

Edijs Vāvers

E1R: JAUNS POZITĪVS
ALLOSTĒRISKAIS SIGMA-1
RECEPTORA MODULATORS

Promocijas darba kopsavilkums
farmācijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2017

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā.

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. pharm. profesore **Maija Dambrova**,
Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas ķīmijas katedra,
Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas
laboratorijas vadītāja

Darba zinātniskā konsultante:

Dr. med. **Līga Zvejniece**,
Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas
laboratorijas vadošā pētniece

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. biol. profesore **Ruta Muceniece**,
Latvijas Universitāte
Dr. pharm. asociētā profesore **Dace Bandere**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
PhD **Monika Jūrgenson**,
Tartu Universitāte, Igaunija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2017. gada 14. decembrī plkst. 15.00
Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas promocijas padomes atklātā sēdē
Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
www.rsu.lv.

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. pharm. asociētā profesore **Dace Bandere**

SATURS

IEVADS	6
Darba mērķis.....	7
Darba uzdevumi.....	7
Darba hipotēze.....	7
Darba zinātniskā novitāte	7
1. METODES	9
1.1. Dzīvnieki	9
1.2. <i>In vitro</i> metodes.....	9
1.2.1. Radioligandu saistīšanās eksperimenti.....	9
1.2.2. Bradikinīna (BDK) izraisītie iekššūnas kalcija jonu koncentrācijas ([Ca ²⁺] _i) pieauguma mērījumi	10
1.2.3. Izolēto žurku sēklvadu modelis SigR aktivitātes novērtēšanai	11
1.3. Metodes <i>in vivo</i> : dzīvnieku uzvedības eksperimenti	11
1.3.1. Pasīvā nosacījuma refleksa (PNR) tests.....	11
1.3.2. Y-veida labirinta tests un skopolamīna izraisītie atmiņas traucējumi	12
1.3.3. Atklātā lauka tests	12
1.3.4. Muskuļu spēks un koordinācija.....	13
1.3.5. Ķīmisko konvulsantu izraisīti krampji	13
1.3.6. Sig1R selektīva antagonista NE-100 izraisīti krampji.....	14
1.4. Datu apstrādes statistiskās metodes.....	14
2. REZULTĀTI	16
2.1. <i>In vitro</i> skrīnings	16
2.2. E1R aktivitāte [³ H]-(+)-pentazocīna saistīšanās eksperimentā.....	19
2.3. E1R aktivitāte uz BDK-izraisītu [Ca ²⁺] _i pieaugumu NG108-15 šūnās..	20
2.4. E1R aktivitāte izolētu sēklvadu modeli	21
2.5. E1R aktivitāte PNR testā	23
2.6. E1R aktivitāte Y-veida labirinta testā.....	25
2.7. E1R ietekme uz kustību aktivitāti, muskuļu spēku un koordināciju.....	26
2.8. E1R aktivitāte PTZ un BIK izraisītajos krampju modeļos	26
2.9. E1R pretkrampju darbība ir saistīta ar Sig1R regulāciju	30
2.10. E1R aktivitāte pret NE-100 izraisītajiem krampjiem	31
3. DISKUSIJA	34
3.1. Allostēriskie Sig1R modulatori	34
3.2. Sig1R darbības modulēšana un atmiņas regulēšana	36
3.3. Sig1R ligandi un to pretkrampju aktivitāte.....	38
3.4. Sig1R allostēriskie modulatori: iespējamie molekulārie mehānismi.....	40
4. SECINĀJUMI	44
5. DARBA APROBĀCIJA – publikācijas un tēzes.....	45
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	49

SAĪSINĀJUMI

ANOVA – dispersiju analīze

ARRIVE – Dzīvnieku pētījumi: ziņošana par *in vivo* eksperimentiem (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*)

BDK – bradikinīns

BIK – (+)-bikukulīns

$[Ca^{2+}]_i$ – iekššūnas Ca^{2+} koncentrācija

CNS – centrālā nervu sistēma

DTG – 1,3-di(2-tolil)guanidīns

ED₅₀ – vidējā efektīvā deva

E1R – 2-(5S-metil-2-okso-4R-fenil-pirolidīn-1-il)-acetamīds

E1S – 2-(5S-metil-2-okso-4S-fenil-pirolidīn-1-il)-acetamīds

GASS – gamma-aminosviestskābe

HCK - holecistokinīns

HEK293 – cilvēka embrionālās nieru šūnas (*human embryonic kidney cells*)

IC₅₀ – puse no maksimālās inhibējošās koncentrācijas

i.p. – intraperitoneāli

i.v. – intravenozi

KGLP – kalcitonīna gēna līdzīgais peptīds

K_i – līdzsvara disociācijas konstante

LZL – laukums zem līknes

NE-100 – 4-Metoksi-3-(2-feniletoksi)-N,N-dipropilbenzēnetānamīna hidrohlorīds

NG108-15 – neiroblastomas-gliomas hibrīdšūnas

PDGF – trombocītu augšanas faktors

PNR – pasīvā nosacījuma reflekss

PAMs – pozitīvs allostēriskais modulators

PAMi – pozitīvi allostēriskie modulatori

PB-28 – 1-cikloheksil-4-[3-(1,2,3,4-tetrahydro-5-metoksi-1-naftalēnil)propil]piperazīna dihidrohlorīds

PRE-084 – 2-(4-Morfolīnetil)-1-fenilciklo-heksānkarboksilāta hidrohlorīds

PTZ – pentilēntetrazols

RFV – relatīvās fluorescences vienības

s.c. – subkutāna jeb zemādas ievadišana

S.E.M. – vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda

SigR – Sigma receptors

Sig1R – Sigma-1 receptors

Sig2R – Sigma-2 receptors

T1R – 2-(5R-metil-2-okso-4R-fenil-pirolidīn-1-il)-acetamīds

T1S – 2-(5R-metil-2-okso-4S-fenil-pirolidīn-1-il)-acetamīds

TNF – tumora nekrozes faktors

TRIS – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propāndiols

VIP – vazointestinālais peptīds

IEVADS

Sigma-1 receptors (Sig1R) ir proteīns, kas regulē ar G proteīnu saistīto receptoru, jonu kanālu un šūnas signālmolekulu funkcijas (*Chu un Ruoho*, 2016). Sig1R ir jauns zāļu mērķis, un tas tiek aktīvi pētīts, meklējot jaunas zāļu vielas neiroloģisko saslimšanu ārstēšanai. Šī čaperona proteīna darbība var tikt regulēta ar dažādu ligandu palīdzību, kas var būt gan agonisti, gan antagonisti. Vairākas klīnikā esošas zāles un arī jaunsintezēti savienojumi spēj mainīt Sig1R aktivitāti (*Cobos et al.*, 2008; *Su et al.*, 2010). Ir pierādīts, ka Sig1R ligandi var tikt pielietoti mācīšanās un atmiņas procesu, depresijas, nemiera, šizofrēnijas, sāpju, krampju regulācijā un atkarības kontrolē (*Banister un Kassiou*, 2012; *Cobos et al.*, 2008; *Maurice un Lockhart*, 1997; *Monnet un Maurice*, 2006). Bez agonistiem un antagonistiem ir zināmi arī Sig1R pozitīvi allosteriskie modulatori (PAMi), taču to darbība ir vismazāk pētīta, salīdzinot ar citiem Sig1R savienojumiem.

Sabiedrības novecošanās izraisītais kognitīvo traucējumu pieaugums pasaulē rada lielu interesi pēc jauniem atmiņu uzlabojošiem savienojumiem. Racetāma grupas savienojumi, kuri viens no otra atšķiras tikai ar aizvietotājiem pirolidīna heterociklā, jau kopš pagājušā gadsimta sešdesmito gadu sākuma tiek izmantoti galvas traumai, insulta, krampju un ar vecumu saistīto patoloģiju ārstēšanai, lai uzlabotu kognitīvās funkcijas, spēju koncentrēties un spēju uztvert informāciju (*Goulliaev un Senning*, 1994; *Gualtieri et al.*, 2002; *Malykh un Sadaie*, 2010; *Arroyo un Crawford*, 2003; *Klitgaard et al.*, 2016). Jaunu savienojumu izstrāde, balstoties uz pirolidīn-2-ona farmakoformu, ir perspektīvs virziens jaunu farmakoloģisko pielietojumu atklāšanai un racetāma grupas savienojumu efektivitātes uzlabošanai. Balstoties uz to, Latvijas Organiskās sintēzes institūtā tika sintezēts jauns piracetāma atvasinājums E1R.

Darba mērķis

Noskaidrot E1R farmakoloģisko aktivitāti un iespējamos molekulāros darbības mehānismus *in vitro* un *in vivo* eksperimentālajos modeļos.

Darba uzdevumi

1. Salīdzināt metilfenilpiracetāma stereoizomēru E1R, T1R, E1S un T1S aktivitāti.
2. Raksturot E1R saistīšanos pie Sig1R, izmantojot radioligandu saistīšanās eksperimentus.
3. Novērtēt E1R aktivitāti *in vitro* un *ex vivo* testos, izmantojot selektīvus Sig1R ligandus.
4. Pārbaudīt E1R aktivitāti ar atmiņu saistītos kognitīvo funkciju testos *in vivo*.
5. Pārbaudīt E1R aktivitāti ķīmisko konvulsantu izraisīto krampju modeļos *in vivo*.

Darba hipotēze

E1R ir praktiski izmantojams savienojums neurofarmakoloģijā.

Darba zinātniskā novitāte

Starptautiskajā receptoru klasifikatorā Sig1R tika iekļauts tikai 2013. gadā. Sig1R ir klasificēts kā neopioīdu receptors, kas lokalizējas iekšējās membrānās, un kam vēl līdz šim nav noskaidrots ar to saistītais signālceļš. Līdz ar to arī šī proteīna fizioloģiskā nozīme un molekulārie

darbības mehānismi līdz galam vēl nav noskaidroti. Ir zināms, ka allostērisko modulatoru izmantošana klīniskajā praksē spēj uzlabot esošo zāļu aktivitāti un mazināt to blakusparādības, tāpēc Sig1R allostēriskā modulēšana varētu būt perspektīvs virziens jaunu zāļu izstrādē. Bez E1R ir zināmi tikai daži savienojumi, kuri darbojas kā Sig1R PAMi. Promocijas darbā apkopotie rezultāti sniedz informāciju un datus par Sig1R PAMu farmakoloģisko aktivitāti, kā arī veicina vispārējo izpratni par Sig1R fizioloģisko funkciju un nozīmi. E1R ir savienojums ar atmiņu uzlabojošu un krampjus mazinošu darbību, un Sig1R PAMu izmantošana ir jauna pieeja traucētas kognitīvās funkcijas uzlabošanai un epilepsijas ārstēšanai.

1. METODES

1.1. Dzīvnieki

Dzīvnieki (peles un žurkas) tika turēti individuāli ventilējamos standarta sprostos, un tiem tika nodrošināti eksperimentālo dzīvnieku uzturēšanas standarta apstākļi (gaisa temperatūra 21–23 °C, relatīvais gaisa mitrums $65 \pm 10\%$, 12 stundu gaismas-tumsas cikls). Barībai izmantoja standartizēto diētu (Lactamin AB, *Mjölby*, Zviedrija). Barība un dzeramais ūdens bija pieejami bez ierobežojuma. Visas eksperimentālās procedūras ar laboratorijas dzīvniekiem tika veiktas saskaņā ar Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU, kā arī tās tika saskaņotas ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi. Ziņošana par *in vivo* eksperimentiem tika veikta pēc ARRIVE vadlīnijām (*Kilkenny et al.*, 2010; *McGrath et al.*, 2010).

1.2. *In vitro* metodes

1.2.1. Radioligandu saistīšanās eksperimenti

E1R aktivitāte tika pārbaudīta 77 dažādos radioligandu saistīšanās eksperimentos kompānijas CEREP (Puatjē, Francija) piedāvātajā skrīninga panelī, lai noskaidrotu E1R darbību uz dažādiem receptoriem un jonu kanāliem (receptori un jonu kanāli, uz kuriem tika pārbaudīta E1R aktivitāte, ir parādīti rezultātu sadaļā).

Lai noteiktu E1R saistīšanos pie Sig1R, tika veikti selektīva Sig1R agonista [^3H]-(+)-pentazocīna saistīšanās eksperimenti. Sinaptosomas saistīšanās eksperimentiem tika izdalītas no *Wistar* līnijas žurku tēviņu smadzeņu audiem. Inkubācijas maisījums sastāvēja no 60 μL inkubācijas

buferšķīduma (sastāvs: 50 mM TRIS-HCl, pH 7,4), 100 µL izdalītā proteīna parauga, 20 µL pārbaudāmā savienojuma vai inkubācijas buferšķīduma kontrolei, un 20 µL [³H]-(+)-pentazocīna. Paraugi tika inkubēti 150 min 30 °C temperatūrā 96 lauciņu platītē uz platīšu maisītāja. Nespecifiskās saistīšanās noteikšanai izmantoja haloperidolu 10 µM koncentrācijā. Vielas saistīšanās pārbaudei eksperimenti tika veikti paralēli vismaz 3 atkārtojumos. Saistītā un brīvā [³H]-(+)-pentazocīna atdalīšanai izmantoja vakuuma filtrēšanu, lietojot *Millipore GF/B* filtrpapīrus (*Merck Millipore*, Billerica, Masačūsetsas štats, ASV). Radioaktivitātes mērīšanai izmantoja šķīduma scintilācijas skaitītāju *Wallac MicroBeta TriLux* (*PerkinElmer*, *Waltham*, Masačūsetsas štats, ASV).

