (t, 12H, 6,6 Hz); 1,16-1,30 (m, 72H); 1,42-1,60 (m, 8H); 3,80-4,01 (m, 8H); 4,96 (s, 2H); 5,52 un 6,19 (AB-kv, 8H, 15,4 Hz); 7,22 (s, 4H); 8,06 (d.d, 8H, 6,6 un 5,9 Hz); 8,56 (t, 4H, 6,6 Hz); 8,95 (d, 8H, 5,9 Hz); 10,34-10,44 (pl.s, 2H) m.d. C<sub>92</sub>H<sub>136</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Br<sub>4</sub>x4H<sub>2</sub>O Aprēķināts: C 60,46; H 7,83; N 4,60%. Noteikts: C 60,36; H 7,72; N 4,34%.

**4-[2-(4-Dimetilaminofenil)etēnil]piridīns (160), 4-[2-(4-hidroksifenil)-etēnil]piridīns (161)**

1,81 ml (0,02 mol) 4-metilpiridīna un 0,02 mol atbilstošā aldehīda (**157** vai **158**) šķīdina 3,6 ml (0,02 mol) etiķskābes anhidrīda un vāra 16 stundas. Tad reakcijas maisījumu izlej ledus ūdenī un pievieno 40% NaOH šķīdumu līdz bāziskai videi. Nogulsnes filtrē un kristalizē no metanola, iegūst:

**160:** iznākums 40%,  $T_{\text{kuš.}}$  164-165<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 3,00 (s, 6H); 6,71 (d, 2H, 8,8 Hz); 6,79 (d, 1H, 16,1 Hz); 7,25 (d, 1H, 16,1 Hz); 7,32 (d, 2H, 5,1 Hz); 7,40 (d, 2H, 8,8 Hz); 8,51 (d, 2H, 5,1 Hz) m.d.

**161:** iznākums 35%,  $T_{\text{kuš.}}$  159-163<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 7,11 (d, 2H, 8,8 Hz); 7,15 (d, 1H, 16,1 Hz); 7,48 (d, 1H, 16,1 Hz); 7,53 (d, 2H, 5,8 Hz); 7,65 (d, 2H, 8,8 Hz); 8,45 (d, 2H, 5,8 Hz) m.d.

**1,1'-[(3,5-Di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-(4-dimetilaminostiril)piridīnija) dibromīds (163), 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-(4-hidroksistiril)piridīnija) dibromīds (164)**

*A metode.* 0,50 g (0,52 mmol) 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-metilpiridīnija) dibromīda (**136**) izšķīdina 5,0 ml metanola pievieno 0,15 g (1,04 mmol) 4-dimetilaminobenzaldehīda un 2 pilienus piperidīna, vāra 16 stundas. Atdziest līdz 20<sup>0</sup>C, filtrē un uz filtra mazgā ar aukstu acetonu, tad kristalizē no etanola.

*B metode.* 0,31 g (0,41 mmol) 2,6-di(brommetil)-3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīna (**132**) izšķīdina 3,0 ml acetona, pievieno 0,82 mmol atbilstošā piridīna atvasinājuma 4-[2-(4-dimetilaminofenil)etēnil]piridīna (**160**) vai 4-[2-(4-hidroksifenil)etēnil]piridīna (**161**), maisa 72 stundas istabas temperatūrā, atdziest līdz -20<sup>0</sup>C, nogulsnes filtrē, mazgā ar acetonu, kristalizē no etanola, iegūst:

**163:** iznākums 0,08g (17%), sarkana kristāliska viela, T<sub>sad.</sub> 185<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,87 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,22-1,30 (m, 36H); 1,62 (m, 4H); 3,02 (s, 12H); 3,98 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,1 (s, 1H); 5,75 un 6,12 (AB-kv, 4H, 13,7 Hz); 6,83 (d, 4H, 8,8 Hz); 6,95 (d, 2H, 16,1 Hz); 7,17-7,32 (m, 5H); 7,45 (d, 2H, 16,1 Hz); 7,35 (d, 4H, 5,1 Hz); 7,40 (d, 4H, 8,8 Hz); 8,51 (d, 4H, 5,1 Hz); 10,24 (pl.s. 1H) m.d.

**164:** iznākums 0,19 g (39%), dzeltena kristāliska viela, T<sub>sad.</sub> 140<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,87 (t, 6H, 6,8 Hz); 1,21-1,29 (m, 36H); 1,62 (m, 4H); 4,01-4,20 (m, 4H); 5,14 (s, 1H); 5,41 un 6,42 (AB-kv, 4H, 14,1 Hz); 6,92 (d, 4H, 8,6 Hz); 7,07 (d, 2H, 16,1 Hz); 7,18-7,36 (m, 5H); 7,57 (d, 4H, 8,6 Hz); 8,23 (d, 2H, 16,1 Hz); 8,31 (d, 4H, 6,4 Hz); 8,65 (d, 4H, 6,4 Hz); 10,86 (pl.s. 1H) m.d.

**1,1'-[(3,5-Di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija diperhlorāts (165), 1,1'-[(3,5-di(etoksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija diperhlorāts (166)**

0,20 mmol atbilstošā 1,1'-[(3,5-dialkoksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]bispiridīnija dibromīda sildot šķīdina 10 ml etanola, pievieno 1,0 ml perhlorskābes (57%) (molārās attiecības 1:30). Šķīdumu maisa istabas

temperatūrā dienu. Pēc tam atdzesē līdz 0<sup>0</sup>C un filtrē, uz filtra skalo ar etanolu un ēteri, žāvē vakuumā 40<sup>0</sup>C.

**165:** iznākums 73%, T<sub>sad.</sub> 132<sup>0</sup>C. <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,2 Hz); 1,13-1,30 (m, 36H); 1,43-1,54 (m, 4H); 3,98 (t, 4H, 5,8 Hz); 5,01 (s, 1H); 5,46 un 6,07 (AB-kv, 4H, 14,6 Hz); 7,19-7,31 (m, 5H); 8,06 (d.d, 4H, 6,6 un 8,1 Hz); 8,56 (t, 2H, 8,1 Hz); 8,88 (d, 4H, 6,6 Hz); 9,90 (pl.s, 1H) m.d. C<sub>49</sub>H<sub>71</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> x H<sub>2</sub>O. Aprēķināts: C 59,87; H 7,48; N 4,27% Noteikts: C 60,20; H 7,46; N 4,30%.

**166:** iznākums 64%, T<sub>sad.</sub> 241<sup>0</sup>C. <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 1,08 (t, 6H, 7,3 Hz); 4,04 (kv, 4H, 7,3 Hz); 5,00 (s, 1H); 5,46 un 6,05 (AB-kv, 4H, 14,6 Hz); 7,26-7,31 (m, 5H); 8,07 (d.d, 4H, 8,1 un 5,9 Hz); 8,56 (t, 2H, 8,1 Hz); 8,88 (d, 4H, 5,9 Hz); 9,84 (pl.s, 1H) m.d. C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> x H<sub>2</sub>O. Aprēķināts: C 49,58; H 4,73; N 5,98% Noteikts: C 49,52; H 4,58; N 5,91%.

