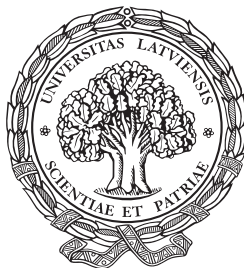


LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE



Zane Dzirkale

# **DABAS VIELU IETEKME UZ PEĻU UZVEDĪBAS REAKCIJĀM**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Doktora grāda iegūšanai farmācijas nozarē  
Apakšnozare: farmaceitiskā farmakoloģija

Rīga, 2014

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedrā laika posmā no 2006. gada līdz 2013. gadam.



## IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā "Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē – 2".

Darba forma: publikāciju kopa Farmācijas nozarē, farmaceitiskās farmakoloģijas apakšnozarē

Darba zinātniskā vadītāja: *Dr. habil. med.*, profesore **Vija Kluša**

Darba recenzenti:

**Nikolajs Sjakste**, *Dr. habil. biol.*, prof., LU Medicīnas fakultāte

**Līga Zvejniece**, *Dr. med.*, Latvijas Organiskās sintēzes institūts

**Lembit Allikmets** *Dr. habil. med.*, prof., Tartu Universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2014. gada 16. maijā Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Latvijas Universitātes Open auditorijā, Raiņa bulvārī 19.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes priekšsēdētājs

prof. *Dr. med.* **Valdis Pīrāgs**

---

promocijas padomes sekretāre

*Dr. pharm.* **Kristīne Saleniece**

---

© Zane Dzirkale, 2014

© Latvijas Universitāte, 2014

ISBN 978-9984-45-837-3

# ANOTĀCIJA

Endogēnu un eksogēnu bioloģiski aktīvu substanču izolēšana no dabas produktiem un to darbības mehānismu noskaidrošana ir likusi pamatus jaunu sintētisku savienojumu dizainam, sintēzei un pētījumiem, lai atrastu jauna tipa ārstnieciskus līdzekļus, vēl aktīvākus par dabas vai endogēnajām vielām un ar uzlabotu vielu biopieejamību un efektivitāti.

Šis promocijas darbs ir veltīts vairāku endogēno vielu –  $\gamma$ -melanokortīnu peptīdu ( $\gamma$ -MSH), aminoskābes taurīna, eksogēno dabas vielu - peptīda lunasīna, kartupeļu sulas un triterpēnu (betulīna, betulīnskābes un lupeola) ietekmes uz centrālo nervu sistēmu (CNS) pētījumiem un to darbības mehānismu noskaidrošanai, pētot vielu efektus uz peļu uzvedības reakcijām un mijiedarbību ar receptoriem *in vivo* un *in vitro*.

Atradām, ka melanokortīnu peptīdi  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH izraisa bailes pastiprinošu uzvedību pelēm, kā arī samazina etanola anksiolītisko darbību un pastiprina etanola abstinences inducēto anksioģēno darbību, norādot uz šo melanokortīnu peptīdu piederību anksioģēno peptīdu ģimenei, kam ir nozīmīga endogēnā loma baiļu/trauksmes procesu un slimību regulācijā. Pirmo reizi parādījām, ka peptīds lunasīns izraisa centrālas darbības efektus, kas galvenokārt izpaužas kā dzīvnieku mazkustīgums, kas vismaz daļēji realizējas caur dopamīnerģiskās sistēmas signālceļiem. Mūsu rezultātos aminoskābe taurīns mazās devās uzrādīja farmakoloģiskus efektus CNS līmenī, kas liecina par tā spēju penetrēt hemato-encefālisko barjeru. Bez tam taurīns, bet ne sintezētais taurīnu saturošais dihidro-piridīnu (DHP) atvasinājums tauropirons saistījās ar GABA-A (gamma-amino-sviestskābes A tipa) receptoru, norādot, ka DHP gredzena pievienošana taurīnam nav uzlabojusi jaunās molekulas īpašības GABA-A receptoru līmenī. Pirmo reizi esam eksperimentāli parādījuši, ka augu valsts produktiem kartupeļu sulai un betulīnam (bet ne betulīnskābei un lupeolam) piemīt antikonvulsanta un GABAerģiska aktivitāte.

Iegūtie rezultāti dod ne tikai jaunu ieskatu un informācijas papildinājumu par pētīto dabas vielu psihotropajām īpašībām un iespējamo funkcionālo lomu, bet arī norāda uz iespējām jaunu preparātu radīšanā, izmantojot dabas vielu struktūru farmakoforus.

**Atslēgvārdi:**  $\gamma$ -MSH, lunasīns, taurīns, tauropirons, kartupeļu sula, betulīns, dabas vielas, CNS efekti

# SATURS

SAĪSINĀJUMI .....	5
IEVADS .....	6
Pētījuma aktualitāte.....	6
Darba mērķis.....	6
Darba uzdevumi.....	6
Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes.....	7
Metodes.....	7
Darba rezultātus atspoguļojošās publikācijas.....	8
Darba rezultātus atspoguļojošās kongresu un konferenču tēzes .....	8
DARBA KONSPEKTĪVS IZKLĀSTS .....	11
Teorētiskais pamatojums .....	11
Pētīto vielu izvēles pamatojums.....	12
Materiāli un metodes.....	14
<i>Dzīvnieki</i> .....	14
<i>Vielas</i> .....	15
<i>Vielu ievadīšana</i> .....	15
<i>Dzīvnieku uzvedības novērošanas testi</i> .....	15
<i>In vitro pētījumi</i> .....	17
<i>Statistiskā datu apstrāde</i> .....	18
Rezultāti.....	18
<i>Melanokortīnu peptīdu <math>\gamma 1</math>- un <math>\gamma 2</math>-MSH anksioģenīe efekti etanola testos paaugstinātā X-veida labirintā (Publikācija III)</i> .....	18
<i>Lunasīna centrālo efektu pētījumi, novērtējot tā iespējamās darbības mehānismus (Publikācija I)</i> .....	21
<i>Taurīna un tauropirona salīdzinošie efekti GABA receptoru līmenī (Publikācija II)</i> .....	23
<i>Kartupeļu sulas izraisītie GABAergiskie efekti (Publikācija V)</i> .....	25
<i>Pentaciklisko triterpēnu - betulīna, betulīnskābes, lupeola farmakoloģiskie efekti un GABAergiskā komponenta loma tajos (Publikācija IV)</i> .....	26
Diskusija .....	27
<i><math>\gamma 1</math>- un <math>\gamma 2</math>-MSH peptīdu anksioģenā darbība (Publikācija III)</i> .....	27
<i>Lunasīna izraisītie centrālās darbības efekti: fokuss uz dopamīnergisko sistēmu (Publikācija I)</i> .....	29
<i>Taurīna un tauropirona atšķirīgā saistīšanās ar GABA-A receptoru un līdzīgie anti-etanola efekti (Publikācija II)</i> .....	30
<i>Kartupeļu sulas pretkrampju darbība (Publikācija V)</i> .....	32
<i>Betulīna antikonvulsīvā darbība (Publikācija IV)</i> .....	33
SECINĀJUMI .....	34
PATEICĪBAS .....	35
LITERĀTŪRAS SARAKSTS.....	36

## SAĪSINĀJUMI

$\gamma$ 1-MSH	gamma1-melanocītstimulējošais hormons
$\gamma$ 2-MSH	gamma2-melanocītstimulējošais hormons
$\alpha$ -MSH	alfa-melanocītstimulējošais hormons
$\beta$ -MSH	beta-melanocītstimulējošais hormons
aCSF	mākslīgais cerebrospinālais šķīdums
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
cAMF	cikliskais adenozinmonofosfāts
CNS	centrālā nervu sistēma
D <sub>1</sub>	dopamīna receptora pirmais subtips
D <sub>2</sub>	dopamīna receptora otrais subtips
DHP	dihidropiridīns
GABA	gamma-aminosviestskābe
GABA-A	gamma-aminosviestskābes A tipa receptors
GABA-B	gamma-aminosviestskābes B tipa receptors
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzīmsA
i.c.	intracisternāli
i.p.	intraperitoneāli
i.v.	intravenozi
K <sub>i</sub>	inhibīcijas konstante
MC3R	melanokortīnu receptora trešais subtips
MC4R	melanokortīnu receptora ceturtais subtips
MSH	melanocītstimulējošais hormons
NMDA	N-metil-D-asparigīnskābe
POMC	proopiomelanokortīns
s.c.	subkutāni

# IEVADS

## Pētījuma aktualitāte

Dabas vielu, īpaši augu izmantošana dažādu slimību profilaksē un ārstēšanā ir gadsimtiem un pat gadu tūkstošiem ilga tradīcija, un tiek uzskatīts, ka vairāk nekā puse mūsdienās izmantojamo medikamentu atklāšana ir saistīta ar dabas produktu pielietošanu.

Dabas vielu pētījumi ir intriģējoši, taču vēl joprojām maz zinām par mūsu organismā biosintezētajām vielām - peptīdiem un proteīniem, arī ikdienas pārtikā, piem., kartupeļos, graudaugu produktos, apkārtējos augos esošajām aktīvajām vielām un to darbības mehānismiem. Īpaša mīkla ir sēru saturošā aminoskābe taurīns, kas atšķirībā no citām aminoskābēm netiek izmantota proteīnu sintēzē. Tomēr jāatzīst, ka dabas vielu aktīvo substāncu izolēšana un to bioloģiskās aktivitātes noskaidrošana ir likusi pamatus jaunu sintētisku savienojumu dizainam, sintēzei un pētījumiem, lai atrastu jauna tipa ārstnieciskus līdzekļus, vēl aktīvākus par endogēnajām vielām un ar uzlabotu vielu biopieejamību un efektivitāti.

Šis promocijas darbs ir veltīts vairāku endogēno vielu –  $\gamma$ -melanokortīnu peptīdu ( $\gamma$ -MSH), aminoskābes taurīna un eksogēno dabas vielu - peptīda lunasīna, kartupeļu sulas un triterpēnu - betulīna, betulīnskābes un lupeola ietekmes uz centrālo nervu sistēmu (CNS) pētījumiem un to darbības mehānismu noskaidrošanai. Iegūtie rezultāti dod ne tikai jaunu ieskatu un informācijas papildinājumu par pētīto dabas vielu psihotropajām īpašībām un iespējamo funkcionālo lomu, bet arī norāda uz iespējām jaunu preparātu radīšanā, izmantojot dabas vielu struktūru farmakoforus.

## Darba mērķis

Noteikt endogēno un eksogēno dabas vielu ietekmi uz centrālās nervu sistēmas funkcijām, pētot vielu efektus uz dzīvnieku uzvedības reakcijām un mijiedarbību ar receptoriem.

## Darba uzdevumi

1. Noteikt melanokortīnu peptīdu  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH spēju izraisīt anksiogēnos vai anksiolītiskos efektus etanola testos;
2. Veikt pirmreizējos peptīda lunasīna centrālo efektu pētījumus;
3. Salīdzināt taurīna un tā dihidropiridīna analogā tauropirona ietekmi uz gamma aminosviestskābes (GABA)-A receptora ligandu izraisītiem efektiem;
4. Novērtēt kartupeļu sulas izraisītos GABAerģiskos efektus;
5. Novērtēt pentaciklisko triterpēnu - betulīna, betulīnskābes un lupeola farmakoloģiskos efektus un GABAerģiskā komponenta lomu tajos.

## Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

Endogēno vielu darbības mehānismu noskaidrošana var palīdzēt saprast to lomu smadzeņu funkciju regulācijā, dažādu neiroloģisku un psihiatrisku traucējumu etiopatogēnēzē.

Daudzas eksogēnas dabas vielas var penetrēt hematoencefālisko barjeru un, ietekmējot smadzeņu neurotransmiteru sistēmas, piedalīties CNS funkciju regulācijā. Šāda veida atklājumi var radīt iespējas dabas produktu struktūru farmakoforu izmantošanā, lai radītu jaunas zāļu vielas un ārstētu dažādas patoloģijas.

## Metodes

*In vivo*: pētīto vielu darbības mehānismu noskaidrošanai un to ietekmes uz CNS novērtēšanai izmantotas dažādas references vielas un izvērtēta darbība dzīvnieku uzvedības testos. Pētījumos izmantoti bezlīniju ICR un C57Bl/6 pelju tēviņi svarā 20 – 25 g. Dzīvnieku vispārējās aktivitātes novērtēšanai izmantots atvērtā lauka (*open field*) tests, anksioģenā/anksiolītiskā efekta noskaidrošanai - paaugstinātais X-veida labirints (*X-maze*), koordinācijas un muskuļu relaksācijas izvērtēšanai - rotējošais stienis (*rota rod*), nekustībai un muskuļu rigiditātei - katalepsijas tests. Pētāmo vielu aktivitāte izvērtēta mijiedarbībā ar vielu-analizatoru izraisītām specifiskām reakcijām bikukulīna krampju, etanola gulēšanas un anksiolītiskās aktivitātes, kā arī abstinences izraisītas anksioģenas uzvedības apstākļos, amfetamīna hiperaktivācijas, apomorfinā stereotipiskās rāpšanās (*climbing*) un ketamīna uzvedības testos. Pētāmās vielas ievadītas intraperitoneāli (i.p.), intracisternāli (i.c.), intravenozi (i.v.), subkutāni (s.c.) vai *per os*.

*In vitro* pētījumos, izmantojot radioligandu saistīšanas (*binding*) metodi pārbaudīta taurīna, tauropirona un 1,4-dihidropiridīna cikla spēja saistīties ar smadzeņu membrānas GABA receptoriem. Savukārt HEK293 šūnu līnijā pārbaudīta lūnasīna spēja saistīties ar dopamīna receptoriem (D<sub>1</sub> un D<sub>2</sub>), un lūnasīna ietekme uz cAMF sintēzes aktivēšanu vai inhibēšanu.

Iegūto datu statistiskā apstrāde veikta, izmantojot datorprogrammu GraphPad Prism v.5.00. Atšķirības starp pētījumu grupām izvērtētas ar vienfaktora ANOVA ar tai sekojošiem multiplās salīdzināšanas testiem. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem pie  $p < 0,05$ . Visas vērtības izteiktas kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  vidējā standartklūda (S.E.M.) vai vidējā standartnovirze (S.D.).

## Darba rezultātus atspoguļojošās publikācijas

### Promocijas darbs ir publicēto rakstu kopa, kas veidota no publikācijām

- I. **Dzirkale Z**, Rumaks J, Svirskis S, Mazina O, Allikalt A, Rinke A, Jekabsons K, Muceniece R, Klusa V. Lunasin-induced behavioural effects in mice: Focus on the dopaminergic system. *Behav Brain Res.* 2013;256:5-9.
- II. **Dzirkale Z**, Pupure J, Rumaks J, Svirskis S, Vanina M, Mezhapuke R, Sile V, Fernandes MA, Duburs G, Klusa V. Comparative study of taurine and tauropyrone: GABA receptor binding, mitochondrial processes and behaviour. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(2):230-7.
- III. Jansone B, Rumaks J, **Dzirkale Z**, Pupure J, Svirskis S, Muceniece R, Klusa V. Gamma1- and gamma2-melanocyte stimulating hormones induce central anxiogenic effects and potentiate ethanol withdrawal responses in the elevated plus-maze test in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;92(2):267-71.
- IV. Muceniece R, Saleniece K, Krigere L, Rumaks J, **Dzirkale Z**, Mezhapuke R, Zharkova O, Klusa V. Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2008;90(4):712-6.
- V. Muceniece R, Saleniece K, Krigere L, Rumaks J, **Dzirkale Z**, Mezhapuke R, Kviesis J, Mekss P, Klusa V, Schiöth HB, Dambrova M. Potato (*Solanum tuberosum*) Juice Exerts an Anticonvulsant Effect in Mice through Binding to GABA Receptors. *Planta Medica* 2008;74(5):491-6.