1.2.2. Bradikinīna (BDK) izraisītie iekššūnas kalcija jonu koncentrācijas ($[Ca^{2+}]_i$) pieauguma mērījumi

Lai novērtētu E1R mijiedarbību ar selektīviem Sig1R ligandiem, tika izmantots BDK izraisītais $[Ca^{2+}]_i$ pieauguma modelis. $[Ca^{2+}]_i$ izmaiņas tika noteiktas, izmantojot komerciāli pieejamo *Fluo-4 NW* kitu (*Invitrogen*, Stokholma, Zviedrija). Neuroblastomas-gliomas hibrīdšūnas (NG108–15) tika inkubētas 15 min istabas temperatūrā kopā ar 10 µM E1R, 2 µM PRE-084 vai šo abu savienojumu kombināciju. Dejonizētu, destilētu ūdeni izmantoja kā kontroli. Lai veicinātu $[Ca^{2+}]_i$ pieaugumu, pievienoja BDK 1 µM koncentrācijā. Lai noteiktu $[Ca^{2+}]_i$ izmaiņu, mērīja fluorescenci pie 516 nm, kas tika ierosināta ar 494 nm lāzeru, lietojot *Fluoroskan Ascent* mikroplašu fluorimetru (*Thermo Labsystems*, Helsinki, Somija). 40 µM NE–100 tika pievienots, lai novērtētu $[Ca^{2+}]_i$ izmaiņas saistību ar Sig1R darbības regulāciju. NE–100 tika inkubēts kopā ar šūnām 40 min pirms BDK pievienošanas. Dati ir aprēķināti kā relatīvās fluorescences vienības (RFV), kas izteiktas pret kopējo šūnas proteīna daudzumu. Metode detalizētāk ir aprakstīta II publikācijā.

1.2.3. Izolēto žurku sēklvadu modelis SigR aktivitātes novērtēšanai

Izolētos sēklvadus inkubēja orgānu vannā, kurā tika iepildīts ar karbogēnu (95 % CO₂; 5 % O₂) piesātināts Krebsa-Henseleita buferšķīdums, un eksperimentālajā sistēmā tika uzturēta 32 °C temperatūra (Pubill *et al.*, 1998). Sēklvadi pamazām tika iestiepti līdz 1 g pasīvajam iestiepumam. Pēc 60 min adaptācijas perioda izolētos sēklvadus sāka stimulēt ar strāvu (strāvas frekvence 0,1 Hz; strāvas impulsa ilgums 1 ms; strāvas spriegums 50 V). Kad elektriskās strāvas izraisītās kontrakcijas amplitūda nostabilizējās, koncentrācijās no 1 līdz 100 μM tika pievienots Sig1R agonists PRE-084. E1R, T1R, E1S un T1S aktivitāte tika pārbaudīta 10 μM koncentrācijā, un savienojumi tika pievienoti 10 min pirms PRE-084. PRE-084 izraisītā elektriski stimulēta sēklvada kontrakciju pastiprināšanās tika izteikta procentos no kontroles kontrakciju līmeņa (kontrakciju amplitūda pirms PRE-084 pievienošanas). Savienojums PB-28 (no 1 līdz 10 μM) tika izmantots, lai novērtētu E1R darbību uz Sigma-2 receptori (Sig2R), izmantojot tos pašus eksperimentālos apstākļus, kas tika lietoti PRE-084 gadījumā.

1.3. Metodes *in vivo*: dzīvnieku uzvedības eksperimenti

1.3.1. Pasīvā nosacījuma refleksa (PNR) tests

PNR testu izmantoja, lai novērtētu E1R ietekmi uz kontekstuālo atmiņu (II publikācija). Ierīce (*Passive avoidance Controller*, modelis A775 (Ugo Basile, Itālija)) PNR izpētei bija veidota no divām savstarpēji savienotām kamerām, kur viena bija apgaismota, bet otra bija tumša. Eksperiments tika veikts 2 dienas. Pirmajā dienā dzīvnieku ievietoja izgaismotajā kamerā, kurā pēc 60 s automātiski atvērās durvis, ļaujot dzīvniekam iekļūt tumšajā kamerā. Dzīvniekam ieejot tumšajā kamerā, durvis starp kamerām automātiski

noslēdzās, un dzīvnieks 3 s saņēma 0,1 mA strāvas kairinājumu, tādējādi nodrošinot nosacījuma refleksa veidošanos. Nākamajā dienā dzīvnieku ievietoja gaišajā kamerā un novēroja līdz 540 s, reģistrējot laiku, kad dzīvnieks iegāja tumšajā kamerā.

Lai radītu kontekstuālās atmiņas traucējumus, 40 min pirms eksperimenta sākuma pelēm subkutāni (s.c.) tika injicēts skopolamīns devā 0,3 mg/kg. Traucētas atmiņas modelī PNR testā strāvas kairinājums 3 s laikā bija 0,4 mA.

1.3.2. Y-veida labirinta tests un skopolamīna izraisītie atmiņas traucējumi

Y-veida labirinta tests tika izmantots, lai novērtētu E1R ietekmi uz darbības atmiņu. Tests tika veikts, izmantojot melnu Y formas telpisku un simetriski (120° leņķī) izveidotu koka labirintu ar trim ejām (ejas garums: 40 cm, platums: 11 cm, augstums: 28 cm). Dzīvnieku ievietoja vienā no labirinta ejas sākuma daļām un novēroja 5 min, reģistrējot ieiešanas skaitu un secību labirinta ejās. Pareizi izvēlēta ejas maiņa tika definēta un aprēķināta procentuāli kā secīga ieiešana visās trīs ejās bez atkātošanās: pareizi izvēlētais eju skaits / (kopējais ieiešanas skaits ejās – 2) x 100 %.

Lai radītu atmiņas un mācīšanās traucējumus, 40 min pirms eksperimenta sākuma pelēm s.c. ievadīja skopolamīnu devā 0,5 mg/kg.

1.3.3. Atklātā lauka tests

Lai novērtētu E1R ietekmi uz lokomotoro jeb kustību aktivitāti, tika izmantots atklātā lauka tests. Dzīvnieku ievietoja atklātā lauka (45 x 45 cm) centrā un ar videokameru reģistrēja tā uzvedību. Ar videoreģistrēšanas programmas *EthoVison* (3.1. versija, *Noldus*, Vāgeningena, Nīderlande)

palīdzību noteica dzīvnieka noieta ceļa garumu (cm/4 min) un ātrumu (cm/s). Dzīvnieku aktivitāte tika novērtēta 30, 60, 120, 180 un 240 min pēc savienojuma ievadīšanas.

1.3.4. Muskuļu spēks un koordinācija

Rotējošais stienis (modelis 7600, *Ugo Basile*, Comerio, Itālija) tika izmantots, lai novērtētu dzīvnieku kustību funkciju un muskuļu spēku pēc savienojumu ievadīšanas. Dzīvnieki tika apmācīti dienu pirms eksperimenta veikšanas. Eksperimenta dienā dzīvniekus novietoja uz rotējošā stieņa (16 apgriezieni minūtē) un reģistrēja laiku, cik ilgi dzīvnieks spēja noturēties uz stieņa. Maksimālais novērošanas laiks bija 180 s.

E1R ietekmi uz kustību koordināciju pārbaudīja arī cilindra testā. Šajā testā novērtēja dzīvnieka spēju atpakaļgaitā uzrāpties pa 30 cm garu organiskā stikla cilindru (cilindra iekšējais diametrs: 3 cm). Tests tika uzskatīts par veiksmīgi izpildītu, ja dzīvnieks 30 s laikā spēja uzrāpties līdz 20 cm atzīmei.

Savienojuma ietekme uz muskuļu spēku tika pārbaudīta priekšķepu trakcijas testā. Dzīvnieku ar priekšējām ķepām pielika pie horizontāla metāliska stieņa, kura diametrs bija 2 mm. Kontroles dzīvnieki 5 s laikā spēja pieķerties pie metāla stieņa ar visām četrām ķepām. Nespēja izpildīt šo uzdevumu tika novērtēta kā savienojuma negatīva ietekme uz muskuļu spēku.

E1R tika pārbaudīts 30, 60, 120, 180 un 240 min pēc savienojuma intraperitoneālas (i.p.) injicēšanas.

1.3.5. Ķīmisko konvulsantu izraisīti krampji

Lai pētītu E1R anti-konvulsīvo jeb pretkrampju darbību, tika izmantota ķīmisko konvulsantu pentilēntetrazola (PTZ) (*Loscher et al.*, 1991; *Mandhane*

et al., 2007) un gamma-aminosviestkābes (GASS)-A receptora konkurējošā inhibitora (+)-bikukulīna (BIK) (Meldrum, 1975) intravenozā (i.v.) injicēšanas metode. Injicējot konvulsantus (1 % PTZ un 0,01 % BIK) peļu astes vēnā ar konstantu ātrumu 20 μ l/2 s, tika reģistrēti kloniskie un toniskie krampji. Kā krampju sliedzē rādītājs tika noteikta ķīmisko konvulsantu minimālā deva (mg/kg), kas nepieciešama, lai izraisītu kloniskos un toniskos krampjus.

1.3.6. Sig1R selektīva antagonista NE-100 izraisīti krampji

NE-100 izraisīja krampjus dzīvniekiem pēc i.p. injicēšanas (devā 75 mg/kg krampjus novēroja 100 % gadījumu). E1R vai izotoniskais 0,9 % NaCl šķīdums (kontrolei) tika injicēts i.p. 30 min pirms NE-100. Pēc NE-100 injicēšanas, dzīvniekus ievietoja caurspīdīgā kastē (40 x 25 x 15 cm) un 25 min to uzvedību filmēja ar augstas izšķirtspējas digitālo videokameru (*Handycam HDR-CX11E*, Sony Corporation, Tokija, Japāna). Dzīvnieku atbildi un uzvedību novērtēja punktos, balstoties uz iepriekš publicētu krampju novērtēšanas skalu (*Lüttjohann et al.*, 2009). Dzīvnieku uzvedība tika analizēta, izmantojot videofailus, kas detalizētāk ir aprakstīti IV publikācijā.

1.4. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datus izteica kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda (S.E.M.). Loģistiskās regresijas analīzi izmantoja, lai noteiktu pusi no maksimālās inhibējošās koncentrācijas (IC_{50}) pārbaudītajiem savienojumiem [3H](+)-pentazocīna saistīšanās eksperimentā. Vidējās efektīvās devas (ED_{50}) noteikšanai, izvērtējot E1R ietekmi uz muskuļu spēku un koordināciju, izmantoja *Probit* analīzi. Grupu salīdzināšanai tika izmantots Stjūdenta t-tests vai atbilstošā dispersijas analīze (ANOVA) ar sekojošu

pēctestu (Tūkija, Bonferoni, Nūmana-Koila vai Manna-Vitnija U-testu), kas norādīts pie attiecīgo rezultātu apkopojuma grafikos. P vērtība mazāka par 0,05 tika uzskatīta par statistiski ticamu. Statistiskiem aprēķiniem izmantoja *Prism* 3.0 programmnodrošinājumu (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornijas štats, ASV*).

2. REZULTĀTI

2.1. *In vitro* skrīnings (II publikācija)

Kompānijā CEREP tika veikta plaša iespējamo mērķproteīnu pārbaude, kas varētu norādīt uz iespējamo E1R darbības mehānismu un tā farmakoloģisko aktivitāti. E1R neuzrādīja aktivitāti pret nevienu ar G-proteīnu saistīto receptoru, jonu kanālu vai transportproteīnu (2.1. tabula).

2.1. tabula

E1R aktivitāte vairākos *in vitro* saistīšanās eksperimentos (CEREP)

Receptori / jonu kanāli	Inhibīcija 10 μ M E1R, %	Standartviela	IC ₅₀ , nM
Adenožīna A ₁	2	dipropilciklopentilksantīns	0,87
Adenožīna A _{2A}	-16	5'-N- etilkarboksamidoadenožīns	10
Adrenerģiskie α_1	-5	prazosīns	0,17
Adrenerģiskie α_2	-4	johimbīns	36
Adrenerģiskie α_1	-5	atenolols	230
Adrenerģiskie α_2	-2	ICI-118551	0,5
Angiotenzīna AT ₁	-14	saralazīns	0,6
Angiotenzīna AT ₂	-5	angiotenzīns	0,13
Benzodiazepīna (centrālie)	-18	diazepāms	110
Benzodiazepīna(perifērie)	3	PK-11195	1,1
Bombezīna BB	-5	bombezīns	0,22
BDK B ₂	3	NPC-567	10
Dopamīna D ₁	-6	SCH-23390	0,22
Dopamīna D _{2S}	5	(+)-butaklamols	1,4
Dopamīna D ₃	7	(+)-butaklamols	1,2
Dopamīna D ₄	-3	klozapīns	32
Dopamīna D ₅	-3	SCH-23390	0,15
Endotelīna ET _A	-2	endotelīns	0,11
Endotelīna ET _B	2	endotelīns	0,04

Receptori / jonu kanāli	Inhibīcija 10 μ M E1R, %	Standartviela	IC ₅₀ , nM
Fenciklidīna	6	MK-801	6,0
GASS (neselektīvs)	13	GASS	73
Galanīna GAL ₁	-2	galanīns	0,16
Galanīna GAL ₂	-4	galanīns	0,8
Glikokortikoīdu	-11	deksametazons	2,5
Hemokīna CXCR2	2	interleikīns-8	0,04
Hemokīna CCR1	-5	makrofāgu iekaisuma proteīns-1	0,08
Histamīna H ₁	-7	pirilamīns	0,82
Histamīna H ₂	-12	cimetidīns	270
Holecistokinīna (HCK) ₁	9	HCK-8	0,2
Holecistokinīna HCK ₂	8	HCK-8	0,26
Kalcitonīna gēna līdzīgā peptīda (KGLP)	1	cilvēka KGLP	0,04
Kanabinoīdu KB ₁	-3	CP-55940	0,21
Melanokortīna MK ₄	4	afamelanotīds	0,2
Melatonīna MT ₁ (ML _{1A})	-6	melatonīns	0,53
Muskarīniskie M ₁	-4	pirenzepīns	27
Muskarīniskie M ₃	-7	4-DAMP	0,43
Muskarīniskie M ₄	-3	4-DAMP	0,83
Muskarīniskie M ₅	-12	4-DAMP	0,80
Neirokinīna NK ₁	-11	substance P	0,24
Neirokinīna NK ₂	-3	Neirokinīna agonists [Nleu 10]-NKA (4-10)	2,5
Neirokinīna NK ₃	-7	SB-222200	8,8
Neuropeptīda Y Y ₁	-15	neuropeptīds Y	0,07
Neuropeptīda Y Y ₂	-18	neuropeptīds Y	0,09
Neirotenzīna NTZ ₁	-3	neirotenzīns	0,24
Nociceptīna	4	nociceptīns	0,29
Opioidu δ	-4	enkefalīns	1,9
Opioidu κ	-5	U-50488	0,84

