

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
ĀRSTNIECĪBAS PROGRAMMA

**R-FENIBUTA EFEKTI NEIROPĀTISKO  
SĀPJU MODEĻOS *IN VIVO***

DIPLOMDARBS

**Autors:** Baiba Zvejniece

Studenta apliecības Nr: bz10007

**Darba vadītāja LU:** Dr.biol. Līga Plakane

**Darba vadītāja OSI:** Dr.pharm. Baiba Švalbe

RĪGA 2016

## KOPSAVILKUMS

Klīnikā fenibutu pielieto kā garastāvokli uzlabojošu, anksiolītisku un nootropu medikamentu. R-fenibuts ((3R)-fenil-4-aminosviestskābe) ir optiski tīra un farmakoloģiski aktīva racēmiskā fenibuta forma. R-fenibuts ir atbildīgs par racēmiskā fenibuta farmakoloģisko aktivitāti, kas korelē ar tā saistīšanos pie gamma aminosviestskābes (GASS)<sub>B</sub> apakštipa receptoriem. Strukturāli R-fenibuts ir baklofēna ((R,S)-4-amino-3-(4-hlorfenil)sviestskābes) un gabapentīna (GBP, (2-[1-(aminometil)cikloheksil]acetskābes) analogs. GBP pretsāpju darbību nodrošina tā saistīšanās ar lādiņa atkarīgo kalcija jonu kanālu (LAKK)  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienību, tajā pašā laikā GBP nesaistās ar GASS<sub>B</sub> receptoriem, savukārt baklofēns saistās gan ar GASS<sub>B</sub> receptoriem, gan LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienību.

Šī darba mērķi bija noskaidrot R-fenibuta saistīšanās afinitāti ar LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienību *in vitro*, izmantojot subvienības selektīvu ligandu – radioaktīvo GBP (<sup>3</sup>H]GBP), un noteikt R-fenibuta efektus neiropātisko sāpju modeļos *in vivo*, izmantojot formalīna izsaukto ķepas laizīšanas testu un sēžas nerva hroniska bojājuma modeli. Lai noskaidrotu R-fenibuta pretsāpju darbības mehānismus, izmantojām GASS<sub>B</sub> receptoru antagonistu CGP35348 un S-fenibutu, kurš nesaistās ar GASS<sub>B</sub> receptoriem.

Saistīšanās eksperimentos novērojām, ka ne tikai GBP un baklofēns saistās pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības, bet arī R-fenibuts un S-fenibuts. R-fenibuta saistīšanās afinitāte pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības bija četras reizes lielāka kā pie GASS<sub>B</sub> receptoriem. R-fenibuts devas atkarīgi (devās 25 un 50 mg/kg) uzrādīja GBP līdzīgus pretsāpju efektus gan formalīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā, gan sēžas nerva hroniska bojājuma modeli, salīdzinot ar kontroles grupām. Formalīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā R-fenibuta pretsāpju efekts netika bloķēts ar GASS<sub>B</sub> selektīvo antagonistu – CGP35348. Līdzīgi kā R-fenibuts, arī S-fenibuts uzrādīja pretsāpju efektus sēžas nerva hroniska bojājuma modeli.

Iegūtie rezultāti ļauj secināt, ka R-fenibuta pretsāpju efekti, kas novēroti formalīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā un sēžas nerva hroniska bojājuma modeli, ir skaidrojami ar vielas saistīšanos pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības, nevis GASS<sub>B</sub> receptoriem. Iegūtie rezultāti nodrošina eksperimentālus pierādījumus R-fenibuta pretsāpju īpašībām un iespējām to pielietot klīniskajā praksē - neiropātisko sāpju ārstēšanā.

**Atslēgvārdi:** R-fenibuts, neiropātiskas sāpes, sēžas nerva hronisks bojājums, lādiņa atkarīgā kalcija jonu kanāla  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienība, gamma-aminosviestskābe.

## SUMMARY

Phenibut is a mood elevator, anxiolytic and nootropic drug, which is widely used in clinics. R-phenibut ((3R)-phenyl-4-aminobutyric-acid) is the active isomer, which is responsible for the pharmacological activity of racemic phenibut. R-phenibut binding affinity to GABA<sub>B</sub> receptors correlate with its pharmacological activity. R-phenibut is similar to GBP (2-[1-(aminomethyl)cyclohexyl]acetic acid or gabapentin) and baclofen ((RS)-4-amino-3-(4-chlorophenyl)butanoicacid). GBP does not bind to GABA<sub>B</sub> receptors and its antinociceptive properties are mediated through the  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of the voltage dependent calcium channel (VDCC), while baclofen binds to GABA<sub>B</sub> receptor and  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of VDCC.

The aims of this study were to find out binding affinity of R-phenibut to the  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of the VDCC *in vitro* using [<sup>3</sup>H]GBP and the effects of R-phenibut in neuropathic pain models *in vivo* using chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve model and formalin induced paw licking (FIPL) test. To find out mechanisms of R-phenibut antinociceptive activity we used CGP35348, which is GABA<sub>B</sub> receptor antagonist and S-phenibut (it did not bind to GABA<sub>B</sub> receptors).

In the binding assay, we found out that R-phenibut and S-phenibut could bind to  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of the VDCC. Compared R-phenibut binding affinity to the  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of the VDCC and GABA<sub>B</sub> receptors, we found out that binding affinity to  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of the VDCC was increased four times. R-phenibut at doses 25 and 50 mg/kg showed antinociceptive effects in both models, compared with control group. The antinociceptive effects of R-phenibut in the FIPL test were not blocked by the CGP35348. The antinociceptive effects of S-phenibut were observed in the CCI of the sciatic nerve.

In the CCI of the sciatic nerve and FIPL test we found out antinociceptive properties of R-phenibut. These properties were associated with R-phenibut binding ability to the  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of the VDCC more than its effects on GABA<sub>B</sub> receptors. Finally, our data suggested evidence for antinociceptive properties of R-phenibut, which might be used in neuropathic pain treatment.

**Keywords:** R-phenibut, neuropathic pain,  $\gamma$ -aminobutyric acid,  $\alpha_2$ - $\delta$  subunit of voltage-dependent calcium channel, chronic constriction injury of the sciatic nerve.

# SATURA RĀDĪTĀJS

KOPSAVILKUMS.....	2
SUMMARY .....	3
IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI .....	5
IEVADS .....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	8
1.1. Neiropātiskas sāpes.....	8
1.1.1. Sāpju vēsturiskie aspekti.....	8
1.1.2. Neiropātisku sāpju raksturojums un to sastopamība populācijā .....	8
1.1.3. Neiropātisku sāpju klasifikācija.....	10
1.1.4. Sāpju rašanās mehānismi, neiropātisko sāpju patofizioloģija.....	11
1.2. Fenibuts .....	15
1.3. Gabapentīns – izvēles medikaments neiropātisku sāpju terapijā .....	17
2. MATERIĀLI UN METODES.....	19
2.1. Izmēģinājuma dzīvnieki.....	19
2.2. Reaktīvi un materiāli.....	19
2.3. [ <sup>3</sup> H]GBP saistīšanās pārbaude .....	20
2.3.1. <i>Lowry</i> proteīna noteikšanas metode.....	21
2.4. Uzvedības testi.....	21
2.4.1. Formalīna izsauktais ķepas laizīšanas tests.....	21
2.4.2. Termālā un mehāniskā alodīnija pēc sēžas nerva hroniska bojājuma .....	22
2.5. Statistiskā analīze.....	26
3. REZULTĀTI .....	27
3.1. [ <sup>3</sup> H]GBP saistīšanās pārbaude .....	27
3.2. Formalīna izsauktais ķepas laizīšanas tests.....	28
3.3. Termālā un mehāniskā alodīnija pēc sēžas nerva hroniska bojājuma .....	31
4. DISKUSIJA.....	35
5. SECINĀJUMI .....	37
6. PATEICĪBAS .....	38
8. ĒTIKAS KOMISIJAS SLĒDZIENS.....	45
9. ZIŅOJUMI UN PUBLIKĀCIJAS.....	46
DOKUMENTĀRĀ LAPA .....	47

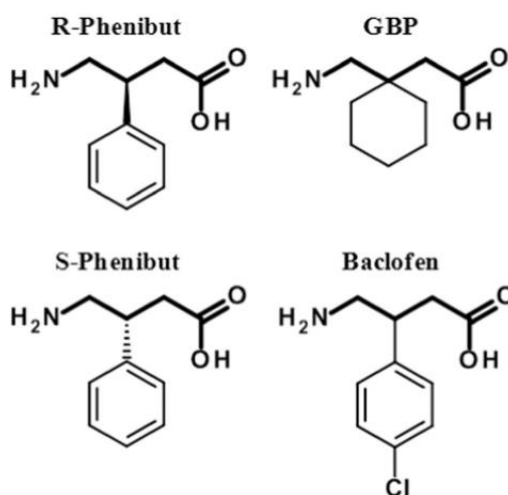
## IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

- [<sup>3</sup> H]GBP – radioaktīvais gabapentīns  
ANOVA – dispersijas analīze (*eng.* analysis of variance)  
ASV – Amerikas Savienotās Valstis  
BDNF – smadzeņu atvasinātais neirotrofais faktors (*eng.* brain-derived neurotrophic factor)  
BSA – buļļa seruma albumīns  
Ca<sup>2+</sup> – kalcija joni  
CGP35348 – (3-aminopropil)(dietoksimetil)fosfīniskābe  
CNS – centrālā nervu sistēma  
GASS – gamma – aminosviestskābe  
GASS<sub>A</sub> – gamma – aminosviestskābes receptora A apakštīps  
GASS<sub>B</sub> – gamma – aminosviestskābes receptora B apakštīps  
GBP – gabapentīns  
HEB – hematoencefaliskā barjera  
i.p. – intraperitoneāli  
IL-1β – interleikīns 1β  
IL-6 – interleikīns 6  
K<sup>+</sup> – kālija joni  
K<sub>d</sub> – disociācijas konstante  
K<sub>i</sub> – inhibīcijas konstante  
LAKK – lādiņa atkarīgie kalcija jonu kanāli  
LZL – laukums zem līknes  
n – izmēģinājuma dzīvnieku skaits  
Na<sup>+</sup> – nātrijs joni  
Nav1.3/1.7/1.8 – lādiņa atkarīgie nātrijs jonu kanāli 1.3/1.7/1.8  
NMDA – N-metil-D-aspartāts  
PNS – perifērā nervu sistēma  
s.c. – zemādas  
S.E.M. – vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda  
TNF- α – tumora nekrozes faktors α  
TRPV1 – vanilloīdreceptoru 1. subtips  
VEGF – asinsvadu endoteliālais augšanas faktors (*eng.* vascular endothelial growth factor)

## IEVADS

Starptautiskā sāpju pētniecības asociācija sāpes definē kā nepatīkamu fizisku un emocionālu pārdzīvojumu, kas saistīts ar esošu vai potenciālu audu bojājumu (IASP, 2011). Pēdējo gadu laikā neiropatisko sāpju ārstēšanā bāzes terapijai izmanto antidepresantus un pretepilepsijas līdzekļus un tikai pēc tam - opioīdus, ja iepriekš minētie nav pietiekami efektīvi. Neskatoties uz plašo medikamentu klāstu, kas tiek piedāvāts, tikai 40-60% pacientu izjūt daļēju atvieglojumu (Cohen et Mao, 2014). Turpretim bieži tiek novērotas izteiktas, dzīves kvalitāti samazinošas blaknes. Ņemot vērā medikamentozās terapijas nepietiekošo efektivitāti, jaunu sintētisko farmakoloģisko aģentu meklējumi joprojām ir ļoti aktuāli.

Fenibuts ir GASS derivāts un salīdzinot ar to, fenibuts spēj labāk šķērsot hematoencefalisko barjeru (HEB), ko nodrošina fenilgredzens (Lapin, 2001). Fenibuts sastāv no diviem izomēriem – R-fenibuta un S-fenibuta. R-fenibuts, S-fenibuts, baklofēns, GBP un GASS ir strukturālie analogi (skat. 1.attēlu). R-fenibuts saistās pie GASS<sub>B</sub> receptoriem, savukārt S-fenibuts nesaistās (Dambrova et al., 2008). Baklofēns ir GASS<sub>B</sub> receptoraktīvs savienojums. GBP uzrāda pret sāpju efektu, saistoties ar LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienību, bet nesaistās pie GASS<sub>B</sub> receptoriem (Gee et al., 1996).



1. attēls. R-fenibuta, S-fenibuta, gabapentīna un baklofēna ķīmiskā struktūra.

### **Pētījuma mērķi:**

1. Noskaidrot R-fenibuta un S-fenibuta saistīšanās afinitāti pie LAKK  $\alpha_2-\delta$  subvienības *in vitro*, izmantojot subvienības selektīvu ligandu – [<sup>3</sup>H]GBP.
2. Noteikt R-fenibuta efektus neiropātisko sāpju modeļos *in vivo*, izmantojot formālīna izsaukto ķepas laizīšanas testu un sēžas nerva hroniska bojājuma modeli.
3. Eksperimentāli noskaidrot R-fenibuta pretsāpju efekta darbības mehānismus.

### **Darba uzdevumi:**

1. Noteikt un salīdzināt vielu (R-fenibuta, S-fenibuta, GBP un baklofēna) saistīšanās afinitāti pie LAKK  $\alpha_2-\delta$  subvienības, izmantojot [<sup>3</sup>H]GBP.
2. Veikt formālīna izsaukto ķepas laizīšanas testu pelēm un pārbaudīt R-fenibuta pretsāpju efektus.
3. Izmantojot selektīvo GASS<sub>B</sub> receptora antagonistu CGP35348, noskaidrot R-fenibuta pretsāpju darbības mehānismu.
4. Noteikt termālo un mehānisko alodīniju izmēģinājuma dzīvniekiem pēc sēžas nerva hroniska bojājuma, un izvērtēt R- un S-fenibuta pretsāpju darbību.

Diplomdarbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Neiropātiskas sāpes

### 1.1.1. Sāpju vēsturiskie aspekti

Kopš seniem laikiem cilvēki mēģinājuši izprast sāpju rašanās mehānismus. Arheologi ir atraduši pierādījumus tam, ka jau pirms 5000 gadiem p.m.ē. opijs tika pielietots sāpju remdēšanai. Senajā Grieķijā pastāvēja uzskats, ka sirds ir centrālais orgāns, kas uztver sāpes (Dallenbach, 1939). Galēns uzskatīja, ka informācija par sāpēm no nervaudiem uz smadzenēm pārvietojas caur neredzamu psihisku „pneimu”. Doma par to, ka sāpes attīstās nervos, bez kādas patoloģijas citos orgānos, radās Viduslaikos. To izvirzīja tā laika zinātnieki – Razes un Avicenna. Viņi šīs sāpes nodēvēja par „*Vaja al asab*” un aprakstīja tās kā nejutīgumu, tirpšanu un durstīšanas sajūtu (Dallenbach, 1939). Renesanses laikā uzskatīja, ka sāpes rodas ārpus cilvēka ķermeņa kā Dieva sods (Meldrum, 2011).