### Darba rezultātus atspoguļojošās kongresu un konferenču tēzes

1. **Z.Dzirkale**, K.Jekabsons J.Namniece, I.Nakurte, S.Svirskis, J.Rumaks, R.Muceniece, V.Klusa. Biologically active seed peptide lunasin and its influence on the CNS. World Congress of Pharmacy&Pharmaceutical Sciences, 73<sup>rd</sup> International Congress of FIP, Aug 31 – Sept 5, 2013, Dublin, Ireland. Poster N<sup>o</sup> NPR-P-16.
2. Klusa V., Muceniece R., **Dzirkale Z.**, Rumaks J., Svirskis S. Central effects of the peptide lunasin. 45th meeting of the European Brain and Behaviour Society (EBBS), September 6-9, 2013, Munich, Germany. Abstract P276.
3. **Z.Dzirkale**, J.Namniece, I.Nakurte, K.Jekabsons, J.Rumaks, Š.Svirskis, B.Jansone, V.Kluša, R.Muceniece. Lunasīna centrālie efekti, LU 71.zinātniskā konference Medicīnas sekcijas sēdes tēžu apkopojums, 15.02.2013., Rīga 2013, 19.lpp.
4. **Z.Dzirkale**, R.Svarcbahs, B.Jansone, N.Karajeva, M.Vanina, L.Adlere, E.Berzina, J.Rumaks, S.Svirskis, A.Plotniece, E.Bisenieks,



- G.Duburs, V.Klusa. Comparative effects of different compounds on stress-induced behavioral responses. 17<sup>th</sup> Multidisciplinary International Conference on Neuroscience and Biological Psychiatry "Stress and Behaviour" Proceedings, pp.27, May 16-19, 2012, St-Petersburg, Russia.
5. **Z.Dzirkale**, R.Svarcbahs, Z.Krumina, S.Svirskis, B.Jansone, M.Vanina, A.Laizane, A.Paskevica, V.Matto, V.Klusa. Influence of different rats' exploratory activity on the learning ability. 43<sup>rd</sup> European Brain and Behaviour Society Meeting 9-12 Sept, 2011 Seville, Spain), Abstract book D11-25, p.113
  6. B.Jansone, J.Pupure, J.Rumaks, **Z.Dzirkale**, S.Svirskis, R.Muceniece, L.Klimaviciusa, V.Matto, V.Klusa. Influence of gamma- and beta-MSH peptides on ethanol-induced antidepressant effect in forced swim test in mice. 166.6/AA13. 2010 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online.
  7. Duburs G.; Klusa V.; Bisenieks E.; **Dzirkale Z.**; Pupure J.; Poikans J.; Velena A.; Klovinis J.; Mandrika I.; Ward R.; Crichton R. Acyltaurine derivatives, tauropyrone and analogues. In *COST Action D34 Final Meeting*, Molecular Targeting in Drug Design for Neurological and Bacterial Diseases, 13th-16th October, 2010: Firenze, Convitto della Calza, Italy, 2010; 41.
  8. **Z.Dzirkale**, J.Pupure, J.Rumaks, S.Svirskis, M.Vanina, R.Mezhapuke, M.A.S. Fernandes, G.Duburs, V.Klusa. Taurine and its analogue tauropyrone: comparative pharmacological activities. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology „Bridging Basic and Clinical Pharmacology”, 17-23 July, 2010, Copenhagen, Denmark, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, Vol 107, Suppl 1, Paper No. 1747, page 1048.
  9. Marija Vaņina, **Zane Dzirkale**, Maria Augusta S.Fernandes, Vija Kluša. Taurīna un tauropirona salīdzinošā ietekme uz mitohondriāliem procesiem un uzvedības reakcijām. LU 68.zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums. 2010.gada 5.februārī, Rīga, 2010, 30.-31 lpp.
  10. **Z.Dzirkale**, J.Rumaks, J.Pupure, J.Piļipenko, Š.Svirskis, G.Duburs, V.Kluša Taurīna un tauropirona mazo devu neirofarmakoloģiskie efekti LU 66.zin. konferences materiāli, LU raksti, Medicīna, 2008.
  11. **Z.Dzirkale**, J.Rumaks, J.Pupure, S.Svirskis, G.Duburs, V.Klusa. Taurine and tauropyrone: Comparative neuropharmacological studies of small doses. 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences Sept.13-15, 2007, Tartu, Estonia. European Journal of Pharmaceutical Sciences Vol.32 (2007), No1 (suppl), S19.
  12. L.Krīgere, K.Salieniece, J.Rumaks, **Z.Dzirkale**, K.Vrubļevska, J.Kviesis, P.Mekšs, V.Kluša, R.Muceniece. Benzodiazepīnu un GABA līmeņu noteikšana *Adretta* šķirnes kartupeļos un kartupeļu sulas

- pretkrampju darbības pētījumi. LU 65.zinātn. konference Medicīnas sekcija 1.02.2007.
13. V.Klusa, B.Jansone, J.Rumaks, **Z.Dzirkale**, S.Svirskis. Regulatory effects of gamma-MSH peptides in alcoholized and alcohol-withdrawn mice. Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP). October 5-7, 2006, Tallinn, Estonia. CINP Book of Abstracts 2006, p.44.
  14. B.Jansone, J.Rumaks, **Z.Dzirkale**, R.Muceniece, S.Svirskis, V.Klusa. Influence of gamma-MSH peptides on behavioural responses induced by forced alcoholization in mice” XVth IUPHAR Congress “The Pharmacology in the 21st century: A Bridge between Past and the New Molecular Frontiers””, July 2-7, 2006, Beijing, China. Acta Pharmacologica Sinica 2006 July, Supplement 1, p.84.
  15. K.Saleniece, L.Krīgere, J.Rumaks, J.Pupure, **Z.Dzirkale**, V.Kluša, M.Dambrova, R.Muceniece. Kartupeļu *Solanum tuberosum*, *L. Ūdens ekstrakta saistīšanās pie neiromediatoru receptoriem peļu smadzenēs un ietekme uz uzvedību LU 64. konference, Rīga, 2006.*

# DARBA KONSPEKTĪVS IZKLĀSTS

## Teorētiskais pamatojums

Līdz ar molekulārās bioloģijas un modernās ķīmijas metožu un tehnoloģiju attīstību ir radusies iespēja identificēt dabas produktu aktīvo molekulu struktūras, raksturot to darbības mehānismus un šūnas mērķus (*targets*), liekot pamatus jaunu ārstniecisku līdzekļu dizainam un sintēzei. Te var minēt bezgala daudz tradicionālu piemēru, kaut vai salicilskābes atklāšanu vītoli mizās, morfīna iegūšanu no miega magonēm (*Papaver somniferum*) un citus.

Dažādu dabas produktu darbības mehānismu atklāšana ir stimulējusi arī organisma endogēno procesu izpratni. Viens no spilgtākajiem piemēriem ap 1970. gadu vidū ir smadzeņu opiātu peptīdu jeb opioīdu (endorfīnu, enkefalīnu, dinorfīnu) un to receptoru atklāšana dažādās šūnās. Tas ir ļāvis izprast ne tikai šo peptīdu lomu neiro-imuno-endokrīno procesu regulācijā, bet arī atklāt eksogēnās dabas vielas morfīna signāltransdukcijas mehānismus. Morfīna efekts realizējas caur tiem pašiem opiātu receptoriem, ar kuriem saistās endogēnie opiātu peptīdi. Vēl vairāk, izrādījās, ka atklātais proteīna prekursors proopiomelanokortīns jeb POMC, šķeloties veido ne tikai opiātu peptīdus, bet arī melanocītus stimulējošos hormonus (MSH) jeb melanokortīnus, kuru pētījumi sākās tikai 1990.gados līdz ar piecu MSH receptoru subtipu atklāšanu.

Promocijas darbā iekļauti neurofarmakoloģiski pētījumi par endogēnām substancēm  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ - MSH peptīdiem, aminoskābi taurīnu un tā sintētisku dihidropiridīna atvasinājumu tauropironu, kā arī par eksogēnām dabas vielām: pārtikā izmantojama produkta (kartupeļu) sulas un nesen no sojas pupām un graudaugiem izolētu peptīdu lunasīnu, un triterpēniem, kas izplatīti augu valstī, īpaši bērzu mizā (detalizētāku pamatojumu skat. zemāk). Saskaņā ar darba koncepciju šīm substancēm piemīt noteikta ietekme uz dažādām smadzeņu neurotransmiteru sistēmām.

Iegūtie rezultāti neapšaubāmi papildinās jau esošo informāciju par smadzeņu MSH peptīdu un taurīna funkcijām, dos priekšstatu par pirmo reizi uz CNS funkcijām pētītā lunasīna darbību, sniegs pārsteidzošus datus par kartupeļu sulas augsto GABA koncentrāciju un salīdzinošiem triterpēnu (betulīna, betulīnskābes un lupeola) efektiem. Šie dati var norādīt uz jaunām iespējām psihotropu vielu dizainā, izmantojot pētīto struktūru farmakoforus un determinantes.

## Pētīto vielu izvēles pamatojums

**$\gamma_1$ -MSH un  $\gamma_2$ -MSH peptīdi.** Melanokortīnu peptīdu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma_1$ -,  $\gamma_2$ - un  $\gamma_3$ -MSH) un to receptoru piecu subtīpu atklāšana ir ļāvusi iegūt priekšstatus par to iespējamo fizioloģisko lomu organismā. Galvenie pētījumi, kas sākas 1990-ajos gados, bija veltīti  $\alpha$ -MSH lomas noskaidrošanai, parādot tā dalību gan ādas aptumšošanās procesos, gan uzvedības, stresa, seksuālās funkcijas, barības uzņemšanas regulācijā, imūnās sistēmas regulācijā, analgēzijā un vēl arī citās organisma funkciju norisēs (Wikberg et al., 2000; Schioth, 2001). Taču joprojām maz ir zināms par  $\gamma_1$ -MSH un  $\gamma_2$ -MSH (peptīdu struktūru skatīt 1. attēlā) lomu smadzeņu funkciju regulēšanā. Iepriekšējos mūsu grupas pētījumos (Jansone et al., 2004)  $\gamma$ -MSH peptīdi uzrādījuši spēju regulēt dopamīnerģiskos procesus mezolimbiskajā sistēmā. Tā kā tiek uzskatīts, ka šī sistēma ir atbildīga par emocijām, motivāciju, atkarības veidošanās procesiem un abstinences sindromu, tad šajā pētījumā īpašu vērību pievērsām tieši  $\gamma_1$ -MSH un  $\gamma_2$ -MSH izraisītām uzvedības reakcijām, kas saistās ar dažādiem trauksmes un fobiju stāvokļiem un bailēm/trauksmi kā būtisku etanola abstinences izpausmi. Bez tam, trauksmes simptomi ir vieni no pirmajiem, kas var norādīt uz mūsdienās ļoti izplatītās slimības - depresijas sākuma stadiju. Ņemot vērā iespējas ķīmiskās sintēzes ceļā iegūt peptīdu dabīgo struktūru modifikācijas, kas melanokortīnu receptoru līmenī darbotos kā agonisti vai antagonistu, pastāv nākotnes izredzes jaunu anksiolītisku vai antidepresantu vielu radīšanai.

$\gamma_1$ -MSH:  $\text{H}_2\text{N-Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-NH}_2$

$\gamma_2$ -MSH:  $\text{H}_2\text{N-Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly-OH}$

### 1. attēls. $\gamma_1$ - un $\gamma_2$ - melanokortīnu peptīdu struktūra.

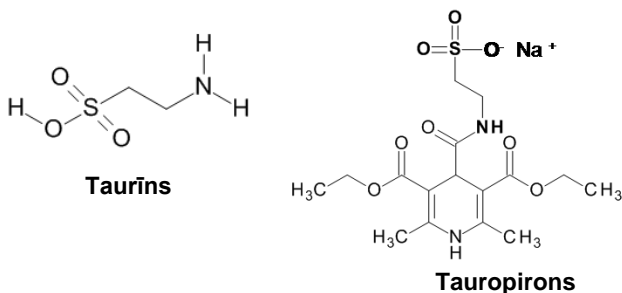
**Lunasīns** ir 43 aminoskābju garš peptīds (2. attēls), ko 1996. gadā atklāja sojas pupās un vēlāk arī vairākos citos graudaugos (Galvez et al., 1997; Nakurte et al., 2013). Salīdzinoši neilgajā pētīšanas vēsturē lunasīnam jau ir atrasta pretiekaisuma, holesterīna līmeni pazeminošā un pretvēža darbība (Hernandez-Ledesma et al., 2013). Tā kā pētījumos uz pelēm, žurkām un arī cilvēkiem ir konstatēta perorāli uzņemtā lunasīna spēja penetrēt hematoencefālisko barjeru un sasniegt smadzeņu audus (Hsieh et al., 2010), tad likās loģiski, ka šis peptīds var ietekmēt CNS funkcijas. Šajā darbā demonstrēti pirmo reizi pasaulē veikto pētījumu dati par sintētiska lunasīna centrāliem efektiem.

Ser-Lys-Trp-Gln-His-Gln-Gln-Asp-Ser-Cys-Arg-Lys-Gln-Leu-Gln-Gly-Val-Asn-Leu-Thr-Pro-Cys-Glu-Lys-His-Ile-Met-Glu-Lys-Ile-Gln-Gly-Arg-Gly-Asp- -Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp

2. attēls. **Lunasīna aminoskābju sekvence.**

**Taurīns** ir endogēna sēru saturoša aminoskābe, kas piedalās daudzu organisma procesu regulācijā, veicot neurotransmitera funkcijas un uzrādot plaša spektra darbību no antioksidanta līdz membrānas stabilizācijai, no osmoregulācijas līdz neiroprotekcijai (Huxtable, 1992). Tiek uzskatīts, ka taurīns savu hidrofilo īpašību dēļ slikti absorbējas, un tā transports cauri hematoencefaliskajai barjerai ir vājš, tāpēc nepieciešamas lielas taurīna devas, lai sasniegtu efektu. Daudzi pētījumi ir veltīti taurīna spējai samazināt etanola patēriņu un samazināt etanola izraisītās aknu patoloģijas (Kerai et al., 1998).