Receptori / jonu kanāli	Inhibīcija 10 μ M E1R, %	Standartviela	IC ₅₀ , nM
Opioīdu μ	-7	DAMGO	0,74
Peroksisomu proliferāciju aktivējošie gamma	-9	rosiglitazons	12
Prostaglandīna EP ₂	-13	prostaglandīns E2	2,2
Prostaglandīna I ₂	-19	iloprosts	13
Purīnerģiskie P2X	6	α,β -metilēnadenozīn-5'- trifosfāts	3,5
Purīnerģiskie P2Y	-4	2'-deoksiaidenozīna-5'-O- (1-tiotrifosfāts)	25
Serotonīna 5-HT _{1A}	-4	8-hidroksi-2- (dipropilamino)tetralīns	0,51
Serotonīna 5-HT _{1B}	0	serotonīns	12
Serotonīna 5-HT _{2A}	5	ketanserīns	0,77
Serotonīna 5-HT _{2B}	-11	2,5-dimetoksi-4- jodoamfetamīns	3,2
Serotonīna 5-HT _{2C}	-2	RS-102221	5,5
Serotonīna 5-HT ₃	-1	MDL-72222	4,9
Serotonīna 5-HT _{5a}	-11	serotonīns	280
Serotonīna 5-HT ₆	-10	serotonīns	180
Serotonīna 5-HT ₇	-4	serotonīns	0,49
SigR	-38	haloperidols	43
Somatostatīna sst	-5	somatostatīns-14	0,14
Trombocītu augšanas faktora (PDGF)	-6	glikoproteīns PDGF-BB	0,05
Tumora nekrozes faktora (TNF) α	-3	TNF α	0,26
Vazoaktīvā intestinālā peptīda ₁	-2	adenilāteiklāzi aktivējošais peptīds 1-38	0,05
Vazointestinālā peptīda-1 (VIP-1)	-11	vazointestinālais peptīds	0,12
Vazopresīna I _a	2	vazopresīns	1,9
Ca ²⁺ kanāli (L-tipa)	-1	metoksiverapamils	20
K _V	-2	α -dendrotoksīns	0,29
SK _{Ca} kanāli	-18	apamīns	0,03

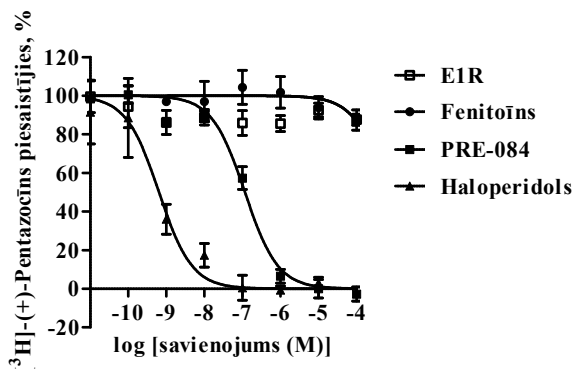
Receptori / jonu kanāli	Inhibīcija 10 μ M E1R, %	Standartviela	IC ₅₀ , nM
Na ⁺ kanāli	5	veratridīns	7700
Cl ⁻ kanāli (GASS regulētais)	-3	pikrotoksīns	250
Norepinefrīna transporteris	-17	protriptilīns	2,5
Dopamīna transporteris	4	BTCP	2,6
Serotonīna 5-HT transporteris	5	imipramīns	2,0

Rezultāti parāda kontroles savienojuma specifiskās saistīšanās kavēšanu pie attiecīgā proteīna (vidējās vērtības; n = 2).

Vienīgais proteīns, pret kuru E1R uzrādīja aktivitāti (radioliganda saistīšanās kavēšana vai veicināšana vairāk nekā par 20 %), bija SigR. E1R 10 μ M koncentrācijā par 38 % uzlaboja neselektīva SigR agonista [³H]-1,3-di(2-tolil)guanidīna (DTG) piesaistīšanos pie SigR. Tajā pašā eksperimentā, kas tika veikts Jurkat (T-limfocītu šūnu līnija) šūnās, SigR antagonists haloperidols kavēja radioliganda piesaistīšanos (IC₅₀ = 43 nM; 2.1. tabula).

2.2. E1R aktivitāte [³H]-(+)-pentazocīna saistīšanās eksperimentā (II publikācija)

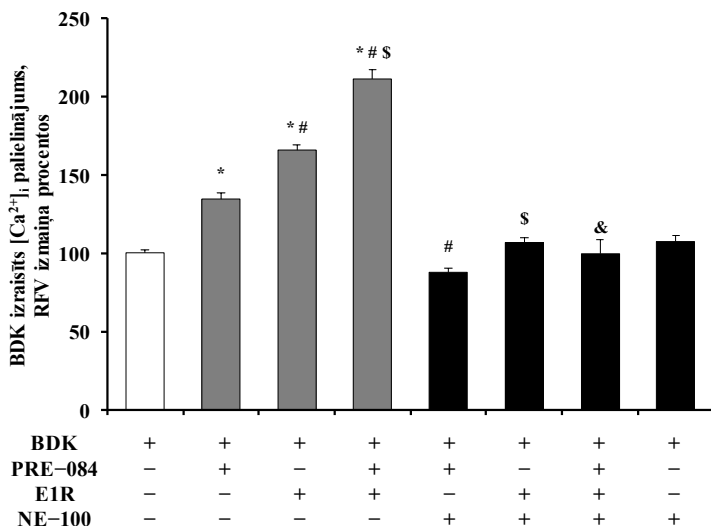
Balstoties uz skrīningā iegūtajiem rezultātiem, E1R aktivitāte tika pārbaudīta selektīva Sig1R agonista [³H]-(+)-pentazocīna saistīšanās eksperimentā. Selektīvs Sig1R agonists PRE-084 (IC₅₀ = 192 nM) un neselektīvs SigR antagonists haloperidols (IC₅₀ = 0,5 nM) spēja izkonkurēt [³H]-(+)-pentazocīnu no tā saistīšanās vietas. E1R nespēja izmainīt iezīmētā pentazocīna piesaistīšanos pie Sig1R (2.1. attēls). Jāatzīmē ir tas, ka arī fenitoīns, kas ir Sig1R PAMs, neietekmēja [³H]-(+)-pentazocīna saistīšanos (2.1. attēls).



2.1. attēls. **E1R un Sig1R ligandu ietekme uz $[^3\text{H}]$ -(+)-pentazocīna saistīšanos**
Sinaptosomas, kas iegūtas no žurku smadzeņu audiem, un pētāmie savienojumi tika inkubēti 150 min kopā ar 1,5 nM $[^3\text{H}]$ -(+)-pentazocīnu 30 °C temperatūrā. Haloperidols (10 μM) tika izmantots, lai novērtētu nespecifisko saistīšanos. Saistīšanās noteikšanai vielas eksperimentā tika pārbaudītas vismaz 3 paralēlos atkārtojumos.

2.3. E1R aktivitāte uz BDK-izraisītu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pieaugumu NG108–15 šūnās (II publikācija)

10 μM E1R un 2 μM selektīvs Sig1R agonists PRE–084 attiecīgi par $66 \pm 3 \%$ un $34 \pm 4 \%$ statistiski ticami palielināja BDK izraisīto $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pieaugumu NG108–15 šūnās. (2.2. attēls). E1R izteikti palielināja PRE–084 aktivitāti šajā eksperimentā. Abu savienojumu kombinācija BDK izraisīto $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pieaugumu palielināja par $212 \pm 6 \%$. E1R, PRE–084, kā arī abu savienojumu vienlaicīgi izraisītie efekti tika bloķēti ar 40 μM selektīvu Sig1R antagonistu NE–100 (2.2. attēls). NE–100 neietekmēja BDK izraisīto $[\text{Ca}^{2+}]_i$ izmaiņu.



2.2. attēls. Sig1R ligandu un to kombināciju ietekme uz 1 μ M BDK izraisītu $[Ca^{2+}]_i$ palielinājumu NG108-15 šūnās

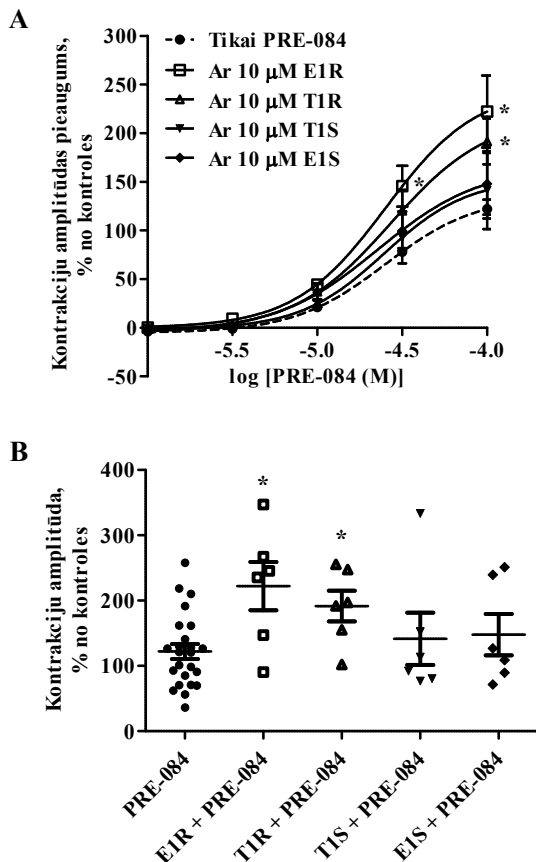
Šūnas tika inkubētas kopā ar 10 μ M E1R, 2 μ M PRE-084 vai abu kombināciju 15 min. 40 μ M NE-100 tika pievienots šūnām 20 min pirms mērījumu uzsākšanas jeb 5 min pirms pārbaudāmo savienojumu pievienošanas. Katrā kolonnā ir attēlotas vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 6-14$). * $P < 0,05$ pret BDK, # $P < 0,05$ pret PRE-084, \$ $P < 0,05$ pret E1R, & $P < 0,05$ pret E1R un PRE-084 kombināciju (Tūkija tests).

2.4. E1R aktivitāte izolētu sēklvadu modelī (I un II publikācija)

E1R un pārējo metilfenilpiracetāma stereoizomēru T1R, E1S un T1S SigR PAM aktivitāte tika pārbaudīta izolētu sēklvadu modelī. Neviens no stereoizomēriem neizmainīja sēklvadu kontrakciju amplitūdu. Sig1R agonists PRE-084 devas atkarīgi palielināja sēklvadu kontrakciju amplitūdu. 100 μ M koncentrācijā PRE-084 palielināja kontrakciju amplitūdu par 122 ± 11 % (2.3.A attēls). E1R, T1R, E1S un T1S spēja pastiprināt PRE-084 efektu, ja izolētie orgāni tika inkubēti ar attiecīgo stereoizomēru 10 min pirms PRE-084 pievienošanas (2.3.A un 2.3.B attēli). Salīdzinot ar pārējiem stereoizomēriem,

E1R uzrādīja vislielāko Sig1R PAM aktivitāti (2.3.A un 2.3.B attēli). E1R vairāk nekā divas reizes uzlaboja PRE-084 efektivitāti.

Sig2R agonists PB-28 arī spēja palielināt elektriskās strāvas izraisītu izolētu sēklvadu kontrakciju amplitūdu, taču E1R neietekmēja PB-28 aktivitāti (rezultāti nav parādīti; II publikācija).



2.3. attēls. Sig1R PAM aktivitātes pārbaude izolētu sēklvadu modeli

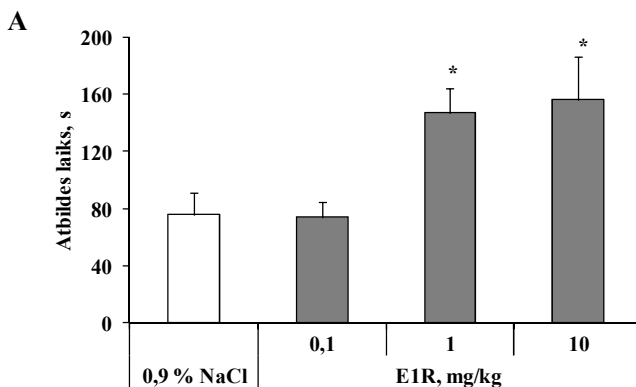
(A) E1R, T1R, T1S un E1S pastiprina Sig1R agonista PRE-084 aktivitāti.