1664.gadā Renē Dekarts aprakstīja teoriju, ka sāpes pārvietojas pa nervu šķiedrām, līdz sasniedz smadzenes (Melzack un Katz, 2004). Moritz Schiff 1858. gadā demonstrēja, ka pieskāriena un sāpju sajūta tiek pārvadīta uz smadzenēm pa atšķirīgiem ceļiem (Dallenbach, 1939). 1896.gadā Max von Frey atklāja un aprakstīja aukstuma un karstuma receptorus kā sāpju punktus uz ādas (Norrzell et al., 1999). 1794.gadā Erasmus Darvins izvirzīja ideju par to, ka sāpes nav tikai sensora modalitāte, bet emocionāls stāvoklis, ko izraisa stiprāki stimuli nekā normas apstākļos, piemēram, intensīva gaisma, spiediens, temperatūra (Dallenbach, 1939). 1965. gadā Ronalds Melzaks un Patriks Valls uzskatīja, ka gan maza, gan liela diametra nervu šķiedras uztver informāciju no bojātā apvidus divos veidos, respektīvi, pārvades šūnas aiznes signālus uz smadzenēm, bet inhibējošie interneironi kavē pārvades šūnu darbību (Melzack un Wall, 1965). Neiralģiju aprakstīja Džons Fotergils, bet pirmā publikācija medicīnas literatūrā parādījās jau 1924.gadā, kad Gordons pirmo reizi izmantoja vārdu „Neiropātija” (Gordon, 1924). 1975. gadā Starptautiskā sāpju pētniecības asociācija sāpes definēja kā nepatīkamu fizisku un emocionālu pārdzīvojumu, kas saistīts ar esošu vai potenciālu audu bojājumu (IASP, 2011).

### 1.1.2. Neiropātisku sāpju raksturojums un to sastopamība populācijā

Hroniskas sāpes ir bieži sastopama problēma, kas skar 28 – 65% Amerikas Savienoto Valstu (ASV) iedzīvotāju. Pasaules Veselības Organizācija ir noskaidrojusi, ka 22% no

pacientiem, kas saņem primāro veselības aprūpi, cieš no hroniskām sāpēm (Lepine un Briley, 2004).

Hroniskas sāpes iedala – neiropātiskas un nociceptīvas sāpes (skat. 1.tabulu). Neiropātiskas sāpes rodas un pastāv heterogēnā etioloģisko saslimšanu grupā, kas raksturojas ar primāro bojājumu vai traucētu funkciju perifērajā (PNS) vai centrālajā nervu sistēmā (CNS) (Colombo et al., 2006).

*1.tabula.*

**Neiropātisko un nociceptīvo sāpju salīdzinājums un raksturojums** [ar izmaiņām no Cohen, P.S., Mao, J.; Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications, BMJ 2014; 348; f7656; doi: 10.1136/bmj.f7656].

Klīniskās izpausmes	Neiropātiskas sāpes	Nociceptīvas sāpes
<b>Iemesls</b>	Bojājums vai izmaiņas nervu sistēmā	Audu bojājums
<b>Sāpju raksturojums</b>	Asas, šāvienveida, elektriskajai strāvai līdzīgas, durošas sāpes	Pulsējošas sāpes, spiediena sajūta
<b>Sensorais deficīts</b>	Raksturīgs (piem., nejūtīgums, tirpšana, durstīšanas sajūta)	Nav raksturīgs. Izpaužas bez dermatomu vai nervu iesaistes
<b>Motorais deficīts</b>	Neiroloģisks vājums var izpausties, ja skarts motorais nervs; distonija vai spasticitāte saistīta ar CNS bojājumu, retāk ar perifēru bojājumu	Var būt sāpju izraisīts vājums
<b>Hipersensitivitāte</b>	Sāpes izraisa nesāpīgi (alodīnija) vai sāpīgi stimuli	Nav raksturīga, izņemot hipersensitivitāti akūtā bojājuma vietā
<b>Sāpju raksturs</b>	Raksturīga distāla izplatība	Biežāk proksimāla izplatība
<b>Paroksizmi</b>	Raksturīgi paasinājumi, ko nevar prognozēt	Paasinājumi saistīti ar aktivitāti, reti
<b>Autonomās pazīmes</b>	Krāsas, temperatūras, pietūkuma, svīšanas izmaiņas	Nav raksturīgas

Informācija par neiropātisko sāpju prevalenci ir ierobežota. Vairumā publikāciju ir dati no atsevišķiem kohorta pētījumiem, kuros ietverti pacienti ar muguras lejasdaļas sāpēm (Freynhagen et al., 2006), cukura diabētu (Argoff et al., 2006), multiplo sklerozi, nervu saknīšu kompresiju vai arī dati no specializētiem veselības aprūpes centriem, piemēram, neiroloģijas klīnikām (Montero Homs et al., 2005). Līdz ar to prevalences datus, kas iegūti atsevišķos pētījumos un klīnikās, nebūtu pareizi attiecināt uz vispārējo populāciju.

Uzskata, ka vispārējā populācijā aptuveni 7-8% pieaugušo ir hroniskas sāpes ar neiropātiskām iezīmēm. Neiropātisko sāpju incidence Holandē ir aptuveni 8 gadījumi uz 1000 iedzīvotājiem gadā. Savukārt Vācijā 37% iedzīvotāju, kas saņem primāro veselības aprūpi, sūdzas par hroniskām (neiropātiskām) sāpēm (Van Hecke et al., 2014). Apvienotajā Karalistē 26% iedzīvotāju, kas slimo ar cukura diabētu, ir perifēras neiropātiskas sāpes. Norvēģi ir pierādījuši, ka 40% iedzīvotāju saglabājas sāpes pēc ķirurģiskām manipulācijām (Johansen et al., 2012), savukārt aptuveni 20% onkoloģisko pacientu attīstās ar audzēju saistītas neiropātiskas sāpes (Bennett et al., 2012). ASV un Nīderlandes pētījumu rezultāti parāda, ka attiecīgi 2,6% un 10% iedzīvotāju cieš no postherpētiskas neiralģijas (Reda et al., 2013).

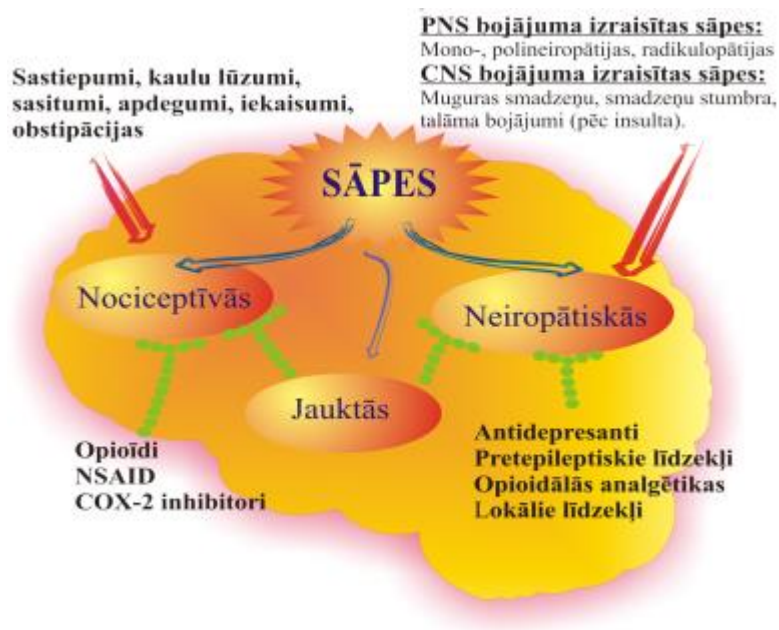
### **1.1.3. Neiropātisku sāpju klasifikācija**

Neiropātiskas sāpes ierosina somatosensorās nervu sistēmas bojājums vai slimība. Neiropātiskas sāpes ir klīnisks termins, bet ne diagnoze, kas atbilst redzamam bojājumam, vai neiroloģiskajiem kritērijiem atbilstoši slimībai (Dworkin et al., 2003).

Neiropātiskas sāpes ir izaicinājums veselības aprūpes speciālistiem, jo tās bieži netiek diagnosticētas, līdz ar to nepietiekoši ārstētas un ir saistītas ar ciešanām, nespēju un traucētu dzīves kvalitāti.

Neiropātiskas sāpes klasificē (skatīt 1.1.3. attēlu):

- Centrālas neiropātiskas sāpes – bojājums ir galvas vai muguras smadzenēs,
- Perifēras neiropātiskas sāpes – bojājums skar perifēros nervus, nervu pinumus vai nervu saknītes (Dworkin et al., 2003).



### 1.1.3.attēls. Sāpju klasifikācija, biežākie izraisītāji un pielietotā terapija.

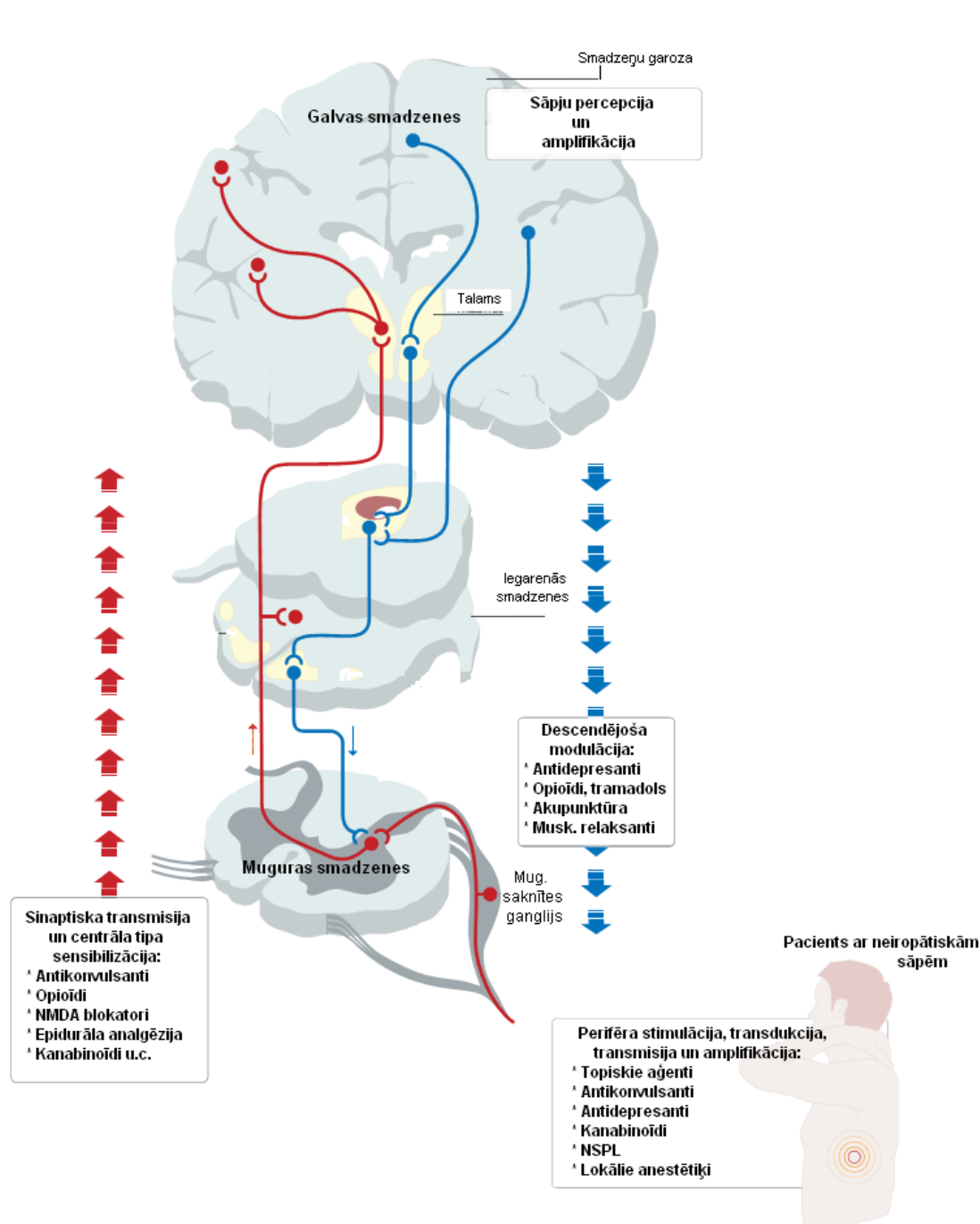
Neuropātiskas sāpes var būt gan spontānas jeb no stimula neatkarīgas, gan stimula izraisītas. Spontānas neuropātiskas sāpes tiek aprakstītas kā dedzināšanas sajūta, iespējams – durstīšanai, tirpšanai līdzīgas sāpes. Ar stimulu saistītas sāpes ierosina mehānisks vai termāls kairinātājs (ķīmisko kairinātāju iedarbība parasti netiek testēta). Stimula izraisītas sāpes var reducēties, ja bojāta nociceptīvā jūšana (hipoalgēzija). Hiperalgēzija attīstās, ja tiek aktivēti perifērie nociceptīvie nervgali. Alodīniju ierosina stimul, kas neaktivē nociceptorus, bet rada izmaiņas centrālajā neirālajā procesā (Dworkin et al., 2003).

### 1.1.4. Sāpju rašanās mehānismi, neuropātisko sāpju patofizioloģija

Sāpes rodas kā atbilde uz audu bojājumu un ietver četrus pamatelementus:

1. Transdukcija – nociceptoru funkcija, kas pārveido potenciāli kaitīgos stimulus par sāpju signāliem;
2. Transmisija – process, kad sāpju impulss tiek pārvadīts pa nervu šķiedrām no bojājuma vietas uz CNS;
3. Transformācija vai plasticitāte – mehānisms, kad nociceptīvs signāls tiek pārvadīts pa ascendējošiem vai descendējošiem CNS traktiem;
4. Percepcija – veidojas kognitīva un emocionāla atbilde uz kairinājumu.

Neiropātisko sāpju patofizioloģiskā mehānisma pamatā ir nervu struktūru bojājums, kas var attīstīties dažādos smadzeņu reģionos un līmeņos (skat. 1.1.4. attēlu).



1.1.4. attēls. Iespējamie neiropātisko sāpju attīstības līmeņi CNS un PNS. Sāpju atbildes veidošanās pamatelementi [ar izmaiņām no Cohen, P.S., Mao, J.; Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications, BMJ 2014; 348; f7656; doi: 10.1136/bmj.f7656].

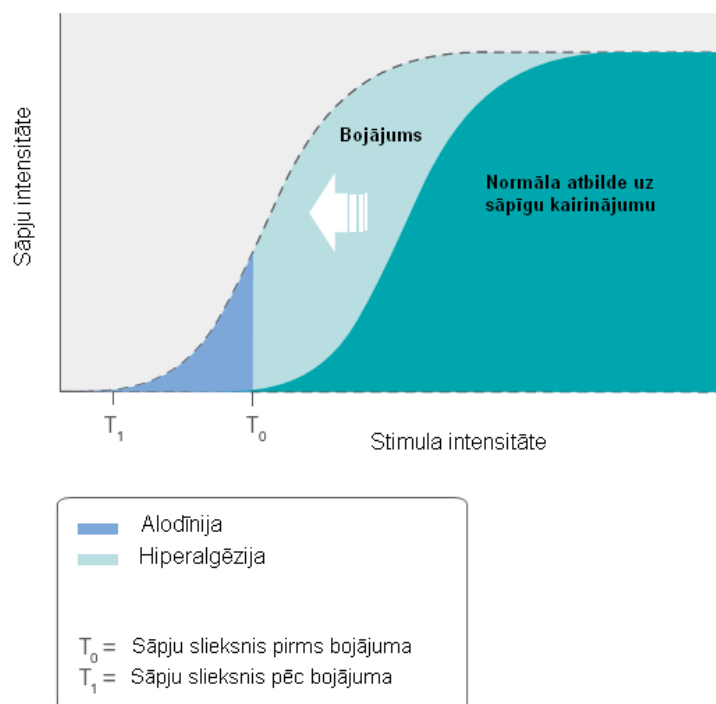
## 1. Bojājums perifērijā jeb perifērā sensibilizācija.