Lai uzlabotu taurīna biopieejamību, uzlabotu vielas lipofilitāti un veicinātu transportu uz mērķšūnām smadzenēs, Latvijas Organiskās sintēzes institūtā ir sintezēts taurīnu saturošs 1,4-dihidropiridīna (DHP) atvasinājums **tauropirons** (struktūras skatīt 3. attēlā). Savienojuma dizaina pamatā bija doma, ka DHP cikls/gredzens kā nesējmolekula atvieglos taurīna nonākšanu smadzenēs (*brain delivery*) un tauropirona efekti būs daudz spēcīgāki nekā taurīnam. Šajā darbā izmantotas līdz šim nepētītas zemas taurīna un tauropirona devas *in vivo*, īpašu vērību veltot etanola efektu regulācijai. Bez tam ir dots abu vielu salīdzinošs raksturojums *in vitro* GABA-A receptoru līmenī.

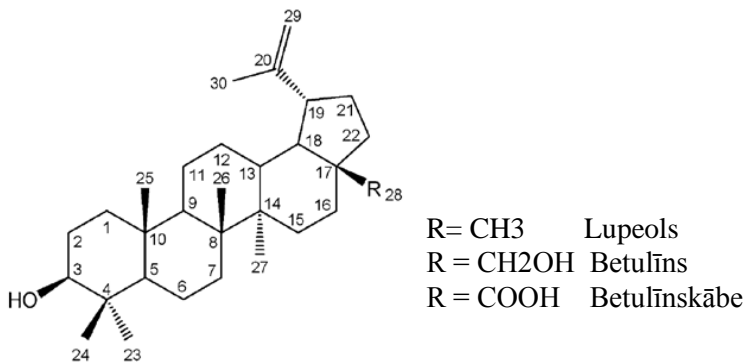


3. attēls. **Taurīna un tauropirona struktūrformula.**

Nesen ir atrasts, ka **kartupeļi** satur benzodiazepīnu struktūras vielas (Wildmann et al., 1988; Skiryecz et al., 2005), kas rada intrigu noskaidrot šīs bioloģiski svarīgās kultūras farmakoloģiskos efektus. Līdz šim nav atrodami pētījumi, kas parādītu, vai kartupeļu produkti var ietekmēt CNS darbību. Zinot, ka benzodiazepīni saistās ar GABA-A receptora noteiktām struktūras daļām (benzodiazepīna saiti), tad loģiski, ka mūsu interese bija noskaidrot, vai kartupeļiem (mūsu gadījumā kartupeļu sulai) piemīt spēja saistīties arī ar

specifisko GABA-A receptora GABA saītu un, vai šī saīstīšanās (ja tā tīktu parādīta) izraīsa tīpīskos GABAerģīskos efektus *in vivo*.

Lupāna tīpa pentacīklīskīe trīterpēnī *betulīns, betulīnskābe un lupeols* (struktūras skatīt 4. attēlā) īr plaīši izplatīti augu valstī, īpaīši bērza mīzā. Pētījumi par to bioloģīsko aktīvītātī galvenokārt saīstīti ar pretīekāīsuma, pretvīrusu, pretseņīīšu un pretvēža darbību (Alakurtī et al., 2006). Saīdzīnoīī nesēn īr pierādīts, ka betulīnskābe, kas atrodama noteīktu augu ekstraktos, pēc īntrapērītoneālas īevadīīšanas spēj šķērsot hemoencefālīsko barjeru (Udeanī et al., 1999) un izraīst anksīolītīsku efektu (Durst et al., 2002). Savukārt līdz šīm nav atrodami pētījumi par betulīna un lupeola spēju šķērsot hēmatoencefālīsko barjeru un šo trīterpēnu īespējamo īetekmi uz CNS funkcijs. Darbā atspoguļoti pīrmo reīzi veīktīe pētījumi CNS līmenī, testējot struktūrālī līdzīģos lupāna tīpa trīterpēnus betulīnu un lupeolu, kā arī betulīnskābī *in vivo* GABAerģīsko procesu kontekstā.



4.attēls. Pentacīklīskīe trīterpēnī - lupeols, betulīns, betulīnskābe.

## Materīālī un metodes

### Dzīvniekī

Pētījuma procedūras veīktas laīka posmā no 2006. gada rudens līdz 2013. gada maījam, īzņemot vasaras sezonas.

Pētījumos īzmantoti bezlīnīju ICR un C57Bl/6 peļu tēvīņī (svarā 20 - 25 g) no Rīģas Strādīņa Unīversītātes Dzīvnieku audzēšanas laboratorījas (Rīģa, Latvīja). Dzīvniekī tīka adaptēti plastīkāta būros, īzmitīnot tos standarta apstākļo: īstabas temperatūra 22±1 °C, gaīsmas/tumsas cīkls 12h/12h, standartīzēta sausa barība un ūdens *ad libitum*. Vīenā eksperīmentālā grupā tīka īekļautī 6-10 dzīvniekī.

Visas pētījumu procedūras veiktas, lai pēc iespējas samazinātu un atvieglotu dzīvnieku ciešanas, un saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes direktīvu 86/609/EEC un 2010/63/ES vadlīnijām par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību un ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomes atļaujām.

## ***Vielas***

Lielākā daļa pētījumos izmantotās pētāmās vielas (betulīns, betulīnskābe, lupeols, taurīns), gan references vielas (bikukulīns, apomorfīns, diazepāms, gamma-aminosviestskābe, ketamīns, amfetamīns) un *Tween-80* iegādātas no *Sigma-Aldrich* (St.Louis, MO, ASV). Peptīdi  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH pirkti no *BACHEM*, Vācija, bet sintētiskais lunasīns - no *CASLO Laboratory ApS* (Dānijas Tehniskā universitāte, Dānija). 1,4-Dihidropiridīna atvasinājums tauropirons (2-(2,6-dimetil-3,5-diet oksikarbonil-1,4-dihidropiridīn-4-karboksamido)-etānsulfoskābe) un dihidropiridīna cikls (Na 3,5-dietoksikarbonil-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridīn-4-karboksilāts) sintezēti Latvijas Organiskās sintēzes institūtā. 95% etanols iegādāts aptiekā un atšķaidīts līdz vajadzīgajai koncentrācijai. Vielu šķīdināšanai izmantots NaCl fizioloģiskais šķīdums 0.9% (*Fresenius Kabi*, Polija). Kartupeļu pētījumos izmantojam „Adretta” šķirnes kartupeļus, kuri audzēti bioloģiskajā zemnieku saimniecībā (Latvija), un kuri pēc novākšanas uzglabāti 10°C temperatūrā telpā ar relatīvo mitrumu 50%. Nomizotiem kartupeļiem izspieda sulu, kuru izfiltrēja caur nitrocelulozes filtru. Eksperimentos izmantoja svaigi spiestu sulu, kuru atšķaidīja ar fizioloģisko šķīdumu līdz vajadzīgajai koncentrācijai.

## ***Vielu ievadīšana***

Pētījumos izmantotie peptīdi ( $\gamma$ 1-,  $\gamma$ 2-MSH un lunasīns), betulīns un kartupeļu sula tika šķīdināti mākslīgajā cerebrospinālajā šķīdumā (aCSF) vai fizioloģiskajā šķīdumā un injicēti i.c. neanestezētām pelēm caur J-veida adatu, kas savienota ar Hamiltona šļirci; metode detalizēti aprakstīta iepriekš (Takagi et al., 1979). Ievadīšanas tilpums vienā reizē bija 5  $\mu$ l vai 10  $\mu$ l.

Lielākā daļa vielu-analizatoru (etanols, ketamīns, amfetamīns, apomorfīns), kā arī pētāmās vielas taurīns, tauropirons šķīdināti fizioloģiskajā šķīdumā, bet triterpēni *Twina* šķīdumā, un ievadīti i.p. vai s.c. tilpumā 10 ml/kg. Kartupeļa sula vadīta arī perorāli, bet bikukulīns – i.v. Detalizētākas vielu devas, ievadīšanas veidus un režīmus skatīt publikācijās I; II; III; IV; V.

## ***Dzīvnieku uzvedības novērošanas testi***

**Rotējošā stieņa (*Rota-rod*)** testā tika pārbaudīta peļu kustību koordinācija un muskuļu tonuss uz rotējošā stieņa aparāta (*Accelerating Rota Rod 7650, Ugo Basile*, Itālija). Testa metodes pamatojums sīkāk aprakstīts iepriekš (Dunham and Miva, 1957). Īsumā: iepriekšējā dienā pirms

eksperimenta dzīvnieki tika trenēti uz rotējošā stieņa, un tie dzīvnieki, kuri 180 sekundes nespēja noturēties uz rotējošā stieņa, kura griešanās ātrums bija 15 apgriezieni minūtē, tika izslēgti no eksperimenta. Eksperimenta dienā vēlreiz tika pārbaudīta spēja noturēties uz rotējošā stieņa, un divas stundas pēc pārbaudes dzīvniekiem tika ievadīta pētāmā viela vai fizioloģiskais šķīdums kontroles grupai. 15 minūtes pēc i.c. ievadīšanas vai 30 (vai 60) minūtes pēc i.p. ievadīšanas pele tika novietota uz rotējošā stieņa, kur katram dzīvniekam tika reģistrēts latentais periods (sekundēs) līdz nokrišanai no rotējošā stieņa, nepārsniedzot laiku 180 s.

**Bikukulīna krampju testā** tika noteikta bikukulīna deva (mg/kg), kas izraisa krampju sākumu pelēm ar un bez pētāmās vielas (metodes pamatojums sīkāk aprakstīts iepriekš, Devaud et al., 1995). Atkarībā no pētījuma protokola (sīkāk skatīt attiecīgās publikācijas I; II; IV; V) pētāmā viela vai fizioloģiskais šķīdums (kontroles grupai) pelēm tika injicēti i.c. 10 vai 15 min, vai i.p. 30 vai 60 min, vai *per os* 30 min pirms bikukulīna šķīduma intravenozas ievadīšanas peles laterālajā astes vēnā ar konstantu ātrumu 0,5 ml/min līdz krampju sākuma sliekšnim. Par krampju sliekšni tika uzskatīts brīdis, kad parādījās pirmie galvas un kakla miokloniskie krampji.

**Etanola izraisītās gulēšanas tests.** Detalizēta etanola izraisītās gulēšanas testa metode sīkāk aprakstīta iepriekš (McBroom et al., 1986). Pētāmās vielas tika ievadītas i.p. 60 min pirms etanola (4 g/kg, 20% šķīdums, i.p.) ievadīšanas. Šāda etanola deva pelēm izraisa sedāciju un miegainību, kas izpaužas kā ierastās pozīcijas refleksa (*righting reflex*) atrasties normālajā ķermeņa pozīcijā uz četrām kājām horizontāli pret virsmu zudums. Gulēšanas laiks tika mērīts kā laika intervāls sekundēs no aizmigšanas (kad pele, nolikta guļus pozīcijā uz muguras, neapgriezās vairāk kā trīs reizes atpakaļ uz kājām), līdz pamošanās brīdim, kad pilnībā tika atgūts ierastās pozīcijas reflekss.

**Paaugstinātā X-veida labirinta tests** ir vispārārstīta metode graužēju baiļu pārbaudei. Labirints sastāv no divām platformām, kas krustojas centrā, veidojot plus zīmes jeb X-veida izskatu un kas novietotas 50 cm augstumā no grīdas. Vienai platformai ir necaurspīdīgas sienas, bet otra platforma ir atvērta, bez sienām. Metodes pamatā ir konflikts starp dabisku graužēju vēlmi izpētīt visu platformu un tajā pašā laikā baidīties no platformas atvērtajiem rajoniem un augstuma. Samazināts pavadītais laiks atvērtajā platformā tiek saistīts ar bailēm jeb anksioģēnu darbību, savukārt pavadītais laiks atvērtajā platformā norāda uz anksiolītisku efektu (Pellow and File, 1986). Testa sākumā eksperimenta dzīvnieks tika novietots uz centrālās zonas ar skatu uz atvērto platformu. 5 minūtes ilgi tika novērotas peles uzvedības reakcijas un ar mikroskaitļotāja *Psion Workabout (Psion PLC, England)* palīdzību tika reģistrēti tādi parametri kā laiks, kas pavadīts uz atvērtās, slēgtās un centrālās platformas; slēgto un atvērto platformu ieeju krustošanas skaits. Ieeja platformā tika fiksēta, kad dzīvnieks ar visām četrām ķepām bija uzgājis uz attiecīgās platformas.



Peļu anksioģēnas/anksiolītiskas uzvedības izpausmes tika pārbaudītas 20 min pēc pētāmo vielu i.e. ievadīšanas, kā arī tika vērtēta pētāmo vielu ietekme uz etanola izraisītiem specifiskiem efektiem paaugstinātā X-veida labirintā. Anksiolītiska uzvedība modelēta, ievadot etanolu vienreizēji i.p. devā 2 g/kg 45 min pirms testēšanas labirintā. Savukārt etanola abstinence tika radīta, 10 dienas pēc kārtas ievadot etanolu (2 g/kg, i.p.), un tad pēc divu dienu etanola vadīšanas pārtraukuma (eksperimenta 12. dienā) paaugstinātā X-veida labirintā novērota abstinences reakcija, kas izpaudās kā baiļu uzvedība jeb anksioģēna darbība (Cole et al., 2000).

**Katalepsijas tests** tika veikts, lēnām novietojot peles abas priekšķepas uz horizontālas stieples (0,2 cm diametrā), kas atradās 6 cm augstumā virs galda virsmas. Latentais periods, ko pele pavadīja neizkustoties no šīs pozīcijas, tika mērīts sekundēs (Kobayashi et al., 1997). Atkarībā no pētījuma protokola katalepsijas tests tika veikts arī atkārtoti pēc 30 vai 60 minūtēm.

**Atvērtā lauka (*open field*) tests** tika izmantots, lai novērtētu pētāmo vielu ietekmi uz peļu lokomotoro aktivitāti. Pele tika ievietota atklāta tipa arēnas jeb lauka (50 x 50 x 20 cm) centrā un tika novērota ar videonovērošanas sistēmu, kura saistīta ar datorprogrammu *Panlab Smart version 2*. Tad 5 minūšu laikā tika reģistrēta dzīvnieka pārvietošanās aktivitāte jeb horizontālā lokomocija, kas tika izteikta kā kopējā noietā distance centimetros. Lai noskaidrotu pētāmās vielas darbības mehānismus, testā izmantotas references vielas - ketamīns un amfetamīns, kas specifiski maina dzīvnieku pārvietošanās aktivitāti.

**Apomorfīna izraisītā rāpšanās uzvedība (*climbing test*):** apomorfīns ir neselektīvs dopamīna receptoru agonists, kas pelēm noteiktās devās izraisa stereotipisku rāpšanās jeb kāpšanas uzvedību. Metodes pamatojums sīkāk aprakstīts iepriekš (Costall et al., 1978; Dixit et al., 2013). Eksperimenta dzīvniekiem tika ievadīts apomorfīns 5 mg/kg s.c., kas izšķīdināts 0.1% askorbīnskābes šķīdumā, kontroles grupai - askorbīnskābes šķīdums. Pēc 5 minūtēm pele tika ielikta būrī, kur gar vertikālajām sienām novietots stieple siets, un tika novērota peles uzvedība ik pa 5 minūtēm 30 minūšu laikā. Rāpšanās uzvedība tika novērtēta ballēs: 0 – visas četras ķepas uz grīdas; 1 – viena ķepa uz sieta; 2 – divas ķepas uz sieta; 3 – trīs ķepas uz sieta; 4 – visas četras ķepas uz sienas sieta. Tādējādi rāpšanās uzvedība katram dzīvniekam tika reģistrēta robežās no 0-24.