**1,1'-[(3,5-Bis(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija ditetrafluorborāts (167)**

200 mg (0,22 mmol) 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija dibromīda (**38**) šķīdina 8,0 ml acetonitrila, pievieno 45 mg (0,43 mmol) NH<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>. Reakcijas maisījums saduļķojas. Maisa istabas temperatūrā 2,5 dienas, atdzesē līdz 0<sup>0</sup>C. Radušās KBr nogulsnes filtrē, šķīdinātāju ietvaicē vakuumā, atlikumu pārkristalizē no etanola, filtrē, uz filtra mazgā ar etanolu, ēteri, žāvē augstvakuumā. Iegūst 140 mg (69%) bezkrāsainas pulverveida vielas. T<sub>sad.</sub> 160<sup>0</sup>C. <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,84 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,18-1,24 (m, 36H); 1,44-1,55 (m, 4H); 3,98 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,00 (s, 1H); 5,47 un 6,06 (AB-kv, 4H, 13,5 Hz); 7,20-7,33 (m, 5H); 8,07 (t, 4H, 6,4 Hz); 8,56 (t, 2H, 6,4 Hz); 8,88 (d, 4H, 6,4 Hz); 9,93 (pl.s, 1H) m.d. C<sub>49</sub>H<sub>71</sub>B<sub>2</sub>F<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O. Aprēķināts: C 61,43; H 7,69; N 4,39% Noteikts: C 61,31; H 7,69; N 4,44%.

**1,1'-[(3,5-Di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija diheksafluorfosfāts (168)**

200 mg (0,22 mmol) 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija dibromīda (**38**) maisot šķīdina 50 ml THF, pievieno 1,0 ml CHCl<sub>3</sub>. Pievieno 87,5 mg (0,48 mmol) KPF<sub>6</sub>, iegūto suspensiju maisa istabas temperatūrā 3 dienas, tad atdzesē līdz 0<sup>0</sup>C, filtrē KBr piemaisījumu.

Ietvaicē vakuumā 2/3 šķīdinātāja, atlikušo atdzesē līdz 0°C, filtrē, kristalizē no EtOH. Žāvē augstvakuumā, iegūst 170 mg (75%) bezkrāsainas pulverveida vielas,  $T_{\text{sad.}}$  180°C.  $^1\text{H}$  KMR spektrs (DMSO- $\text{D}_6$ ,  $\delta$ ): 0,84 (t, 6H, 6,6 Hz); 1,19-1,26 (m, 36H); 1,44-1,55 (m, 4H); 3,98 (t, 4H, 6,6 Hz); 5,00 (s, 1H); 5,51 un 6,07 (AB-kv, 4H, 13,5 Hz); 7,21-7,32 (m, 5H); 8,07 (t, 4H, 6,4 Hz); 8,56 (t, 2H, 6,4 Hz); 8,92 (d, 4H, 6,4 Hz); 10,08 (pl.s, 1H) m.d. Elementanalīzes dati: aprēķināti ar 1,6% ūdens un 5% neorganisko piemaisījumu.  $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{F}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ . Aprēķināts: C 52,06; H 6,51; N 3,72% Noteikts: C 51,88; H 6,35; N 3,58%.

### **1,1'-[(3,5-Dietoksikarbonil)-4-fenilpiridīn-2,6-diil]dimetilēn-bispiridīnija dibromīds (154)**

*A metode: Savienojuma 153 oksidēšana ar NBS.* 0,25 g (0,39 mmol) savienojuma **153** šķīduma metanolā (10 ml) pievieno 0,18 g (1 mmol) NBS, reakcijas maisījumu maisa 10 stundas 70°C. Pēc atdzesēšanas līdz istabas temperatūrai, šķīdinātāju ietvaicē vakuumā, atlikumu apstrādā ar heksāna/etilacetāta maisījumu (1:1). Nogulsnes filtrē un pārkristalizē no etanola, iegūstot 0,12 g (48%) savienojumu **154** kā bezkrāsainu pulverveida vielu.  $T_{\text{sad.}}$  163°C,  $^1\text{H}$  KMR spektrs (DMSO- $\text{D}_6$ ,  $\delta$ ): 0,80 (t, 6H, 6,8 Hz); 4,02 (kv, 4H, 6,8 Hz); 6,14 (s, 4H); 7,17-7,21 (m, 2H); 7,51-7,56 (m, 3H); 8,02 (d.d, 4H, 7,8 un 6,8 Hz); 8,60 (t, 2H, 7,8 Hz); 8,76 (d, 4H, 6,8 Hz) m.d.  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ . Aprēķināts: C 49,94; H 5,06; N 6,03%. Noteikts: C 50,16; H 4,56; N 5,89%.

*B metode. Savienojuma 153 oksidēšana ar selēna dioksīdu.* 0,20 g (0,31 mmol) savienojuma **153** šķīdumam etiķskābē (10 ml) pievieno 0,14 g (1,26 mmol)  $\text{SeO}_2$ . Reakcijas maisījumu sildot 50°C maisa 5 stundas. Pēc atdzesēšanas līdz istabas temperatūrai reakcijas maisījumu izlej piesātinātā  $\text{NaHCO}_3$  šķīdumā un ekstrahē ar etilacetātu (3x20 ml). Apvienoto organisko fāzi žāvē ar b/ū  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  un šķīdinātāju ietvaicē vakuumā. Atlikumu pārkristalizē no etanola, iegūstot 0,18 g oranžīgu vielu, kas satur savienojumu **154** (40% pēc AEŠH datiem) un Se.

### **1,1'-[(3,5-Dietoksikarbonil)-4-fenilpiridīn-2,6-diil]dimetilēn-bispiridīnija diperhlorāts (169)**

*A metode. Savienojuma 166 oksidēšana ar NBS.* 0,25 g (0,37 mmol) savienojuma **166** šķīduma metanolā (10 ml) pievieno 0,18 g (1 mmol) NBS, reakcijas

maisījumu maisa 10 stundas 70<sup>0</sup>C. Pēc atdzesēšanas līdz istabas temperatūrai, šķīdinātāju ietvaicē vakuumā, atlikumu apstrādā ar heksāna/etilacetāta maisījumu (1:1). Nogulsnes filtrē un pārkristalizē no etanola, iegūstot 0,15 g (63%) savienojumu **169** kā bezkrāsainu pulverveida vielu.

*B metode. Savienojuma 166 oksidēšana ar Pd/C.* 0,15 g (0,22 mmol) savienojuma **166** šķīdumam sausa etilacetāta (30 ml) un sausa acetonitrila (10 ml) maisījumā pievieno 0,23 g (0,22 mmol) 10% Pd/C. Maisa 60 stundas 80<sup>0</sup>C, tad filtrē caur Celītu divreiz un mazgā ar etilacetātu, žāvē ar b/ū Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrē caur membrānu filtru (Nylon Filter Membranes (0,2mm)), šķīdinātāju ietvaicē vakuumā. Atlikumu pārkristalizē no etanola, iegūstot 0,055 g (37%) savienojumu **169** kā bezkrāsainu pulverveida vielu.

T<sub>sad.</sub> 235<sup>0</sup>C, <sup>1</sup>H KMR spektrs (DMSO-D<sub>6</sub>, δ): 0,81 (t, 6H, 7,0 Hz); 4,06 (kv, 4H, 7,0 Hz); 6,10 (s, 4H); 7,15-7,19 (m, 2H); 7,52-7,55 (m, 3H); 7,99 (d.d, 4H, 5,9 un 8,1 Hz); 8,57 (t, 2H, 8,1 Hz); 8,72 (d, 4H, 5,9 Hz) m.d. C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>. Aprēķināts: C 51,04; H 4,28; N 6,16%. Noteikts: C 50,95; H 4,15; N 6,08%.

### 3.3 Pielietotās metodes

#### pH noteikšana

Katjono liposomu buferkapacitāte noteikta balstoties uz literatūras [103] metodi. Iesver 32,5 μmol analizējamās vielas un šķīdina 150 ml 0,5% Triton X-100 ūdens šķīdumā. Alikvotu (50 ml) analizējamā parauga paskābina ar 0,1 M sālskābi līdz pH 3,5 un titrē ar 0,5 M nātrija hidroksīda šķīdumu līdz pH >10. Titrēšanu atkārto trīs reizes.