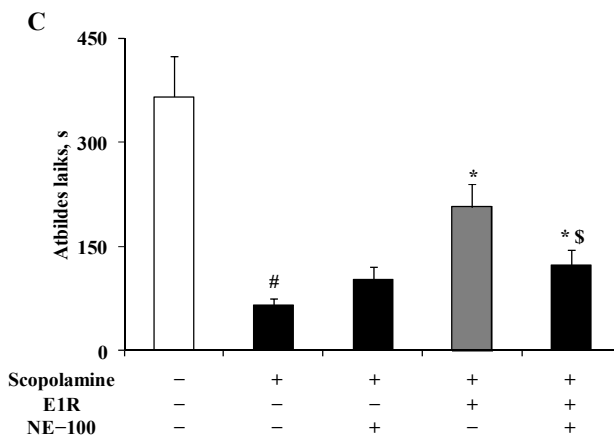
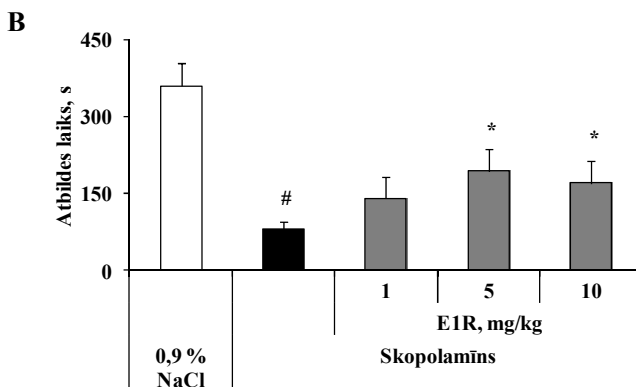
(B) Salīdzinājums starp metilfenilpiracetāma stereoizomēru PAM efektivitāti, izmantojot 100 μM PRE-084 koncentrāciju. Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M. (n = 6–24). * $P < 0,05$ pret PRE-084 (Bonferoni tests).

2.5. E1R aktivitāte PNR testā (II publikācija)

Lai novērtētu E1R atmiņu uzlabojošo aktivitāti, tika izmantots PNR tests. Pēc 3 s ilga 0,1 mA strāvas kairinājuma, ieiešanas laiks tumšajā kambarī kontroles grupas dzīvniekiem bija 76 ± 16 s. Kā redzams 2.4.A attēlā, E1R, ievadīts devās 1 un 10 mg/kg, pagarināja atbildes laiku atbilstoši par 194 % un 211 %, salīdzinot ar kontroles grupu. E1R devas atkarīgi uzlaboja atmiņas funkciju.

PNR tests tika izmantots, lai pārbaudītu E1R efektivitāti arī skopolamīna izraisītā traucētas atmiņas testā. Kontroles grupas dzīvnieku ieiešanas laiks tumšajā kambarī bija 360 ± 45 s (2.4.B attēls). Skopolamīna injicēšana izteikti samazināja ieiešanas laiku par 77 % (2.4.B attēls). E1R, ievadīts devās 5 un 10 mg/kg, aizkavēja skopolamīna radītos atmiņas traucējumus un pagarināja ieiešanas laiku attiecīgi par 137 % un 109 % (2.4.B attēls). E1R efekts tika kavēts, ja dzīvniekiem pirms E1R injicēja Sig1R antagonistu NE-100 (2.4.C attēls).





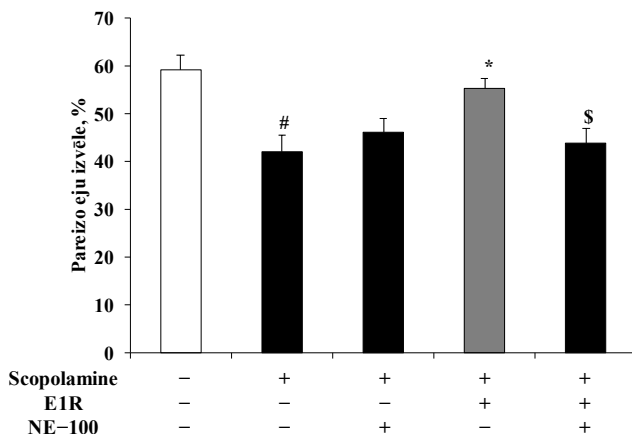
2.4. attēls **E1R atmiņu uzlabojošā darbība PNR testā**

E1R tika injicēts 60 min pirms eksperimenta veikšanas. 40 min pirms eksperimenta veikšanas jeb 20 min pēc E1R ievadīšanas, s.c. tika injicēts skopolamīns devā 0,3 mg/kg.

Rezultāti grafikos attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. (A) E1R devas atkarīgie efekti PNR testā ($n = 15-18$). $*P < 0,05$ pret kontroles grupu (Nūmana-Koila tests). (B) E1R aktivitāte skopolamīna izraisīto atmiņas traucējumu modelī ($n = 17-20$). $^{\#}P < 0,05$ skopolamīns pret kontroles grupu, $*P < 0,05$ pret skopolamīnu (Manna-Vitnija U-testu). (C) E1R (5 mg/kg) efekts tiek kavēts ar Sig1R antagonistu NE-100 (2 mg/kg) ($n = 20-25$). $^{\#}P < 0,05$ skopolamīns pret kontroles grupu, $*P < 0,05$ pret skopolamīnu, $^{\$}P < 0,05$ pret E1R (Manna-Vitnija U-tests).

2.6. E1R aktivitāte Y-veida labirinta testā (II publikācija)

Y-veida labirinta tests tika izmantots, lai novērtētu E1R efektivitāti pret skopolamīna izraisītajiem darbības atmiņas traucējumiem. Kontroles grupā Y-veida labirinta pareizā ejas izvēle bija 59 ± 3 %. Skopolamīna gadījumā pareizi izvēlētas ejas biežums samazinājās un bija 42 ± 3 % (2.5. attēls). Kā redzams 2.5. attēlā, E1R, injicēts devā 10 mg/kg, spēja novērst skopolamīna radītos darbības atmiņas traucējumus. Savukārt Sig1R antagonists NE-100 kavēja E1R atmiņu uzlabojošo darbību (2.5. attēls).

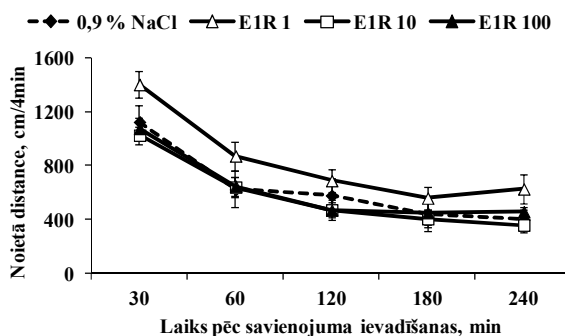


2.5. attēls. E1R efektivitāte pret skopolamīna izraisītajiem darbības atmiņas traucējumiem Y-veida labirinta testā

E1R (10 mg/kg, i.p.) tika injicēts 60 min pirms eksperimenta. 40 min pirms eksperimenta jeb 20 min pēc E1R, s.c. tika injicēts skopolamīns devā 0,5 mg/kg. E1R efekts tika bloķēts ar NE-100 (2 mg/kg), kas tika injicēts 20 min pirms E1R jeb 80 min pirms eksperimenta. Rezultāti grafikos attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 14-16$). [#] $P < 0,05$ skopolamīns pret kontroles grupu, ^{*} $P < 0,05$ pret skopolamīnu un [§] $P < 0,05$ pret E1R (Nūmana-Koila tests).

2.7. E1R ietekme uz kustību aktivitāti, muskuļu spēku un koordināciju (II publikācija)

Atklātā lauka testā tika novērtēta E1R ietekme uz kopējo dzīvnieku kustību aktivitāti pēc savienojuma vienreizējas injicēšanas. E1R devā līdz 100 mg/kg neietekmēja dzīvnieku kustību aktivitāti, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem (2.6. attēls). E1R ietekmi uz muskuļu spēku un koordināciju novēroja augstās devās, attiecīgi ED_{50} (ED_{16} – ED_{84}) mg/kg = 453 (398–516) rotējošā stieņa, 349 (199–611) cilindra un 595 (409–866) priekšķepu traksijas testā.



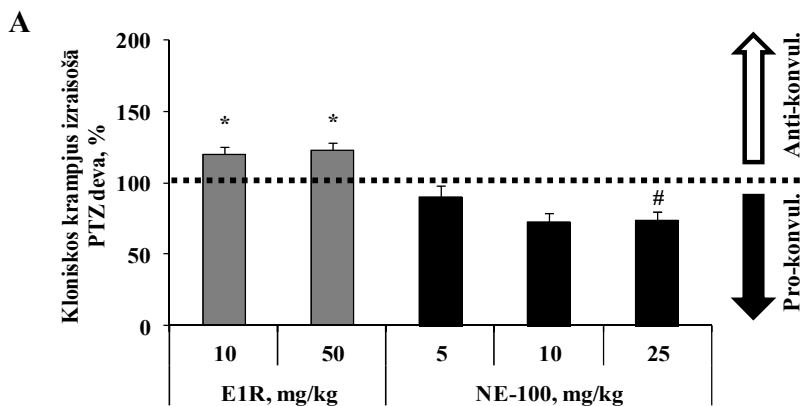
2.6. attēls. E1R ietekme uz noieto distanci atklātā lauka testā

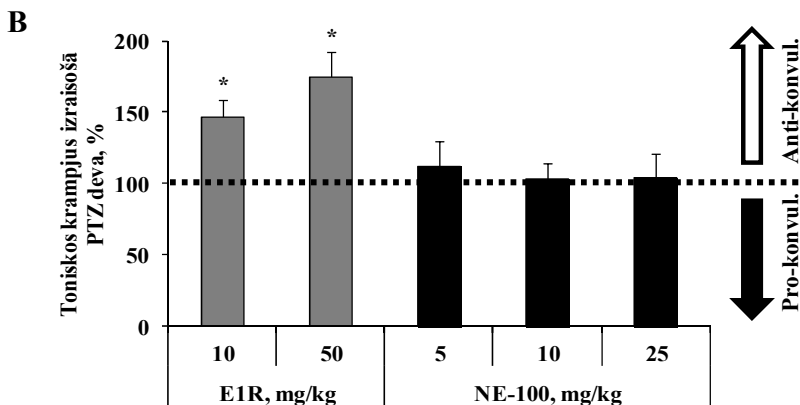
E1R tika pārbaudīts devās 1, 10 un 100 mg/kg (i.p.). Kopējo kustību aktivitāti pelēm novērtēja 30, 60, 120, 180 un 240 min pēc E1R injicēšanas. Rezultāti grafikā attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 10$).

2.8. E1R aktivitāte PTZ un BIK izraisītajos krampju modeļos (IV publikācija)

1 % PTZ i.v. infuzēšana devā 24 ± 1 mg/kg dzīvniekiem izraisīja kloniskos krampjus un devā 67 ± 8 mg/kg – toniskos krampjus. Lai novērtētu Sig1R ligandu pretkrampju aktivitāti šajā modelī, tie tika injicēti 60 min pirms PTZ infuzēšanas. E1R uzrādīja devas atkarīgu pretkrampju efektu PTZ izraisīto

krampju modeli (2.7. attēls). Devā 10 mg/kg E1R par 20 % paaugstināja klonisko krampju rašanās sliekšni, bet tonisko krampju sliekšni E1R paaugstināja par 47 % (2.7.A un 2.7.B attēli). Devā 50 mg/kg novēroja vēl izteiktāku E1R pretkrampju darbību. Injicēts devā 50 mg/kg, E1R par 23 % un 75 % spēja paaugstināt attiecīgi klonisko un tonisko krampju rašanās sliekšni (2.7.A un 2.7.B attēli). Sig1R antagonists NE-100, injicēts devā 5 mg/kg, neietekmēja PTZ izraisītos kloniskos un toniskos krampjus. Devā 10 mg/kg NE-100 pazemināja klonisko krampju rašanās sliekšni, savukārt devā 25 mg/kg savienojums uzrādīja ticamu PTZ aktivitāti veicinošu iedarbību, tas rezultējās ar zemāku PTZ devu, kas bija nepieciešama, lai izraisītu krampjus (2.7.A attēls). Jaatzīmē, ka NE-100 neietekmēja PTZ izraisīto tonisko krampju sliekšni (2.7.B attēls). Sig1R agonists PRE-084 līdz pat devai 50 mg/kg neietekmēja PTZ izraisītos krampjus (dati nav parādīti; IV publikācija).

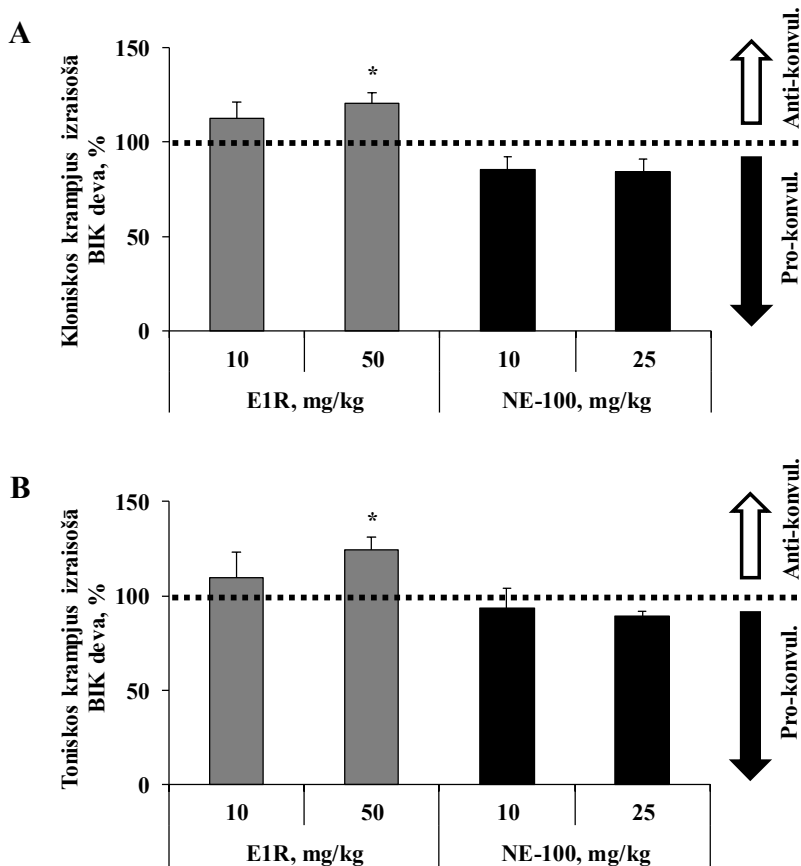




2.7. attēls. E1R pretkrampju aktivitāte PTZ izraisīto krampju modelī

Raustītā līnija grafikos atspoguļo PTZ izraisīto krampju rašanās sliekšni kontroles grupā (tas atbilst 100 %). (A) Sig1R ligandu aktivitāte pret PTZ izraisītajiem kloniskajiem krampjiem. (B) Sig1R ligandu aktivitāte pret PTZ izraisītajiem toniskajiem krampjiem. Savienojumi tika injicēti 60 min pirms PTZ infuzēšanas. Rezultāti grafikos attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 8-10$). * $P < 0,05$ pret kontroles grupu, # $P = 0,05$ pret kontroles grupu (Stjūdenta t-tests).