### ***In vitro* pētījumi**

Pētāmo vielu (taurīna, tauropirona un DHP cikla) saistīšanās ar GABA-A receptoriem pārbaudīta uz peļu smadzeņu šūnu membrānām, kā „karsto” ligandu izmantojot [<sup>3</sup>H]GABA, bet nespecifisko saistīšanos nosakot ar 10 mM GABA (Mehta and Ticku, 2001). Saistīšanās ar GABA-B receptoriem noteikta žurku smadzeņu membrānās (Bischoff et al., 1999; Asay and Boyd, 2006), izmantojot GABA-B receptora selektīvu radioligandu [<sup>3</sup>H]CGP54626 un

neiezīmētu 10mM baklofēnu. Saistītā radioaktivitāte tika mērīta ar šķidrums scincilācijas un luminiscences mērīšanas aparātu *1450 Microbeta Trilux* (Wallac, Somija). Radioligandu saistīšanās pētījums veikts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā (Rūdolfs Mežapuķe).

Lunasīna spēja saistīties ar dopamīna receptoriem noteikta HEK293 šūnu līnijas šūnu membrānu suspensijā, nosakot specifisko saistīšanos ar D<sub>1</sub> receptoru, izmantojot [<sup>3</sup>H]SCH23390, un iezīmēto [<sup>3</sup>H]rakloprīdu - ar D<sub>2</sub> receptoru (Reinart-Okugbeni et al., 2013). Lunasīna ietekme uz cAMF sintēzi novērtēta HEK293 līnijas dzīvās šūnās, izmantojot <sup>T</sup>Epac<sup>vv</sup> biosensoru (Mazina et al., 2012). Pētījums veikts Tartu universitātes Ķīmijas institūta Bioorganiskās ķīmijas laboratorijā (Ago Rinken grupā).

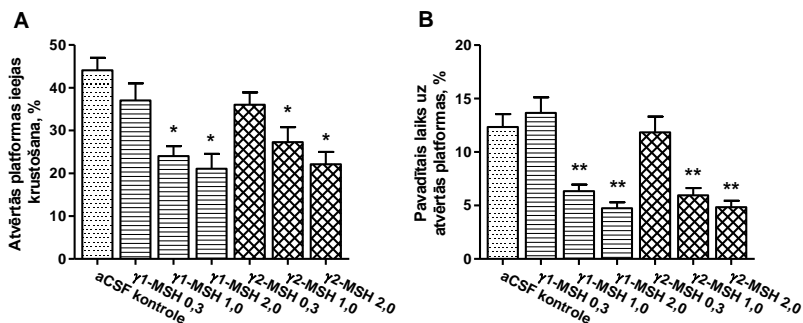
### ***Statistiskā datu apstrāde***

Iegūto datu statistiskā apstrāde veikta, izmantojot datorprogrammu GraphPad Prism v.5.00. *In vivo* eksperimentos atšķirības starp pētījumu grupām izvērtētas ar vienfaktora ANOVA ar tai sekojošiem multiplās salīdzināšanas testiem (detalizētāk skatīt rezultātu sadaļā vai attiecīgās publikācijas I; II; III; IV; V). *In vitro* radioligandu saistīšanās pētījumi veikti ar 2-3 paralēliem mērījumiem un atkārtoti vismaz divas reizes, iegūtie rezultāti attēloti, pozitīvo atbildes vērtību normalizējot līdz 100%. Visu pētījumu rezultāti uzskatīti par statistiski ticamiem pie  $p < 0,05$ . Visas vērtības izteiktas kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  vidējā standartkļūda (S.E.M.) vai vidējā standartnovirze (S.D.).

## **Rezultāti**

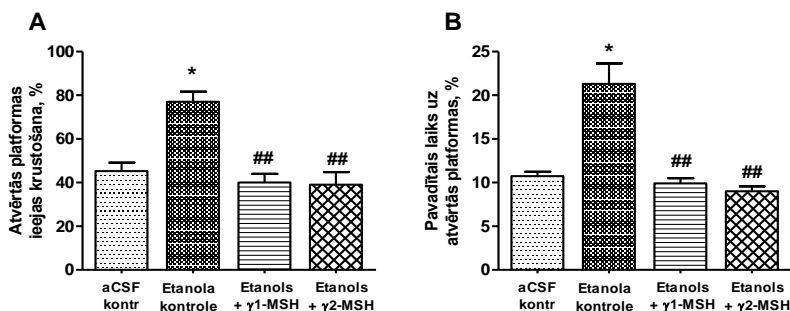
### ***Melanokortīnu peptīdu $\gamma$ 1- un $\gamma$ 2-MSH anksioģēnie efekti etanola testos paaugstinātā X-veida labirintā (Publikācija III)***

Pārbaudot  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH efektus paaugstinātajā X-veida labirintā, novērojām, ka abi peptīdi *per se*, ievadīti intracisternāli devās 1 un 2 nmoli/pelei, ievērojami samazina atvērtās platformas ieejas krustošanas skaitu. 5.A attēlā tas izteikts procentos pret kopējo platformu ieeju krustošanas skaitu, bet 5.B attēlā atspoguļots laiks, kas pavadīts uz atvērtās platformas, salīdzinot ar aCSF kontroles grupu. Devā 0,3 nmoli/pelei šādas peļu uzvedības izpausmes nenovēroja (5. att.). Abu peptīdu efektivitāte abās aktīvajās devās bija līdzīga.



5. attēls.  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH (devās 0,3; 1,0 un 2,0 nmol/pelei/5 $\mu$ l) efekti uz izpētes uzvedību pelēm paaugstinātā X-veida labirintā. Atvērtās platformas ieejas krustošanas skaits, % (A) un pavadītais laiks uz atvērtās platformas, % (B) tika uzskaitīts 20 min pēc i.c. peptīdu vai aCSF kontrolei ievadīšanas. Dati attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 vs. attiecīgā aCSF kontrole, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunnetta multiplās salīdzināšanas testu.

Pārbaudot  $\gamma$ -MSH peptīdu ietekmi uz akūti ievadīta etanola izraisītu anksiolītisku darbību paaugstinātajā X-veida labirintā, atradām, ka  $\gamma$ 1-MSH un  $\gamma$ 2-MSH devā 1 nmols/pelei samazināja gan atvērtās platformas ieejas krustošanas skaitu, gan procentuāli pavadīto laiku atvērtajā platformā, salīdzinot ar etanola kontroles grupu. Turklāt etanola izraisītos anksiolītiskos efektus abi peptīdi reversēja līdz kontroles līmenim (6. att.).



6. attēls.  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH (devā 1,0 nmol/pelei/5 $\mu$ l) ietekme uz izpētes uzvedību pelēm, kas akūti saņēmušas etanolu, testējot paaugstinātā X-veida labirintā. Atvērtās platformas ieejas krustošanas skaits, % (A) un pavadītais laiks uz atvērtās platformas, % (B) tika uzskaitīts 5 min ilgi. Etanols devā 2 g/kg vai fizioloģiskais šķīdums kontrolei ievadīts i.p. 45 min pirms, un peptīdi vai aCSF kontrolei ievadīti i.c. 20 min pirms testēšanas X-veida labirintā. Dati attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0,05 vs. attiecīgā aCSF kontrole; ## $p$ <0,01 vs. attiecīgā Etanola kontrole, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunnetta multiplās salīdzināšanas testu.

Modelējot etanola abstinences izraisītu anksioģēnu uzvedību, peles 10 dienas pēc kārtas saņēma etanola (2 g/kg i.p.) injekciju, un eksperimenta 12. dienā (divas dienas pēc etanola vadīšanas pārtraukšanas) tika testētas paaugstinātājā X-veida labirintā.

1. tabula.  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH efekti uz etanola abstinences izraisītu baiļu tipa uzvedību paaugstinātā X-veida labirinta testā pelēm

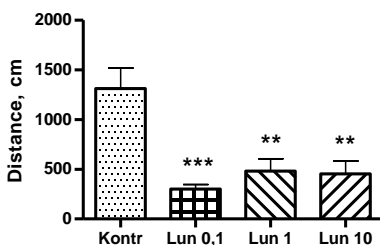
Vielu ievadīšana (i.c. un i.p.)	Deva (i.c. ievadīšanai)	Atvērtās platformas ieejas krustošana, %	Platformu kopējais ieeju krustošanas skaits	Atvērtajā platformā pavadītais laiks, %	Centrālajā platformā pavadītais laiks, %
aCSF kontrole (+ fiz. šķ., i.p.)	aCSF, 5 $\mu$ l	42,85 $\pm$ 1,78	14,21 $\pm$ 0,51	13,6 $\pm$ 0,51	17,20 $\pm$ 1,51
Etanola abstinences kontrole (etanols, 2 g/kg, i.p.)	aCSF, 5 $\mu$ l	35,30 $\pm$ 1,69*	8,64 $\pm$ 0,68*	6,78 $\pm$ 0,54*	14,25 $\pm$ 1,52*
$\gamma$ 1-MSH (+etanols, 2 g/kg, i.p.)	0,3 nmol/5 $\mu$ l	33,13 $\pm$ 1,72*	9,84 $\pm$ 0,44*	6,73 $\pm$ 0,45*	14,88 $\pm$ 1,46*
$\gamma$ 1-MSH (+etanols, 2 g/kg, i.p.)	1 nmol/5 $\mu$ l	5,68 $\pm$ 0,54***	7,74 $\pm$ 0,63*	1,33 $\pm$ 0,28***	14,32 $\pm$ 1,50*
$\gamma$ 1-MSH (+etanols, 2 g/kg, i.p.)	2 nmol/5 $\mu$ l	3,25 $\pm$ 0,49***	7,69 $\pm$ 0,58*	1,12 $\pm$ 0,14***	13,78 $\pm$ 1,39*
$\gamma$ 2-MSH (+etanols, 2 g/kg, i.p.)	0,3 nmol/5 $\mu$ l	36,99 $\pm$ 1,84*	8,19 $\pm$ 0,76*	6,38 $\pm$ 0,52*	14,02 $\pm$ 1,35*
$\gamma$ 2-MSH (+etanols, 2 g/kg, i.p.)	1 nmol/5 $\mu$ l	7,03 $\pm$ 0,61***	7,39 $\pm$ 0,63*	1,22 $\pm$ 0,22***	14,29 $\pm$ 1,53*
$\gamma$ 2-MSH (+etanols, 2 g/kg, i.p.)	2 nmol/5 $\mu$ l	3,51 $\pm$ 0,49***	7,40 $\pm$ 0,90*	1,18 $\pm$ 0,16***	14,18 $\pm$ 1,55*

Etanola abstinencē esošām pelēm (2 dienas pēc desmit dienu piespiestas alkoholizācijas, etanols 2 g/kg i.p.) i.c. tika ievadīti  $\gamma$ 1- un  $\gamma$ 2-MSH (devās 0,3; 1,0 un 2,0 nmoli/pelei/5 $\mu$ l) vai aCSF kontroles grupai. 20 min pēc peptīdu ievadīšanas pārbaudīja uzvedības reakcijas paaugstinātā X-veida labirinta testā 5 minūtes. Kontroles grupas dzīvnieki saņēma aCSF i.c. un fizioloģisko šķīdumu i.p. etanola vietā 10 dienas. Dati attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 vs. aCSF kontrole; \*\*\* $p$ <0,01 vs. etanola abstinences kontroles grupa, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunnetta multiplās salīdzināšanas testu.

Etanola abstinencē esoši dzīvnieki uzrādīja ievērojamu samazinājumu tādos uzvedības parametros kā laiks, kas pavadīts atvērtajā un centrālajā platformā (izteikts procentos pret kopējo testa laiku), atvērtās platformas ieejas krustošanas skaits, (izteikts procentos), un kopējais ieeju krustošanas skaits, salīdzinot ar fizioloģiskā šķīduma grupu (1. tabula). Dzīvnieki, kas bija saņēmuši  $\gamma$ 1-MSH un  $\gamma$ 2-MSH injekcijas devās 1 un 2 nmoli/pelei, potencēja etanola izraisīto reakciju samazinājumu: atvērtās platformas ieeju krustošanas skaitu un laiku, kas pavadīts atvērtajā platformā (izteikts procentos), salīdzinot ar etanola abstinences kontroles grupu. Taču devā 0,3 nmoli/pelei ne  $\gamma$ 1-MSH, ne  $\gamma$ 2-MSH neietekmēja etanola abstinences izraisītos anksioģēnos efektus (1. tabula).

## **Lunasīna centrālo efektu pētījumi, novērtējot tā iespējamās darbības mehānismus (Publikācija I)**

Lunasīna ietekmi uz lokomotoro aktivitāti atvērtā lauka testā novērtējām ar video novērošanas sistēmas palīdzību pēc peptīda intracisternālas ievadīšanas devās 0,1, 1 un 10 nmoli/pelei. Lunasīns visās devās uzrādīja ievērojamu horizontālās lokomotorās aktivitātes samazināšanos, kas izpaudās kā ievērojami īsāka noietā distance, salīdzinot ar kontroles grupu. Īpaši tas izpaudās zemākajā testētajā devā 0,1 nmols/pelei, kad noietā distance samazinājās par aptuveni 75% ( $p < 0,001$  vs. kontroles grupa). Savukārt lielākajās devās 1 un 10 nmoli/pelei efekts nepalielinājās, pat nedaudz samazinājās (distance samazinājās par aptuveni 63%,  $p < 0,01$  vs. kontroles grupa) (7. att.).

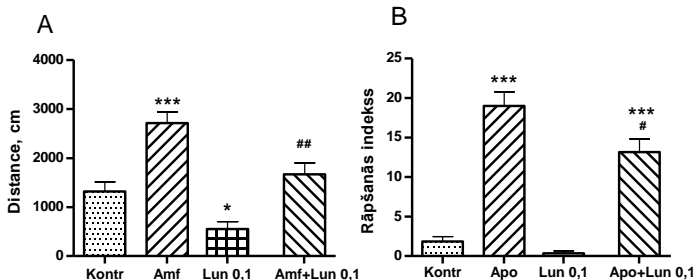


### **7. attēls. Lunasīna ietekme uz lokomotoro aktivitāti C57Bl/6 pelu tēviņiem atvērtā lauka testā.**

Lunasīns (Lun) ievadīts devās 0,1, 1 un 10 nmol/pelei/5 $\mu$ l i.c.; aCSF ievadīts kontroles grupai (Kontr) 10 min pirms testa. Horizontālā lokomotorā aktivitāte izteikta kā distance cm, kas noietā 5 minūtēs. Dati attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0,01$  un \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontr, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Bonferroni multiplās salīdzināšanas testu.