Perifērā sensibilizācija attīstās pēc bojājuma, kad tiek aktivēti iekaisuma un reparācijas procesi. Vairumā gadījumu iekaisuma procesam samazinoties, bojājums sadzīst. Savukārt, ja atbilde uz sāpīgu stimulu saglabājas, bojājums vai slimība persistē un izmaiņas skar primāros aferentos neironus. Perifēro sensibilizāciju rada iekaisuma mediatoru, kā piemēram, kalcitonīna un substances P atbrīvošanās no nociceptoru nervgaliem. Tādā veidā palielinās asinsvadu caurlaidība, kā rezultātā lokāli veidojas tūska un izdalās prostaglandīni, bradikinīns, augšanas faktori, citokīni. Minētās substances var sensibilizēt sāpju receptorus un samazināt kairinājuma sliekšni, un tas daļēji izskaidro faktu, ka medikamenti ne vienmēr pretsāpju terapijā ir efektīvi (Cohen un Mao, 2014).

Termins alodīnija raksturo sāpes, kuras ierosina kairinājums, kas normālos apstākļos nebūtu sāpīgs (skatīt 1.1.5. attēlu). Alodīnija var attīstīties, ja ir samazināts kairinājuma uztveršanas sliekšnis. Alodīniju iedala - mehāniskā alodīnija (sāpes rodas kā atbilde uz vieglu pieskārienu) un termālā alodīnija. Savukārt hiperalgēzija raksturo pastiprinātu sāpju percepciju, kas rodas perifēro nociceptoru bojājuma dēļ (skat. 1.1.5. attēlu). To iedala primārajā un sekundārajā hiperalgēzijā. Primārā hiperalgēzija nozīmē, ka ir iesaistīti bojātie audi un sensibilizēti perifērie nociceptori, bet sekundārā hiperalgēzija ir novērojama veselos audos, ja ir sensibilizācija CNS (Cohen un Mao, 2014).

Ir zināms, ka pēc bojājuma palielinās  $\text{Na}^+$  jonu kanālu ekspresija muguras smadzeņu nervu ganglijos un skartajos aksonos. Sāpju patofizioloģija ir saistīta ar vairāku veidu  $\text{Na}^+$  jonu kanālu ekspresiju. Heterotrofisko  $\text{Na}^+$  jonu kanālu proliferācija, piemēram,  $\text{Na}_v1.3$ ,  $\text{Na}_v1.7$  vai  $\text{Na}_v1.8$ , var samazināt kairinājuma sliekšni un provocēt ektopiskas izmaiņas, kuru rezultātā rodas spontānas sāpes. Dažu medikamentu, piemēram, karbamazepīnu darbība notiek bloķējot  $\text{Na}^+$  jonu kanālus, taču tiem ir daudz blakus efektu – slikta dūša, diareja, galvas sāpes, reiboņi, redzes traucējumi, artralģijas u.c. (Cohen un Mao, 2014).

Zināmi vairāki  $\text{Ca}^{2+}$  jonu kanālu veidi (N-tips, T-tips, L-tips), kā arī  $\text{K}^+$  jonu kanāli. Pēc nerva bojājuma  $\text{Ca}^{2+}$  jonu kanālu  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienību ekspresija pieaug. GBP, kas ir pirmās izvēles medikaments neiropatisku sāpju ārstēšanā, piesaistās pie  $\text{Ca}^{2+}$  jonu kanāliem (Cohen un Mao, 2014).



**1.1.5. attēls. Sāpju atbildes sliekšnis alodīnijas, hiperalgēzijas un normālas sāpju atbildes gadījumā** [ar izmaiņām no Cohen, P.S., Mao, J.; Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications, BMJ 2014; 348; f7656; doi: 10.1136/bmj.f7656].

## 2. Bojājums muguras smadzenēs jeb spinālie mehānismi.

Spinālā mehānisma pamatā ir sinaptiskā plasticitāte jeb palielināta neironālā atbilde uz atkārtotiem kaitīgiem stimuliem. Nociceptīvo signālu transmisiju caur CNS regulē celulārie un intracelulārie mehānismi. Tie ir jonu ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) kanāli, glutamāterģiskie, GASS-erģiskie, serotonīnerģiskie u.c. receptori, iekaisuma citokīnu atbrīvošanās no aktivētām glijas šūnām un augšanas faktoru izdalīšanās (Cohen un Mao, 2014).

Perifērā nerva bojājums palielina neironu uzbudināmību muguras smadzenēs, aktivējot glutamāta receptorus. Glutamāta izdalīšanās ierosina intracelulāro signālceļu kaskādi, kas aktivē proteīnkināzes C darbību, kā rezultātā attīstās neiroplastiskas izmaiņas muguras smadzenēs. Tāpat glutamāta receptori ir atbildīgi par centrālu sensibilizāciju, N-metil-D-aspartāta (NMDA) un ne-NMDA receptoru bloķēšanu (Cohen un Mao, 2014).

Glijas šūnu un citokīnu aktivācijas loma neiroplāstisku sāpju modeļos tiek aktīvi pētīta. Iekaisuma citokīni – interleikīni (IL-1 $\beta$ , IL-6), tumora nekrozes faktors  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) tiek producēti gan perifēri, gan centrāli kā atbilde uz nervu bojājumu. Preklīniskajos pētījumos citokīnu inhibitoru lietošana (pirms nerva bojājuma veikšanas) uzrāda pretsāpju darbību.

Glijas šūnas veido aptuveni 70% no CNS un tām ir nozīme homeostāzes uzturēšanā. Mikroglia veido mazāk kā 20% no muguras smadzeņu glijas šūnu populācijas. Pēc nerva struktūru bojājuma, mikroglijas šūnas aktivējas 24 stundu laikā un stimulē imūnās sistēmas komponentus, atbrīvojas citokīni un citotoksiskas vielas – slāpekļa oksīds un brīvie radikāļi. Citokīnu izdalīšanās no astrocītiem un mikroglijas šūnām ierosina glikokortikoīdu un glutamāta receptoru aktivāciju, kā rezultātā palielinās muguras smadzeņu uzbudināmība, un rodas neiroplastiskas izmaiņas (Cohen un Mao, 2014).

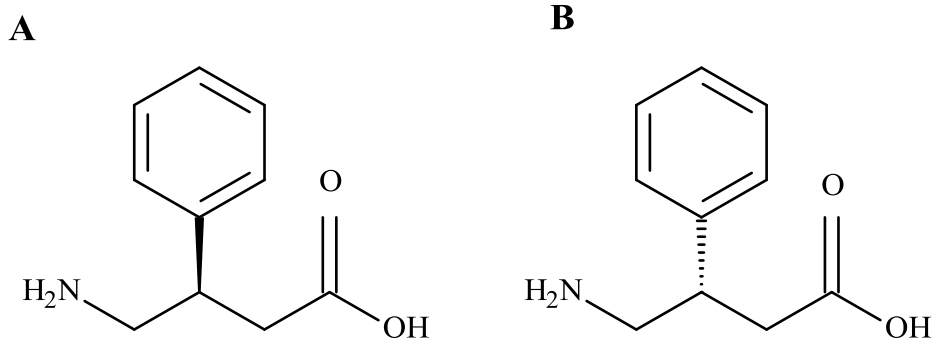
### 3. Supraspinālie mehānismi.

Nociceptīvie signāli var tikt pārveidoti arī supraspinālā līmenī. Pacientiem, kuri cieš no hroniskām sāpēm, smadzenēs ir izmainīts metabolisms un reģionālā neurotransmiteru koncentrācija, īpaši *thalamus* un *cortex cingularis* zonā. Izmaiņas ir atkarīgas arī no sāpju veida. Ir noskaidrots, ka pacientiem ar hroniskām sāpēm ir samazināts pelēkās vielas daudzums (Cohen un Mao, 2014).

## 1.2. Fenibuts

Fenibuts (3-fenil-4-aminosviestskābe) Latvijas zāļu tirgū ir pazīstams ar nosaukumu Noofen un to tirgo AS „Olainfarm”. Fenibuts plaši tiek lietots Krievijā un bijušajās Padomju Savienības valstīs. Klīniskajā praksē fenibutu izmanto kā medikamentu, lai ārstētu posttraumatisko stresa slimību, trauksmi, depresiju, astēniju, bezmiegu, alkoholismu, stostīšanos, vestibulārās slimības, kā arī citus patoloģiskus stāvokļus (Lapin, 2001). Pagājušā gadsimta 70.gados fenibuts tika iekļauts krievu kosmonautu medicīniskajā aprīkojumā, jo, salīdzinot ar trankvilizatoriem, tam nebija miegainības efekta (Neumyvakin et al., 1978). Citās pasaules valstīs fenibuts nav reģistrēts kā medikaments, bet tiek pārdots ar interneta starpniecību uztura bagātinātāju sastāvā (Nelson, 2008).

Fenibuts tika sintezēts 1963. gadā Sanktpēterburgā. To atklāja profesors Vsevolod Perekalin ar savu komandu. Fenibuts ir inhibējošā neurotransmitera GASS atvasinājums. Tas tika sintezēts ar mērķi uzlabot GASS biopieejamību smadzeņu audiem, un tas izdevās pievienojot GASS fenilgredzenu (Lapin, 2001). Fenibuta molekulā ir optiski aktīvais ogleklis, kā rezultātā šai molekulai ir divi optiskie izomēri: R- un S-fenibuts (skat. 1.2.att.). Klīniskajā praksē izmanto šo izomēru maisījumu – fenibuta racemātu, kaut gan ir zināms, ka optisko izomēru darbības aktivitāte bieži vienam no izomēriem ir izteiktāka kā otram, vai reizēm tā ir pat atšķirīga.



1.2.attēls. **R-fenibuta (A) un S-fenibuta (B) ķīmiskās struktūrformulas.**

Fenibuts ir GASS<sub>B</sub> receptoru agonists, līdzīgi kā baklofēns un  $\gamma$ -hidroksisviestskābe (GHB) (Dambrova et al., 2008). Racēmiskā fenibuta saistīšanās spēja pie GASS<sub>B</sub> receptoriem žurku smadzenīšu membrānās tika pētīta jau 90.gados, izmantojot [<sup>3</sup>H]-R-baklofēnu kā iezīmēto vielu (Allan et al., 1990). Pētot salīdzinošo R-, S-fenibutu un fenibuta racemāta saistīšanās afinitāti pie GASS<sub>B</sub> receptoriem tika noskaidrots, ka R-fenibuts un fenibuta racemāts saistās pie GASS<sub>B</sub> receptoriem un R-fenibuta saistīšanās aktivitāte ir divas reizes labāka nekā fenibuta racemātam. Savukārt S-fenibuts nesaistās pie GASS<sub>B</sub> receptoriem (Dambrova et al., 2008). Papildu tam tika parādīts, ka R-fenibuts ticami samazina kustību aktivitāti atvērtā lauka testā un samazina imobilitātes jeb nekustīguma laiku piespiedu peldēšanas testā *in vivo*. Šos R-fenibuta nomierinošos un antidepresīvos efektus bloķēja selektīvs GASS<sub>B</sub> receptoru antagonists (3-aminopropil)(dietoksimetil)fosfīnikskābe (CGP35348) (Dambrova et al., 2008). Tajā pašā laikā S-fenibuts neietekmēja kustību aktivitāti un imobilitātes laiku. Iegūtie rezultāti ļāva secināt, ka fenibuta racemāta farmakoloģiskā darbība ir atkarīga no R-fenibuta, un tas korelē ar R-, S-fenibuta un fenibuta racemāta saistīšanās afinitāti pie GASS<sub>B</sub> receptoriem (Dambrova et al., 2008).

Literatūras dati par fenibuta saistīšanos pie GASS<sub>A</sub> receptoriem ir pretrunīgi. GASS<sub>A</sub> receptori ir atbildīgi par benzodiazepīnu, ne-benzodiazepīnu, barbiturātu grupas medikamentu darbību un etanola efektiem. *Shulgina* publicētie rezultāti parāda, ka fenibuts saistās pie GASS<sub>A</sub> receptoriem (Shulgina, 1986), savukārt *Lapin* rezultāti to neapstiprina (Lapin, 2001), lai gan netiek izslēgta fenibuta sekundāra iedarbība uz GASS<sub>A</sub> receptoru.

Papildu tam ir parādīts, ka fenibuts stimulē dopamīna (DA) receptorus (Lapin, 2001) un veicina paaugstinātu DA intraneironālo sintēzi un katabolismu žurkās (Allikments, 1979), kā arī stimulē serotonīnērgiskos procesus pelēs (Nurmand, 1980). Literatūrā ir aprakstīts, ka fenibuts devā 25 mg/kg neuzrāda ievērojamu GASS, serotonīna un DA līmeņa

paaugstināšanos *Wistar* žurku smadzeņu struktūrās, savukārt samazina noradrenalīna līmeni *hippocampus* un palielina DA metabolītu (3,4-dioksifenilacetātskābes) līmeni, kā arī samazina taurīna līmeni smadzenēs *striatum* rajonā (Borodkina, 2009).

Nesen tika parādīts, ka R-fenibuts pēc *a.cerebri media* oklūzijas ievērojami samazina smadzeņu audu bojājuma lielumu garozas zonā, kā arī samazina nekrotisko audu veidošanos (Vavers et al., 2015). Papildu tam tika parādīts, ka pēcinsulta periodā samazinās smadzenēs atvasinātā neirotropā faktora (*BDNF*) un asinsvadu endoteliālā augšanas faktora (*VEGF*) gēnu ekspresija, savukārt R-fenibuta terapija pēcinsulta periodā ievērojami palielina šo gēnu ekspresiju (Vavers et al., 2015). Vairākos pētījumos ir parādīts, ka terapijas rezultātā ir palielināts *VEGF*, tādējādi palīdzot nervam reģenerēties. *VEGF* ir nozīmīga loma Švāna šūnu proliferācijā, palielinot šī faktora ekspresiju, tiek uzlabota nerva atjaunošanās pēc bojājuma (Hsieh et al., 2012; Murakami et al., 2014). Ir zināms, ka *BDNF* tiek pastiprināti ekspresēti Švāna šūnās kā atbildes reakcija uz nervu bojājumu, tādējādi izraisot neiropatiskās sāpes. Bez tam ir parādīts, ka sēžas nerva hroniska bojājuma modelī, izraisot neiropatiskās sāpes, *BDNF* ekspresija ir palielināta, salīdzinot ar veselu, nebojātu nervu. Mūsdienās *BDNF* ir viens no mērķa proteīniem, ko varētu izmantot neiropatisko sāpju ārstēšanai (Neumann et al., 2015; Vanelderren et al., 2013).

### **1.3. Gabapentīns – izvēles medikaments neiropatisku sāpju terapijā**

GBP ir GASS analogs (skat. 1.attēlu), kas tika sintezēts 1993.gadā kā antikonvulsants, lai ārstētu parciālas epilepsijas krampju lēkmes. Literatūrā ir aprakstīts, ka GBP ir efektīvs līdzeklis dažu neiropatisko sāpju formu (postherpētiskas neiralģijas, diabētiskās neiropatijas, kompleksā reģionālā sāpju sindroma, trigeminālās neiralģijas, HIV-izraisītas neiropatijas, galvassāpju, malignitātes izraisītu sāpju) un pēcoperācijas sāpju kupēšanai (Kong, Irwin, 2007).