E1R pretkrampju darbība tika pārbaudīta arī BIK izraisīto krampju modelī. BIK devā $0,49 \pm 0,06$ mg/kg izraisīja kloniskos krampjus un devā $0,96 \pm 0,15$ mg/kg - toniskos krampjus. E1R devā 50 mg/kg kavēja BIK izraisītos kloniskos un toniskos krampjus. Klonisko un tonisko BIK izraisīto krampju sliekšni E1R paaugstināja attiecīgi par 21 % un 25 % (2.8.A un 2.8.B attēli). Līdzīgi kā PTZ izraisīto krampju modelī, NE-100 uzrādīja tendenci samazināt krampju rašanās sliekšni, kas norāda uz tā prokonvulsīvo darbību (2.8.A un 2.8.B attēli). Sig1R agonists PRE-084, injicēts devās līdz 50 mg/kg, neietekmēja BIK izraisīto krampju sliekšni (rezultāti nav parādīti; IV publikācija).

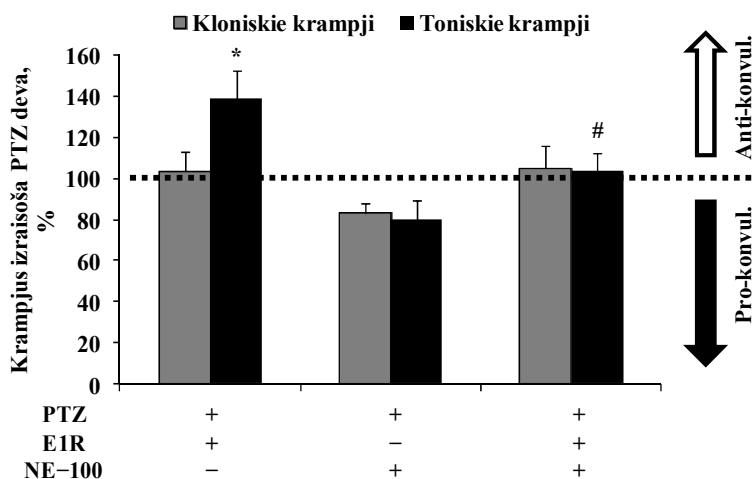


2.8. attēls. E1R pretkrampju aktivitātē BIK izraisīto krampju modeli

Raustītā līnija grafikos atspoguļo BIK izraisīto krampju rašanās sliekšni kontroles grupā (tas atbilst 100 %). (A) Sig1R ligandu aktivitātē pret BIK izraisītajiem kloniskajiem krampjiem. (B) Sig1R ligandu aktivitātē pret BIK izraisītajiem toniskajiem krampjiem. Savienojumi tika injicēti 60 min pirms BIK infuzēšanas. Rezultāti grafikos attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 7-10$). * $P < 0,05$ pret kontroles grupu (Stjūdenta t-tests).

2.9. E1R pretkrampju darbība ir saistīta ar Sig1R regulāciju (IV publikācija)

Lai pārliecinātos, ka E1R pretkrampju darbība ir saistīta ar Sig1R regulāciju, tika izmantots antagonists NE-100, kas devā 5 mg/kg tika injicēts 20 min pirms E1R. Savienojumu un to kombinācijas aktivitāte tika pārbaudīta PTZ izraisīto krampju modelī. Līdzīgi kā iepriekš, E1R, ievadīts devā 10 mg/kg, par 39 % paaugstināja PTZ izraisīto tonisko krampju rašanās sliekšni (2.9. attēls). NE-100 devā 5 mg/kg neietekmēja krampju rašanās sliekšni, taču ticami kavēja E1R darbību (2.9. attēls), tādējādi apstiprinot to, ka E1R krampjus mazinošais efekts ir saistīts ar Sig1R darbības regulāciju.

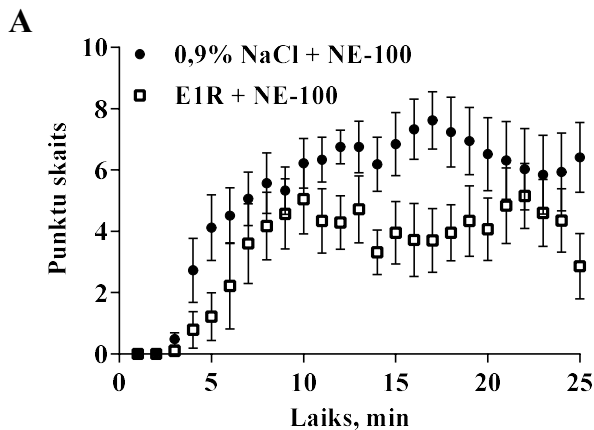


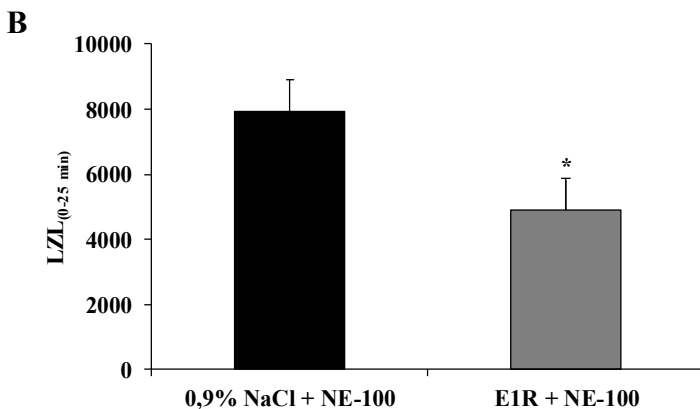
2.9. attēls. Sig1R atkarīgā E1R pretkrampju aktivitāte

Raustītā līnija grafikos atspoguļo PTZ izraisīto krampju rašanās sliekšni kontroles grupā (tas atbilst 100 %). E1R (10 mg/kg) tika injicēts 60 min pirms PTZ infuzēšanas. NE-100 (5 mg/kg) tika injicēts 20 min pirms E1R. Rezultāti grafikos attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 10$). * $P < 0,05$ pret kontroles grupu, # $P < 0,05$ pret E1R (Nūmana-Koila tests).

2.10. E1R aktivitāte pret NE-100 izraisītajiem krampjiem (IV publikācija)

NE-100 vienreizēja i.p. injicēšana devā 50 mg/kg 5 no 7 dzīvniekiem izraisīja krampjus. Visiem dzīvniekiem, kuri bija saņēmuši NE-100 devā 75 mg/kg, novēroja krampjus. NE-100 devā 75 mg/kg izraisīja gan kloniskus, gan toniskus, gan ģeneralizētus krampjus. Visi veiktie novērojumi plašāk ir aprakstīti IV publikācijā. E1R, injicēts devā 75 mg/kg, ticami samazināja NE-100 izraisīto krampju smaguma pakāpi, ko raksturo zemāks punktu skaits, kas iegūts izmantojot krampju novērtēšanas skalu (2.10.A attēls; 2.2. tabula). Novērtējot laukumu zem līknes (LZL) iegūtajam punktu un laika grafikam (2.10.A attēls), redzams, ka E1R statistiski ticami kavēja NE-100 krampjus izraisīto darbību (2.10.B attēls).

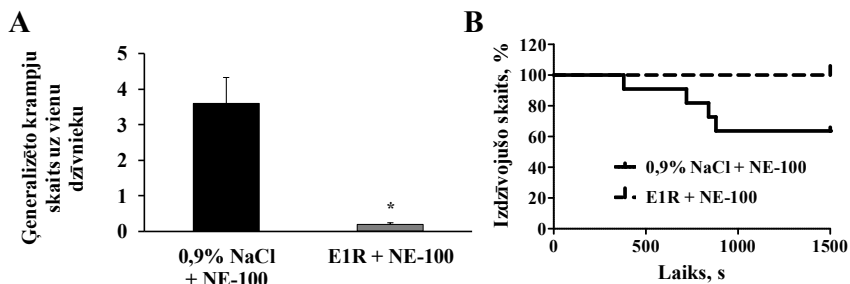




2.10. attēls. E1R kavē NE-100 izraisītos krampjus

E1R (75 mg/kg) vai 0,9 % NaCl izotoniskais šķīdums tika injicēti i.p. 30 min pirms i.p. NE-100 (75 mg/kg) injicēšanas. (A) Vidējais punktu skaits grupā 25 min novērošanas periodā. Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās punktu vērtības $\pm$ S.E.M. katrā novērošanas min. (B) Laukums zem līknes (LZL_{0-25min}) tika aprēķināts, izmantojot punktu laika grafiku (A). Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 6-11$). * $P < 0,05$ pret kontroles grupu (Numana-Koila tests).

E1R ticami samazināja ģeneralizēto krampju epizožu skaitu (2.11.A attēls). E1R pagarināja latento laiku līdz pirmo krampju parādīšanās brīdim (2.2. tabula), kā arī novērsa dzīvnieku mirstību, kas tika reģistrēta NE-100 kontroles grupā (2.11.B attēls).



2.11. attēls. E1R efektivitāte pret NE-100 izraisītajiem ģeneralizētajiem krampjiem un dzīvnieku mirstību

E1R (75 mg/kg) vai 0,9 % NaCl izotoniskais šķīdums tika injicēti i.p. 30 min pirms i.p. NE-100 (75 mg/kg) injicēšanas. (A) NE-100 izraisītie ģeneralizētie krampji. Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ S.E.M. ($n = 6-11$). $*P < 0,05$ salīdzinot pret kontroles grupu (Ņumana-Koila tests). (B) Dzīvnieku mirstība 25 min novērošanas periodā.

2.2. tabula

E1R aktivitāte NE-100 izraisīto krampju modelī

Novērojums	0,9 % NaCl + NE-100	E1R + NE-100
Dzīvnieki ar krampjiem, skaits / kopējais dzīvnieku skaits	11/11	5/6
Laiks, kad sākās krampji, s	238 $\pm$ 27	320 $\pm$ 34
Dzīvnieki ar ģeneralizētiem krampjiem, skaits/kopējais dzīvnieku skaits	11/11	1/5
Vidējais maksimālais punktu skaits (pīķis)	8.2 $\pm$ 0.8	5.8 $\pm$ 1.3
Vidējais laiks, lai sasniegtu pīķi, s	569 $\pm$ 65	708 $\pm$ 166
Vidējais punktu skaits grupā	5.3 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.2

E1R (75 mg/kg; $n = 6$) vai 0,9% NaCl izotoniskais šķīdums ($n = 11$) tika ievadīti i.p. 30 minūtes pirms NE-100 (75 mg/kg) ievadīšanas.

3. DISKUSIJA

Sig1R ir jauns un nozīmīgs zāļu mērķis ar daudzām iespējām neiroloģisko saslimšanu ārstēšanai nākotnē. Mēs esam atklājuši jaunu savienojumu E1R, kam piemīt atmiņu uzlabojošas īpašības un pretkrampju aktivitāte. E1R darbība ir saistīta ar Sig1R pozitīvu allostērisko modulēšanu, un E1R darbības mehānisms norāda uz jaunu iespējamu zāļu vielu klasi demences un epilepsijas ārstēšanai.

3.1. Allostēriskie Sig1R modulatori

Sig1R ir vienīgais līdz šim zināmais bioloģiskais mērķis, kas nosaka E1R farmakoloģisko darbību. *In vitro* aktivitātes novērtēšanas testi parādīja, ka E1R nesaistās Sig1R aktīvajā centrā, taču savienojums darbojas kā Sig1R PAMs. E1R veicināja neselektīva SigR agonista [³H]-DTG saistīšanos pie SigR, taču, izmantojot selektīvu Sig1R agonistu [³H]-(+)-pentazocīnu, E1R neietekmēja tā saistīšanos. Šajā eksperimentā arī cits Sig1R PAMs fenitoīns neuzrādīja aktivitāti, savukārt PRE-084 un haloperidols spēja devas atkarīgi konkurēt par saistīšanos pie Sig1R ar [³H]-(+)-pentazocīnu. Fenitoīna allostēriskā darbība iepriekš ir parādīta, lietojot membrānas, kas izolētas no žurku un jūrascūciņu smadzeņu audiem (Cobos *et al.*, 2006; DeHaven-Hudkins *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2013), žurku aknām (McCann un Su, 1991) un peļu plaušu audiem (Lever *et al.*, 2015). Neskatoties uz to, ir arī eksperimenti, kuros fenitoīna allostēriskā aktivitāte ir novērota smadzeņu audos, savukārt žurku aknu audos fenitoīns ir bijis neaktīvs (Guo *et al.*, 2013). Līdzīgi ir arī ar citiem Sig1R PAMiem, piemēram, SCH-23390 un SKF-38393 spēja veicināt [³H]-(+)-pentazocīna saistīšanos pie Sig1R tikai aknu audos, bet tie neuzrādīja PAM aktivitāti smadzeņu audos (Guo *et al.*, 2013), turpretī cits PAMs

SKF-83959 veicināja iezīmētā pentazocīna piesaistīšanos gan smadzeņu, gan aknu audos (Guo *et al.*, 2013). Dažādība šo vielu efektos varētu būt skaidrojama ar Sig1R atšķirībām starp dzīvnieku sugām (Klein un Musacchio, 1992). Salīdzinot ar jūrascūciņu audu homogenātu, žurku audu homogenātā ir nepieciešams izmantot vairāk nekā 10 reizes lielāku fenitoīna koncentrāciju, lai novērotu līdzvērtīgu PAM efektu (DeHaven-Hudkins *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2013). SKF-83959 un tā analogi nespēja mainīt [³H]-(+)-pentazocīna saistīšanos Sig1R ekspresējošās cilvēka embrionālajās nieru šūnās HEK293 (Guo *et al.*, 2013). HEK293 šūnās arī fenitoīns bija neaktīvs (Guo *et al.*, 2013). Interesanti, ka gan HEK293 šūnās, gan smadzeņu audos [³H]-(+)-pentazocīns uzrādīja līdzīgu afinitāti pret Sig1R (Guo *et al.*, 2013), norādot uz to, ka Sig1R varētu būt iespējamās dažādas šūnu specifiskas izformas, kuras PAMi ietekmē dažādi. Iepriekš minētais būtu jāņem vērā, pētot Sig1R darbības mehānismus *in vitro*, un izvērtējot PAMu darbību atsevišķos *in vitro* eksperimentālajos modeļos, kas ne vienmēr var sniegt pilnīgu atbildi par PAMu funkciju un īpašībām.