#### Liposomu pagatavošana ASM pētījumiem

Nosver nepieciešamo daudzumu atbilstošā 1,4-dihidropiridīna atvasinājuma, pievieno ūdeni, lai gala koncentrācija būtu 0,5 mM, un sonificē istabas temperatūrā. Svaigu vizlas plāksnīti (4x4 mm) iegremdē pagatavotajā šķīdumā uz 3 sekundēm, izņem, žāvē istabas temperatūrā un veic ASM mērījumus.



## **Liposomu pagatavošana bioloģiskajiem pētījumiem**

Nosver nepieciešamo daudzumu atbilstošā 1,4-dihidropiridīna atvasinājuma, pievieno dejonizētu ūdeni, lai gala koncentrācija būtu 1,25 mM, sonificē, silda līdz 60°C, lai iegūtu dzidru šķīdumu. 1,4-DHP atvasinājumu **140, 146, 150, 165 un 167** šķīdumi tika pagatavoti analogiski, bet samazinot šķīdumu koncentrāciju līdz 0,33 mM.

## **Kompleksēšanās ar DNS**

96-Lauciņu platītē pirmajās 4 kolonās iepilda 75 µl MES HEPES NaCl buferšķīduma (pH 7,2), tad pirmās kolonas pirmajā lauciņā iepilda 75 µl 1,25 mM liposomu šķīduma, 15 reizes samaisa ar pipeti, iesūcot un iepildot atpakaļ tai pašā lauciņā, pēc tam 75 µl no tā pārnes uz otro lauciņu tai pašā kolonā un atkal kārtīgi samaisa, atkārto šo procedūru, līdz visi astoņi kolonas lauciņi satur liposomu šķīdumus, katrs nākamais, sākot no pirmā, ir uz pusi atšķaidītāks par iepriekšējo. Pēc tam visos lauciņos pievieno 75 µl šķīdumu, kas satur 0,6 µg β-galoktozidāzes plazmīdu, un atstāj uz 25 minūtēm, lai izveidojas kompleksi. Tātad pirmajā lauciņā izveidojās lādiņu attiecība savienojums/DNS=32/1 un katrā nākamajā - lādiņu attiecība mainījās uz pusi, atbilstoši 16/1, 8/1, 4/1 2/1, 1/1, 1/2, un 1/4. Tālāk visiem lauciņiem pievieno bromfenola zilo un paraugus pārnes uz 0,9% agarozes gēla Tris-borata EDTA buferšķīdumā pH 8,0. Par kontroli izmanto DNS šķīdumu MES HEPES NaCl buferšķīdumā pH 7,2. Tad gēlu ievieto 65 V sprieguma elektriskajā laukā uz trijām stundām, kuru laikā seko bromfenola zilā krāsojumam. Tad gēlu iegremdē EtBr šķīdumā uz 10 min. un UV kamerā fotogrāfē. Nolasa pēdējo lādiņu attiecību pie kuras ir pilnībā saistīts DNS.

## **Citotoksicitātes noteikšana, izmantojot MTT metodi**

Citotoksicitāti nosaka kalorimetriski ar (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolija bromīda metodi. Šūnas savāc, saskaita un iesēj augšanas vidē 100 µl 96-lauciņu platītē, katrā lauciņā pa 20000 šūnām. Dienu vēlāk noņem augšanas vidi un

pievieno 150 µl vidi bez seruma. Savienojumu kompleksi ar DNS ar dažādu lādiņu attiecību tiek sagatavoti tieši pirms lietošanas 50 mM MES, 50 mM HEPES, 75 mM NaCl buferšķīdumā, pH 7,2 atsevišķā 96-lauciņu platītē. Pēc 5 stundām kompleksus aizvāc un lauciņus mazgā ar PBS un pievieno augšanas vidi. Inkubē 48 stundas 37<sup>0</sup>C, mazgā ar PBS pievieno 100 µl vidi bez seruma un 10 µl MTT, inkubē 2 stundas un pievieno 100 µl (20% SDS 50% DMF, pH 4,7) 24 stundas inkubē 37<sup>0</sup>C un mēra absorbciju pie 570 nm. Izdzīvojušo šūnu skaitu izsaka procentos salīdzinot ar kontroli.

### **Gēnu transfekcijas aktivitāte izmantojot ONPG metodi**

Šūnas savāc, saskaita un iesēj augšanas vidē 100 µl 96-lauciņu platītē, katrā lauciņā pa 20000 šūnām. Dienu vēlāk noņem augšanas vidi un pievieno 150 µl vidi bez seruma. Savienojumu kompleksi ar DNS ar dažādu lādiņu attiecību tiek sagatavoti tieši pirms lietošanas 50 mM MES, 50 mM HEPES, 75 mM NaCl buferšķīdumā, pH 7,2 atsevišķā 96-lauciņu platītē. Pēc 5 stundām kompleksus aizvāc un mazgā ar PBS un pievieno augšanas vidi. Inkubē 48 stundas 37<sup>0</sup>C, aizvāc vidi un pievieno 50 µl 2% Triton X-100 šķīdumu, sasaldē -80<sup>0</sup>C. Atkausē un spektrofotometriski mēra hidrolizētā ONPG daudzumu pie 405 nm, standartlīknes konstruēšanai lietojot attīrītu β-galaktozidāzi izdalītu no *E.coli*, lai aprēķinātu β-galaktozidāzes daudzumu tranfecētājās šūnās.

## Secinājumi

1. Izstrādāta izejvielas – 2,6-dimetil-3,5-didodeciloksikarbonil-4-fenil-1,4-dihidropiridīna iegūšanas metode, klasiskās Hanča reakcijas vietā lietojot tai radniecīgu ciklokondensācijas reakciju starp 2-benzilidēnacetetiķskābes dodecilesteri un  $\beta$ -aminokrotonskābes dodecilesteri, reakciju veicot dietilēnglikolā 4-metil-1-butilpiridīnija bromīda katalītiskā klātienē. Produkta iznākums uzlabots no 21% Hanča reakcijā līdz 72% ciklokondensācijas reakcijā (kopējais - 42%, rēķinot no  $\beta$ -krotonskābes dodecilestera).
2. Sintezējot jaunu oriģinālu katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu klasi, veikta 2,6-bis(brommetil)-1,4-dihidropiridīna broma nukleofila aizvietošana ar dažādus elektroniskos un stēriskos efektus uzrādošiem aizvietotiem piridīna atvasinājumiem. Noskaidrots, ka katjoni amfifilie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi ar elektrondonoriem aizvietotajiem 1,4-dihidropiridīna 2,6-vietu piridīnija gredzenā veicina spēju pārnest  $\beta$ -galaktozidāzi CV1-P šūnās, palielina gēnu transfekcijas aktivitāti salīdzinot ar savienojumiem, kas satur elektronakceptorus aizvietotājus 1,4-dihidropiridīna 2,6-vietu piridīnija gredzenā.
3. Pētot katjono 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ķīmisko oksidēšanu, noskaidrots, ka N-bromsukcīnimīds ir efektīvākais oksidētājs no pārbaudītajiem. Parādīts, ka katjonos aizvietotājus saturošu 4-fenilaizvietotu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu oksidēšana notiek grūtāk, salīdzinot ar neitrālu 4-fenilaizvietotu 1,4-dihidropiridīna oksidēšanu.
4. Iegūtajiem katjonajiem amfifilajiem 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem piemīt buferkapacitāte fizioloģiskajā pH 6-8 apgabalā, tomēr 1,4-dihidropiridīna cikla 2,6-vietu piridīnija aizvietotāji būtiski neietekmē 1,4-dihidropiridīna NH grupas skābju/bāzu īpašības.
5. Sintezētie katjoni amfifilie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi nav citotoksiski gēnu transfekcijas aktivitāti uzrādošajā koncentrācijā. Atrasti un izvērtēti līdersavienojumi kā potenciālie gēnu transfekcijas aģenti: 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-me-

tilpiridīnija) dibromīds, 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-dimetilaminopiridīnija) dibromīds, 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(4-aminopiridīnija) dibromīds, 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)-dimetilēn]-bis(3-metilpiridīnija) dibromīds un 1,1'-[(3,5-di(dodeciloksikarbonil)-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bis(3-aminopiridīnija) dibromīds, kuriem veiks padziļinātus bioloģiskos pētījumus.