GBP saistīšanās vietas ir heterogēni izplatītas žurku smadzeņu audos (Hill et al., 1993; Bian et al., 2006). Ir aprakstīts, ka no cūku smadzeņu membrānām tika izolēts augstas afinitātes [<sup>3</sup>H]GBP-saistīšanās proteīns, un, veicot N-terminālu sekvencēšanu, šis proteīns tika identificēts kā LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienība (Gee et al., 1996). To apstiprināja arī audu izdalīšanas pētījumi, hidrodinamiski dati, klonētās  $\alpha_2\delta$  cDNS heterogēna ekspresija COS-7 un HEK šūnās, un arī radioligandu saistīšanās un fracionētā  $Ca^{2+}$  kanāla subvienības imūnblota

pētījumi. [<sup>3</sup>H]GBP bija pirmais aprakstītais ligands, kas saistās ar  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienību (Gee et al., 1996).

Lai gan GBP ir GASS strukturāls analogs, GBP saistīšanās pie GASS<sub>A</sub> vai GASS<sub>B</sub> receptora nav novērota. GBP (>1mM koncentrācijā) neaizvieto [<sup>3</sup>H]GASS pie GASS<sub>B</sub> receptora žurku sinaptiskajās membrānās (Jensen et al., 2002). Ir zināms, ka GBP saistās pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta_1$  un  $\alpha_2$ - $\delta_2$  subvienībām (attiecīgi  $K_d = 59$  un  $153$ nM), bet tas nesaistās pie  $\alpha_2$ - $\delta_3$  and  $\alpha_2$ - $\delta_4$  subvienībām (Marais et al., 2001; Qin et al., 2002). Pierādījumi par GBP un pregabalīna pretsāpju efektiem balstās uz rezultātiem, ka abas vielas saistās pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta_1$  subvienības (Field et al., 2007). Spontānas un inducētas mutācijas (saistītas ar epilepsiju), kas skar  $\alpha_2$ - $\delta_2$  gēnu, palielina krampju un ataksijas attīstību (Barclay et al., 2001). Pelēm, kurām trūkst *Cacna2d2* gēns, novēro palielinātu uzņēmību pret krampjiem, kas inducēti ar konvulsantu - pentilenetrazolu (PTZ) (Ivanov et al., 2004). Tas norāda, ka GBP antikonvulsanta aktivitāte tiek mediēta saistoties pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta_2$  subvienības.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Izmēģinājuma dzīvnieki

Eksperimentos izmantoja pieaugušus *Wistar* līnijas žurku tēviņus ar ķermeņa masu 350-400g un *ICR* vīriešu kārtas peles ar ķermeņa masu 23-25g. Izmēģinājuma dzīvnieki tika iegādāti Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas vivārijā, Latvijā. Eksperimenta laikā dzīvniekus izvietoja Latvijas Organiskās sintēzes institūta vivārija telpās (atradās Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra (BMC) telpās Rīgā, Rātsupītes ielā 1). Pēc dzīvnieku attransportēšanas ievēroja adaptācijas periodu (vismaz septiņas dienas) līdz eksperimentu sākumam. Eksperimentētāji pieradināja pie sevis, savas smaržas, ņemot dzīvniekus rokās (*handling*). Izmēģinājuma dzīvnieki tika randomizēti sadalīti grupās. Eksperimentu laikā dzīvnieki tika turēti standarta sprostos. Tika nodrošināti eksperimentālo dzīvnieku uzturēšanas standarta apstākļi (gaisa temperatūra 21-23°C, relatīvais gaisa mitrums  $65 \pm 10\%$ , 12 stundu gaismas/tumsas cikls). Barība standartizētā diēta R70 no firmas LABFOR (Lactamin AB, Zviedrija) un dzeramais ūdens bija pieejams bez ierobežojuma. Visas eksperimentālās procedūras ar laboratorijas dzīvniekiem tika veiktas saskaņā ar 2010. gada 22. septembrī pieņemto Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU un apstiprinātas Pārtikas un veterinārā dienestā (Pārtikas un veterinārā dienesta un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomes atzinums, Rīga, Latvija). Eksperimenti tika veikti FELASA sertificētu speciālistu (Dr. med. L. Zvejniece, Dr.pharm. B. Švalbe) vadībā.

### 2.2. Reaktīvi un materiāli

R-fenibutu un S-fenibutu iepirka no JSC Olainfarm (Latvija). Racēmiskais baklofēns tika iepirkts no Polpharma (Polija). GBP tika iepirkts no TCI Europe nv (Beļģija). [<sup>3</sup>H]GBP (1-(Amino-[3H]-metil)-[2,3,5,6-3H]cikloheksilacetātskābe; specifiskā aktivitāte 110 Ci/mmol) tika iepirkts no American Radiolabeled Chemicals (ASV). 3-Aminopropil-(dietoksimetil)-fosfīniskābe (CGP35348) tika iepirkts no Tocris Bioscience (Apvienotā Karaliste). Formaldehīda šķīdums (37%) tika iepirkts no Sigma-Aldrich (Vācija).

### 2.3. [<sup>3</sup>H]GBP saistīšanās pārbaude

Membrānas tika sagatavotas kā aprakstīts *Suman-Chauhan* (Suman-Chauhan et al., 1993) pētījumā. Respektīvi, vīriešu kārtas *Wistar* žurkām tika veikta dekapitācija, uzmanīgi izņemtas smadzenes un pēc tam atdalīta smadzeņu garoza. Smadzeņu garoza tika homogenizēta aukstā buferšķīdumā A (5mM Tris un 5mM EDTA, pH = 7,4, temperatūrā +4°C), kura sastāvā ietilpst 0,32 M saharoze, masas tilpuma attiecībā 1:10, ar teflona/stikla homogenizētāju. Homogenāts tika centrifugēts 950×g, 10 minūtes, +4°C temperatūrā (*Heraeus™ Biofuge™ Stratos™ Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*). Virsnogulšņu šķīdums tika noņemts un centrifugēts 50 000×g, 30 minūtes, +4°C temperatūrā, izmantojot *Optima™ L-100 XP* ultracentrifūgu (*Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland*). Iegūtās nogulsnes atkārtoti resuspendēja masas tilpuma attiecībā 1:20 (ievērojot oriģinālo smadzeņu garozu slapjsvaru) buferšķīdumā B (5 mM Tris un 5 mM EDTA, pH = 8,0, +4°C) un atstātas ledū uz krafitāja (*Biosan*) 30 minūtes maisīties. Tālāk suspensija tika centrifugēta 50 000×g, 30 minūtes, +4°C. Nogulsnes tika atkārtoti resuspendētas buferšķīdumā A (satur 1,2M saharozi) un tālāk sadalītas pēc saharozes gradienta (buferšķīdums B satur 0,0, 0,9 vai 1,2M saharozes; 1:1:1 tilp/tilp/tilp), izmantojot centrifugēšanu ar 90Ti rotoru 100 000×g, 90 minūtes. Sinaptiskās plazmas membrānas novietojās starp 0,9 un 1,2M saharozes slāni, tās tika savāktas un resuspendētas 2ml buferšķīdumā A un centrifugētas 50 000×g, 30 minūtes. Beidzamās iegūtās nogulsnes tika resuspendētas buferšķīdumā A un sasaldētas (proteīna koncentrācija 6-8 mg/ml) –80°C, līdz to izmantošanai. Proteīna koncentrācija tika mērīta izmantojot *Lowry et al., 1951* metodi, kā standartu izmantojot buļļa seruma albumīnu (BSA). Lietošanas dienā membrānas tika atkausētas un centrifugētas 50 000×g, 30 minūtes, tad resuspendētas izmantojot inkubācijas bufera šķīdumu (10 mM HEPES, pH = 7,4, +4°C). Saistīšanās pārbaudes buferšķīdums sastāv no 110 µL inkubācijas bufera šķīduma, 50 µL membrānām, 20 µL nosakāmās vielas vai destilēta ūdens kontrolei un 20 µL [<sup>3</sup>H]GBP. [<sup>3</sup>H]GBP beigu koncentrācija ir 1,0 nM. Nespecifisko saistīšanos pārbaudīja pievienojot GBP (100 µM). Paraugi tika inkubēti 40 minūtes istabas temperatūrā. Saistītie un brīvie radioligandi tika atdalīti, izmantojot strauju filtrāciju vakuumā, izmantojot *Millipore GF/B* filtrpapīru (*Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA*). Filtri tika skaloti trīs reizes ar (0,25 mL) 50 mM Tris (pH 7,4, +4°C) buferšķīdumu. Paraugu radioaktivāte tika mērīta ar scintilācijas šķīduma skaitītāju (*Wallac MicroBeta TriLux (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA)*). Katrs eksperiments tika atkārtots vismaz trīs reizes, katru piegājienu veicot dubultā.

### 2.3.1. Lowry proteīna noteikšanas metode

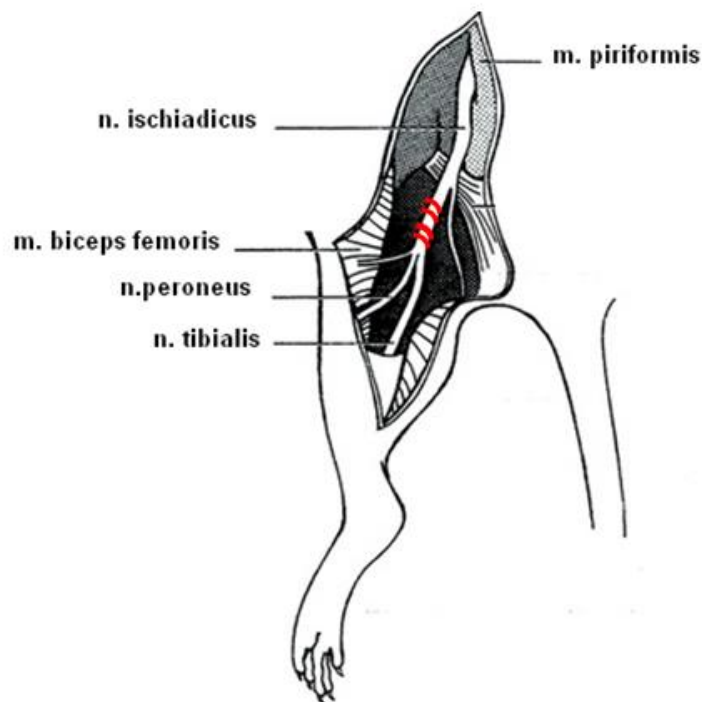
Virsnogulšņu šķīdumam un plazmas paraugiem tika noteikta proteīnu koncentrācija ar Lowry metodi (Lowry et al., 1951). Standartlīkne tika konstruēta, mērot zināmas koncentrācijas BSA šķīdumiem (0,0625-0,125-0,25-0,5-1-2-4 mg/ml). Paraugi un standarts tika pilināts pa 20 µl 96 lauciņu platītē. Pēc tam pievienoja 200 µl reaģenta C, kas tieši pirms pievienošanas tika sagatavots, sajaucot reaģentus A (2% nātrija karbonāts šķīdināts 0,1 M nātrija hidroksīda šķīdumā) un B (0,5% vara vitriola šķīdināts 1% nātrija citrāta šķīdumā) tilpuma attiecībā 50:1. Tad platīte tika inkubēta uz kratītāja (*Biosan*) istabas temperatūrā 10 min. Pēc inkubācijas tika pievienots 20 µl Folin-Ciocalteu reaģents, pēc pievienošanas platīti inkubēja uz kratītāja (*Biosan*) 30 minūtes istabas temperatūrā. Optisko blīvumu noteica pie 540 nm viļņa garuma.

## 2.4. Uzvedības testi

### 2.4.1. Formalīna izsauktais ķepas laizīšanas tests

Formalīna izsauktais ķepas laizīšanas tests tika veikts kā aprakstīts *Zvejniece et al.* iepriekš veiktajā pētījumā (*Zvejniece et al.*, 2006). Respektīvi, izmēģinājuma dzīvnieki saņēma savienojumus vai fizioloģisko šķīdumu 60 minūtes pirms intraplantāras formalīna injekcijas (skat. 2.4.1.attēlu). GPB (50 mg/kg) un R-fenibuts (10, 25 un 50 mg/kg) tika injicēti intraperitoneāli (i.p.). Kontroles grupas peles saņēma i.p. fizioloģiskā šķīduma injekciju. 30 µL formalīna šķīduma (1,5% fizioloģiskajā šķīdumā) tika injicēts subkutāni (s.c.) pelēm labās pakalķepas plantārajā virsmā, izmantojot mikrošļirci ar 27G izmēra adatu. Pēc tam katra pele tika ievietota individuālā caurspīdīgā observācijas kamerā (30 × 20 × 30 cm). Katras peles kopējais pavadītais laiks laizot ķepu, tika noteikts ar piecu minūšu intervāliem, kopā 60 minūtes. Eksperimentētāji, kuri veica dzīvnieku uzvedības testus un analizēja datus, nebija informēti par izmēģinājuma dzīvnieku sadalījumu pa grupām līdz individuālo dzīvnieku datu analīzes pilnīgai pabeigšanai. Ķepas laizīšanas pirmā fāze sākās uzreiz pēc formalīna injekcijas un ilga līdz piecām minūtēm. Sekundārā fāze sākās aptuveni 15-20 minūtes pēc formalīna injekcijas un ilga 35-40 minūtes (skat. 2.4.1.attēlu). Antagonisma pētīšanai pelēm tika i.p. injicēts CGP35348 devā 100 mg/kg 10 minūtes pirms R-fenibuta vai GBP injekcijas, deva 50 mg/kg. R-fenibuts vai GBP tika injicēts 50 minūtes pirms eksperimenta. CGP35348 deva tika izvēlēta balstoties uz *Dambrova et al.* iepriekš veiktajiem eksperimentiem, kuros tika noskaidrots, ka CGP35348 bloķē R-fenibuta (100 mg/kg) farmakoloģisko aktivitāti (*Dambrova et al.*, 2008).





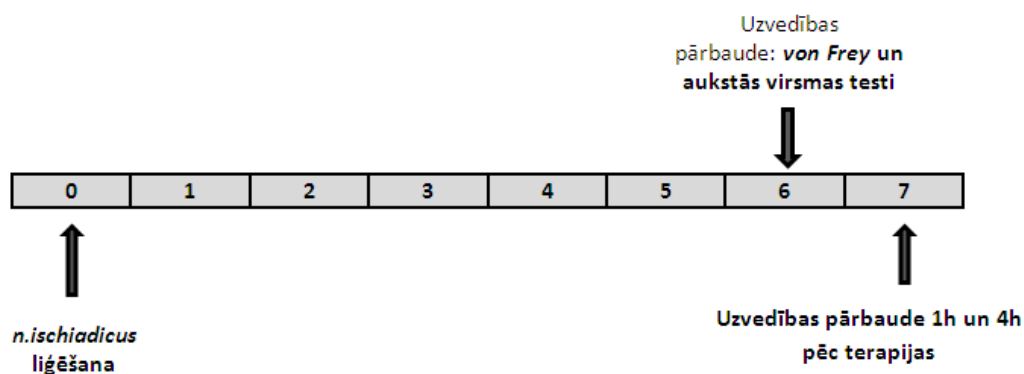
Ligatūras proksimāli no *n. ischiadicus* trifurkācijas vietas

2.4.2.1.1. attēls. Eksperimenta dizains. Kreisais sēžas nervs tika bojāts, veicot trulu disekciju starp *m.biceps femoris*, tika uzliktas četras ligatūras proksimāli no sēžas nerva trifurkācijas.