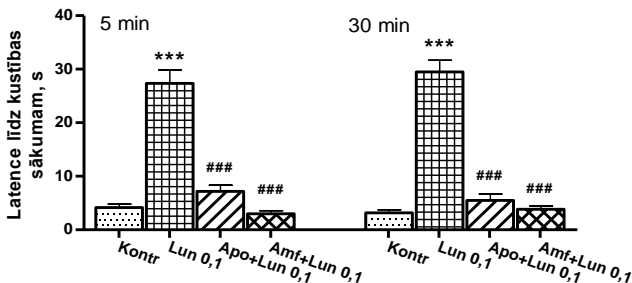
Lai noskaidrotu lunasīna izraisītās hipoaktivitātes cēloņus, izvēlējāmies zemāko aktīvāko peptīda devu (0,1 nmols/pelei). Šī deva ievērojami, aptuveni par 40%, samazināja amfetamīna izraisīto, hiperlokomociju (noietās distances pieaugumu) (8.A att.), kā arī samazināja, aptuveni par 15%, apomorfīna izraisīto stereotipiskās rāpšanās jeb *climbing* uzvedības intensitāti (8.B att.).

Savukārt ketamīna izraisītu lokomotoro aktivitāti atvērtā lauka testā un bikukulīna izsuktas konvulsijas lunasīns neietekmēja (dati nav attēloti).



8. attēls. Lunasīna ietekme uz amfetamīna izraisīto hiperaktivitāti (A) un apomorfīna izraisīto rāpšanās uzvedību (B) C57Bl/6 peļu tēviņiem. Amfetamīns (Amf) devā 2,5 mg/kg ievadīts i.p. 20 min pirms lunasīna devā 0,1 nmol/pelei/5µl (Lun 0,1) vai aCSF (Kontr) kontroles grupai i.c. ievadīšanas. Horizontālā lokomotorā aktivitātē atvērtā laukā novērtēta 10 min pēc i.c. ievadīšanas un izteikta kā distance cm, kas noietā 5 min laikā. Apomorfīns (Apo) 5 mg/kg ievadīts s.c. 10 min pirms Lun 0,1 vai aCSF kontroles grupai i.c. ievadīšanas. Rāpšanās uzvedība sākta novērot 5 min pēc i.c. ievadīšanas un uzskaitīta ik pa piecām minūtēm 30 minūtes ilgi. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± S.E.M. \* $p < 0,05$  un \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontr; # $p < 0,05$  un ## $p < 0,01$  vs. Amf (A) vai Apo (B), vienfaktora ANOVA ar sekojošu Bonferroni multiplās salīdzināšanas testu.

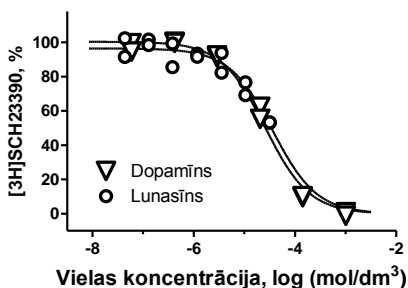
Novērojām, ka devā 0,1 nmols/pelei lunasīns izraisa ļoti izteiktu katelepsiju (9. att), kas sākas jau 5 min pēc peptīda ievadīšanas un turpinās 30 min ilgi (un pat 60 min, dati nav attēloti). Pele kateleptiskā pozīcijā neizkustoties pavadīja pat 30 sekundes. Taču lunasīna izraisītā katelepsija neatīstījās, ja pirms peptīda ievadīja amfetamīnu vai apomorfīnu (9. att.).



9. attēls. Apomorfīna un amfetamīna ietekme uz lunasīna izraisītu katelepsiju C57Bl/6 peļu tēviņiem. Apomorfīns (Apo) devā 5 mg/kg ievadīts s.c. 10 min un amfetamīns (Amf) devā 2,5 mg/kg ievadīts i.p. 20 min pirms lunasīna 0,1 nmol/pelei/5µl (Lun 0,1) vai aCSF (Kontr) kontroles grupai i.c. ievadīšanas. Latents periods, ko pele pavadīja neizkustoties no kateleptiskās pozīcijas, tika mērīts sekundēs un novērtēts 5 un 30 min pēc peptīda ievadīšanas. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± S.E.M. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontr; ### $p < 0,01$  vs. Lun 0,1, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Bonferroni multiplās salīdzināšanas testu.

Pētījumos HEK293 šūnu membrānu suspensijās izmantoja specifisko dopamīna D<sub>1</sub> radioligandu [<sup>3</sup>H]SCH23390, kura saistīšanās afinitāte K<sub>d</sub> bija 0,5 nM, un dopamīna receptora D<sub>2</sub> radioligandu [<sup>3</sup>H]raklopridu, K<sub>d</sub>=0,7 nM. Lunasīns inhibēja D<sub>1</sub> radioliganda saistīšanos (K<sub>i</sub>= 60 ± 15 μM) (10. attēls), bet neietekmēja D<sub>2</sub> liganda saistīšanos (dati nav attēloti).

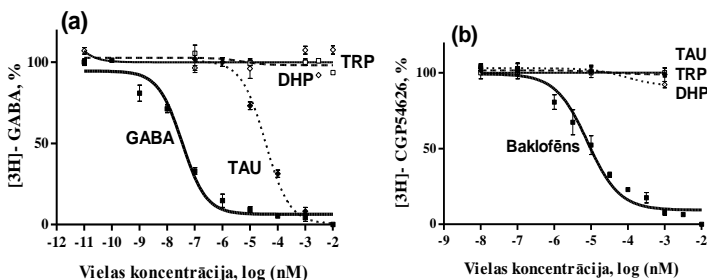
HEK293 līnijas šūnās, kas ekspresē D<sub>1</sub> receptoru, lunasīns inhibēja 10 nM apomorfīna (10 nM) stimulētu cAMF producēšanos (pEC<sub>50</sub>=6,1 ± 0,3), savukārt D<sub>1</sub> specifiskā antagonista SCH 39166 pEC<sub>50</sub> vērtība bija 7,61 ± 0,03. Šūnās, kuras ekspresēja D<sub>2</sub> receptoru, lunasīna ietekmi līdz pat 100 μM koncentrācijai uz cAMF veidošanos nenovērojām.



10. attēls. **Dopamīna un lunasīna inhibējošā aktivitāte attiecībā pret [<sup>3</sup>H]SCH23390 saistīšanos D<sub>1</sub> receptora producējošo HEK293 šūnu membrānās.** Attēlā parādi rezultāti no viena reprezentējoša eksperimenta. Inhibīcijas konstantes aprēķinātas no diviem atsevišķiem eksperimentiem: dopamīnam K<sub>i</sub> = 36 ± 7 μM un lunasīnam K<sub>i</sub> = 60 ± 15 μM.

### ***Taurīna un tauropirona salīdzinošie efekti GABA receptoru līmenī (Publikācija II)***

*In vitro* pētījumā, izmantojot radioligandu saistīšanās metodi, noteicām, ka taurīns saistās ar peļu smadzeņu membrānas GABA-A receptoru, izspiežot [<sup>3</sup>H]GABA no saistīšanās vietām, ar afinitāti ap 10 μM (K<sub>i</sub> = 1,013 x 10<sup>-5</sup> M) (11.a attēls). Turpretī tauropirons un DHP cikls neuzrādīja saistīšanos ar GABA-A receptoru (11.a attēls). Visas trīs pētītās vielas - taurīns, tauropirons un DHP pārbaudītajās koncentrācijās no 0,1 nM līdz 1 mM mūsu pētījumā, kur kā iezīmētais ligands tika izmantots [<sup>3</sup>H]-CGP54626, neuzrādīja afinitāti pret GABA-B receptoru (11.b attēls).



11. attēls. Taurīna (TAU), tauropirona (TRP), un DHP saistīšanas pie peļu smadzeņu membrānas (a) GABA-A receptora, un žurku smadzeņu (b) GABA-B receptora. Smadzeņu membrāna tika inkubēta ar 10 nM  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  (a) un  $\sim 2$  nM  $[^3\text{H}]\text{-CGP54626}$  (b), un TAU, TRP, un DHP koncentrācijās 0,1 nM līdz 1 mM. Nespecifiskā saistīšanās noteikta 10 mM GABA (a) vai 10 mM baklofēna (b) klātbūtnē.

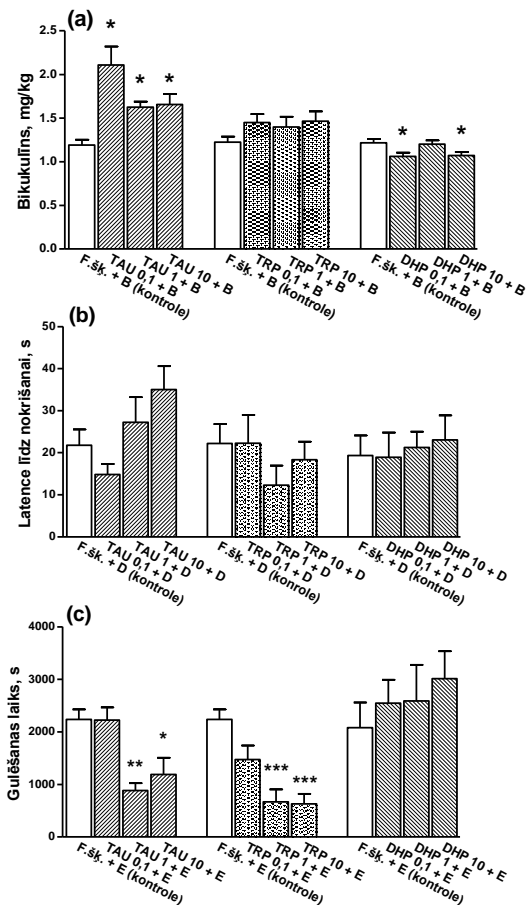
*In vivo* pētījumos noteicām taurīna, tauropirona un DHP cikla ietekmi uz GABA-A receptora ligandu izraisītiem efektiem uz peļu uzvedību.

Intravenozi pelēm ievadot bikukulīnu, pirmie miokloniskie krampji parādījās bikukulīna devā ap 1,2 mg/kg. Kā redzams 12.a attēlā, taurīns, ievadīts i.p. 60 min pirms bikukulīna, visās testētajās devās 0,1, 1 un 10 mg/kg antagonizē bikukulīna efektu, kas izpaužas kā lielāka bikukulīna deva, kas nepieciešama, lai izraisītu krampjus. Taurīns visspēcīgāko efektu uzrādīja devā 0,1 mg/kg, kad bija nepieciešama gandrīz dubulta bikukulīna deva, lai parādītos krampji, salīdzinot ar kontroli. Savukārt tauropirona ievadīšana neietekmēja bikukulīna konvulsīvo darbību, bet DHP ievadīšana devās 0,1 un 10 mg/kg, bet ne 1 mg/kg, samazināja bikukulīna devu, kas izsauc krampjus (12.a att.). Taurīnam, tauropironam un DHP *per se* 60 min iedarbības laikā līdz bikukulīna ievadīšanai nenovēroja jebkāda veida konvulsīvu darbību.

Taurīns, tauropirons un DHP nevienā no testētajām devām pašas par sevi neuzrādīja miorelaksējošu efektu rotējošā stieņa testā (dati nav attēloti). Šīs vielas arī neietekmēja diazepāma izraisīto muskuļu spēka pazeminājumu un koordinācijas traucējumus, kaut gan taurīns devā 10 mg/kg uzrādīja tendenci pagarināt diazepāma efektu - laiku līdz nokrišanai no rotējošā stieņa (12.b att.).

Kā redzams 12.c attēlā, taurīns devās 1 un 10 mg/kg ievērojami samazināja etanola izraisīto gulēšanas laiku. Līdzīgu efektu varēja novērot pēc tauropirona ievadīšanas, bez tam devā 10 mg/kg varēja novērot visizteiktāko gulēšanas laika samazinājumu. DHP ievadīšana pelēm neietekmēja etanola efektu šajā testā, kā arī pašas vielas 60 min iedarbības laikā neizraisīja gulēšanu.





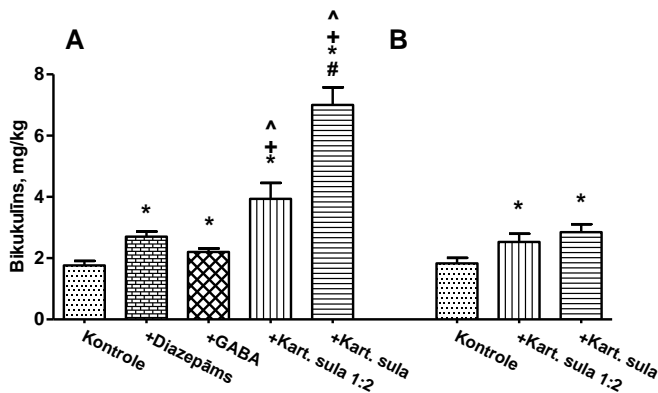
12. attēls. **Taurīna (TAU), tauropirona (TRP) un 1,4-dihidropiridīna (DHP) ietekme uz GABA-A receptora ligandu izraisītu uzvedību pelēm.**

(a) Bikukulīna (B) izraisīti krampji. (b) Diazepāma (D) izraisīta miorelaksācija rotējošā stieņa testā. (c) Etanola (E) izraisīta gulēšana. TAU, TRP un DHP ievadīti devās 0,1, 1,0 un 10 mg/kg i.p. 60 min pirms B (0,1 mg/ml, i.v.) un E (4 g/kg 20% šķ., i.p.), un 60 min pirms rotējošā stieņa testa. D (5 mg/kg, i.p.) ievadīts 30 min pēc TAU, TRP vai DHP ievadīšanas. Kontroles dzīvniekiem ievadīts fizioloģiskais šķīdums (F.šk.). Dati attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. attiecīgā kontrole, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunnetta multiplās salīdzināšanas testu (b un c) vai Kruskal-Wallis ar sekojošu Dunna multiplās salīdzināšanas testu (a).

**Kartupeļu sulas izraisītie GABAergiskie efekti (Publikācija V)**

Bikukulīns, ievadīts i.v. devā ap 1,5-2 mg/kg peles astes laterālajā vēnā, izsauc miokloniskus krampjus. Pārbaudot kartupeļu sulas ietekmi uz bikukulīna izsauktiem krampjiem, novērojām, ka gan uz pusi atšķaidīta, gan neatšķaidīta kartupeļu sula, ievadīta i.c. pirms bikukulīna, uzrādīja ievērojamu antikonvulsīvu darbību (13.A att.). Bez tam kartupeļu sulas efekts uz bikukulīna krampju sākšanās sliekšni bija ievērojami augstāks, salīdzinot ar jau zināmām antikonvulsīvām vielām diazepāmu un GABA i.c. ievadīšanu (13.A att.). Ne tik spēcīgu, bet arī statistiski ticamu bikukulīna darbības

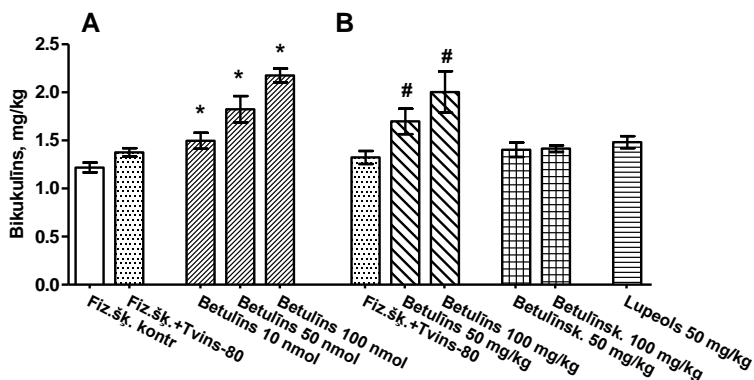
samazinājumu, tātad antikonvulsīvu efektu, novērojām pēc perorālas kartupeļu sulas ievadīšanas (13.B att.).