6. Parādīts, ka oriģinālie 1,1'-[(3,5-didodeciloksikarbonil-4-fenil-1,4-dihidropiridīn-2,6-diil)dimetilēn]-bispiridīnija Hofmeistera anjonu rindas pārstāvji uzrāda dažādas gēnu transfekcijas aktivitātes *o*-nitrofenilgalaktopiranozīda testos, apstiprinot anjona ietekmi uz savienojuma bioloģiskajām īpašībām.

7. Noskaidrots, ka sintezētais *dvīņu* tipa savienojums ar dubultotu lipofilo un hidrofilo grupu skaitu molekulā - 1,4-bis[1,4-dihidro-2,6-di(piridīn-1-iummetil)-3,5-di(dodeciloksikarbonil)-piridīn-4-il]benzola tetrabromīds, uzrādīja zemāku gēnu transfekcijas aktivitāti *o*-nitrofenilgalaktopiranozīda testos salīdzinot ar monomēro modeļsavienojumu.

8. Darbā parādīta atomspēku un elektronmikroskopijas metožu piemērotība un efektivitāte katjono amfifilo 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu veidoto nanoagregātu struktūru pētījumos. Noskaidrots, ka nanodaļiņu lielums atkarīgs no savienojuma struktūras, kā arī paraugu apstrādes laika ar ultraskaņu līdz tās sasniedz vielai raksturīgo minimālo liposomu izmēru.

## Publikācijas

1. **Pajuste K.**, Plotniece A., Kore K., Intenberga L., Cekavicus B., Kaldre D., Duburs G., Sobolev A. Use of pyridinium ionic liquids as catalysts for the synthesis of 3,5-bis(dodecyloxycarbonyl)-1,4-dihydropyridine derivative. *Central European Journal of Chemistry*. (iesniegts).
2. Plotniece A., **Pajuste K.**, Kaldre D., Cekavicus B., Vigante B., Turovska B., Belyakov S., Sobolev A., Duburs G. Oxidation of cationic 1,4-dihydropyridine derivatives as model compounds for putative gene delivery agents. *Tetrahedron*, 2009, 65, 8344–8349.
3. **Pajuste K.**, Krivicka I., Plotniece M., Plotniece A., Kampars V., Duburs G. Jaunu potenciālu gēnu transfekcijas aģentu – katjono 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu sintēze un īpašības. *RTU zinātniskie raksti: Materilālzinātne un lietišķā ķīmija*, 2005, 11, 7-10.
4. **Pajuste K.**, Serzhane R. Synthesis 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylates modified in positions 2,6 as potential gene delivery agents. *Latvijas Ķīmijas žurnāls*, 2004, 2, 166.

## Konferenču tēzes.

1. Kaldre D., Plotniece A., Pajuste K., **Pajuste K.**, Duburs G. Synthesis of 1,4-dihydropyridines containing lipophilic and conjugated moieties for nonviral gene delivery applications. *International Conference on Organic Synthesis = BOS-2010 Balticum Organicum Syntheticum*, June 27-30, 2010: Riga (Latvia), Abstr.p. 121.
2. Skrivele B., **Pajuste K.**, Kaldre D., Plotniece A., Ose V., Sobolev A., Danne R., Cekavicus B., Birjukovs P., Etrs D., Duburs G. The influence of preparation conditions on nanoaggregates formed by self-assembling amphiphilic pyridinium derivatives. *23<sup>rd</sup> Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2009)*, September 6-11, 2009, Antalya (Turkey), Abstr.p. P.D43.055.
3. Kaldre D., Plotniece A., **Pajuste K.**, Duburs G. Synthesis of amphiphilic 1,4-dihydropyridine derivatives for gene delivery. *International Conference on Organic Synthesis, Balticum Organicum Syntheticum = BOS 2008*, June 29-July 2, 2008, Vilnius (Lithuania), Abstr.p.102.
4. Kaldre D., Danne R., Plotniece A., **Pajuste K.**, Sobolev A., Cekavicus B., Vigante B., Duburs G. Amphiphilic pyridinium derivatives on base of 1,4-di-

hydropyridines for gene transport – synthesis and self-assembling properties. Workshop of COST Action D43 „Functionalized Materials and Interfaces”, April 2-4, 2008, Berlin (Germany).

5. **Pajuste K.**, Kaldre D., Plotniece A., Sobolevs A., Cekavicus B., Reksne L., Vigante B., Birjukovs P., Erts D., Duburs G. Self-assembling amphiphilic pyridinium derivatives for gene delivery: synthesis and properties. 21<sup>st</sup> Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2007), September 10-14, 2007, Geneva (Switzerland), Abstr.p.164.

6. Duburs G., Plotniece A., **Pajuste K.**, Kaldre D., Vigante B., Danne R. Cationic Amphiphilic 1,4-Dihydropyridine Type Lipids and Liposomes for Drug Delivery. 2<sup>nd</sup> European Conference on Chemistry for Life Sciences, September 4-8, 2007, Wroclaw (Poland), Abstr.b.161.

7. **Pajuste K.**, Kaldre D., Danne R., Plotniece A., Priksane A., Duburs G. Studies of proton mobility at formation of pyridinium ylide. 15<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 15), July 8-13, 2007, Dublin (Ireland), Abstr.p. P239.

8. **Pajuste K.**, Plotniece A., Polyakov B., Erts D., Duburs G. Self-assembling pyridinium derivatives as gene transfection agents: synthesis and properties. International Conference on Organic Synthesis, Balticum Organicum Syntheticum = BOS 2006, June 25-29, 2006, Tallin (Estonia), Abstr.p.128.

9. **Pajuste K.**, Kaldre D., Plotniece A., Sobolev A., Cekavicus B., Vigante B., Duburs G. Modification and study of cationic amphiphilic 1,4-dihydropyridine derivatives for gene transfection. In *Final Workshop of the Chemistry COST Action D19*, Chemical Functionality Specific to the Nanometer Scale, Sitges, 12-14 May, 2006: Barselona (Spain), 2006.

10. **Pajuste K.**, Krivicka I., Plotniece A., Polyakov B., Erts D., Duburs G. Synthesis and properties of self-assembling 1,4-dihydropyridine derivatives for DNA delivery. - COST Chemistry - Action D19. Chemical Functionality Specific to the Nanometer Scale, September 1-4, 2005, Koc University, Istanbul (Turkey): Nano-Chemistry Workshop Program & Abstracts; P8 (p.49).