Žurkas iedalīja sešās eksperimentālajās grupās:

- viltus operētās žurkas (n=8);
- sēžas nerva hroniska bojājuma jeb kontroles grupa, kas saņēma fizioloģiskā šķīduma (saline) injekcijas (n=8);
- sēžas nerva hroniska bojājuma grupa, kas saņēma R-fenibuta injekcijas devā 25 mg/kg (n=8);
- sēžas nerva hroniska bojājuma grupa, kas saņēma R-fenibuta injekcijas devā 50 mg/kg (n=8);
- sēžas nerva hroniska bojājuma grupa, kas saņēma S-fenibuta injekcijas devā 50 mg/kg (n=8);
- sēžas nerva hroniska bojājuma grupa, kas saņēma GBP injekcijas devā 100 mg/kg (n=8).

Uzvedības testi tika veikti pirms operācijas, sestajā pēcooperācijas dienā (kā atskaites punkts) un septītajā pēcooperācijas dienā (eksperimenta diena). R- un S-fenibuts tika injicēti i.p., un efekts uz termālo vai mehānisko alodīniju tika pārbaudīts vienu un četras stundas pēc injekcijas (skat. 2.4.2.1.2.attēlu).



2.4.2.1.2.attēls. Eksperimenta dizains. Uzvedības testus veic sestajā pēcooperācijas dienā un septītajā pēcooperācijas dienā vienu un četras stundas pēc R- un S-fenibuta injicēšanas.

#### 2.4.2.2. Elektroniskais von Frey tests

Mehāniskā alodīnija tika reģistrēta žurkās ar sēžas nerva hronisku bojājumu, nosakot kreisās ķepas atbildes reakcijas sliekšni pret mehānisku kairinājumu (skatīt 2.4.2.2.attēlu). Mērījumiem izmantoja elektronisko *von Frey* anesteziometru (modelis 2391C; IITC *Life Science Inc.*, *Woodland Hills, CA, USA*) (Hara et al., 2014). Testa laikā žurkas tika ievietotas individuālā caurspīdīgā novērošanas kamerā uz metāla režģa pamatnes. 10 minūtes pirms testa uzsākšanas žurkas adaptējās novērošanas kamerās. Ar *von Frey* matiņu kairināja kreisās ķepas plantārās virsmas vidusdaļu, un tika reģistrēta atbilde uz kairinājumu (ķepas pacelšana, kratīšana). Kairinājuma sliekšnis tika definēts kā vidējais mērījums, kas izteikts gramos (g), no pieciem mēģinājumiem, nosakot nepieciešamo kairinājuma stiprumu, lai stimulētu ķepas atbildes reakciju.



**2.4.2.2.attēls. von Frey tests mehāniskās alodīnijas noteikšanai.**

#### 2.4.2.3. Aukstās virsmas tests

Termālā alodīnija žurkām ar sēžas nerva hronisku bojājumu tika novērtēta, izmantojot aukstās virsmas testu (*Hot/Cold Plate, model 35100, Ugo Basile, Varese, Italy*, skatīt 2.4.2.3. attēlu). Žurkas tika novietotas uz aukstas nerūsējošā tērauda plates, kur uzstādīta nemainīga  $+3^{\circ}\text{C}$  temperatūra. Tika piefiksēta žurku atbildes reakcija, operētās ķepas pacelšana un kratīšana. Atbildes reakciju mērīja sekundēs. Maksimālais laiks, kad žurka atradās uz aukstās virsmas, bija 90 sekundes, lai novērstu audu bojājumus.



**2.4.2.3.attēls. Aukstās virsmas tests termālās alodīnijas noteikšanai.**

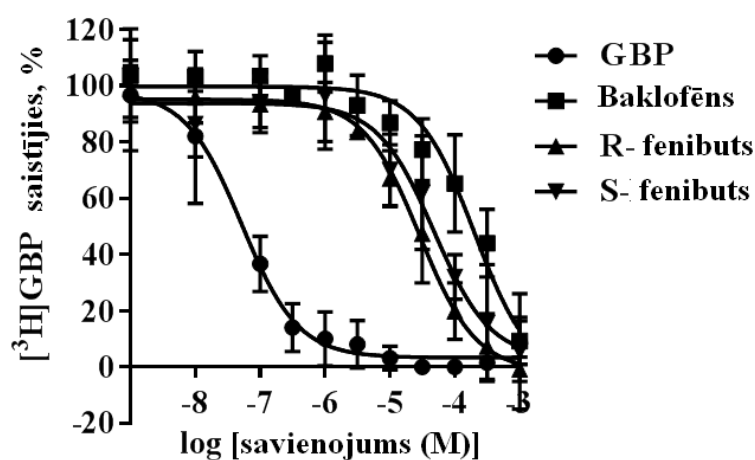
## 2.5. Statistiskā analīze

Visi rezultāti tika izteikti kā vidēja vērtība  $\pm$  vidējā standarta kļūda (S.E.M.). R-fenibuta pretsāpju efekta ilgums formalīna inducētā ķepas laizīšanas testa pirmās un otrās fāzes laikā tika analizēts, izmantojot vienvirziena dispersijas analīzi (ANOVA) ar Newman–Keuls salīdzināšanas testu. Uzvedība pēc sēžas nerva hroniska bojājuma tika pētīta ar divvirzienu atkārtotu mērījumu ANOVA un vienvirziena ANOVA ar Newman–Keuls salīdzināšanas un Student's t-testu. Statistikas kalkulācija tika veikta, izmantojot GraphPad Prism 3.0 software package (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA*). Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja p vērtība bija mazāka par 0,05. Testēto medikamentu iespēja aizvietot radioligandu pie receptoriem tika kalkulēta, izmantojot GraphPad Prism 3.0 software package.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. [<sup>3</sup>H]GBP saistīšanās pārbaude

Tika testēta R-fenibuta, S-fenibuta un baklofēna (1nM līdz 1 mM) saistīšanās afinitāte pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības. Vielas mijiedarbojās ar [<sup>3</sup>H]GBP-definētām vietām konkurētspējīgā veidā. Pēc iegūtās  $K_i$  vērtības, R-fenibuta, S-fenibuta un baklofēna afinitāte pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības attiecīgi ir  $23 \pm 6 \mu\text{M}$ ,  $39 \pm 5 \mu\text{M}$  un  $156 \pm 40 \mu\text{M}$  (skatīt 3.1.attēlu un 2.tabulu). Neiezīmētais GBP tika izmantots kā referentais medikaments, kuram tika iegūta raksturīgā konkurences līkne ar vidējo  $K_i$  vērtību  $0.05 \pm 0.01 \mu\text{M}$  (skatīt 3.1.attēlu).



3.1.attēls. R-fenibuta ( $\blacktriangle$ ), S-fenibuta ( $\blacktriangledown$ ), baklofēna ( $\blacksquare$ ) un GBP ( $\bullet$ ) efekti, saistoties ar [<sup>3</sup>H]GBP pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības (*Wistar* vīriešu kārtas žurku membrānu preparātos).

2.tabula.

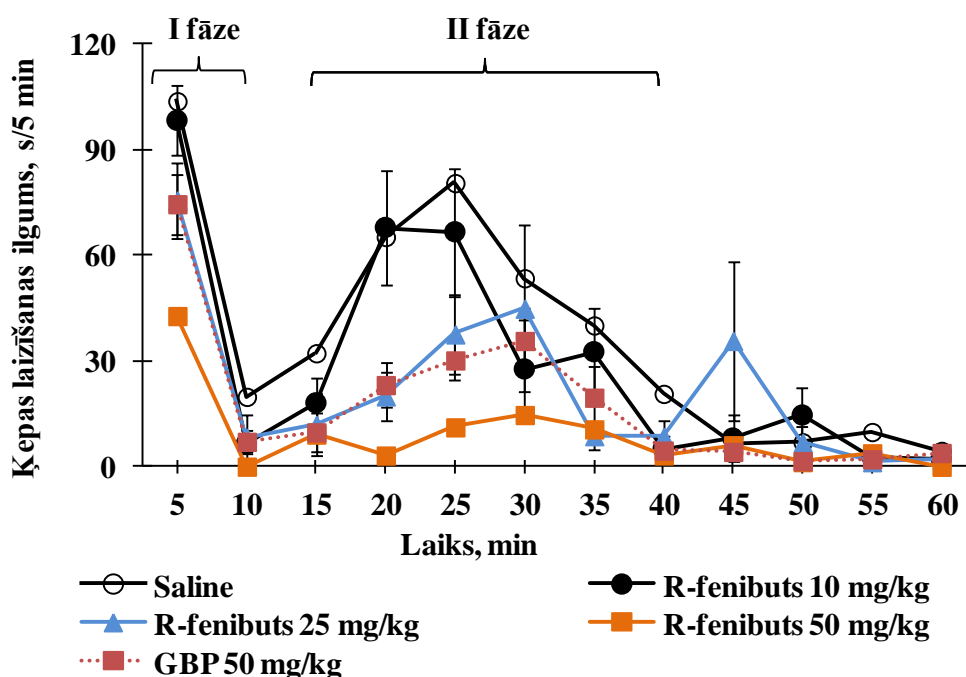
R-fenibuta, S-fenibuta, baklofēna, GBP līdzsvara disociācijas konstante pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības un GASS<sub>B</sub> receptora (<sup>a</sup> - Dambrova et al., 2008; <sup>b</sup> – Jensen et al., 2002)

	LAKK $\alpha_2$ - $\delta$ subvienība $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	GASS <sub>B</sub> $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>R-fenibuts</b>	$23 \pm 6$	$92 \pm 3^a$
<b>S-fenibuts</b>	$39 \pm 5$	$>1\text{mM}^a$
<b>Baklofēns</b>	$156 \pm 40$	$6 \pm 1^a$
<b>GBP</b>	$0.05 \pm 0.01$	$>1\text{mM}^b$

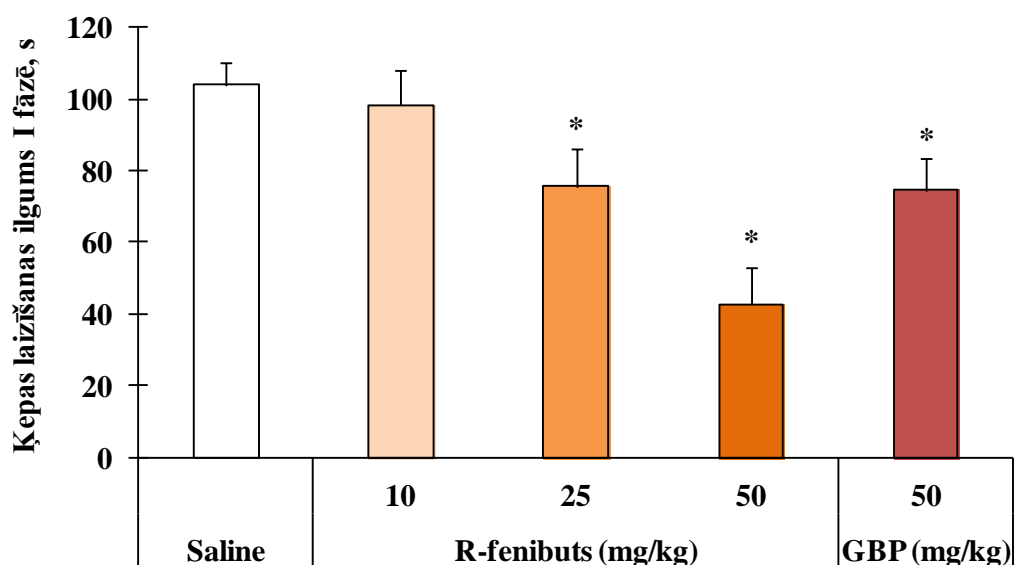
### 3.2. Formalīna izsauktais ķepas laizīšanas tests

R-fenibuta pretsāpju efekts tika pētīts, izmantojot formalīna izsaukto ķepas laizīšanas testu pelēm (skatīt 3.2.1.attēlu). Kā redzams 3.2.2.attēlā, formalīna injekcija kontroles grupas pelēm izraisīja akūtu, tūlītēju nocieptīvu atbildi, respektīvi, pēdas laizīšanu un kratīšanu, kas ilga piecas minūtes (pirmā fāze). Nocieptīvās uzvedības otrā fāze kontroles grupas pelēm sakās 15-20 minūtes pēc formalīna injekcijas un ilga 35-40 minūtes (skatīt 3.2.3.attēlu).

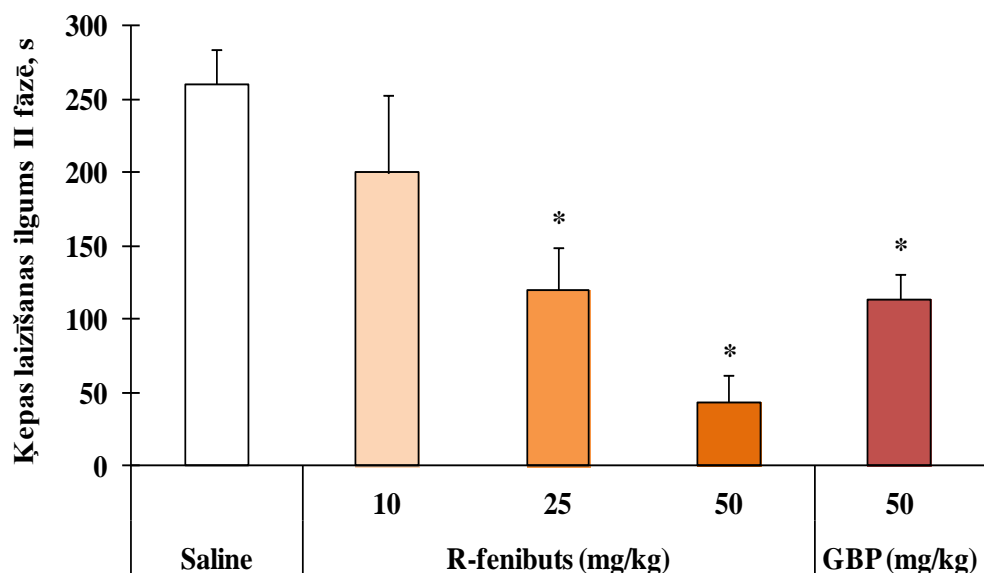
Kā redzams 3.2.2.attēlā, R-fenibuts (10, 25 un 50 mg/kg, i.p.) devas atkarīgi samazināja formalīna izsaukto nocieptīvo uzvedību pirmās fāzes laikā ( $F_{(4, 79)} = 6,958$ ,  $p < 0.0001$ ). Šīs fāzes laikā R-fenibuts devā 25 un 50 mg/kg samazināja ķepas laizīšanas ilgumu attiecīgi par 30% ( $p < 0,05$ ) un 60% ( $p < 0,001$ ). Līdzīgi R-fenibuta efekti tika novēroti arī otrās fāzes laikā ( $F_{(4, 79)} = 10,14$ ,  $p < 0,0001$ ), kurā ķepas laizīšanas ilgums, pēc R-fenibuta injicēšanas devā 25 un 50 mg/kg, samazinājās par 55% un 85%, (skatīt 3.2.3.attēlu). Pirmās fāzes laikā GBP devā 50 mg/kg samazināja ķepas laizīšanas ilgumu par 32% ( $p < 0,05$ ) un otrās fāzes laikā par 56% (skatīt 3.2.2. un 3.2.3. attēlus;  $p < 0,001$ ).