Neskatoties uz to, ka E1R nespēja izmainīt [³H]-(+)-pentazocīna saistīšanās parametrus žurku smadzeņu audos, E1R izteikti pastiprināja žurku sēklvadu elektriskās strāvas izraisītās kontrakcijas selektīva Sig1R agonista PRE-084 klātbūtnē, kas nebija novērojams Sig2R agonista gadījumā. E1R pastiprināja PRE-084 efektu arī uz BDK izraisītu [Ca²⁺]_i pieaugumu, tādējādi apstiprinot, ka *in vitro* E1R darbojas kā selektīvs Sig1R PAMs.

Sig1R PAMi ir savienojumi, kas molekulārās struktūras ziņā atšķiras no ortostēriskajiem Sig1R ligandiem, savukārt savstarpēji tiem ir izteikta līdzība. Visi allostēriskie Sig1R modulatori ir mazmolekulāri heterocikliski savienojumi ar samērā cieši lokalizētiem hidrofobiem (fenil- un/vai metil-) aizvietotājiem pie heterocikla. Atšķirības to molekulārajā struktūrā nodrošina to, kāpēc šie savienojumi nekonkurē ar ortostēriskajiem Sig1R ligandiem to

saistīšanās vietā. Ņemot vērā Sig1R lokalizāciju organismā, PAMi ir savienojumi, kuriem var būt diezgan plašs farmakoloģiskais pielietojums dažādu saslimšanu ārtsēšanā.

3.2. Sig1R darbības modulēšana un atmiņas regulēšana

Vairāki veiktie pētījumi norāda uz to, ka Sig1R aktivēšana spēj novērst kognitīvos traucējumus dzīvnieku modeļos, kas ir saistīti ar holīnerģisko signālceļu bloķēšanu, imitējot Alcheimera saslimšanas simptomus (*Antonini et al.*, 2009; *Earley et al.*, 1991; *Matsuno et al.*, 1994; *Maurice et al.*, 1998; *Maurice un Su*, 2009). Ir parādīts, ka daži Sig1R agonisti spēj palielināt acetilholīna atbrīvošanu (*Matsuno et al.*, 1993; *van Waarde et al.*, 2011). Mūsu veiktie *in vitro* eksperimenti parādīja, ka E1R spēj kavēt skopolamīna izraisītos kognitīvos traucējumus gan PNR, gan Y-veida labirinta testā. E1R aktivitāti bloķēja selektīvs Sig1R antagonists NE-100, tādējādi *in vivo* apstiprinot, ka E1R efekts ir saistīts ar Sig1R aktivitātes modulēšanu.

Neirosteroīdu klases vielas pieskaita iespējamiem endogēniem Sig1R ligandiem (*Cobos et al.*, 2008; *Niitsu et al.*, 2012). Fizioloģiskos apstākļos pregnenolons un dehidroepiandrosterons spēj saistīties ar Sig1R, kas ir viens no šo savienojumu galvenajiem farmakoloģiskajiem mērķiem, tādējādi nosakot šo vielu neiromodulatorās un uzvedību ietekmējošās īpašības (*Monnet un Maurice*, 2006; *Su et al.*, 1988). Pregnenolons, dehidroepiandrosterons un arī nesteroīdie Sig1R agonisti spēj ietekmēt mācīšanos un atmiņu dažādos amnēzijas modeļos (ar ķīmiskiem savienojumiem izraisīta holīnerģiskā disfunkcija, N-metil-D-aspartāta ievadīšana), kā arī atmiņas traucējumu modeļos, kas ir saistīti ar novecošanos (*Maurice et al.*, 2001; *Monnet un Maurice*, 2006). Dzīvniekos ir novērota korelācija starp pregnenolona līmeni hipokampā un tā ietekmi uz atmiņas procesiem (*Robel et al.*, 1995). Līdz ar to

E1R atmiņu uzlabojošā darbība varētu būt saistīta ar kāda endogēna Sig1R liganda darbības pastiprināšanu.

E1R atmiņu uzlabojošais efekts rada interesi tieši piracetāmam līdzīgās molekulārās struktūras dēļ. Vairākiem racetāma grupas savienojumiem piemīt piracetāmam raksturīgā nootropā aktivitāte dažādās dzīvnieku sugās, kā arī cilvēkos (*Frostl un Maitre*, 1989; *Gouliaev et al.*, 1995; *Malykh un Sadaie*, 2010). Ir zināms, ka piracetāms un tā atvasinājumi ir uzrādījuši aktivitāti PNR testā (*Krylova et al.*, 1991; *Zvejniece et al.*, 2011), un tie spēj novērst skopolamīna un citu savienojumu izraisītos atmiņas traucējumus (*Malykh un Sadaie*, 2010; *Zvejniece et al.*, 2011). Fenilpiracetāmam un tā aktīvākajam enantiomēram R-fenilpiracetāmam piemīt gan atmiņu uzlabojoša, gan stimulējoša aktivitāte, kas iepriekš parādīta PNR un atklātā lauka testos (*Tiurenkov et al.*, 2007; *Zvejniece et al.*, 2011). E1R ir fenilpiracetāma analogs, kas ķīmiskās struktūras ziņā atšķiras tikai ar vienu metil- grupu (*Kalvins et al.*, 2011; *Zvejniece et al.*, 2011; I un III publikācija). Līdz ar to E1R ietekme uz dzīvnieku uzvedību varētu būt līdzīga fenilpiracetāma farmakoloģiskajai aktivitātei. Mūsu iegūtie rezultāti parādīja, ka E1R izsauc atmiņu uzlabojošu efektu, neietekmējot dzīvnieku kustību aktivitāti devās līdz pat 100 mg/kg (II publikācija). Tādējādi pat pavisam nelielas izmaiņas piracetāmam līdzīgo savienojumu ķīmiskajā struktūrā var radīt būtisku atšķirību to farmakoloģiskajā iedarbībā. Piracetāmam līdzīgo savienojumu efektus saista ar vairāku molekulāro mērķu iespējamu regulāciju, taču līdz šim starp tiem nebija minēts Sig1R.

E1R ir vienīgais no visiem zināmajiem Sig1R PAMiem, kam piemīt atmiņu uzlabojošs efekts. Ir zināms, ka fenitoīns spēj samazināt kustību aktivitāti pelēm (*Poncelet et al.*, 1984), samazināt ārpusšūnas K^+ koncentrācijas pieaugumu (*Nobile un Lagostena*, 1998), kavēt gan Na^+ (*Rush un Elliott*, 1997), gan Ca^{2+} pārvadi (*Todorovic un Lingle*, 1998). Pretēji E1R, fenitoīns PNR testā

pelēm radīja atmiņas traucējumus (*Reeta et al.*, 2009). Fenitoīns izraisīja mācīšanās un atcerēšanās traucējumus arī epilepsijas pacientiem (*Mishra un Goel*, 2015). Mūsdienās ir nepieciešama jauna pieceja, lai mazinātu antiepileptisko līdzekļu izraisītās blakusparādības, kas saistītas ar atmiņas traucējumiem (*Mishra un Goel*, 2015). E1R farmakoloģiskais profils norāda uz to, ka šī viela varētu būt daudzsološs jauns pretkrampju līdzeklis, kuram nepiemīt līdz šim novērotā pretepilepsijas līdzekļu negatīvā ietekme uz kognitīvo funkciju. Salīdzinot ar fenitoīnu, E1R neietekmē kustību aktivitāti, un, kā redzams pēc veiktā skrīninga datiem, E1R neietekmē arī Na^+ un K^+ kanālu darbību. E1R devā līdz pat 200 mg/kg neietekmē muskuļu tonusu un koordināciju, kā arī neizraisa motorās funkcijas traucējumus. Līdz ar to E1R ir pirmais zināmais Sig1R PAMs, kas uzlabo kognitīvo funkciju, neietekmē lokomotoro aktivitāti, un, tāpat kā citi piracetāma atvasinājumi, neizraisa nopietnas blakusparādības.

3.3. Sig1R ligandi un to pretkrampju aktivitāte

Lai gan visiem zināmajiem Sig1R PAMiem piemīt pretkrampju aktivitāte, tomēr ne visu PAMu pretkrampju aktivitāti saista ar Sig1R regulāciju. Fenitoīna galvenais darbības mehānisms ir lādiņa-atkarīgo nātrija kanālu darbības kavēšana (*Tunnicliff*, 1996), un ir parādīts, ka selektīvs Sig1R antagonists BD-1047 nespēj kavēt fenitoīna pretkrampju darbību maksimālajā elektrošoka izraisītajā krampju modelī (*Guo et al.*, 2015). Līdzīgi ir arī savienojuma SCH-23390 gadījumā, jo SCH-23390 pretkrampju efekts ķīmisko konvulsantu izraisītajos krampju modeļos ir atkarīgs no dopamīna D_1 receptora regulācijas (*Bourne et al.*, 2001). Tas norāda uz to, ka Sig1R PAMu farmakoloģiskā aktivitāte varētu būt vairāku molekulāro darbības mehānismu summa.

Krampjus modulējošā aktivitātē nav raksturīga tikai Sig1R PAMiem. Agonisti ar augstu afinitāti pret Sig1R, piemēram, deksmetorfāns (24 mg/kg, s.c.) un dimetorfāns (24 mg/kg, s.c.) spēj kavēt kainskābes izraisītos krampjus žurkās (*Shin et al.*, 2005). Līdzīga aktivitātē kainskābes izraisīto krampju modeli novērota arī citam Sig1R agonistam pentoksiverīnam (*Kim et al.*, 2001). Sig1R agonists pentazocīns devas atkarīgi (20–100 mg/kg, s.c.) samazināja N-metil-DL-aspartātskābes izraisītos toniskos krampjus (*Singh et al.*, 1990). Ir parādīts, ka Sig1R antagonists panamezīns pasargā pret kokaīna izraisītajiem krampjiem (*Skuza*, 1990). Pret kokaīna izraisītajiem krampjiem līdzīgu aktivitāti ir uzrādījuši arī citi Sig1R antagonisti, kā, piemēram, AC-927 (1–10 mg/kg, i.p.), LR-172 (1–30 mg/kg, i.p.) un BD-1047 (1–40 mg/kg, i.p.) (*Matsumoto et al.*, 2011; *McCracken et al.*, 1999), tomēr informācija par Sig1R antagonistu aktivitāti citos krampju modeļos ir ierobežota, šaurā pārbaudīto devu diapazona dēļ. Sig1R antagonists BD-1047 spēj kavēt agonistu pretkrampju aktivitāti kainskābes, maksimālā elektrošoka un PTZ izraisītajos krampju modeļos, taču, salīdzinot ar agonistiem, kuru darbība ir pētīta plašā devu diapazonā, BD-1047 aktivitātē ir pārbaudīta tikai mazās devās (1 un 2 mg/kg, i.p.). NE-100 ir selektīvs Sig1R antagonists ($K_i = 0.86$ nM). Salīdzinot ar Sig1R, NE-100 uzrāda 55 reizes zemāku selektivitāti pret Sig2R, un vairāk nekā 6000 reizes zemāku selektivitāti pret dopamīna, serotonīna un fenciklidīna receptoriem (*Okuyama et al.*, 1993). Mēs novērojām, ka NE-100 pēc vienreizējas ievadīšanas izraisa krampjus pelēm, un tam piemīt devas atkarīga pro-convulsīvā aktivitātē PTZ un BIK izraisīto krampju modeļos (IV publikācija). E1R kavēja NE-100 krampjus izraisīto aktivitāti, līdz ar to mijiedarbība starp E1R un NE-100 efektiem ļauj apstiprināt Sig1R lomu krampju regulācijā.

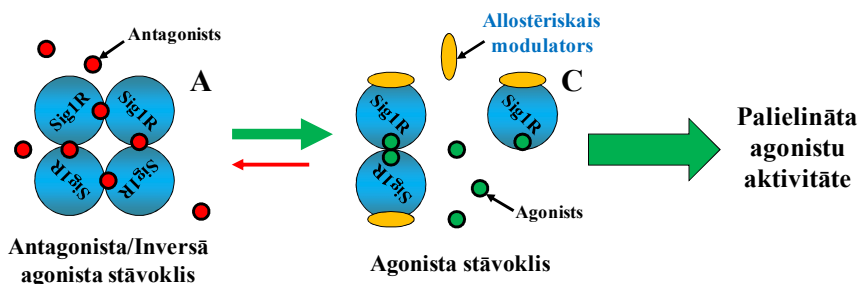
Daži piracetāma atvasinājumi uzrāda pretkrampju aktivitāti, un tiek lietoti klīnikā epilepsijas ārstēšanai jau vairākus gadus, taču šo savienojumu

darbības mehānisms nav saistīts ar Sig1R aktivitātes regulāciju. Brivaracetāms, levetiracetāms un seletracetāms saistās ar sinapšu vezīkuļu glikoproteīnu 2A, kas nosaka šo savienojumu pretkrampju efektu (*Malykh un Sadaie, 2010*). Piracetāmam piemīt vāja krampjus mazinoša aktivitāte un tas, salīdzinot ar levetiracetāmu, ļoti vāji saistās pie iepriekš minētā glikoproteīna (*Noyer et al., 1995*). Šobrīd Sig1R darbības regulācija ir vienīgais, ar ko saista E1R farmakoloģisko aktivitāti gan *in vitro*, gan *in vivo*, un E1R ir vienīgais piracetāma atvasinājums, kura pretkrampju efektivitāte ir saistīta ar allostērisku Sig1R darbības modulēšanu.