## Literatūras saraksts

1. **Park, K.**, *J. Controlled Release*, 2007, 120, 1–3.
2. **Cohen, J.**, *Science*, 1993, 259, 1691–1692.
3. **Yang, J.P., Huang, L.**, *Gene Ther.*, 1996, 3, 542–548.
4. **Nayak, S., Herzog, R.W.**, *Gene Ther.*, 2010, 17, 295–304.
5. **Barquinero, J., Eixarch, H., Pérez-Melgosa, M.**, *Gene Ther.*, 2004, 11, 3–9.
6. **Jooss, K., Chirmule, N.**, *Gene Ther.*, 2003, 10, 955–963.
7. **McConnell, M.J., Imperiale, M.J.** *Hum. Gene Ther.*, 2004, 15, 1022–1033.
8. **Frampton, A.R., Goins, W.F., Nakano, K., et al.**, *Gene Ther.*, 2005, 12, 891–901.
9. **Ledley, F.D.**, *Pharm. Res.*, 1996, 13, 1595–1614.
10. **Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., et al.**, *N. Engl. J. Med.*, 2002, 346, 1185–1193.
11. **Anderson, W.F.**, *Science*, 1992, 255, 808–813.
12. **Miller, A.D.**, *Nature*, 1992, 357, 455–460.
13. **Verma, I.M., Somia, N.**, *Nature*, 1997, 389, 239–242.
14. **Miller, N., Vile, R.**, *FASEB J.*, 1997, 9, 190–199.
15. **Crystal, R.G.**, *Science*, 1995, 270, 404–410.
16. **Selvama, S., Thomas, P.B., Hamm-Alvarez, S.F., et al.**, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, 58, 1243–1257.
17. **Casali, M., Zambonelli, C., Goldwasser, J., et al.**, *Virology*, 2008, 380, 91–98.
18. **Mehier-Humbert, S., Guy, H.R.**, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2005, 57, 733–753.
19. **Capecchi, M.R.**, *Cell*, 1980, 22, 479–488.
20. **Christian, R.M., Bekeredjian, R.**, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, 60, 1177–1192.
21. **Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, 87, 9568–9572.
22. **Yang, N.S., Sun, W.H.**, *Nat. Med.*, 1995, 1, 481–483.
23. **Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu R., et al.**, *Nature*, 1987, 327, 70–73.
24. **Fuller, H.D., Loudon, P., Schmaljohn, C.**, *Methods*, 2006, 40, 86–97.
25. **Qui, P., Ziegelhoffer, P., Sun, J., et al.**, *Gene Ther.*, 1996, 3, 262–268.
26. **Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90, 11478–11482.
27. **Karmali, P.P., Chaudhuri, A.**, *Med. Res. Rev.*, 2007, 27, 696–722.
28. **Martin, B., Sainlos, M., Aissaoui, A., et al.**, *Curr. Pharm. Des.*, 2005, 11, 375–394.
29. **Wielbo, P., Shi, N., Sernia, C.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 232, 794–799.
30. **Lappalainen, K., Pirila, L., Jaaskelainen, I., et al.**, *Anticancer Res.*, 1996, 16, 2485–2492.

31. **Ilies, M.A., Seitz, A.W., Caproiu, M.T., et al.,** *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 14, 2645–2655.
32. **Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., Ninham, B.W.,** *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 470, 185–201.
33. **Walker, M.L.,** *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2001, 6, 451–456.
34. **Stuart, C.A.M., Boekema, E.J.,** *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, 1768, 2681–2689.
35. **Hamai, C., Yang, T., Kataoka, S., et al.,** *Biophys. J.*, 2006, 90, 1241–1248.
36. **Gonçalves, G., Debs, R.J., Heath T.D.,** *Biophys. J.*, 2004, 86, 1554–1563.
37. **Ewert, K., Slack, N.L., Ahmad, A., et al.,** *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 133–149.
38. **Mintzer, A.M., Simanek, E.E.,** *Chem. Rev.*, 2009, 109, 259–302.
39. **Morille, A.M., Passirani, C., Vonarbourg, A., et al.,** *Biomaterials*, 2008, 29, 3477–3496.
40. **El-Aneed, A.,** *J. Controlled Release*, 2004, 94, 1–14.
41. **Brown, M.D., Schätzlein, A.G., Uchegbu, I.F.,** *Int. J. Pharm.*, 2001, 229, 1–21.
42. **Merdan, T., Kopeček, J., Kissel, T.,** *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54, 715–758.
43. **Zuhorn, I.S., Hoekstra, D.,** *J. Membr. Biol.*, 2002, 189, 167–179.
44. **Xu, L., Tang, W.-H., Huang, C.-C., et al.,** *Mol. Med.*, 2001, 7, 723–734.
45. **Kogure, K., Akita, H., Yamada, Y., et al.,** *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, 60, 559–571.
46. **Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., et al.,** *Nature*, 1993, 364, 639–642.
47. **Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, 84, 7413–7417.
48. **Leventis, R., Silviu, J.R.,** *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1023, 1, 124–132.
49. **Маслов, М.А., Сычева, Е.В., Морозова, Н.Г., и др.,** *Изв. Акад. Наук, Сер. хим.*, 2000, 3, 385–399.
50. **Ramezani, M., Khoshhamdam, M., Dehshahri, A., et al.,** *Colloids Surf., B*, 2009, 72, 1–5.
51. **Chabaud, P., Camplo, M., Payet, D., et al.,** *Bioconjugate Chem.*, 2006, 17, 466–472.
52. **Barthélemy, P.,** *C. R. Chim.*, 2009, 12, 171–179.
53. **Moreau, L., Bartheélémy, P., Maataoui, M.El., et al.,** *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 7533–7539.
54. **Moreau, L., Bartheélémy, P., Li, Y., et al.,** *Mol. BioSyst.*, 2005, 1, 260–264.
55. **Gissot, A., Camplo, M., Grinstaff, M.W., et al.,** *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6, 1324–1333.
56. **Hyvönen, Z., Plotniece, A., Reine, I., et al.,** *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1509, 451–466.
57. **Paul, B., Bajaj, A., Indi, S.S., et al.,** *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 8401–8405.
58. **Wettig, S.D., Badea, I., Donkuru, M., et al.,** *J. Gene Med.*, 2007, 9, 649–658.



59. **Bajaj, A., Kondaiah, P., Bhattacharya, S.,** *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 2533–2540.
60. **Zou, Q.C., Chen, H., Yu, H., et al.,** *Sensor. Actuator. B. Chem.*, 2010, 145, 378–385.
61. **Gaucheron, J., Wong, T., Wong, K.F., et al.,** *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13, 671–675.
62. **He, C.-X., Tabata, Y., Gao, J.-Q.,** *Int. J. Pharm.*, 2010, 386, 232–242.
63. **Banerjee, R., Das, P.K., Srilakshmi, G.V., et al.,** *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4292–4299.
64. **Pinnaduwege, P., Schmitt, L., Huang, L.,** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1989, 985, 33–37.
65. **Rose, J.K., Buonocore, L., Whitt, M.A.,** *BioTechniques*, 1991, 10, 520–525.
66. **Ballas, N., Zakai, N., Sela, I., et al.,** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1988, 939, 8–18.
67. **Bhattacharya, S., Subhrangsu, S.M.,** *Biochemistry*, 1998, 37, 7764–7777.
68. **Dow, S., Elmslie, R., Kurzman, I., et al.,** *Hum. Gene Ther.*, 2005, 16, 937–946.
69. **Stekar, J., Nössner, G., Kutscher, B., et al.,** *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1995, 34, 238–240.
70. **Picquet, E., Le, N.K., Delépine, P., et al.,** *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16, 1051–1053.
71. **Bajaj, A., Mishra, S.K., Kondaiah, P., et al.,** *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1778, 1222–1236.
72. **Han, S.E., Kang, H., Shim, G.Y., et al.,** *Int. J. Pharm.*, 2008, 353, 260–269.
73. **Van der Woude, I., Wagenaar, A., Meekel, A.A.P., et al.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, 94, 1160–1165.
74. **Ilies, M.A., Johnson, B.H., Makori, F., et al.,** *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, 435, 1, 217–226.
75. **Ilies, M.A., Seitz, W.A., Johnson, B.H., et al.,** *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 3872–3887.
76. **Pijper, D., Bulten, E., Šmisterova, J., et al.,** *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 4406–4412.
77. **Roosjen, A., Šmisterova, A., Driessen, C., et al.,** *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 1271–1277.
78. **Hulst, R., Muizebelt, I., Oosting, P., et al.,** *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, 835–849.
79. **Ewert, K.K., Evans, H.M., Zidovska, A., et al.,** *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 3998–4006.
80. **Farago, O., Ewert, K., Ahmad, A., et al.,** *Biophys. J.*, 2008, 95, 836–846.
81. **Swami, A., Goyal, R., Tripathi, S.K., et al.,** *Int. J. Pharm.*, 2009, 374, 125–138.
82. **Bruni, P., Fino, V., Pisani, M., et al.,** *J. Mol. Struct.*, 2009, 919, 328–333.
83. **Zhang, Y., Cremer, P.S.,** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 658–663.
84. **Evens, J.T., Niedz, R.P.,** *Scholarly Res. Exchange.*, 2008, 1–9.
85. **Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S., et al.,** *Tetrahedron*, 2005, 61, 1015–1060.