3.2.1.attēls. R-fenibuts devas atkarīgi uzrāda pretsāpju efektus formalīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā pelēm. R-fenibuts (10, 25 un 50 mg/kg) un GBP (50 mg/kg) tika injicēti i.p. 30 minūtes pirms testa. Formalīns (1,5%; 30 $\mu$ L) tika injicēts s.c. labās ķepas plantārajā virsmā. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi  $\pm$  S.E.M. 9-15 dzīvniekiem: \* $p < 0,05$  statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu.



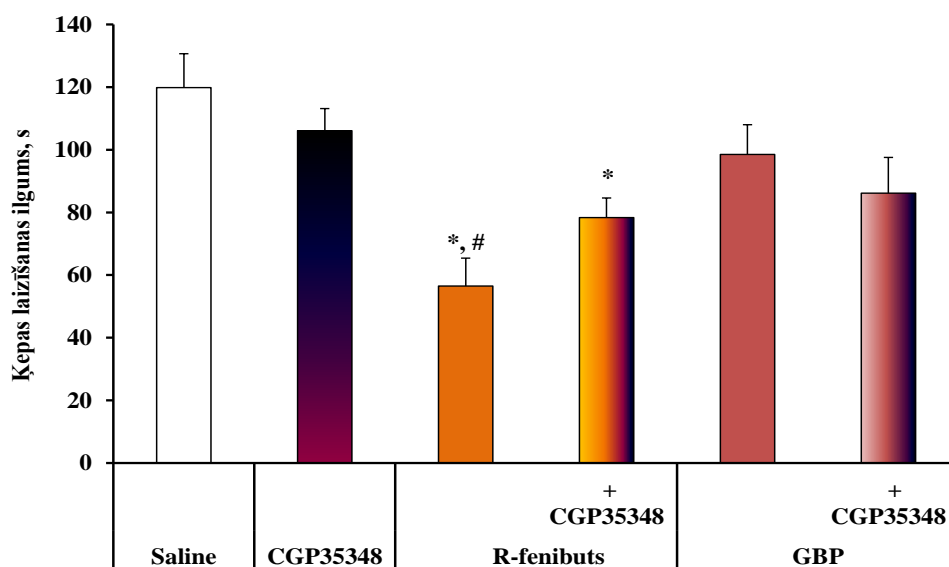
3.2.2.attēls. R-fenibuts (25 un 50 mg/kg) un GBP (50 mg/kg) uzrāda pretspāju efektus pelēm formalīna izsauktā ķepas laizīšanas testa pirmajā fāzē (līdz piecām minūtēm). Kopējais testa ilgums 60 minūtes. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi  $\pm$  S.E.M. 9-15 dzīvniekiem: \*p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu.



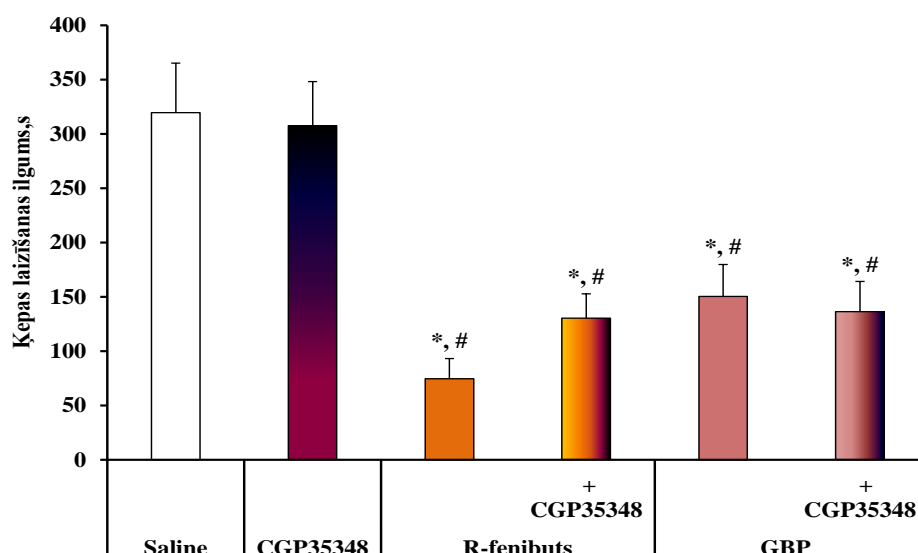
3.2.3.attēls. R-fenibuta (25 un 50 mg/kg) un GBP (50 mg/kg) pretspāju efekti formalīna izsauktā ķepas laizīšanas testa otrajā fāzē (no 15. – 50. minūtei). Kopējais testa ilgums 60 minūtes. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi  $\pm$  S.E.M. 9-15 dzīvniekiem: \*p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu.

GASS<sub>B</sub> receptora antagonists CGP35348 neuzrādīja pretsāpju efektus formalīna izsauktā ķepas laizīšanas testa abās fāzēs (skatīt 3.2.4. un 3.2.5 attēlus). Pirmās un otrās fāzes laikā R-fenibuts devā 50 mg/kg ievērojami samazināja ķepas laizīšanas ilgumu, salīdzinot ar fizioloģisko šķīdumu jeb saline un CGP35348 ( $F_{(5, 52)} = 4,677, p < 0,001$ ). GBP arī samazināja nociceptīvo atbildi, lai gan pirmās fāzes laikā efekts nebija ievērojams (skatīt 3.2.4. attēlu).

Kā redzams 3.2.5. attēlā, R-fenibuta un GBP injicēšana kopā ar CGP35348 nenomāca ne R-fenibuta, ne GBP pretsāpju efektus formalīna testa otrās fāzes laikā, un laizīšanas uzvedība šajās grupās būtiski atšķīrās no kontroles un CGP35348 grupām (skatīt 3.2.5. attēlu,  $F_{(5, 52)} = 8,309, p < 0,001$ ). Kā parādīts 3.2.4. attēlā, R-fenibuta injicēšana kopā ar CGP35348 nenomāca R-fenibuta pretsāpju atbildi formalīna testa pirmās fāzes laikā, salīdzinot ar kontroles grupu ( $p < 0,05$ ). Premedikācija ar CGP35348 samazināja R-fenibuta pretsāpju efektus par aptuveni 30% pirmās fāzes laikā, bet efekts nebija statistiski ievērojams.



**3.2.4.attēls. CGP35348 ietekme uz R-fenibuta un GBP pretsāpju efektiem formalīna izsauktā ķepas laizīšanas testa pirmajā fāzē. R-fenibuts (50 mg/kg) un GBP (50 mg/kg) tika injicēti i.p. 50 minūtes pirms testa sākuma, bet CGP35348 (100 mg/kg) tika injicēts 10 minūtes pirms R-fenibuta un GBP injicēšanas. Formalīns (1,5%; 30μL) tika injicēts s.c. labās ķepas plantārajā virsmā. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. 6-12 dzīvniekiem: \* $p < 0,05$  statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p < 0,05$  statistiski ticami, salīdzinot ar CGP35348 grupu.**



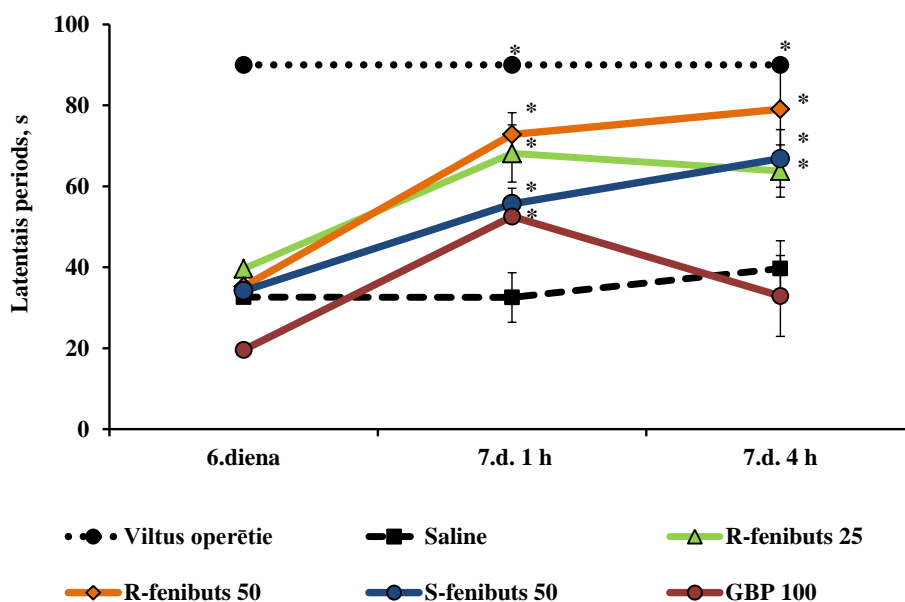
**3.2.5.attēls.** CGP35348 efekts uz R-fenibuta un GBP pretsāpju efektiem formālā izsauktā ķepas laizīšanas testa otrajā fāzē. R-fenibuts (50 mg/kg) un GBP (50 mg/kg) tika injicēti i.p. 50 minūtes pirms testa sākuma, bet CGP35348 (100 mg/kg) tika injicēts 10 minūtes pirms R-fenibuta un GBP injicēšanas. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi  $\pm$  S.E.M. 6-12 dzīvniekiem: \* $p < 0,05$  statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu, #  $p < 0,05$  statistiski ticami, salīdzinot ar CGP35348 grupu.

### 3.3. Termālā un mehāniskā alodīnija pēc sēžas nerva hroniska bojājuma

Veicot aukstās virsmas testu dzīvniekiem ar sēžas nerva hronisku bojājumu, sestajā pēcoperācijas dienā var novērot termālo alodīniju. Neviens no viltus operētajiem dzīvniekiem neatrāva vai nesāka kratīt ķepu pirms noteiktā laika beigām – 90 sekundēm. Savukārt pamata (atskaites punkta) ķepas atraušanas laiks pēc sēžas nerva hroniska bojājuma bija  $32,2 \pm 3,4$  s, kas ir ievērojami mazāks kā viltus operēto dzīvnieku grupā (skatīt 3.3.1. attēlu,  $p < 0,0001$ ). Veicot divvirzienu atkārtotu mērījumu ANOVA analīzi, tika novērots, ka savienojumu ievade samazina termālo alodīniju žurkām pēc sēžas nerva hroniska bojājuma (skatīt 3.3.1. attēlu, galvenais laika efekts ( $F_{(3, 42)} = 35,63$ ,  $p < 0,0001$ ) un grupas efekts ( $F_{(5, 126)} = 8,60$ ,  $p < 0,0001$ ) un grupas un laika savstarpējās mijiedarbības efekts ( $F_{(15, 126)} = 14,57$ ,  $p < 0,0001$ ).

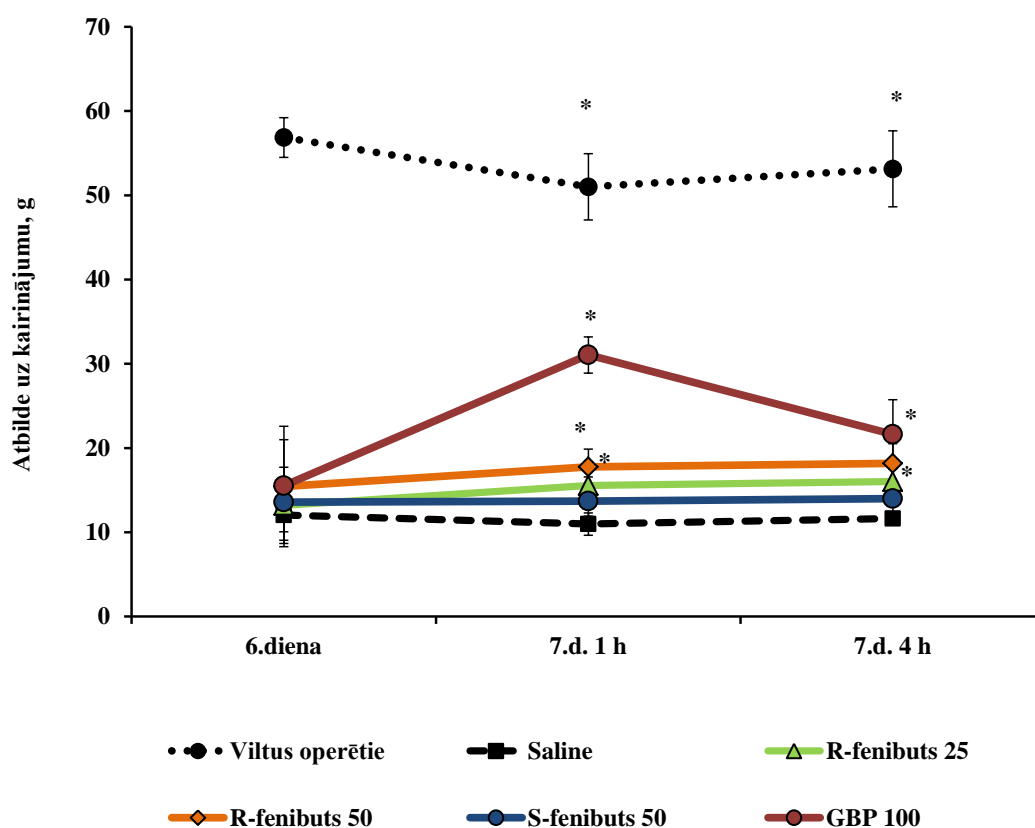
Salīdzinot ar kontroles grupu, R-fenibuts devās 25 un 50 mg/kg ievērojami palielināja ķepas atraušanas laiku (septītajā dienā) vienu un četras stundas pēc savienojumu injicēšanas. S-fenibuts devā 50 mg/kg ievērojami samazināja termālo alodīniju vienu un četras stundas pēc savienojumu injicēšanas, salīdzinot ar kontroles grupu (skatīt 3.3.1. attēlu,  $p < 0,001$ ). GBP devā 100 mg/kg ievērojami palielināja atraušanas laiku vienu stundu pēc vielu

injicēšanas, bet ne četras stundas pēc vielu injicēšanas, salīdzinot ar kontroles grupu (skatīt 3.3.1. attēlu).



**3.3.1.attēls.** R- un S-fenibuts samazina termālā alodīniju žurku sēžas nerva hroniska bojājuma modeli. Termālā alodīnija tika noteikta sestajā pēcooperācijas dienā (kā atskaites punkts) un septītajā pēcooperācijas dienā vienu un četras stundas pēc savienojumu injicēšanas. R-fenibuts (25 un 50 mg/kg), S-fenibuts (50 mg/kg) un GBP (100 mg/kg) tikai injicēti i.p. Termālā alodīnija tika noteikta, izmantojot aukstās virsmas testu. Iegūtie dati izteikti kā latentais periods (sekundēs). Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. 8 dzīvniekiem: \*p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu.