3.4. Sig1R allostēriskie modulatori: iespējamie molekulārie mehānismi

Līdz šim nav precīzi definēts molekulārais darbības mehānisms, kas varētu pilnībā izskaidrot Sig1R funkcijas un Sig1R ligandu aktivitāti. Šobrīd zināmā Sig1R kristālstruktūra parāda, ka ligandu saistīšanās vieta proteīnā ir ļoti cieši noslēgta, līdz ar to nav skaidrs, kā ligandi var piekļūt proteīna aktīvajam centram (*Schmidt et al., 2016*). Sig1R PAMu saistīšanās vieta pie proteīna vistīcamāk atrodas ārpus ortostērisko ligandu saistīšanās vietas, un tā varētu lokalizēties uz proteīna virsmas. PAMi ir savienojumi, kas, mijiedarbojoties ar proteīnu, spēj izmainīt tā struktūru, kā rezultātā agonisti var daudz brīvāk piekļūt receptora aktīvajam centram. Līdzīgi jau iepriekš ir diskutēts par fenitoīnu, ka tas varētu izraisīt izmaiņas receptora konformācijas stāvoklī un tādējādi palielināt ortostēriskā liganda [³H]-(+)-pentazocīna afinitāti pret Sig1R (*Cobos et al., 2006*). Līdz galam nav skaidrs, kā PAMi var selektīvi veicināt agonistu aktivitāti, jo atsevišķos gadījumos ķīmiskā struktūra gan agonistam, gan antagonistam ir ļoti līdzīga.

Sig1R funkcionalitāte varētu būt atkarīga no proteīna oligomerizācijas stāvokļa (Chu un Ruoho, 2016). Iepriekš ir parādīts, ka agonists (+)-pentazocīns izraisa proteīna dimēru un monomēru veidošanos un receptora aktivēšanu, kamēr antagonists haloperidols veicina proteīna oligomerizēšanos un receptora bloķēšanu (Chu un Ruoho, 2016), kas varētu liecināt par to, ka oligomerizācijas stāvoklī (Attēls 3.1.A) Sig1R varētu būt funkcionāli neaktīvs. Līdz šim ir zināms, ka PAMi veicina Sig1R agonistu aktivitāti, līdz ar to PAMi varētu izmainīt Sig1R struktūru un stabilizēt receptora agonista stāvokli, kā rezultātā vairāk pieejamas būtu proteīna dimēra (Attēls 3.1.B) un/vai monomēra (Attēls 3.1.C) formas, un receptors atrastos aktivētā stāvoklī.



3.1. attēls. PAMi veicina Sig1R aktivētā stāvokļa stabilizāciju.

Modelis parāda iespējamo ligandu darbības pamatprincipu. Antagonista stāvoklī **A** norāda uz Sig1R oligomēru veidošanos. Agonista stāvoklī **B** norāda uz Sig1R dimēra, bet **C** uz monomēra veidošanos.

Sig1R PAMu iespējamais darbības modelis, kas parādīts 3.1. attēlā, mēģina skaidrot duālo mijiedarbību starp E1R un NE-100 krampju gadījumā. NE-100, ievadīts pirms E1R, varētu veicināt Sig1R nonākšanu oligomerizētā jeb inertā stāvoklī, kā rezultātā E1R pretkrampju efekts tiek bloķēts. Līdz ar to ir skaidrs, ka E1R darbības mehānisms krampju regulācijā ir saistīts ar Sig1R aktivitātes regulāciju. Savukārt, ja E1R tiek ievadīts pirms NE-100, tas spēj kavēt NE-100 krampjus izraisošo darbību, kas varētu būt skaidrojams ar Sig1R

aktivēta stāvokļa stabilizēšanu. Šo procesu skaidrojumā ir jāņem vērā tas, ka antagonistu efektivitāte ir atkarīga no tiešas mijiedarbības ar receptoru, bet PAMu efekts lielā mērā ir atkarīgs no agonista klātbūtnes pētāmajā sistēmā. Neatkarīgi no tā, līdzsvars starp aktivētu un bloķētu receptoru visticamāk ir atkarīgs no katra Sig1R liganda ievadīšanas secības un laika. Savienojums, kurš pirmais atrodas pārākumā nosaka to, uz kuru pusi līdzsvars starp dažādiem Sig1R aktivācijas stāvokļiem ir novirzīts. Tas varētu arī skaidrot to, kāpēc praktiski visu Sig1R antagonistu darbība ir atgriezeniska.

Novērotā E1R aktivitāte uz BDK izraisīto $[Ca^{2+}]_i$ palielinājumu varētu būt skaidrojama ar iespējamu endogēna liganda klātbūtni NG108-15 šūnu kultūrā, vai ago-allostērisko modulatoro darbību izmantotajā sistēmā. Ago-allostēriskie modulatori vienlaikus ir gan allostēriskie agonisti gan allostēriskie modulatori, kuru darbība rezultējas kā „superagonisms” (*Schwartz* un *Holst*, 2007). Piemēram, mūsu pētījumā gan PRE-084, gan E1R veicināja BDK izraisītu kalcija koncentrācijas pieaugumu, norādot uz to, ka E1R pētāmajā sistēmā darbojas kā agonists, kurš bez tā vēl spēj pastiprināt selektīva agonista efektivitāti, un abu kombinācija rezultējas ar vēl izteiktāku efektu, ko varētu apzīmēt kā „superagonismu”.

Neskatoties uz to, ka ANAVEXTM 2-73 (tetrahydro-N,N-dimetil-2,2-difenil-3-furānmetānamīns) ir Sig1R agonists, mēs saskatām ķīmiski strukturālu līdzību ar Sig1R PAMiem. Līdzīgi kā E1R, arī ANAVEXTM 2-73 ir savienojums ar atmiņu uzlabojošu un pretkrampju aktivitāti. I.p. ANAVEXTM 2-73 ievadīšana devā 0.3-1 mg/kg uzlaboja atmiņu Y-veida labirinta un PNR testā, novēršot skopolamīna izraisītos atmiņas traucējumus pelēs (*Villard et al.*, 2011). ANAVEXTM 2-73 ir parādījis arī devas atkarīgu pretkrampju aktivitāti maksimālā elektrošoka un PTZ izraisīto krampju modelī (*Vamvakidēs*, 2002). Šobrīd ANAVEXTM 2-73 tiek pārbaudīts klīniskajos pētījumos Alzheimer slimības un epilepsijas ārstēšanai. ANAVEXTM 2-73

darbības mehānisms ir ne tikai Sig1R, bet arī muskarīniskā M_1 receptora un M_2/M_3 receptoru aktivēšana (Villard *et al.*, 2011). ANAVEX™ 2–73 farmakoloģiskais efekts ir saistīts ar sinerģisku ietekmi uz muskarīnisko receptoru signālceļiem un Sig1R (Villard *et al.*, 2011). Līdz ar to ANAVEX™ 2–73 darbības mehānisms varētu būt muskarīniskā M_1 receptora „supersensitizācija”, ko, saista ar iespējamu muskarīniskā M_1 receptora heterodimerizāciju ar Sig1R (Fisher *et al.*, 2013). Sig1R ir zināms kā čaperona proteīns, kas regulē citus receptorus, pateicoties proteīna-proteīna mijiedarbībai (Pabba, 2013). Ir ļoti iespējams, ka šādi izveidojušos proteīna kompleksu aktivitāti var regulēt arī Sig1R PAMi. E1R un ANAVEX™ 2–73 uzrāda ļoti līdzīgas farmakoloģiskās īpašības, kas ietver gan atmiņu uzlabojošu darbību, gan pretkrampju aktivitāti, līdz ar to E1R, līdzīgi kā ANAVEX™ 2–73, varētu ietekmēt dažādas proteīnu kompleksu sistēmas, veicinot to formēšanos vai stabilizējot jau izveidojušos Sig1R un mērķproteīnu heteromērus.

Kopumā ir skaidrs, ka šobrīd, izmantojot esošo informāciju un iegūtos datus, izskaidrot līdz galam Sig1R PAMu darbību un īpašības nav iespējams, un visticamāk dažādi kompleksi mehānismi ir iesaistīti Sig1R darbības regulācijā. E1R ir jauns savienojums ar unikālu farmakoloģisko darbības mehānismu un zemu toksicitāti, un varētu kalpot kā perspektīvs savienojums atmiņas traucējumu un epilepsijas ārstēšanai.

4. SECINĀJUMI

1. 4,5-diaizvietota pracetāma atvasinājuma metilfenilpiracetāma stereoizomēri E1R un T1R, ar R-konfigurāciju pie C-4 hirālā centra, ir daudz aktīvāki Sig1R allostēriski modulatori nekā to atbilstošie enantiomēri E1S un T1S.
2. E1R nesaistās Sig1R ortostērisko ligandu saistīšanās vietā. Veiktie *in vitro* un *in vivo* pētījumi apstiprina, ka E1R darbojas kā Sig1R PAMs.
3. E1R uzlabo atmiņu un kavē skopolamīna izraisītos atmiņas traucējumus, kā arī tam piemīt ievērojama pretkrampju aktivitāte ķīmisko konvulsantu izraisīto krampju modeļos.
4. E1R ir perspektīvs savienojums demences un epilepsijas ārstēšanai.

5. DARBA APROBĀCIJA – PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

Promocijas darbs balstās uz sekojošām publikācijām:

1. Veinberg G, Vorona M, Zvejniece L, Vilskersts R, Vavers E, Liepinsh E, Kazoka H, Belyakov S, Mishnev A, Kuznecovs J, Vikainis S, Orlova N, Lebedev A, Ponomaryov Y, Dambrova M, Synthesis and biological evaluation of 2-(5-methyl-4-phenyl-2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetamide stereoisomers as novel positive allosteric modulators of sigma-1 receptor, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2013**, 21: 2764–71, **(I publikācija)**.
2. Zvejniece L, Vavers E, Svalbe B, Vilskersts R, Domracheva I, Vorona M, Veinberg G, Misane I, Stonans I, Kalvinsh I, Dambrova M. The cognition-enhancing activity of E1R, a novel positive allosteric modulator of sigma-1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, **2014**, 171: 761–771, **(II publikācija)**.
3. Veinberg G, Vavers E, Orlova N, Kuznecovs J, Domracheva I, Vorona M, Zvejniece L, Dambrova M. Stereochemistry and its methyl derivative: improvement of the pharmacological profile. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2015**; 51: 601–606, **(III publikācija)**.
4. Vavers E, Svalbe B, Lauberte L, Stonans I, Misane I, Dambrova M, Zvejniece L. The activity of selective sigma-1 receptor ligands in seizure models in vivo. *Behavioural Brain Research* **2017**; 328: 13–18, **(IV publikācija)**.

Balstoties uz iegūtajiem darba rezultātiem ir reģistrēts 1 patents:

Zvejniece L, Dambrova M, Svalbe B, Vavers E, Kalvins I, Veinbergs G, Stonans I, Misane I. Use of 2-(5S-methyl-2-oxo-4R-phenyl-pyrrolidin-1-yl)-

acetamide in the treatment of seizures. **2017** (International filing date: 02.08.2016; Priority data: 03.08.2015); WO2017021881 (A1).

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās starptautiskās konferencēs:

1. Vavers E, Svalbe B, Lauberte L, Veinberg G, Dambrova M, Zvejniece L. Sigma-1 receptor ligand activities in chemoconvulsant-induced seizure models in mice. *European Symposium: Physiopathology of sigma-1 receptors*, Barcelona, Spain, May 29–30, **2017**, Book of Abstracts, P.14.
2. Zvejniece L, Vavers E, Svalbe B, Veinberg G, Dambrova M. Allosteric modulators of Sigma-1 receptor. *European Symposium: Physiopathology of sigma-1 receptors*, Barcelona, Spain, May 29–30, **2017**, Book of Abstracts, P.11.
3. Vavers E, Zvejniece L, Svalbe B, Domracheva I, Vilskersts R, Makrecka-Kuka M, Veinberg G, Dambrova M. Allosteric Sigma-1 receptor modulators: a novel approach to treat memory disorders. *FEBS/IUBMB "Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools"*, Spetses island, Greece, May 27–June 1, **2016**, Book of Abstracts, P.72.
4. Vavers E, Zvejniece L, Dambrova M. Ligands of sigma-1 receptor: agonists, antagonists, allosteric modulators. *Drug Discovery conference*, Riga, Latvia, August 27–29, **2015**. Book of Abstracts, P.63.
5. Vavers E, Zvejniece L, Veinberg G, Svalbe B, Domracheva I, Vilskersts R, Dambrova M. Stereoselective pharmacological activity of 4,5-disubstituted piracetam derivatives, positive allosteric modulators of sigma-1 receptor. *Drug Discovery conference*, Riga, Latvia, August 27–29, **2015**. Book of Abstracts, P.156.
6. Vavers E, Zvejniece L, Veinberg G, Svalbe B, Domracheva I, Vilskersts R, Dambrova M. Novel positive allosteric modulators of sigma-1 receptor.