86. **Fraga-Dubreuil, J., Bazureau, J.P.,** *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42, 6097–6100.
87. **Ilies, M.A., Seitz, W.A., Ghiviriga, I., et al.,** *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 3744–3754.
88. **Lv, H., Zhang, S., Wang, B., et al.,** *J. Controlled Release*, 2006, 114, 100–109.
89. **Dal-Maso, D.A., Dellacasagrande, J., Legendre, F., et al.,** *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, 43, 1758–1766.
90. **Subramanian, G., Hjelm, R.P., Deming, T.J., et al.,** *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 26–34.
91. **Gaucheron, J., Santaella, C., Vierling, P.,** *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1564, 349–358.
92. **Meekel, A.A.P., Wagenaar, A., Šmisterova, J., et al.,** *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 4, 665–673.
93. **Wong, Y.S., Pelet, J.M., Putnam, D.,** *Prog. Polym. Sci.*, 2007, 32, 799–837.
94. **Laemmlil, U.K.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, 72, 4288–4292.
95. **Wu, Y.G., Wu, C.G.,** *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 4429–4432.
96. **Li, J., Guo, Z., Xin, J., et al.,** *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 2008, 60, 1000–1017.
97. **Chae, Y.S., Son, S., Lee, M., et al.,** *J. Controlled Release*, 2005, 109, 330–344.
98. **Opanasopit, P., Sajomsang, W., Ruktanonchai, U., et al.,** *Int. J. Pharm.*, 2008, 364, 127–134.
99. **Luten, J., van Nostrum, C.F., De Smedt S.C., et al.,** *J. Controlled Release*, 2008, 126, 97–110.
100. **MacLaughlin, F.C., Mumper, R.J., Wang, J., et al.,** *J. Controlled Release*, 1998, 56, 259–272.
101. **Huang, M., Fong, C.-W., Khor, E., et al.,** *J. Controlled Release*, 2005, 106, 391–406.
102. **Kim, H.T., Ihm, J.E., Choi, Y.J., et al.,** *J. Controlled Release*, 2003, 93, 389–402.
103. **Germershaus, O., Mao, S., Sitterberg, J., et al.,** *J. Controlled Release*, 2008, 125, 145–154.
104. **Lim, Y., Choi, Y.H., Park, J.,** *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 5633–5639.
105. **Piest, M., Lin, C., Mateos-Timoneda M.A., et al.,** *J. Controlled Release*, 2008, 130, 38–45.
106. **Gao, C., Yan, D.,** *Prog. Polym. Sci.*, 2004, 29, 183–275.
107. **Zinselmeyer, B.H., Mackay, S.P., Schatzlein, A.G., et al.,** *Pharm. Res.*, 2002, 19, 960–967.
108. **Caminade, A.M., Majoral, J.-P.,** *Prog. Polym. Sci.*, 2005, 30, 491–505.
109. **Lee, H.J., Lim, Y., Choi, J.S., et al.,** *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14, 1214–1221.
110. **Ghosh, P., Han, G., De, M., et al.,** *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2008, 60, 1307–1315.
111. **Guo, S., Li, D., Zhang, L., et al.,** *Biomaterials*, 2009, 30, 1881–1889.
112. **Sitharaman, B., Zakharian, T.Y., Saraf, A., et al.,** *Mol. Pharmacol.*, 2007, 5, 567–578.

113. **Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., et al.,** *J. Photochem. Photobiol., B*, 2010, 98, 99–105.
114. **Krajcik, R., Jung, A., Hirsch, A., et al.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, 369, 595–602.
115. **Kasturi, P.S., Sachaphibulkij, K., Roy, K.,** *Biomaterials*, 2005, 26, 6375–6385.
116. **Singh, S.R., Gonçalves, C., Sandrin, P., et al.,** *Chem. Biol.*, 2004, 11, 713–723.
117. **Lavilla, R. J.,** *Chem. Soc., Perkin Trans.1*, 2002, 1, 1141–1156.
118. **Bossert, F., Vater, W.,** *Med. Chem. Res.*, 1989, 9, 291–324.
119. **Triggle, D.J.,** *Biochem. Pharmacol.*, 2007, 74, 1–9.
120. **Peri, R., Padmanabhan, S., Rutledge, A., et al.,** *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 2906–2914.
121. **Rovnyak, G., Andersen, N., Gougoutas, J., et al.,** *J. Med. Chem.*, 1988, 31, 936–944.
122. **Triggle, D.J.,** *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2003, 23, 293–303.
123. **Chang, C.-C., Cao, S., Kang, S., et al.,** *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, 18, 3147–3158.
124. **Tirzit, G.D., Dubur, G.Ya.,** *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1972, 1, 133-134.
125. **Velena, A., Zilberts, J., Duburs, G.,** *Cell Biochem. Funct.*, 1999, 17, 237–252.
126. **Kumar, A., Maurya, R.A., Sharma, S., et al.,** *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45, 501–509.
127. **Klegeris, A., Liutkevicia, E., Mikalauskiene, G., et al.,** *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 441, 203–203.
128. **Vaitkuviene, A., Ulinskaite, A., Meskys, R., et al.,** *Pharmacol. Rep.*, 2006, 58, 551–558.
129. **Kozlov, E.I., Ivanova, R.A., Dubur, G.J.,** *Khim. Farm.*, 1978, 12, 101–105.
130. **Ivanov, E.V., Ponomarjeva, T.V., Merkusev, G.N., et al.,** *Radiobiol. Radiother.*, 1990, 31, 69–78.
131. **Kumsar, K.K., Velena, A., Dubur, G., et al.,** *Biokhimija*, 1971, 36, 1204–1208.
132. **Manpadi, M., Uglinskii, P.Y., Rastogi, S.K., et al.,** *Org. Biomol. Chem.*, 2007, 5, 3865–3872.
133. **Briede, J., Daija, D., Stivrina, M., et al.,** *Cell Biochem. Funct.*, 1999, 17, 89–96.
134. **Briede, J., Stivrina, M., Stoldere, D., et al.,** *Cell Biochem. Funct.*, 2008, 26, 908–915.
135. **Andrzejczak, D., Gorska, D., Czarnecka, E.,** *Pharmacol. Rep.*, 2006, 58, 711–719.
136. **Velena, A., Skujins, A. Svirskis, S., et al.,** *Cell Biochem. Funct.*, 1997, 15, 211–220.
137. **Klimaviciusa, L., Klusa, V., Duburs, G., et al.,** *Cell. Biochem. Funct.*, 2007, 25, 15–21.
138. **Jarlier, V., Nikaido, H.,** *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, 123, 11–18.