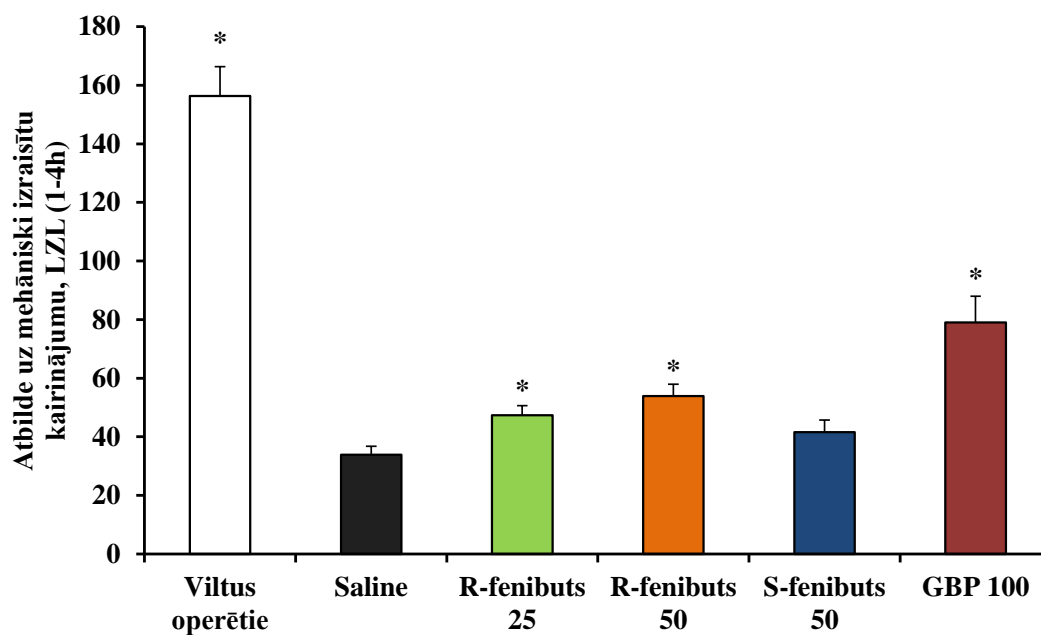
Veicot elektronisko *von Frey* testu, sestajā dienā pēc sēžas nerva hroniska bojājuma, dzīvniekiem novēroja mehānisko alodīniju (skatīt 3.3.2. attēlu). Vidējais ķepas atraušanas sliekšnis, reaģējot uz mehānisku stimulāciju, operētajiem dzīvniekiem bija ievērojami mazāks kā viltus operētajiem ( $14.0 \pm 0,7$  g un  $56.8 \pm 3,9$  g;  $p < 0,0001$ , skatīt 3.3.2. attēlu). Divvirzienu atkārtoti mērījumi ANOVA parādīja, ka savienojumi mazināja mehānisko alodīniju žurkām pēc sēžas nerva hroniska bojājuma (skatīt 3.3.1. un 3.3.2. attēlus, galvenais laika efekts ( $F_{(3, 42)} = 261,0$ ,  $p < 0,0001$ ) un grupas efekts ( $F_{(5, 126)} = 46,68$ ,  $p < 0,0001$ ) un grupas un laika savstarpējās mijiedarbības efekts ( $F_{(15, 129)} = 12,97$ ,  $p < 0,0001$ ).



3.3.2.attēls. R- un S-fenibuta efekti uz mehānisko alodīniju žurku sēžas nerva hroniska bojājuma modelī. Mehāniskā alodīnija tika noteikta sestajā pēcooperācijas dienā (kā atskaites punkts) un septītajā pēcooperācijas dienā vienu un četras stundas pēc vielu injicēšanas. Mehāniskā alodīnija tika noteikta, izmantojot *von Frey* testu. Dati izteikti kā ķepas atraušanas sliekšnis (gramos). Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi  $\pm$  S.E.M. 8 dzīvniekiem: \* $p < 0,05$  statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu.

R-fenibuts (devā 25 un 50 mg/kg) septītajā dienā vienu un četras stundas pēc i.p. injicēšanas ievērojami palielināja ķepas atraušanas sliekšni attiecīgi par 40 un 60%, salīdzinot ar kontroles grupu (skatīt 3.3.2. attēlu). Pēc S-fenibuta (50 mg/kg) injicēšanas ķepas atraušanas sliekšnis pieauga par 20%, taču efekts statistiski ticami neatšķīrās no kontroles grupas (skatīt 3.3.2. attēlu). Salīdzinot ar kontroles grupu, GBP devā 100 mg/kg palielināja ķepas atraušanas sliekšni gan vienu, gan četras stundas pēc iekļūšanas.

Rezultāti tika izteikti arī kā laukums zem līknes (LZL) (skatīt 3.3.3.attēlu). R-fenibuts un GBP ievērojami samazināja mehānisko alodīniju žurkām pēc sēžas nerva hroniska bojājuma ( $F_{(5,48)} = 62,98$ ,  $p < 0,0001$ ).



3.3.3.attēls. R- un S-fenibuts uzlabo mehānisko alodīniju žurku sēžas nerva hroniska bojājuma modelī. Mehāniskā alodīnija tika noteikta, izmantojot *von Frey* testu. Dati izteikti kā laukums zem līknes (LZL), kas tika aprēķināta vienu un četras stundas pēc savienojumu injicēšanas. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi  $\pm$  S.E.M. 8 dzīvniekiem: \* $p < 0,05$  statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu.

## 4. DISKUSIJA

Pēdējo gadu laikā palielinās pacientu skaits, kam attīstās un tiek diagnosticētas neiropatiskas sāpes. Pacientam ir pasliktināta dzīves kvalitāte, bet nozīmētā terapija ne vienmēr ir efektīva. Lai gan nav precīzi zināma neiropatisko sāpju incidence, domā, ka katrs piektais cilvēks cieš no hroniskām, tajā skaitā – neiropatiskām sāpēm (Cohen un Mao, 2014).

Vairākiem klīniskajā praksē izmantotiem medikamentiem, kā kapsaicīnam, GBP, pregabalīnam, ir neiropatisko sāpju mazinoša darbība. Kapsaicīns ir efektīvs medikaments perifēru neiropatisko sāpju ārstēšanā, tas saistās ar TRPV-1 receptoru (vanilloīdreceptoru pirmais subtips) un aktivē proteīnkināzi C (Groninger un Schisler, 2012). Visplašāk pielietotie pretsāpju līdzekļi neiropatisko sāpju ārstēšanā ir GBP un pregabalīns. Tos izmanto centrālu un perifēru neiropatisko sāpju mazināšanai, un šo medikamentu pretsāpju efekts tiek mediēts caur LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta_1$  subvienību (Gee et al., 1996). Tomēr ne visiem pacientiem pašreiz pieejamā terapija neiropatisko sāpju kupēšanai ir efektīva, bez tam šiem medikamentiem raksturīgi vairāki blakus efekti, kā miegainība, galvassāpes, samazinātas koncentrēšanās spējas, vemšana, nervozitāte, depresija (Baron, 2006). Tādēļ joprojām ir aktuāls jautājums par jaunu un efektīvu zāļu vielu radīšanu neiropatisko sāpju ārstēšanai.

Ir zināms, ka GBP saistās ar LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta$  subvienību, bet nesaistās pie GASS<sub>B</sub> receptoriem. R-fenibuta gadījumā tika parādīts, ka tas tieši saistās pie GASS<sub>B</sub> receptora un R-fenibuts bija apmēram 15 reizes mazāk aktīvs kā baklofēns. Šajā pētījumā tika parādīts, ka R-fenibuts konkurētspējīgā veidā mijiedarbojās arī ar LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta$  subvienību, un tā afinitāte bija septiņas reizes lielāka kā baklofēnam (skatīt 3.1.attēlu). Bez tam arī S-fenibuts saistījās pie LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta$  subvienības (skatīt 2.tabulu). R-fenibuta saistīšanās afinitāte pie LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta$  subvienības bija četras reizes augstāka kā tā saistīšanās afinitāte pie GASS<sub>B</sub> receptora (skatīt 2.tabulu). Kā parādīts 2. tabulā, R-fenibuts uzrādīja lielāku afinitāti pie LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta$  subvienības kā baklofēns. Tādējādi mēs noskaidrojām, ka R-fenibuts saistās gan pie LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta$  subvienības, gan GASS<sub>B</sub> receptoriem.

Vairākos preklīniskajos un klīniskajos pētījumos ir parādīta GBP pretsāpju darbība neiropatisko sāpju kupēšanai (Backonja un Glanzman, 2003). Preklīniskajos pētījumos GBP samazina sāpju atbildes reakcijas gan formālīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā, gan sēžas nerva hroniska bojājuma modelī (Dixit et al., 1999; Cesena et Calcutt, 1999; Ma et al., 2011). Eksperimentāli ir pierādīts, ka GBP pretsāpju darbība ir atkarīga no GBP saistīšanās pie LAKK  $\alpha_2\text{-}\delta_1$  subvienības (Field et al., 2007). Pētījumā iegūtie rezultāti pierāda, ka R-fenibuts

uzrāda devas atkarīgu pretsāpju efektu formalīna testa abās fāzes, un tā aktivitāte ir līdzīga GBP inducētajiem efektiem (skatīt 3.2.1.- 3.2.3. attēlus). Ir zināms, ka R-fenibuta pretsāpju un lokomotorais efekts, attiecīgi izmantojot karstās virsmas testu un atvērtā lauka testu, kā arī antidepresanta efekts piespiedu peldēšanas testā, tiek bloķēti ar GASS<sub>B</sub> receptora antagonistu - CGP35348 (Dambrova et al., 2008). Formalīna testa otrās fāzes laikā CGP35348 neinhibēja R-fenibuta pretsāpju aktivitāti, tātad R-fenibuta pretsāpju efekts nav saistīts ar GASS<sub>B</sub> receptoru. Turklāt arī pēc sēžas nerva hroniska bojājuma R-fenibuta lietošana ievērojami samazināja termālo un mehānisko alodīniju, uzrādot pretsāpju efektu neiropātisko sāpju modelī (skatīt 3.3.1.- 3.3.3. attēlus). Tā kā nav farmakoloģisku antagonistu, kas varētu bloķēt GBP efektu caur LAKK  $\alpha_2$ - $\delta_1$  subvienību, tika izmantots S-fenibuts, kas nesaistās pie GASS<sub>B</sub> receptoriem, bet saistās pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta_1$  subvienības. S-fenibuts arī samazināja atbildes reakciju uz termālo alodīniju (skatīt 3.3.1. attēlu). Līdz ar to varam secināt, ka R-fenibuta pretsāpju efektu neiropātisko sāpju modeļos nodrošina tā spēja saistīties ar LAKK  $\alpha_2$ - $\delta_1$  subvienību, nevis tā aktivitāte pie GASS<sub>B</sub> receptora.

Literatūrā ir aprakstīts, ka arī baklofēns devā 1,5 mg/kg uzrāda pretsāpju efektu formalīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā (Akada et al., 2005). Savukārt jau devās 2,5 un 5 mg/kg baklofēns izraisa ievērojamus blakusefektus – sedāciju (Li et al., 2013), muskuļu relaksāciju (Akada et al., 2005; Cryan et al., 2004) un samazinātu kustību aktivitāti (Farkas et al., 2005), kas nozīmē to, ka baklofēnam ir ļoti šaurs farmakoloģiskās darbības spektrs. Baklofēnu spasticitātes terapijā lieto jau 30 gadus (Brogden et al., 1974). Tomēr baklofēna spēja relaksēt muskuļus, kopā ar tā sedatīvajiem un hipotermiskajiem efektiem, ierobežo tā plašāku pielietojumu klīnikā (Dalvi un Rodgers, 1996). Savukārt R-fenibuta pretsāpju darbība ir novērojama piecas reizes mazākā devā kā sedatīvie efekti (Dambrova et al., 2008), kas ir priekšrocība R-fenibuta izmantošanai neiropātisko sāpju ārstēšanā.

Iegūtie dati parāda, ka fenibutam ir ne tikai trauksmi mazinoša, garstāvokli uzlabojoša, nootropa darbība, bet arī neiropātiskās sāpes kupējoša darbība. R-fenibuts neiropātisko sāpju modeļos uzrāda analgētiskus efektus līdzīgi kā GBP. Rezultāti apstiprina, ka R-fenibuta pretsāpju efekts netiek mediēts caur GASS<sub>B</sub> receptoru, bet gan caur LAKK  $\alpha_2$ - $\delta_1$  subvienību.

## 5. SECINĀJUMI

1. R-fenibuts saistās pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības, un tā saistīšanās afinitāte ir četras reizes labāka kā pie GASS<sub>B</sub> receptoriem. S-fenibuts arī saistās pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības.
2. R-fenibuts uzrāda pretsāpju darbību formalīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā un sēžas nerva hroniska bojājuma modelī.
3. R-fenibuta pretsāpju efekti formalīna izsauktajā ķepas laizīšanas testā un sēžas nerva hroniska bojājuma modelī korelē ar vielas saistīšanos pie LAKK  $\alpha_2$ - $\delta$  subvienības, nevis GASS<sub>B</sub> receptoriem.
4. Iegūtie rezultāti eksperimentāli pierāda R-fenibuta pretsāpju īpašības, un paver iespējas to izmantot klīniskajā praksē neiropātisko sāpju ārstēšanā.

## 6. PATEICĪBAS

Īpaša pateicība Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītājai Dr. pharm. Maijai Dambrovai par doto iespēju izstrādāt diplomdarbu Latvijas Organiskās sintēzes institūtā.

Vislielāko pateicību izsaku savai darba vadītājai Dr. pharm. Baibai Švalbei par palīdzību un doto iespēju piedalīties eksperimentu veikšanā, kā arī par atbalstu darba tapšanas procesā.

Liels paldies darba vadītājai Dr. biol. Līgai Plakanei, kas uzņēmās mana diplomdarba vadīšanu.

Miļš paldies Dr. med. Līgai Zvejniecei par vērtīgiem padomiem un atbalstu darba tapšanas laikā.

Darbs tapis ar Eiropas reģionālās attīstības fonda atbalstu, projekta Nr. 2013/0030/2DP/2.1.1.1.0/13/APIA/VIAA/001.

## 7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Argoff CE., Cole BE., Fishbain DA., Irving GA.; Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality of life issues; *Mayo Clin. Proc.*, 2006; 81 (4 Suppl): S3-11; PMID
2. Akada, Y., Mori, R., Kato, Y., Yamasaki, F., Mochizuki, H.; Analgesic properties of the novel compound M43068 in rat models of acute and neuropathic pain. *Eur.J. Pharmacol.* 2005; 523; 46–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.016>
3. Allan, R.D., Bates, M.C., Drew, C.A., Duke, R.K., Hambley, T.W., Johnston, G.A., Mewett, K.N., Spence, I.; A new synthesis, resolution and in vitro activities of (R)- and (S)- $\beta$ -phenyl-GABA. *Tetrahedron* 1990; 46; 2511–2524.
4. Allikmets, L.H., Rago, L.K.; The action of benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 on the effects of GABA-ergic drugs; *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1983; 324; 235–237; PMID 6318128
5. Backonja M., Glanzman RL.; Gabapentin dosing for neuropathic pain: evidence from randomized, placebo-controlled clinical trials; *Clin Ther.* 2003 Jan; 25 (1): 81-104; PMID 12637113
6. Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S.L., Letts, V.A., Brodbeck, J., Canti, C., Meir, A., Page, K.M., Kusumi, K., Perez-Reyes, E., Lander, E.S., Frankel, W.N., Gardiner, R.M., Dolphin, A.C., Rees, M.; Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 2001; 21, 6095–6104; PMID 11487633
7. Baron; Mechanisms of Disease: neuropathic pain—a clinical perspective; *Nature Clinical Practice*, 2006 Feb; Vol.2; N; doi:10.1038/ncpneuro0113
8. Bennett MI, Rayment C, Hjermstad M, Aass N, Caraceni A, Kaasa S.; Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: a systematic review. *Pain* 2012; 153; 359–65; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.10.028>; PMID 22115921
9. Bennett, G.J., Xie, Y.K.; A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33; 87–107; PMID 2837713
10. Bian, F., Li, Z., Offord, J., Davis, M.D., McCormick, J., Taylor, C.P., Walker, L.C.; Calcium channel  $\alpha$ 2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in  $\alpha$ 2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res.* 2006; 1075; 68–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.084>.