13. attēls. **Kartupeļu sulas pretkrampju darbība pēc i.c. (A) un perorālas (B) ievadīšanas.** Intracisteriāli kartupeļu (Kart.) sula neatšķaidīta un atšķaidīta 1:2, diazepāms devā 25 µg/pelei un GABA devā 50 µg/pelei tika ievadīti 10 µl tilpumā 10 min pirms bikukulīna i.v. ievadīšanas. Kontroles dzīvnieki saņēma fizioloģisko šķīdumu tādā pat tilpumā kā pētāmās vielas. Perorāli kartupeļu sula neatšķaidīta un uz pusi atšķaidīta ievadīta 0,4 ml tilpumā 30 min pirms bikukulīna i.v. ievadīšanas. Kontroles dzīvnieki saņēma fizioloģisko šķīdumu tādā pat tilpumā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± S.E.M. \*p<0,05 vs. attiecīgā bikukulīna kontrole; #p<0,05 vs. atšķaidīta kartupeļu sula; †p<0,05 vs. diazepāms; ^p<0,05 vs. GABA, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunnetta multiplās salīdzināšanas testu.

### ***Pentaciklisko triterpēnu - betulīna, betulīnskābes, lupeola farmakoloģiskie efekti un GABAergiskā komponenta loma tajos (Publikācija IV)***

Triterpēnu efektu noskaidrošanai *in vivo* sarežģītumus radīja vielu sliktā šķīdība. Betulīnu izdevās izšķīdināt fizioloģiskajā šķīdumā ar vielas *Tween-80* palīdzību, bet betulīnskābi un lupeolu neizdevās izšķīdināt, tāpēc šīs divas vielas ievadīja tikai i.p. Pārbaudot, ka šķīdinātājs neietekmē bikukulīna darbību, turpmāk to izvēlējāmies kā kontroli. Intracisteriāla betulīna ievadīšana visās testētājās devās 10, 50 un 100 nmoli/pelei ievērojami antagonizēja bikukulīna efektu, kas izpaudās kā lielāka bikukulīna deva, kas nepieciešama, lai parādītos pirmie miokloniskie krampji (14.A att.). Līdzīgi, betulīna ievadīšana i.p. devās 50 un 100 mg/kg samazināja bikukulīna krampju efektu. Taču ne betulīnskābe, ne lupeols neuzrādīja ietekmi uz bikukulīna konvulsīvo darbību (14.B att.). Pārbaudījām arī triterpēnu ietekmi uz muskuļu spēku un koordināciju rotējošā stieņa testā. Ne betulīns, ievadīts i.c. vai i.p., ne betulīnskābe un lupeols, ievadīti i.p., neuzrādīja muskuļus relaksējošu efektu (dati nav attēloti).



#### 14. attēls. Triterpēnu ietekme uz bikukulīna krampju izraisīto darbību pelēm.

A. Betulīns devās 10, 50 un 100 nmol/10μl/pelei vai kontroles grupai fizioloģiskais šķīdums (Fiz.šķ.) ar 0,5% Tvina-80 šķīdumu ievadīts i.c. 15 min pirms bikukulīna i.v. infūzijas. B. Betulīns (50 un 100 mg/kg), betulīnskābe (50 un 100 mg/kg) un lupeols (50 mg/kg) vai Fiz.šķ./Tvins-80 ievadīti i.p. 30 min pirms bikukulīna i.v. infūzijas. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± S.D. \*p<0,05 vs. Fiz.šķ.kontrolē pēc i.c. ievadīšanas; #p<0,05 vs. Fiz.šķ. + Tvins-80 pēc i.p. ievadīšanas, vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunnetta multiplās salīdzināšanas testu.

## Diskusija

### *γ1- un γ2-MSH peptīdu anksioģenā darbība (Publikācija III)*

Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ -MSH funkcijas baiļu uzvedības regulācijā pelēm paaugstinātā X-veida labirinta testā, kā arī pārbaudīt šo peptīdu ietekmi uz etanola anksiolītiskiem efektiem un etanola abstinences izraisīto anksioģeno uzvedību.

Cik mums zināms, šis ir pirmais šāda veida pētījums, kurā identificēta  $\gamma$ -MSH peptīdu (1 un 2 nmoli/pelei i.c.) anksioģenā darbība X-veida labirintā: peptīdu ietekmē samazinājās atvērtās platformas ieejas krustošanas skaits un kopējais pavadītais laiks atvērtajās platformās. Zemākā testētā deva 0,3 nmoli/pelei neietekmēja peļu uzvedību. Lai pārliecinātos, ka iegūtais efekts ir tiešām anksioģena darbība, nevis katalepsijas izraisīts mazkustīgums, tūlīt pēc X-veida labirinta testa veicām katalepsijas pārbaudi. Katalepsiju nevienā no gadījumiem nenovērojām, kas liecina, ka  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ -MSH tiešām izraisa anksioģenu efektu.

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti par  $\gamma$ -MSH anksioģeno darbību ir līdzīgi citu autoru iepriekš atrastajiem datiem par  $\alpha$ -MSH anksioģeno darbību (Vecsernyes et al., 2000; Kokare et al., 2006). Interesanti, ka līdzīgi  $\alpha$ -MSH darbībai (Kokare et al., 2006), arī  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ -MSH samazināja etanola inducēto anksiolītisko efektu. Tādējādi var domāt, ka gan  $\alpha$ -MSH, gan  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ -MSH

pieder anksioģēno peptīdu ģimenei, kam ir liela nozīme trauksmes un baiļu procesu regulācijā.

Interesanti, ka abi peptīdi  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ -MSH (devās 1 un 2 nmoli/pelei, bet ne 0,3 nmoli/pelei) pastiprināja etanola abstinences izraisīto anksioģēno darbību, ko novērojām kā samazinātu atvērtās platformas ieejas krustošanas skaitu un mazāk pavadītu laiku atvērtajā platformā, salīdzinot ar etanola kontroles grupu. Tādējādi abi  $\gamma$ -MSH peptīdi uzrādīja pat pastiprinošu jeb sinerģisku ietekmi uz etanola abstinences radītām pastiprinātām baiļu sajūtām pelēm.

Šajā pētījumā iegūtajiem rezultātiem nevar noteikt viennozīmīgu  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ -MSH anksioģēnās darbības mehānismu. No vienas puses anksioģēno darbību var skaidrot ar  $\gamma$ -MSH peptīdu augstas afinitātes saistīšanos ar melanokortīna receptora MC3R un MC4R subtipiem (Wikberg, 1999; Wikberg et al., 2000; Schioth, 2001), kas lielā mērā lokalizējas mezolimbiskajā sistēmā, kas savukārt ir saistīta ar emociju un atkarības procesu regulāciju. Citos pētījumos (Kokare et al., 2006) ir uzsvērtā MC4R loma, realizējot  $\alpha$ -MSH anksioģēnos efektus, jo melanokortīnu receptora 3. un 4. subtipa antagonists HS014 ir inhibējis etanola abstinences izraisītos anksioģēnos efektus. Šie pētījumi ļauj domāt, ka ir kopīgi mehānismi, kas nodrošina  $\alpha$ - un  $\gamma$ -MSH peptīdu anksioģēno darbību, kā arī melanokortīnu mijiedarbību ar etanolu.

Taču etanola abstinences izraisītās trauksmes jeb baiļu reakcijās nevar izslēgt arī ne-melanokortīnerģiskos, galvenokārt ar GABA-A un GABA-B receptoriem saistītos mehānismus. Arī etanola efektus prioritāri saista ar GABAerģisko sistēmu (File et al., 1991), kaut gan neizslēdz kortikotropīnu izdalošā hormona (Dave et al., 1986) un serotonīna receptora 1A subtipa (Lal et al., 1991) nozīmi. Savukārt  $\gamma$ -MSH centrālas darbības efektu izraisīšanā GABA un dopamīnerģisko efektu loma jau ir iepriekš parādīta (Klusa et al., 2001; Jansone et al., 2004). Tā, piemēram,  $\gamma_1$ -MSH i.c. ievadīšana pelēm ievērojami samazināja etanola un diazepāma izraisītu analģēziju (Klusa et al., 2001).

$\gamma$ -MSH peptīdu potencējošo darbību uz etanola abstinences izsuktām trauksmes reakcijām vēl var skaidrot ar vienādu etanola un  $\gamma$ -MSH ietekmi uz šūnas signālceļiem, kas aktivē adenilciklāzi un cAMF izraisītās reakciju kaskādes (Wikberg, 1999; Yoshimura et al., 2006).

Taču kopumā var teikt, ka pirmo reizi parādītie  $\gamma_1$ - un  $\gamma_2$ -MSH anksioģēnie efekti, kas ir līdzīgi  $\alpha$ -MSH anksioģēnajai darbībai (ko iepriekš ir novērojuši citi pētnieki), liecina par MSH peptīdu (iespējams arī  $\beta$ -MSH) endoģēno lomu trauksmes un baiļu procesu regulācijā. Vēl jo vairāk, šie peptīdi varētu būt iesaistīti alkohola atkarības un abstinences stāvokļu manifestācijā. Nepieciešami vēl turpmāki pētījumi, kas ļautu detalizētāk izprast melanokortīnu peptīdu ietekmi uz alkohola izraisītiem CNS traucējumiem un to ārstēšanas iespējām.

## ***Lunasīna izraisītie centrālās darbības efekti: fokuss uz dopamīnerģisko sistēmu (Publikācija I)***

No augiem izolētā 43 aminoskābju atlikumu garā peptīda lunasīna spēja šķērsot hematoencefālisko barjeru (Hsieh et al., 2010) radīja lielu interesi pārbaudīt tā iespējamo ietekmi uz centrālās nervu sistēmas funkcijām. Ievadot peptīdu tieši peļu smadzenēs intracisternāli, pirmo reizi parādījām, ka ķīmiski sintezēts lunasīns ietekmē CNS darbību, izraisot izteiktu mazkustīgumu un katelepsiju pat ļoti mazās devās (piem., 0,1 nmols/pelei). Ņemot vērā, ka katelepsijas stāvoklis lielākoties realizējas caur dopamīna receptoru antagonismu (galvenokārt caur dopamīna receptora 2.subtipu jeb D<sub>2</sub>), tad vispirms pārbaudījām lunasīna mijiedarbību ar vielām, kuru pamata darbības mērķis ir dopamīnerģiskā sistēma. Kad pelēm ievadījām dopamīna receptoru agonistu apomorfinu, kurš aktivē gan D<sub>1</sub>, gan D<sub>2</sub> receptora subtipus, un kurš pelēm izraisa stereotipisku rāpšanās jeb kāpšanas uzvedību, tad novērojām, ka lunasīns samazina rāpšanās uzvedības intensitāti tikai aptuveni par 15%.

Pārsteidzoši, bet pētījumos HEK293 šūnu membrānu suspensijās lunasīns konkurējoši inhibēja D<sub>1</sub> radioliganda [<sup>3</sup>H]SCH23390 saistīšanos ar D<sub>1</sub> receptoru (K<sub>i</sub>= 60 ± 15 μM), bet neietekmēja D<sub>2</sub> liganda [<sup>3</sup>H]rakloprida saistīšanos ar D<sub>2</sub> receptoru. Arī pārbaudot cAMF producēšanos HEK293 šūnās, kas ekspresē D<sub>1</sub> receptoru, lunasīns inhibēja apomorfīna (10 nM) stimulētu cAMF producēšanos (pEC<sub>50</sub>=6,1 ± 0,3), kas ir tuvu D<sub>1</sub> specifiskā antagonista SCH39166 pEC<sub>50</sub> aktivitātei (pEC= 7,61 ± 0,03). Šūnās, kuras ekspresēja D<sub>2</sub> receptoru, lunasīna ietekmi uz cAMF veidošanos nenovērojām līdz pat 100 μM koncentrācijai. Tādējādi šie *in vitro* dati ļauj domāt, ka būtiskāka loma lunasīna izraisīto CNS efektu realizēšanā ir drīzāk D<sub>1</sub>, nekā D<sub>2</sub> receptoram.

Tomēr lunasīna darbību dopamīnerģiskajā sistēmā nevar attiecināt tikai caur iedarbību uz D<sub>1</sub> receptoru, jo katelepsijas testā gan apomorfīns (dopamīna receptora agonists), gan amfetamīns, kas ir dopamīna izdalītājs (*releaser*), pilnībā novērsa lunasīna izsauktās katelepsijas attīstīšanos. Bez tam novērojām, ka lunasīns izteikti samazināja (aptuveni par 40%) amfetamīna (vielas, ko izmanto šizofrēnijas modeļēšanai) izraisīto lokomotoro hiperaktivitāti, kas liecina, ka lunasīna izraisīto centrālo efektu realizēšanā var būt iesaistīti arī intracelulārie dopamīnerģiskie procesi. Nevar izslēgt arī citus intracelulāros mehānismus, ja ņem vērā iepriekš aprakstīto lunasīna pretvēža darbību, inhibējot histona acetiltransferāzi (de Lumen, 2005; Jeong et al., 2007; Hernandez-Ledesma et al., 2011), pretiekaisuma efektu, supresējot transkripcijas faktoru NF-kappaB (de Mejia and Dia, 2009; Hernandez-Ledesma et al., 2009), holesterola līmeni pazeminošo aktivitāti, inhibējot HMG-CoA reduktāzes gēnu (Galvez, 2012). Intracelulārās darbības koncepcijai par labu runā citu autoru pētījumi, kuros atklāts, ka lunasīns var tikt internalizēts šūnā ar šūnas adhēzijas motīva RGD (Arg-Gly-Asp) un C-gala deviņu asparagīnskābju atlikumu palīdzību (Galvez et al., 2001).

Šajā pētījumā pārbaudījām arī lunasīna ietekmi uz citu neirotransmiteru izraisītiem efektiem. Taču lunasīns neuzrādīja efektu uz NMDA receptora antagonista ketamīna lokomotoro aktivitāti, kā arī neietekmēja GABA-A receptora GABA subvienības antagonista bikukulīna krampju izraisīto darbību. Šie rezultāti norāda, ka glutamāt- un GABAergiskajām sistēmām nav būtiskas nozīmes lunasīna izraisīto efektu realizēšanā CNS.

Protams, šie pirmo reizi iegūtie rezultāti par peptīda lunasīna centrālajiem efektiem ir intriģējoši un izvirza nākošās darba hipotēzes, lai noskaidrotu lunasīna iespējamo antipsihotisko un atkarību mazinošu darbību.