139. Görlitzer, K., Kramer, C., Boyle, C., *Pharmazie*, 2000, 55, 651–658.
140. Prokai, L., Prokai-Tatra, K., Bodor, N., *Med. Res. Rev.*, 2000, 20, 367–416.
141. Sterk, G.J., Van derWerf, J.F., *U.S. Patent 6,689,799*, 2004; *Chem. Abstr.*, 2001, 134, 193346j.
142. Tasaka, S., Ohmori, H., Gomi, N., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 275–277.
143. Miri, R., Mehdipour, A., *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 8329–8334.
144. Hyvönen, Z., Ruponen, M., Rönkkö, S., et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2002, 15, 449–460.
145. Duburs, G., Vigante, B., Plotniece, A., et al., *Chim. Oggi.*, 2008, 26, 648–70.
146. Duburs, G., Bisenieks, E., Krauze, A., et al., *In Proceedings, The Chemistry and Biological Activity of Synthetic and Natural Compounds. Nitrogen-Containing Heterocycles*, June 20–23, 2006, Chernogolovka, Moscow, Russia, 2006, 1, 239–242.
147. Tirzite, D., Koronova, J., Plotniece, A., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1998, 45, 849–856.
148. Roy, K.A., Rajaraman, B., Batra, S., et al., *Tetrahedron*, 2004, 60, 2301–2310.
149. Heropoulos, G.A., Cravotto, G., Screttas, C.G., et al., *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48, 3247–3250.
150. Kolvari, E., Ghorbani-Choghamarani, A., Salehi, P., et al., *J. Iran. Chem. Soc.*, 2007, 4, 126–174.
151. Кац, А.М., Соловьева, В.В., Дубур, Г.Я., *Авт. свид. 545639, СССР. БИ.*, 1977, 5, 90.
152. Кац, А.М., Кастрон, В.В., Дубур, Г.Я., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1977, 4, 555–559.
153. Ханина, Е.Л., Кац, А.М., Кастрон, В.В., *Тезисы докладов II республиканской конференции молодых ученых-химиков*. Рига, 1977, 44–47.
154. Скрастиньш, И.П., Кастрон, В.В., Дубур, Г.Я., и др., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1989, 7, 948–953.
155. Чекавичус, Б.С., Саусиньш, А.Э., Скрастиньш, И.П., и др., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1989, 10, 1422–1423.
156. Скрастиньш, И.П., Кастрон, В.В., Чекавичус, Б.С., и др., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1991, 9, 1230–1236.
157. Corrol, W.A., Agrios, K.A., Altenbach, R.J., et al., *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 3180–3192.
158. Sircar, I., Anderson, K.R., Bonadies, L., *Tetrahedron Lett.*, 1988, 29, 6835–6838.
159. Görlitzer, K., Schmidt, E., *Arch. Pharm.*, 1991, 324, 105–109.
160. Ebiiike, H., Maruyama, K., Yamazaki, Y., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1997, 45, 863–868.
161. Goswami, S., Dey, S., Jana, S., et al., *Chem. Lett.*, 2004, 33, 916–917.
162. Suárez, M., de Armas, M., Ramírez, O., et al., *Synthesis*, 2009, 11, 1807–1810.

163. Liu, P., Chen, Y., Deng, J., et al., *Synthesis*, 2001, 2078–2080.
164. Sket, B., Zupan, M., *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 929–931.
165. Al Hariri, M., Galley, O.; Pautet, F., et al., *Eur. J. Org. Chem.*, 1998, 593–594.
166. Chhattise, K.P., Ramaswamy, A.V., Waghmode, S.B., *Tetrahedron Lett.*, 2008, 49, 189–194.
167. Podgoršek, A., Stavber, S., Zupan, M., et al., *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 1097–1099.
168. Heropoulos, A.G., Cravotto, G., Screttas, C.G., et al., *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48, 3247–3250.
169. Кастрон, В.В., Кац, А.М., Дубур, Г.Я., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1978, 11, 1519–1524.
170. Alker, D., Swanson, A.G., *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 1479–1482.
171. Кастрон, В.В., Витолия, Р.О., Шмидлерс, А.Г., и др., *Хим.-фарм. журн.*, 1993, 27, 22–24.
172. Urtti, A., Huvönen, Z., PlotnieceA., et al., Pat. WO 01/62946 A1, Int.Cl. C12N 15/87, 30.08.2001.
173. Tirzite, D.Ya., Khyuvonen, Zh.V., Shmidlers, A.G., et al., *Pharm. Chem. J.*, 2000, 34, 297–300.
174. Бартон, Б., Оллис У.Д., *Общая органическая химия*. Москва. Мир., 1985, 752.
175. Шестопапов, А.М., Литвинов, В.П., Шаранин, Ю.А., *Итоги науки и техники. Органическая химия*, 1989, 17, 253.
176. Petit, S., Azzouz, R., Fruit, C., et al., *Tetrahedron Lett.*, 2008, 49, 3663–3665.
177. Lukeš, R., Plíml, J., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1956, 21, 1602–1603.
178. Литвинов, В.П., *Журн. Орг. Хим.*, 1993, 29, 2072–2090.
179. Legeay, J.C., Vanden, Eyndeb, J.J., Bazureau, J. P., *Tetrahedron*, 2005, 61, 12386–12397.
180. Sliwa, W., Matusiak, G., *Heterocycles*, 1985, 23, 6, 1513–1554.
181. Aupoix, A., Régot, B., Vo-Thanh, G., *Tetrahedron*, 2010, 66, 1352–1356.
182. Coo, D.G., *J. Org. Chem.*, 1952, 24, 882.
183. Katritzky, A.R., Greskowiak, N.E., Alvarez-Buila, J., *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1981, 4, 1180–1185.
184. Бобровский, С.И., Бабаев, Е.В., Бундель, Ю.Г., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1987, 2, 203–208.
185. Бобровский, С.И., Бабаев, Е.В., Громов, С.П., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1987, 2, 209–213.
186. Matern, A. I., Charushin, V. N., Chupakhin, O. N., *Russ. Chem. Rev.*, 2007, 76, 23–40.
187. Filipan-Litvic, M., Litvic, M., Vinkovic, V., *Tetrahedron*, 2008, 64, 5649–5656.
188. Belenky, P., Bogan, K.L., Brenner, C., *Trends Biochem. Sci.*, 2007, 32, 12–19.

189. **Guengerich, F.P., Brian, W.R., Iwasaki, M., et al.,** *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 1838–1844.
190. **Böcker, R.H., Guengerich, F.P.,** *J. Med. Chem.*, 1986, 29, 1596–1603.
191. **Turovska, B., Stradins, J., Strazdins, I., et al.,** *Electrochim. Acta*, 1997, 42, 3553–3564.
192. **Arguello, J., Núñez-Vergara, J.L., Strum, J.A., et al.,** *Electrochim. Acta*, 2004, 49, 4849–4856.
193. **Da Silva, J.,A., Núñez-Vergara, J.L., Squella, B.J.A.,** *J. Electroanal. Chem.*, 2006, 591, 99–104.
194. **Salazar, R., Encina, P.A.N., Camargo, C., et al.,** *J. Electroanal. Chem.*, 2008, 622, 29–36.
195. **Kaldre, D., Pajuste, K., Plotniece, A., et al.,** *15<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 15)*, Dublin, 2007, 260.
196. **Stradins, J., Ogle, J., Kadysh, V., et al.,** *J. Electroanal. Chem.*, 1987, 206, 103–116.
197. **Núñez-Vergara, J.L., Salazar, R., Camargo, C., et al.,** *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 4318–4326.
198. **Knoevenagel, E., Ruschhaupt, W.,** *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1898, 31, 1025–1033.
199. **Garcia, O., Delgado, F., Cano, A.C., et al.,** *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 623–625.
200. **Loev, B., Snader, K.M.,** *J. Org. Chem.*, 1965, 30, 1914–1916.
201. **Huntress, E. H., Shaw, E. N.,** *J. Org. Chem.*, 1948, 13, 674–681.
202. **Yadav, J.S., Reddy, B.V.S., Sabitha, G., et al.,** *Synthesis*, 2000, 11, 1532–1534.
203. **Zolfigol, M.A., Bagherzadeh, M., Niknam, K., et al.,** *J. Iran. Chem. Soc.*, 2006, 3, 73–80.
204. **Ko, K.J., Kim, J.Y.,** *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 3207–3208.
205. **Vanden Eynde, J.J., Mayence, A., Maquestiau, A.,** *Tetrahedron*, 1992, 48, 463–468.
206. **Vanden Eynde, J.J., Orazio, R.D., Van Haverbeke, Y.,** *Tetrahedron*, 1994, 50, 2479–2484.
207. **Sabitha, G., Reddy, G.S.K.K., Reddy, C.S., et al.,** *Synthesis*, 2003, 8, 1267–1271.
208. **Mashraqui, S.H., Karnik, M.A.,** *Synthesis*, 1998, 5, 713–714.
209. **Varma, R.S., Kumar, D.,** *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 21–24.
210. **Litvic, M., Cepanec, I., Filipan, M., et al.,** *Heterocycles*, 2005, 65, 23–35.
211. **Mashraqui, S.H., Karnik, M.A.,** *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 4895–4898.
212. **Heravi, M.M., Behbahani, F.K., Oskooie, H.A., et al.,** *Tetrahedron Lett.*, 2005, 46, 2775–2777.
213. **Khalilzaden, M.A., Hosseini, A., Sadeghifar, H., et al.,** *Acta Chim. Slov.*, 2007, 54, 900–902.
214. **Liu, Q., Li, J., Shen, X.-X., et al.,** *Tetrahedron Lett.*, 2009, 50, 1026–1028.