11. Borodkina LE, Kudrin VS, Klodt PM, Narkevich VB, Tiurenkov IN.; Effect of phenibut on the content of monoamines, their metabolites, and neurotransmitter amino acids in rat brain structures. *Eksp Klin Farmakol* 2009; 72(1); 60–3; PMID 19334514
12. Brogden, R.N., Speight, T.M., Avery, G.S.; Baclofen: a preliminary report of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in spasticity. *Drugs* 1974; 8; 1–14; PMID 4154834
13. Ceseña RM., Calcutt NA.; Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats; *Neurosci Lett.* 1999 Mar ; 262 (2): 101-4; PMID 10203241
14. Cohen, P.S., Mao, J.; Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications, *BMJ* 2014; 348; f 7656; doi:10.1136/bmj.f7656
15. Colombo B, Annovazzi PO, Comi G.; Medications for neurophatic pain: current trends; *Neurol Sci.*, 2006; 27 (Suppl 2): S183-9; PMID 16688627
16. Cryan, J.F., Kelly, P.H., Chaperon, F., Gentsch, C., Mombereau, C., Lingenhoehl, K., Froestl, W., Bettler, B., Kaupmann, K., Spooren, W.P.; Behavioral characterization of the novel GABA<sub>B</sub> receptor-positive modulator GS39783 (N, N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitropyrimidine-4,6-diamine): anxiolytic-like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 310; 952–963. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.104.066753>
17. Dallenbach KM; Pain: History and present status. *American Journal of Psychology* 1939; 52; 331–347
18. Dalvi, A., Rodgers, R.J.; GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berlin)* 1996; 128; 380–397; PMID 8986009
19. Dambrova, M., Zvejniece, L., Liepinsh, E., Cirule, H., Zharkova, O., Veinberg, G., Kalvinsh, I.; Comparative pharmacological activity of optical isomers of phenibut. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 583; 128–134; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.015>
20. Dixit R., Bhargava VK., Kaur N.; Antinociceptive effect of gabapentin in the formalin test; *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1999 Sep; 21 (7): 481-2; PMID 10544392
21. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM.; Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol.* 2003 Nov; 60(11): 1524-34. PMID 14623723

22. Farkas, S., Berzsenyi, P., Kárpáti, E., Kocsis, P., Tarnawa, I.; Simple pharmacological test battery to assess efficacy and side effect profile of centrally acting muscle relaxant drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2005; 52; 264–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2004.11.005>
23. Field, M.J., Li, Z., Schwarz, J.B.; Ca<sup>2+</sup> channel alpha2-delta ligands for the treatment of neuropathic pain. *J. Med. Chem.* 2007; 50; 2569–2575. <http://dx.doi.org/10.1021/jm060650z>.
24. Freunhagen R., Baron R., Tolle T., Stemmle E., Gockle U., Stevens M., Maier C.; Screening of neuropathic pain components in patients with chronic back pain associated with nerve root compression: a prospective observational pilot study (MIPORT); *Curr Med Res Opin.*, 2006; 22 (3): 529–37; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.05.006>; PMID 16574036
25. Gee, N.S., Brown, J.P., Dissanayake, V.U.K., Offord, J., Thurlow, R., Woodruff, G.N.; The novel anticonvulsant drug, gabapentin (neurontin), binds to the  $\alpha_2\delta$  subunit of calcium channel; *J. Biol. Chem.* 1996; 271; 5768–5776; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.10.5768>
26. Gordon AH.; Clinical Lecture on Lead Neuropathy; *Can Med Assoc J.* 1924 Jun; 14 (6): 479–81; PMID 20314995
27. Groninger MD un Schisler MD; Topical Capsaicin for Neuropathic Pain; *J Palliat Med.* 2012 Aug; 15(8): 946–947; doi:10.1089/jpm.2012.9571
28. Hill, D.R., Suman-Chauhan, N., Woodruff, G.N.; Localization of [3H] gabapentin to a novel site in rat brain: autoradiographic studies. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 244; 303–309.
29. Hsieh YL, Chou LW, Chang PL, Yang CC, Kao MJ, Hong CZ.; Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *J Comp Neurol.* 2012 Sep 1; 520(13): 2903–16. doi:10.1002/cne.23072
30. International Association for the Study of Pain "IASP Taxonomy", 14 July 2011; [http://www.iasppain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain\\_Definitions&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=1728](http://www.iasppain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=1728)
31. Ivanov, S.V., Ward, J.M., Tessarollo, L., McAreavey, D., Sachdev, V., Fananapazir, L., Banks, M.K., Morris, N., Djurickovic, D., Devor-Henneman, D.E., Wei, M.-H., Alvord, G.W., Gao, B., Richardson, J.A., Minna, J.D., Rogawski, M.A., Lerman, M.I.; Cerebellar ataxia, seizures, premature death, and cardiac abnormalities in mice with targeted disruption of the *Cacna2d2* gene. *Am. J. Pathol.* 2004; 165; 1007–1018. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63362-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63362-7)

32. Jensen, A.A., Mosbacher, J., Elg, S., Lingenhoehl, K., Lohmann, T., Johansen, T.N., Abrahamsen, B., Mattsson, J.P., Lehmann, A., Bettler, B., Bräuner-Osborne, H.; The anticonvulsant gabapentin (neurontin) does not act through gamma-aminobutyric acid B receptors. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61; 1377–1384; PMID 12021399
33. Johansen A, Romundstad L, Nielsen CS, Schirmer H, Stubhaug A.; Persistent postsurgical pain in a general population: prevalence and predictors in the Tromsø study. *Pain* 2012; 153: 1390–6; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2012.02.018>; PMID 22445291
34. Kong, V. K. F., Irwin, M. G.; Gabapentin: a multimodal perioperative drug?; *Br. J. Anaesth.* 2007; 99: 775–86; PMID 18006529
35. Lapin, I.; Phenibut (beta-phenyl-GABA): a tranquilizer and nootropic drug. *CNS Drug Rev.* 2001; 7; 471–481. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00211.x>
36. Lepine JP., Briley M.; The epidemiology of pain in depression; *Hum Psychopharmacol.*, 2004; 19 (Suppl 1): S3-7; PMID 15378670
37. Li, X., Risbrough, V.B., Cates-Gatto, C., Kaczanowska, K., Finn, M.G., Roberts, A.J., Markou, A.; Comparison of the effects of the GABAB receptor positive modulator BHF177 and the GABA<sub>B</sub> receptor agonist baclofen on anxiety-like behavior, learning, and memory in mice. *Neuropharmacology* 2013; 70; 156–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.018>.
38. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193; 265–275
39. Ma LL., Liu W., Huang YG. Yang N., Zuo PP.; Analgesic effect of gabapentin in a rat model for chronic constrictive injury; *Chin Med J (Engl)*. 2011 Dec; 124 (24): 4304-9; PMID 22340405
40. Marais, E., Klugbauer, N., Hofmann, F.; Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol. Pharmacol.* 2001; 59; 1243–1248; PMID 11306709
41. Meldrum, Marcia; A Capsule History of Pain Management. *JAMA* 2003; 290(18): 2470-2475. doi:10.1001/jama.290.18.2470.
42. Melzack R, Katz J.; „Pain: psychological perspectives”; Chapter - The Gate Control Theory: Reaching for the Brain; Edited by Craig KD, Hadjistavropoulos T.; Lawrence Erlbaum Associates, London 2004; 13-32; ISBN 0-8058-4299-3
43. Melzack R, Wall PD;. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965; 150 (3699): 971–9.
44. Montero Homs J., Gutierrez-Rivas E., Pardo fernandez J., Navarro Darder C.; Epidemiological study of prevalence, incident and neurophatic pain characterization in neurology units (PREVADOL study); *Neurologia* 2005; 20 (8): 385-9.

45. Murakami MD, Kuniyoshi MD, PhD, Iwakura MD, PhD, Matsuura MD, Suzuki MD, PhD, Takahashi MD, PhD, Ohtori MD, PhD; Vein Wrapping for Chronic Nerve Constriction Injury in a Rat Model Study Showing Increases in VEGF and HGF Production and Prevention of Pain-Associated Behaviors and Nerve Damage; *J Bone Joint Surg Am.* 2014; 96; 859-67; <http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.L.01790>
46. Nelson, LS; Phenibut Withdrawal - A Novel 'Nutritional Supplement'. *Clinical Toxicology* 2008; 46 (7): 605
47. Neumann E., Hermanns H., Barthel F., Werdehausen R., Brandenburger T.; Expression changes of microRNA-1 and its targets Connexin 43 and brain-derived neurotrophic factor in the peripheral nervous system of chronic neuropathic rats; *Mol Pain* 2015; 11; 39; DOI 10.1186/s12990-015-0045-y
48. Neumyvakin, I.P., Krupina, T.N., Polevoĭ, L.G., Semeĭkina, L.A.; Principles for making up pharmaceutical kits to supply cosmonauts with drug packs; *Kosm Biol Aviakosm Med.* 197; 12 (3): 27-31;
49. Norrsell U, Finger S and Lajonchere C; Cutaneous sensory spots and the "law of specific nerve energies": history and development of ideas. *Brain Research Bulletin* 1999; 48 (5): 457–465
50. Nurmand LB, Otter M, Vasar EE.; Effect of structural analogs of gamma aminobutyric acid on serotonin- and dopaminergic mechanisms. *Farmakol Toksikol* 1980; 43(3): 288–91
51. Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M.L., Codd, E.E., D'Andrea, M.R.; Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha 2delta-4 subunit. *Mol. Pharmacol.* 2002; 62; 485–496. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.62.3.485>
52. Reda H, Greene K, Rice FL, Rowbotham MC, Petersen KL; Natural history of herpes zoster: late follow-up of 3.9 years (n=43) and 7.7 years (n = 10). *Pain* 2013; 154; 2227–33; doi:10.1016/j.pain.2013.04.015.; PMID 23719573
53. Shulgina, G. I.; On neurotransmitter mechanisms of reinforcement and internal inhibition. *The Pavlovian journal of biological science* 1986; 21 (4): 129–140. doi:10.1007/BF02734511; ISSN 0093-2213. PMID 2431377.
54. Suman-Chauhan, N., Webdale, L., Hill, D.R., Woodruff, G.N.; Characterisation of [3H] gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 244; 293–301; PMID 8384570
55. Van Hecke O, Austin S, Smith BH, Khan R, Torrance N.; Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* 2014; 155: 654–662; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013>; PMID 24291734

56. Vanelderden MD, Rouwette PhD, Kozicz MD, PhD, Heylen MD, PhD, Van Zundert MD, PhD, Roubos PhD, Vissers MD, PhD; Effects of Chronic Administration of Amitriptyline, Gabapentin and Minocycline on Spinal Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression and Neuropathic Pain Behavior in a Rat Chronic Constriction Injury Model; *Regional Anesthesia and Pain Medicine* & Volume 2013; 2; 38; ISSN: 1098-7339; DOI: 10.1097/AAP.0b013e31827d611b
57. Vavers, Edijs; Zvejniece, Liga; Svalbe, Baiba; Volska, Kristine; Makarova, Elina; Liepinsh, Edgars; Rizhanova, Kristina; Liepins, Vilnis; Dambrova, Maija.; The neuroprotective effects of R-phenibut after focal cerebral ischemia. *Pharmacological Research* 2015; doi:10.1016/j.phrs.2015.11.013. ISSN 1043-6618.
58. Zvejniece, L., Muceniece, R., Krigere, L., Dambrova, M., Klusa, V.Z.; The differential influences of melanocortins on nociception in the formalin and tailflick tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006; 85; 287–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2006.08.001>

## **8. ĒTIKAS KOMISIJAS SLĒDZIENS**

Visas eksperimentālās procedūras ar laboratorijas dzīvniekiem tika veiktas saskaņā ar Eiropas direktīvu 010/63/EU un apstiprinātas Pārtikas un veterinārā dienestā (Pārtikas un veterinārā dienesta un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomes atzinums, Rīga, Latvija).

Eksperimenti tika veikti FELASA sertificētu speciālistu (Dr. med. L. Zvejniece, Dr. pharm. B. Švalbe) vadībā.

## 9. ZIŅOJUMI UN PUBLIKĀCIJAS

Diplomdarbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā.

### **Piedalījos eksperimentā, kura rezultāti tika publicēti:**

Zvejniece L, Vavers E, Svalbe B, Veinberg G, Rizhanova K, Liepins V, Kalvinsh I, Dambrova M. *“R-phenibut binds to the  $\alpha 2$ - $\delta$  subunit of voltage-dependent calcium channels and exerts gabapentin-like anti-nociceptive effects”*, *Pharmacol Biochem Behav.* **2015**; 137: 23-29. doi: 10.1016/j.pbb.2015.07.014.

### **Piedalījos eksperimentā, par kura rezultātiem tika zinots:**

Zvejniece L, Svalbe B, Vavers E, Zvejniece B, Rizhanova K, Liepins V, Dambrova M. *“Anti-nociceptive properties and binding to subunit of voltage-dependent calcium channels of R- and S-Phenibut”*. Drug Discovery conference, Riga, Latvia, August 27-29, **2015**. Abstracts, P.167.

Zvejniece B, Vāvers E, Švalbe B, Dambrova M un Zvejniece L. *“R-fenibuta saistīšanās pie lādiņa atkarīgo kalcija jonu kanālu  $\alpha 2$ - $\delta$  subvienības un gabapentīnam līdzīgie pretsāpju efekti”*. LU 74. zinātniskā konference, Medicīnas bāzes zinātnes un reģeneratīvās medicīnas sekcija, Rīga, Latvija, 19. februāris, **2016**. gads, Tēzes, 50. lpp.

Zvejniece L., Vavers E., Svalbe B., Zvejniece B and Dambrova M. *“Neuroprotective effects of R-phenibut in experimental models of stroke and neuropathic pain”*. 9<sup>th</sup> International Symposium on Neuroprotection Neurorepair, April 19-22, **2016**. Leipzig, Germany. Oral presentation, P. 23.

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Diplomdarbs „**R-fenibuta efekti neiropatisko sāpju modeļos *in vivo***” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: **Baiba Zvejniece** \_\_\_\_\_

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājas:

Dr.biol. **Līga Plakane** \_\_\_\_\_

Dr.pharm. **Baiba Švalbe** \_\_\_\_\_

Recenzents: Dr.med. **Baiba Jansone** \_\_\_\_\_

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē 16.05.2016.

Vecākā lietvede Juta Bārtule \_\_\_\_\_

Diplomdarbs aizstāvēts II līmeņa profesionālās augstākās izglītības studiju programmas „Ārstniecība” Valsts pārbaudījumu komisijas sēdē \_\_\_\_\_ 2016., prot. Nr.\_\_\_\_\_.

Komisijas sekretāre: \_\_\_\_\_

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)