### ***Taurīna un tauropirona atšķirīgā saistīšanās ar GABA-A receptoru un līdzīgie anti-etanola efekti (Publikācija II)***

Šī pētījuma galvenais mērķis bija salīdzināt farmakoloģiskos efektus endogēnai sēru saturošai aminoskābei taurīnam un tauropironam, kas ir 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājums, kam DHP gredzena 4. pozīcijā ar peptīdsaiti (-CONH-) pievienots taurīns. Tauropirona dizaina pamatā bija doma, ka 1,4-DHP cikliskā struktūra kalpos par nesējmolekulu, kas atvieglos taurīna (kas ir izteikti hidrofila molekula) penetrāciju cauri hematoencefāliskajai barjerai un nonākšanu smadzenēs, līdz ar to nodrošinot augstāku aktivitāti nekā tā piemīt taurīnam.

Taču izrādījās, ka taurīna pievienošana DHP gredzenam ir izmainījusi vielas kvalitatīvās īpašības, jo atšķirībā no taurīna, kas spēja saistīties ar GABA-A receptora GABA saistīšanās vietu ( $K_i = 1.013 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) un kas sakrīt ar citu pētīnieku iegūtiem datiem (Frosini et al., 2003), tauropirons un DHP cikls (kas kalpoja par references savienojumu) neuzrādīja saistīšanās afinitāti ar GABA-A receptoru. Var domāt, ka būtisku lomu tauropirona gadījumā spēlē izmainītā molekulas ģeometrija/ konformācija, kas ir daudz optimālāka taurīnam, lai nodrošinātu tā saistīšanos ar GABA receptoru. Savukārt ar GABA-B receptoru nesaistījās ne taurīns, ne tauropirons, un arī ne 1,4-DHP gredzens.

Pētījumā arī pārbaudījām un salīdzinājām taurīna, tauropirona un DHP ietekmi uz GABA-A receptora ligandu - bikukulīna (GABA subvienības antagonista), diazepamā (benzodiazepīnu subvienības agonista) un etanola (modulatorās subvienības liganda) izraisītiem peļu uzvedības efektiem. Mēs izmantojām mazas taurīna un tauropirona devas, tas ir, 0,1, 1 un 10 mg/kg, kuras uzskatījām par fizioloģiski nozīmīgākām nekā citos pētījumos izmantotās taurīna devas, kas vidēji ir ap 100 - 200 mg/kg (Chen et al., 2004; Kong et al., 2006; Wang et al., 2007). Savukārt tauropironam iepriekš ir atrasts, ka tas uzrāda efektu devās 0,5, 1 un 5 mg/kg (Klusa et al., 1997; Pupure et al., 2008). Šajā pētījumā pirmo reizi parādījām, ka taurīns arī mazās devās, pat 0,1 un 1 mg/kg, uzrāda antikonvulsīvas īpašības, antagonizējot bikukulīna darbību. Šis efekts apstiprina *in vitro* iegūtos rezultātus par taurīna spēju saistīties ar GABA-A receptora GABA saistīšanās vietu. Mūsu pētījuma

rezultāti vismaz daļēji parāda, ka mazas taurīna devas spēj šķērsot hematoencefālisko barjeru, pretēji iepriekš veiktajiem pētījumiem un postulātiem (Benrabh et al., 1995; Tamai et al., 1995), ka ātra taurīna iekļūšana smadzenēs un efekta izpausmes ir iespējamās tikai pēc lielu taurīna devu ievadīšanas. Kas attiecas uz tauropironu, kam neatradām saistīšanos ar GABA-A receptoru, tas loģiski neietekmēja arī bikukulīna efektu. Taču DHP, kas arī nesaistījās ar GABA-A receptoru, uzrādīja vieglu bikukulīnu potencējošu efektu, kas izpaudās kā mazāka bikukulīna deva, kas nepieciešama, lai izsauktu krampjus. Šis viegls izteiktā konvulsogēnais darbības mehānisms paliek neskaidrs.

Izmantojot diazepamā kā miorelaksējošu testvielu, noteicām, ka taurīns, tauropirons un DHP neietekmē diazepamā darbību rotējošā stieņa testā. Iespējams, ka taurīna zemā saistīšanās spēja (50mM) ar GABA-A receptora benzodiazepīnu saistīšanās vietu (Malminen and Kontro, 1986) varētu izskaidrot, kāpēc taurīns neietekmē diazepamā izraisītos efektus, līdzīgi tas varētu būt arī tauropirona gadījumā.

Ļoti pretrunīga informācija atrodama par taurīna ietekmi uz etanola izraisītiem efektiem. Mūsu pētījuma rezultāti pirmo reizi parādīja, ka taurīns mazās devās 1 un 10 mg/kg, kas ir zemākas nekā citos pētījumos minēts (piemēram, 50, 100 un 200 mg/kg) (Olive, 2002), samazināja etanola izraisītu gulēšanas laiku par aptuveni divām reizēm. Taču literatūrā atrasti ziņojumi, ka taurīns ievadīts intracerebroventrikulāri devās 7.5, 14 un 25  $\mu$ moli/kg žurkām pagarina etanola izraisītu gulēšanas laiku (Mattucci-Schiavone and Ferko, 1985), bet, ievadīts perifēri, taurīns mazina etanola sedatīvo efektu (Olive, 2002). Īpaša vērība pievērsta taurīna efektam uz alkohola patēriņu. Tā taurīna ievadīšana devās 50, 100 un 200 mg/kg samazina akūtu etanola patēriņu par 25 – 40 % (Olive 2002).

Mūsu pētījumos atradām, ka līdzīgi taurīnam tauropirons samazināja etanola izraisītu gulēšanas laiku pelēm aptuveni trīs reizes. DHP gredzens neuzrādīja ietekmi uz etanola darbību. Spēcīgi izteiktā taurīna un tauropirona darbība salīdzinoši zemajās devās uz etanola izraisītā efekta antagonizēšanu varētu būt šī pētījuma nozīmīgākais atklājums, taču mehānismi, caur ko šis efekts tiek izsaukts, vēl joprojām ir neskaidri. Iespējams, ka pētītās vielas mijiedarbojas ar kādu citu etanola saistīšanās vietu, kas ir atrastas ne tikai heterogēnajā GABA-A receptora proteīnā, bet arī glutamāterģiskajā NMDA (Salous et al., 2009), glicīnā (Crawford et al., 2007), serotonīna receptora 3A subtipa (Hu et al., 2006), nikotīna tipa acetilholīna (Narahashi et al., 1999) un opiātu (Charness et al., 1983) receptora proteīnos. Tāpat nevar izslēgt, ka taurīns un tauropirons var ietekmēt (aktivēt?) kalcija kanālus pretēji etanolam, kas izraisa voltāžas atkarīgo kalcija kanālu bloķēšanu (Twombly et al., 1990).

Salīdzinot mazu devu taurīna un tauropirona farmakoloģiskos efektus, iegūtie rezultāti kopumā liecina, ka dihidropiridīna gredzena pievienošana aminoskābei taurīnam nav uzlabojusi molekulas farmakoloģiskos efektus un pat pasliktinājusi vielas saistīšanās spējas GABA-A receptoru līmenī.

## *Kartupeļu sulas pretkrampju darbība (Publikācija V)*

Šajā pētījumā pirmo reizi esam parādījuši, ka kartupeļu sula uzrāda pretkrampju darbību pelēm caur GABAerģisku mehānismu. Gan koncentrētas, gan uz pusi atšķaidītas kartupeļu sulas ievadīšana perorāli vai intracisternāli pelēm uzrādīja ļoti izteiktu pretkrampju efektu, antagonizējot bikukulīna darbību. Bez tam intracisternāli ievadītas kartupeļu sulas efekts uz bikukulīna krampju sākšanās sliksni bija ievērojami augstāks, salīdzinot ar zināmo antikonvulsīvo vielu diazepamū, kā arī ar pašu aminoskābi GABA.

Benzodiazepīnu esamība kartupeļos jau bija vairākkārt pierādīta dažādos radioligandu saistīšanās un AEŠH (augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas) pētījumos (Wildmann et al., 1988, Kavvadias et al., 2000). Mūsu pētījumā ar AEŠH nelielos daudzumos kartupeļu bumbuļos tika atrasts benzodiazepīns diazepāms, taču kartupeļu sulā to neizdevās noteikt. Tas ļāva izteikt pieņēmumus, ka kartupeļu sula satur citas GABAerģiskas vielas Radioligandu saistīšanās pētījumos atrada, ka kartupeļu sulai piemīt spēcīga konkurence ar iezīmēto GABA, uzrādot daudzārt lielāku afinitāti pret GABA saistīšanās vietu nekā pret benzodiazepīnu saistīšanās vietu GABA-A receptorā (Saleniece, Promocijas darbs 2010). Šī spēcīgā saistīšanās ar GABA-A receptora GABA saistīšanās vietu pamato kartupeļu sulas izraisīto pretkrampju darbību.

Pretkrampju efekts, ko ieguvām ne tikai pēc intracisternālas, bet arī pēc perorālas kartupeļu sulas ievadīšanas pelēm, ļauj spriest, ka kartupeļos esošās bioloģiski aktīvās vielas, kurām piemīt GABAerģiska aktivitāte, šķērso hematoencefālisko barjeru. Diazepāms ir termostabils benzodiazepīns, kas nezaudē savas fizikāli ķīmiskās īpašības vārot (Jumaa and Muller, 2002), līdzīgi arī GABA ir termostabila viela (Enna et al., 1977). Tāpēc jāpatur prātā, ka arī termiski apstrādāti kartupeļi var saturēt benzodiazepīnus, GABA vai GABAerģiskas vielas, kas var ietekmēt smadzeņu darbību. Protams, šobrīd pētījumos atrastie benzodiazepīnu daudzumi kartupeļu produktos, kas varētu tikt uzņemti ar ikdienas pārtiku, ir ļoti mazi un ievērojami zemāki par benzodiazepīnu terapeitisko devu robežām. Tā, piemēram, diazepāma terapeitiskā deva cilvēkiem ir 5-20 mg dienā, bet kartupeļu bumbuļos konstatētais diazepāma un delorazepāma daudzums bija apmēram 250 ng/kg (Wildman et al., 1988). Ņemot vērā šobrīd zināmo, dažādo informāciju, vēl nevajadzētu izdarīt fundamentālus secinājumus par ikdienā lietotu kartupeļu produktu ietekmi uz CNS.

Taču mūsu pētījuma rezultāti pirmo reizi apstiprināja, ka arī vienreizēja kartupeļu sulas ievadīšana izraisa pretkrampju darbību un ietekmē GABAerģiskus procesus smadzenēs. Visticamāk šī ietekme ir devas un laika atkarīga, līdz ar to ilgstoša lielu daudzumu kartupeļu produktu patērišana var ietekmēt galvenā nomierinošā neirotransmitera darbību CNS.



### **Betulīna antikonvulsīvā darbība (Publikācija IV)**

Šajā pētījumā mēs pirmo reizi parādījām, ka lupāna rindas triterpēniem piemīt atšķirīgi, caur GABA-A receptoru realizēti efekti *in vitro* un *in vivo*. Īpaša nozīme ir iepriekš veiktajam (Saleniece, Promocijas darbs 2010) pētījumam *in vitro*, kurā konstatēja, ka no pārbaudītajiem lupāna rindas triterpēniem tikai betulīns saistās ar GABA-A receptoru, konkurējot ar iezīmēto [<sup>3</sup>H]GABA par saistīšanās vietām. Savukārt betulīnskābe un lupeols nekonkurēja ne ar benzodiazepīnu saistīšanās vietas ligandu [<sup>3</sup>H]flunitrazepamu, ne ar GABA saistīšanās vietas ligandu [<sup>3</sup>H]GABA.

*In vivo* pētījumā GABAergisko aktivitāti noteicām, izmantojot GABA-A receptora GABA saistīšanās vietas antagonistu bikukulīnu, kura ievadīšana izsauc miokloniskus krampjus. Atklājām, ka betulīnam piemīt antikonvulsīva darbība, jo tas inhibēja bikukulīna izraisītos krampjus pelēm gan pēc intracisternālas, gan pēc intraperitoneālas ievadīšanas. Taču betulīnskābes un lupeola ievadīšana neietekmēja bikukulīna konvulsīvo darbību. Šis rezultāts labi saskan ar *in vitro* pētījumu par betulīna spēju saistīties ar GABA-A receptoru. Tā kā betulīns gan pēc centrālas (i.c.), gan pēc perifēras (i.p.) ievadīšanas uzrāda antagonistisku darbību pret bikukulīnu, tad visticamāk, ka betulīns šķērso hemoencefālisko barjeru un, saistoties ar GABA-A receptora GABA saistīšanās vietu, veic savus efektus. Savukārt novērojumi, ka betulīnskābe un lupeols neuzrādīja ietekmi uz bikukulīna izraisītiem krampjiem, arī saskan ar radioligandu saistīšanās datiem. Arī citi pētnieki ir ieguvuši līdzīgus rezultātus, kas rāda, ka betulīnskābe nesaistās ar GABA-A receptoru (Zhu et al., 1996). Taču informācija par betulīna saistīšanos ar GABA-A receptoru citu pētnieku darbos nav atrodamā.

Mēs arī parādījām, ka pētītie triterpēni devu diapazonā līdz pat 100 nmoli/pelei i.c. vai 100 mg/kg i.p. neietekmē muskuļu tonusu un motoro koordināciju rotējošā stieņa testā.

Kopumā, šis pētījums pirmo reizi apstiprina, ka betulīns ietekmē GABA-A receptora mediētus efektus. Lai arī betulīnskābe un lupeols no betulīna atšķiras ar pavisam niecīgām struktūras izmaiņām, tie nesaistās ar GABA-A receptoru, kā arī neietekmē bikukulīna izraisītos krampjus pelēm.

Cerams, ka iegūtie rezultāti ļaus labāk izprast betulīna ietekmi uz CNS darbību, un veicinās jaunu, uz dabas produktu izmantošanu balstītu zāļu dizainu, kura pamatā izmantojamas betulīna struktūras modifikācijas.

## SECINĀJUMI

1. Melanokortīnu peptīdi  $\gamma 1$ - un  $\gamma 2$ -MSH izraisa salīdzināmu bailes pastiprinošu uzvedību pelēm, samazina etanola anksiolītisko darbību, kā arī pastiprina etanola abstinences izraisīto anksioģēno efektu. Iegūtie rezultāti norāda, ka šie melanokortīnu peptīdi pieder anksioģēno peptīdu ģimenei, kam ir nozīmīga endogēnā loma baiļu/trauksmes procesu regulācijā.
2. Pirmo reizi esam parādījuši, ka peptīds lunasīns izraisa centrālas darbības efektus, kas galvenokārt izpaužas kā dzīvnieku mazkustīgums un amfetamīna un apomorfinā efektu antagonizēšana. Lunasīns uzrāda saistīšanās afinitāti pret dopamīna  $D_1$ , bet ne  $D_2$  receptoru, kas norāda uz lunasīnu kā iespējamu jauna tipa antipsihotisku peptīdu.
3. Tauropirons atšķirībā no taurīna nesaistās ar GABA-A receptoru un neizraisa antikonvulsanta darbību, norādot, ka dihidropiridīna gredzena pievienošana taurīnam ir kvalitatīvi izmainījusi vielas īpašības, kas nepieciešamas, lai realizētu GABA-A receptora mediētus efektus. Taču taurīns un tauropirons uzrāda salīdzināmu anti-etanola efektu, kas liecina par kopīgiem, bet ar GABAerģiskiem procesiem nesaistītiem signālceļiem. Pretēji iepriekš literatūrā paustajiem apgalvojumiem par taurīna lielo devu ( $>100$  mg/kg) efektiem esam parādījuši taurīna spēju izraisīt farmakoloģisku aktivitāti CNS līmenī arī mazās devās (0,1 un 1 mg/kg).
4. Pirmo reizi esam eksperimentāli parādījuši, ka kartupeļu sula uzrāda antikonvulsanta aktivitāti, kas ļauj domāt, ka kartupeļu produktu uzņemšana ar pārtiku var ietekmēt GABAerģiskai sistēmai raksturīgos trankvilizējošos procesus smadzenēs.
5. Betulīns (bet ne betulīnskābe un lupeols) gan pēc centrālas, gan perifēras ievadīšanas pelēm uzrāda antagonistisku darbību pret bikukulīnu, norādot uz betulīna spēju penetrēt smadzeņu barjeras un nonākt smadzenēs, kur tas saistās ar GABA-A receptoru. Tādējādi betulīna kā modeļsavienojuma struktūras elementi var tikt izmantoti jauna tipa psihotropu zāļu dizainam.