215. Moreau, J., Duboc A., Hubert C., et al., *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48, 8647–8650.
216. Beaune, G., Ménager, C., *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, 343, 396–399.
217. An, S.Y., Bui, M.P., Nam, Y.J., et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, 331, 98–103.
218. Ciani, L., Ristori, S., Bonechi, C., et al., *Biophys. Chem.*, 2007, 131, 80–87.
219. Ruozi, B., Tosi, G., Leo, E., et al., *Talanta*, 2007, 73, 12–22.
220. Sakai, K., Tomizawa, H., Tsuchiya, K., et al., *Colloid. Surf., B*, 2008, 67, 73–78.
221. Mertins, O., Schneider, P.H., Pohlmann, A.R., et al., *Colloid Surf., B*, 2010, 75, 294–299.
222. Jiang, N., Hu, L., Gao, C., et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, 284, 759–764
223. Le Bihan, O., Bonnafous, P., Marak, L., et al., *J. Struct. Biol.*, 2009, 168, 419–425.
224. Yamaguchi, T., Nomura, M., Matsuoka, T., et al., *Chem. Phys. Lipids*, 2009, 160, 58–62.
225. Hyvönen, Z., *Ph.D Thesis*, Kuopio, Finland, 2006, 95.
226. Pradhan, P., Geri, J., Reiken, f., et al., *J. Controlled Release*, 2010, 142, 108–121.
227. Koh, C.G., Zhang, X., Liu, S., et al., *J. Controlled Release*, 2010, 141, 62–69.
228. Vijayanathan, V., Thomas, T., Thomas, T.J., *Biochemistry.*, 2002, 41, 14085–14094.
229. Rinia, A., Kruijff, B., *FEBS Lett.*, 2001, 11, 194–199.
230. Dauty, E., Remy, S.J., Blessing, T., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 9227–9234.
231. Arleth, L., Bauer, R., Egelhaaf, U.S., et al., *Langmuir*, 2003, 19, 4096–4104.
232. Smeenk, J.M., Otten, M.B.J., Thies, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44, 1968–1971.
233. Plunkett, A.M., Feiler, A., Rutland, M.W., *Langmuir*, 2003, 19, 4180–4187.
234. Thalhamer, S., Heckl, W.M., *Nanotoday*, 2005, 5, 40–49.
235. Liang, X., Mao, G., Ng, S.K.Y., *J. Colloid. Interf. Sci.*, 2004, 278, 53–62.
236. Sriamornsak, P., Thirawong, N., Nunthanid, J., et al., *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71, 324–329.
237. Giocondi, M.C., Yamamoto, D., Lesniewska E., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1798, 703–718.
238. Clemens, R.J., Hyatt, J.A., *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 2431–2435.
239. Tamaddon, F., Razmi, Z., Jafari, A.A., *Tetrahedron Lett.*, 2010, 51, 1187–1189.
240. Filipan-Litvić, M., Litvić, M., Capanec, I., et al., *Molecules*, 2007, 12, 2546–2558
241. Bader, A.R., Cummings, L.O., Vogel, H.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, 73, 4195–4197.
242. Ji, S.J., Jiang, Z.-Q., Lu, J., et al., *Synlett*, 2004, 5, 831–835.

243. Sùarez, M., De Armas, M., Ramùrez, O., et al., *New J. Chem.*, 2005, 29, 1567–1576.
244. Robin, R.O., Moore, W., *United States patent* 2, 1942; 305,558, C.A. 37,1943, P3220<sup>1</sup>
245. Zicmanis, A., Hinica, A., Pavlovica, S., et al., *Latv. Kim. Z.*, 2009, 3, 235-241.
246. Xanthakis, E., Zarevucka, M., Saman, D., et al., *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2006, 17, 2987–2992.
247. Sobolev, A., Franssen, M.C.R., Vigante, B., et al., *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 401-410.
248. Скрастиньш, И.П., Дубур, Г.Я., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1992, 6, 781-791.
249. Nagarajan, R., Anthonyraj, J.C.A., Muralidharan, D., et al., *J. Chem. Sect. B*, 2006, 45, 826–828.
250. Гордон, А., Форд, Р., *Спутник Химика, Мир* 1976, 167–168.
251. Bellavance, M.A., Poirier, M.B., Fortin, D., *Int. J. Pharm.*, 2010, 395, 251–259.
252. Белевич, Г.В., Дубур, Г.Я., Спирин, М.М., и др., *Биофизика.*, 1985, 30, 713.
253. Белевич, Г.В., Дубур Г.Я., Добрецов Г.Е., и др., *Биол. мембраны*, 1988, 5, 768-776.
254. Макарова, Н.В., Белевич, Г.В., Бисениекс, Э.А., и др., *Хим.фарм. журн.*, 1988, 7, 810-815.
255. Dubur, G.Y., Dobretsov, G.E., Deme, A.K., et al., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 1984, 10, 123–134.
256. Rezunkova, O.P., Dubur, G., Deme, A., Sungurov, A.Yu., *Stud. Biophys.*, 1988, 128, 199-205.
257. Turshatov, A.A., Zaitsev, S.Y., Sazonov, S.K., et al., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, 329, 18–23.
258. Turovska, B., Stradins, J., Turovskis, I., et al., *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2004, 40, 753–758.
259. Макарова, Н.В., Плотнище, А., Тирзитис, Г., и др., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1997, 202–211.
260. Dubur, G.Y., Uldrikis, Y.R., *Хим. Гетероцикл.Соед.*, 1972, 8, 321–323.
261. Nakamichi, N., Kawashita, Y., Hayashi, M., *Org. Lett.*, 2002, 22, 3955–3957.
262. Cai, X.-H., Yang, H.-J., Zhang, G.-L., *J. Chem.*, 2005, 83, 273–275.
263. Azarifar, D., Zolfigol, M.A., Maleki, B., *Bull Korean Chem. Soc.*, 2004, 25, 23–24.
264. Ogle, J., Stradins, J., Baumanе, L., *Electrochim. Acta*, 1994, 39, 73–79.
265. Skala, V., Volke, J., Ohanka, V., et al., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1977, 42, 292–305.
266. Lopez-Alarcon, C., Nunez-Vergara, L.J., Squella, J.A., *Electrochim. Acta*, 2003, 48, 2505–2516.
267. Anne, A., Fraoua, S., Hapiot, P., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 7412–7421.
268. Mosmann, T., *J. Immunol. Method.*, 1983, 65, 55-63.



## **Pielikums**