## PATEICĪBAS

Paldies visiem, kas palīdzējuši šī darba tapšanā gan intelektuāli, gan morāli, gan finansiāli.

Visdziļāko pateicību izsaku darba vadītājai un manai zinātnes Skolotājai profesorei Vijai Klušai.

Vēlos pateikties saviem tuvākajiem kolēģiem Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedrā un jo īpaši - asoc. prof. Šimonam Svirskim, asoc. prof. Baibai Jansonei un pētniekam Jurim Rumakam - par apmācību un kopīgu eksperimentu veikšanu. Pateicos LU Medicīnas fakultātes Farmācijas programmas vadītājai profesorei Rutai Muceniecei par noderīgu padomu un vienmēr „palīdzīgas rokas” sniegšanu.

Pateicos par sadarbību *in vitro* pētījumu veikšanā Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītājai asoc. prof. Maijai Dambrovai un Rūdolfam Mežapuķem, un citiem šīs laboratorijas darbiniekiem, un Tartu Universitātes Ķīmijas institūta Bioorganiskās ķīmijas laboratorijas grupai profesora Ago Rinken vadībā. Izsaku pateicību Koimbras Universitātes (Portugāle) Zooloģijas katedras bioloģijas doktorei Marijai Augustai Fernandesai par kopīgu publikāciju veidošanu.

Pētījumu finansiālais atbalsts: Eiropas Sociālā fonda projekts „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē – 2”; Latvijas Zinātņu padomes projekti Nr.09.1037, Nr. 09.1025, 05.1418, 05.1419; Latvijas Universitātes granti Nr. 2005/2 un 7, 2006/1-229723, 2006/1-229712; ESS2004/3; COST D34 „Molecular targeting and drug design in neurological and bacterial diseases”.

Vislielākā pateicība, protams, manai ģimenei, jo īpaši - mammai par atbalstu, mīļotajam dzīvesbiedram Jurim par sapratni un pacietību, un atvainojos meitai Elīnai par kopīgām rotaļām neveltīto laiku.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Alakurtti S., Makela T., Koskimies S., Yli-Kauhalouma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci*, 2006;29:1-13.
2. Asay MJ, Boyd SK. Characterization of the binding of [<sup>3</sup>H]CGP54626 to GABAB receptors in the male bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Brain Res* 2006; 1094: 76–85.
3. Benrabh H, Bourre JM, Lefauconnier JM et al. Taurine transport at the blood-brain barrier: an in vivo brain perfusion study. *Brain Res* 1995; 692: 57–65.
4. Bischoff S, Leonhard S, Reymann N, Schuler V, Shigemoto R, Kaupmann K, Bettler B. Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *J Comp Neurol* 1999; 412: 1–16.
5. Charness ME, Gordon AS, Diamond I. Ethanol modulation of opiate receptors in cultured neural cells. *Science* 1983; 222: 1246–1248.
6. Chen SW, Kong WX, Zhang YJ, Li YL, Mi XJ, Mu XS. Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci*, 2004, 75:1503–1511.
7. Cole JC, Littleton JM, Little HJ. Acamprosate, but not naltrexone, inhibits conditioned abstinence behaviour associated with repeated ethanol administration and exposure to a plus-maze. *Psychopharmacology* 2000;147:403–11.
8. Costall B, Naylor RJ, Nohria V. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a potential model for the detection of neuroleptic activity. *Eur J Pharmacol* 1978;50:39–50.
9. Crawford DK, Trudell JR, Bertaccini EJ, Li K, Davies DL, Alkana RL Evidence that ethanol acts on a target in Loop 2 of the extracellular domain of alpha1 glycine receptors. *J Neurochem* 2007; 192: 2097–2109.
10. Dave J, Eiden L, Karanian J, Eskay R. Ethanol exposure decreases pituitary corticotropin-releasing factor binding, adenylate cyclase activity, proopiomelanocortin biosynthesis, and plasma beta-endorphin levels in the rat. *Endocrinology* 1986;118:280–6.
11. de Lumen BO. Lunasin: A Cancer-Preventive Soy Peptide. *Nutrition Reviews* 2005;63(1):16-21.
12. de Mejia EG, Dia VP. Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kB pathway in the macrophage. *Peptides* 2009;30(12):2388-98.
13. Devaud LL, Purdy RH, Morrow AL. The neurosteroid, 3alpha-hydroxy-5 alpha pregnan-20-one, protects against bicuculline-induced seizures during ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:350-5.
14. Dixit TS, Sharma AN, Lucot JB, Elased KM. Antipsychotic-like effect of GLP-1 agonist liraglutide but not DPP-IV inhibitor sitagliptin in mouse model for psychosis. *Physiol Behav*. 2013;114-115:38-41.
15. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 1957; 46:208–9.
16. Durst T, Merali Z, Arnason JT, Sanchez-Vindas EP, Poveda AL. Anxiolytic Marcgraviaceae compositions containing betulinic acid, betulinic acid derivatives, and methods; 2002. WO/2002/091858.
17. Enna SJ, Wood JH, Snyder SH.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) in human cerebrospinal fluid: radioreceptor assay. *J Neurochem* 1977; 28:1121 – 4
18. File SE, Zharkovsky A, Gulati K. Effects of baclofen and nitrendipine on ethanol withdrawal responses in the rat. *Neuropharmacology* 1991;30:183–90.

19. Frosini M, Sesti C, Dragoni S, Valoti M, Palmi M, Dixon HB, Machetti F, Sgaragli G. Interactions of taurine and structurally related analogues with the GABAergic system and taurine binding sites of rabbit brain. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 1163–1171.
20. Galvez AF, Chen N, Macasieb J, de Lumen BO. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Res.* 2001;61(20):7473-8.
21. Galvez AF, Revilleza MJR, de Lumen BO. A novel methionine-rich protein from soybean cotyledon: cloning and characterization of a cDNA (Accession No.AF005030) Plant Gene Register #PGR97-103. *Plant Physiology* 1997;114:1567
22. Galvez AF. Identification of Lunasin as the Active Component in Soy Protein Responsible for Reducing LDL Cholesterol and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* 2012;126, A10693.
23. Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Antioxidant and antiinflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;390(3):803-8.
24. Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Chemopreventive properties of Peptide Lunasin: a review. *Protein Pept Lett.* 2013;20(4):424-32.
25. Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Relationship between lunasin's sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation. *Molecular Nutrition & Food Research* 2011;55(7):989-98
26. Hsieh CC, Hernandez-Ledesma B, Jeong HJ, Park JH, de Lumen BO. Complementary Roles in Cancer Prevention: Protease Inhibitor Makes the Cancer Preventive Peptide Lunasin Bioavailable. *PLoS ONE* 2010;5(1):e8890.
27. Hu XQ, Hayrapetyan V, Gadhya JJ, Rhubottom HE, Lovinger DM, Machu TK. Mutations of L293 in transmembrane two of the mouse 5-hydroxytryptamine3A receptor alter gating and alcohol modulatory actions. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 88–101.
28. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*, 1992, 72:101–163.
29. Jansone B, Bergstrom L, Svirskis S, Lindblom J, Klusa V, Wikberg JE. Opposite effects of gamma(1)-and gamma(2)-melanocyte stimulating hormone on regulation of the dopaminergic mesolimbic system in rats. *Neurosci.Lett.* 2004;361, 68-71.
30. Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, Park JH, Lee JB, Kweon DH, Chung GY, Seo EW, de Lumen BO. The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Lett.* 2007;255(1):42-8.
31. Jumaa M, Muller BW. Formulating and stability of benzodiazepines in a new lipid emulsion formulation. *Pharmazie* 2002; 57: 740–3.
32. Kavvadias D, Abou-Mandour AA, Czygan FC, Beckmann H, Sand P, Riederer P, Schreier P. Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracunculoides* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269(1):290-5.
33. Kerai MD, Waterfield CJ, Kenyon SH, Asker DS, Timbrell JA. Taurine: protective properties against ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation during chronic ethanol consumption in rats. *Amino Acids.* 1998;15(1-2):53-76).
34. Klusa V, Germane S, Svirskis S, Opmane B and Wikberg JES (2001) The  $\gamma$ 2-MSH peptide mediates a central analgesic effect via a GABA-ergic mechanism that is independent from activation of melanocortin receptors, *Neuropeptides* 35, 50-57.

35. Kluša V., Ģērmāne S., and Duburs G. Taurine and tauropyrone: anti-neurodeficit activity in alcoholized rats, *Pharmacol. Toxicol.* 1997; 80:29.
36. Kobayashi T, Araki T, Itoyama Y, Takeshita M, Ohta T, Oshima Y. Effects of L-DOPA and bromocriptine on haloperidol-induced motor deficits in mice. *Life Sci* 1997;61:2529–38.
37. Kokare D, Chopde C, Subhedar N. Participation of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone in ethanol-induced anxiolysis and withdrawal anxiety in rats. *Neuropharmacology* 2006;51:536–45.
38. Kong WX, Chen SW, Li YL, Zhang YJ, Wang R, Min L, Mi X. Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006; 83: 271–276.
39. Lal H, Prather PL, Rezazadeh SM. Anxiogenic behavior in rats during acute and protracted ethanol withdrawal: reversal by buspirone. *Alcohol* 1991;8:467–71.
40. Malminen O, Kontro P. Modulation of the GABA benzodiazepine receptor complex by taurine in rat brain membranes. *Neurochem Res* 1986; 11: 85–94.
41. Mattucci-Schiavone L, Ferko AP. Acute effects of taurine and taurine antagonist on ethanol-induced central nervous system depression. *Eur J Pharmacol* 1985;113:275–278.
42. Mazina O, Reinart R, Kopanchuk S, Rinken A. BacMam system for FRET based cAMP sensor expression in studies of melanocortin MC1 receptor activation. *Journal of Biomolecular Screening* 2012;17(8):1096-101.
43. McBroom MJ, Elkhawad AO, Dlouha H. Taurine and ethanol-induced sleeping time in mice: route and time course effects. *Gen Pharmacol.* 1986; 17(1):97-100.
44. Mehta AK, Ticku MK. Unsulfated and sulphated neurosteroids differentially modulate the binding characteristics of various radioligands of GABA<sub>A</sub> receptors following chronic ethanol administration. *Neuropharmacology* 2001;40:668–75.
45. Nakurte I, Kirhnere I, Namniece J, Saleniece K, Krigere L, Mekss P, Vicupe Z, Bleidere M, Legzdina L, Muceniece R. Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L). *Journal of Cereal Science* 2013;57(3):319-24.
46. Narahashi T, Aistrup GL, Marszalec W, Nagata K. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol. *Neurochem Int* 1999; 35: 131–141.
47. Olive MF. Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. *Amino Acids*, 2002, 23:345–357.
48. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:525–9.
49. Pupure J, Isajevs S, Gordjushina V, Taivans I, Rumaks J, Svirskis S, Kratovska A, Dzirkale Z, Pilipenko J, Duburs G, Klusa V. Distinct influence of atypical 1,4-dihydropyridine compounds in azidothymidine-induced neuro- and cardiotoxicity in mice *ex vivo*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 401–406.
50. Reinart-Okugbeni R, Vonk A, Uustare A, Gyulai Z, Sipos A, Rinken A. 1-substituted apomorphines as potent dopamine agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2013;21(14):4143-50.
51. Saleniece K. Augu bioloģiski aktīvo vielu darbība s molekulāro mehānismu pētījumi. Promocijas darbs. Rīga: (LU), 2010., 104 lpp.
52. Salous AK, Ren H, Lamb KA, Hu XQ, Lipsky RH, Peoples RW. Differential actions of ethanol and trichloroethanol at sites in the M3 and M4 domains of the NMDA receptor GluN2A (NR2A) subunit. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 1395–1404.

53. Schiöth HB. The physiological role of melanocortin receptors, *Vitamins and Hormones* 2001; 63,195-232.
54. Skiryycz A, Swiedrych A, Szopa J. Expression of human dopamine receptor in potato (*Solanum tuberosum*) results in altered tuber carbon metabolism. *BMC Plant Biol.* 2005;5:1.
55. Takagi H, Shiomi H, Ueda H, Amano H. Morphine-like analgesia by a new dipeptide, L-tyrosyl-L-arginine (Kyotorphin) and its analogue, *Eur J Pharmacol.* 1979;55,109-111.
56. Tamai I, Senmaru M, Terasaki T, Tsuji A. Na(+)- and Cl(-)-dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1783–1793.
57. Twombly DA, Herman MD, Kye CH, Narahashi T. Ethanol effects on two types of voltage-activated calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254:1029–1037.
58. Udeani GO, Zhao GM, Shin YG, Cooke BP, Graham J, Beecher CWW, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos* 1999;20:379–83
59. Vecsernyes M, Biro E, Gardi J, Julesz J, Telegdy G. Involvement of endogenous corticotropin-releasing factor in mediation of neuroendocrine and behavioral effects to alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Endocr Res* 2000;26:347–56.
60. Wang GH, Jiang ZL, Fan XJ, Zhang L, Li X, Ke KF. Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABA-A and glycine receptors. *Neuropharmacology*, 2007; 52: 1199–1209.
61. Wikberg JES, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Post C, Skottner A. New aspects on the melanocortins and their receptors, *Pharmacol. Res.* 2000;42, 393-420.
62. Wikberg JES. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur J Pharmacol Rev* 1999;375:295–310.
63. Wildmann J, Vetter W, Ranalder UB, Schmidt K, Maurer R, Möhler H. Occurrence of pharmacologically active benzodiazepines in trace amounts in wheat and potato. *Biochem Pharmacol.* 1988;37(19):3549-59.
64. Yoshimura M, Pearson S, Kadota Y, Gonzalez CE. Identification of ethanol responsive domains of adenylyl cyclase. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1824–32.
65. Zhu M, Phillipson J, Greengrass P, Bowery N. Chemical and biological investigation of the root bark of *Clerodendrum mandarinorum*. *Planta Med* 1996;62:393-6.