- European Society for Neurochemistry's Conference, "Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System". Tartu, Estonia, June 14–17, 2015. SpringerPlus 2015; 4 (Suppl 1): P.51.*
7. Zvejniece L, Vavers E, Svalbe B, Domracheva I, Vorona M, Veinberg G, Kalvinsh I, Dambrova M. Allosteric modulator of Sigma-1 receptors enhance cognition and memory. *The 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)*, Cape Town, South Africa, July 13–18, **2014**. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115 (Suppl. 1), P.177.
 8. Vavers E. Ligands of sigma-1 receptor: agonists, antagonists, allosteric modulators. *InnovaBalt, pre-Bos Roundtable, New therapeutic targets: Chemistry and Biology*, Malpils, Latvija, July 3–5, **2014**.
 9. Dambrova M, Vavers E, Zvejniece L. The cognition-enhancing activity of E1R, a novel positive allosteric modulator of sigma-1 receptors. *The 2nd GlowBrain project Workshop, Application of biomaterials and in vivo imaging in stem cell research*, Zagreb, Croatia, March 27–29, **2014**. *Book of Abstracts*, P.43.
 10. Zvejniece L, Vilskersts R, Svalbe B, Vavers E, Misane I, Stonans I, Veinbergs G, Dambrova M. Stereoselective pharmacological activity of novel 4,5-disubstituted piracetam derivatives, positive allosteric modulators of sigma 1 receptor. *The 11th International Conference On Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Mechanisms, clinical strategies and promising treatments of neurodegenerative diseases*, Florence, Italy, March 6–10, **2013**.
 11. Vorona M, Orlova N, Kuznecovs J, Veinberg G, Vavers E, Zvejniece L, Dambrova M. The Preparation and Biological Investigation of Stereoisomeric 2-(5-methyl-4-phenyl-2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetamides.

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās Latvijas mēroga konferencēs:

1. Zvejniece L, Vāvers E. Sigma-1 receptors kā jauns zāļu mērķis Alzheimeras saslimšanas ārstēšanai. *Ķīmijas, bioloģijas un medicīnas zinātņu nodaļas sēde "Novecošana: ar to saistītās slimības, problēmas, risinājumi"*, Rīga, Latvija, 15. jūnijs, **2017**.
2. Vāvers E. Sigma-1 receptora aktivitātes modulēšana: jauna pieeja atmiņas procesu uzlabošanai. *Ķīmijas, bioloģijas un medicīnas zinātņu nodaļas sēde "Farmācijas nozares jauno zinātnieku preklīniskie pētījumi: no dabas vielām līdz jaunām zālēm"*, Rīga, Latvija, 6. marts, **2015**.
3. Vāvers E, Zvejniece L, Švalbe B, Domračeva I, Vilšķērsts R, Dambrova M. Sigma-1 receptoru pozitīva allostēriska modulēšana uzlabo kognitīvo funkciju. *RSU 2014. gada zinātniskā konference*, Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte, Rīga, Latvija, 10.–11. aprīlis, **2014**, Tēzes, 89. lpp.
4. Vāvers E, Zvejniece L, Ķīsis V, Švalbe B, Vilšķērsts R, Dambrova M. Jauns sigma-1 receptoru pozitīvs allostēriskais modulators ar atmiņu uzlabojošu darbību. *Rīgas Stradiņa universitātes 2013. gada zinātniskā konference*, Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte, Rīga, Latvija, 21.–22. marts, **2013**, Tēzes, 117. lpp.
5. Švalbe B, Zvejniece L, Vāvers E, Ķīsis V, Muceniece R, Dambrova M. Sigma-1 receptori kā jauns neiroprotektīvu zāļu mērķis. *Latvijas Universitātes 71. zinātniskā konference*, Medicīnas un bāzes zinātnes sekcija, Rīga, Latvija, 15. februāris, **2013**, Tēžu apkopojums, 24. lpp.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Antonini, V., Prezzavento, O., Coradazzi, M., Marrazzo, A., Ronsisvalle, S., Arena, E., Leanza, G., 2009. Anti-amnesic properties of ($\pm$)-PPCC, a novel sigma receptor ligand, on cognitive dysfunction induced by selective cholinergic lesion in rats. *J Neurochem.* 109, 744–54.
2. Arroyo, S., Crawford, P., 2003. Safety profile of levetiracetam. *Epileptic Disord.* 5 Suppl. 1, S57–63.
3. Banister, S. D., Kassiou, M., 2012. The therapeutic potential of sigma (σ) receptors for the treatment of central nervous system diseases: evaluation of the evidence. *Curr Pharm Des.* 18, 884–901.
4. Bourne, J. A., Fosbraey, P., Halliday, J., 2001. SCH–23390 affords protection against soman-evoked seizures in the freely moving guinea-pig: a concomitant neurochemical, electrophysiological and behavioural study. *Neuropharmacology* 40, 279–288.
5. Chu, U. B., Ruoho, A. E., 2016. Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Mol Pharmacol.* 89, 142–53.
6. Cobos, E. J., Entrena, J. M., Nieto, F. R., Cendán, C. M., Del Pozo, E., 2008. Pharmacology and therapeutic potential of sigma-1 receptor ligands. *Curr Neuropharmacol.* 6, 344–66.
7. Cobos, E. J., Lucena, G., Baeyens, J. M., Del Pozo, E., 2006. Differences in the allosteric modulation by phenytoin of the binding properties of the sigma-1 ligands [3 H](+)-pentazocine and [3 H]NE-100. *Synapse* 59, 152–61.
8. Dambrova, M., Zvejniece, L., Liepinsh, E., Cirule, H., Zharkova, O., Veinberg, G., Kalvinsh, I., 2008. Comparative pharmacological activity of optical isomers of phenibut. *Eur J Pharmacol.* 583, 128–134.
9. DeHaven-Hudkins, D. L., Ford-Rice, F. Y., Allen, J. T., Hudkins, R. L., 1993. Allosteric modulation of ligand binding to [3 H](+)-pentazocine-defined sigma recognition sites by phenytoin. *Life Sci.* 53, 41–8.
10. Earley, B., Burke, M., Leonard, B. E., Gouret, C. J., Junien, J. L., 1991. Evidence for an anti-amnesic effect of JO 1784 in the rat: a potent and selective ligand for the sigma receptor. *Brain Res.* 546, 282–6.
11. Fisher, A., Medeiros, R., Bar-Ner, N., Natan, N., Brandeis, R., Elkon, H., Nahum, V., LaFerla, F., 2013. Synchronized activation of M1 muscarinic receptor and sigma1 receptor: a novel target in treatment of Alzheimer's disease. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (ADPD), Book of abstracts, P.23.
12. Frostl, W., Maitre, L., 1989. The families of cognition enhancers. *Pharmacopsychiatry* 22 Suppl 2, 54–100.
13. Gouliaev, A. H., Senning, A., 1994. Piracetam and other structurally related nootropics. *Brain Res Rev.* 19, 180–222.
14. Gualtieri, F., Manetti, D., Romanelli, M., Ghelardini, C., 2002. Design and Study of Piracetam-like Nootropics, Controversial Members of the Problematic Class of Cognition-Enhancing Drugs. *Curr Pharm Des.* 8, 125–138.

15. Guo, L., Chen, Y., Zhao, R., Wang, G., Friedman, E., Zhang, A., Zhen, X., 2015. Allosteric modulation of sigma-1 receptors elicits anti-seizure activities. *Br J Pharmacol.* 172, 4052–4065.
16. Guo, L., Zhao, J., Jin, G., Zhao, B., Wang, G., Zhang, A., Zhen, X., 2013. SKF83959 is a potent allosteric modulator of sigma-1 receptor. *Mol Pharmacol.* 83, 577–86.
17. Kalvins, I., Lebedevs, A., Cernobrovijs, A., Dambrova, M., Zvejniece, L., Vorona, M., Veinbergs, G., 2011. 4R,5S-enantiomer of 2-(5-methyl-2-oxo-4-phenyl-pyrrolidin-1-yl)-acetamide with nootropic activity. WO2011054888 (A1).
18. Kilkeny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D. G., NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol.* 160, 1577–9.
19. Kim, H. C., Jhoo, W. K., Kim, W. K., Shin, E. J., Cheon, M. A., Shin, C. Y., Ko, K. H., 2001. Carbetapentane attenuates kainate-induced seizures via sigma-1 receptor modulation. *Life Sci.* 69, 915–22.
20. Klein, M., Musacchio, J. M., 1992. High-affinity dextromethorphan and (+)-3-(-3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine binding sites in rat brain. Allosteric effects of ropizine. *J Pharmacol Exp Ther.* 260, 990–9.
21. Klitgaard, H., Matagne, A., Nicolas, J.-M., Gillard, M., Lamberty, Y., De Ryck, M., Kaminski, R. M., Leclercq, K., Niespodziany, I., Wolff, C., Wood, M., Hannestad, J., Kervyn, S., Kenda, B., 2016. Brivaracetam: Rationale for discovery and preclinical profile of a selective SV2A ligand for epilepsy treatment. *Epilepsia* 57, 538–548.
22. Krylova, I. N., Antonova, L. V., Kamenskii, A. A., Iasnetsov, V. V., 1991. [A comparative study of the nootropic properties of piracetam and oxiracetam]. *Farmakol Toksikol.* 54, 14–6.
23. Lever, J. R., Litton, T. P., Fergason-Cantrell, E. A., 2015. Characterization of pulmonary sigma receptors by radioligand binding. *Eur J Pharmacol.* 762, 118–126.
24. Lüttjohann, A., Fabene, P. F., van Luijtelaar, G., 2009. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav.* 98, 579–586.
25. Malykh, A. G., Sadaie, M. R., 2010. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs* 70, 287–312.
26. Mandhane, S. N., Aavula, K., Rajamannar, T., 2007. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c. PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure* 16, 636–44.
27. Matsumoto, R. R., Li, S.-M., Katz, J. L., Fantegrossi, W. E., Coop, A., 2011. Effects of the selective sigma receptor ligand, 1-(2-phenethyl)piperidine oxalate (AC927), on the behavioral and toxic effects of cocaine. *Drug Alcohol Depend.* 118, 40–7.
28. Matsuno, K., Matsunaga, K., Senda, T., Mita, S., 1993. Increase in extracellular acetylcholine level by sigma ligands in rat frontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 265, 851–9.

29. Matsuno, K., Senda, T., Matsunaga, K., Mita, S., 1994. Ameliorating effects of sigma receptor ligands on the impairment of passive avoidance tasks in mice: involvement in the central acetylcholinergic system. *Eur J Pharmacol.* 261, 43–51.
30. Maurice, T., Lockhart, B. P., 1997. Neuroprotective and anti-amnesic potentials of sigma (sigma) receptor ligands. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21, 69–102.
31. Maurice, T., Su, T.-P., 2009. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther.* 124, 195–206.
32. Maurice, T., Su, T.-P., Privat, A., 1998. Sigma-1 receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* 83, 413–28.
33. Maurice, T., Urani, A., Phan, V. L., Romieu, P., 2001. The interaction between neuroactive steroids and the sigmal receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res Rev.* 37, 116–32.
34. McCann, D. J., Su, T.-P., 1991. Solubilization and characterization of haloperidol-sensitive (+)-[³H]SKF-10,047 binding sites (sigma sites) from rat liver membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 257, 547–54.
35. McCracken, K. A., Bowen, W. D., de Costa, B. R., Matsumoto, R. R., 1999. Two novel sigma receptor ligands, BD1047 and LR172, attenuate cocaine-induced toxicity and locomotor activity. *Eur J Pharmacol.* 370, 225–32.
36. McGrath, J. C., Drummond, G. B., McLachlan, E. M., Kilkeny, C., Wainwright, C. L., 2010. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol.* 160, 1573–6.
37. Meldrum, B. S., 1975. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol.* 17, 1–36.
38. Mishra, A., Goel, R. K., 2015. Comparative behavioral and neurochemical analysis of phenytoin and valproate treatment on epilepsy induced learning and memory deficit: Search for add on therapy. *Metab Brain Dis.* 30, 951–8.
39. Monnet, F. P., Maurice, T., 2006. The sigma-1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects. *J Pharmacol Sci.* 100, 93–118.
40. Niitsu, T., Iyo, M., Hashimoto, K., 2012. Sigma-1 receptor agonists as therapeutic drugs for cognitive impairment in neuropsychiatric diseases. *Curr Pharm Des.* 18, 875–83.
41. Nobile, M., Lagostena, L., 1998. A discriminant block among K⁺ channel types by phenytoin in neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol.* 124, 1698–702.
42. Noyer, M., Gillard, M., Matagne, A., Hénichart, J. P., Wülfert, E., 1995. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) appears to act via a specific binding site in CNS membranes. *Eur J Pharmacol.* 286, 137–46.
43. Okuyama, S., Imagawa, Y., Ogawa, S., Araki, H., Ajima, A., Tanaka, M., Muramatsu, M., Nakazato, A., Yamaguchi, K., Yoshida, M., 1993. NE-100, a novel sigma receptor ligand: in vivo tests. *Life Sci.* 53, PL285–90.
44. Pabba, M., 2013. The essential roles of protein–protein interaction in sigma-1 receptor functions. *Front Cell Neurosci.* 7, 50.

45. Poncelet, M., Hakkou, F., Simon, P., 1984. Psychopharmacological profile of diphenylhydantoin in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8, 373–8.
46. Reeta, K. H., Mehla, J., Gupta, Y. K., 2009. Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Brain Res.* 1301, 52–60.
47. Robel, P., Young, J., Corpéchet, C., Mayo, W., Perché, F., Haug, M., Simon, H., Baulieu, E. E., 1995. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 53, 355–60.
48. Rush, A. M., Elliott, J. R., 1997. Phenytoin and carbamazepine: differential inhibition of sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett.* 226, 95–8.
49. Schmidt, H. R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., Kruse, A. C., 2016. Crystal structure of the human $\sigma 1$ receptor. *Nature* 532, 527–30.
50. Schwartz, T. W., Holst, B., 2007. Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol Sci.* 28, 366–373.
51. Shin, E.-J., Nah, S.-Y., Kim, W.-K., Ko, K. H., Jhoo, W.-K., Lim, Y.-K., Cha, J. Y., Chen, C.-F., Kim, H.-C., 2005. The dextromethorphan analog dimemorfan attenuates kainate-induced seizures via sigma-1 receptor activation: comparison with the effects of dextromethorphan. *Br J Pharmacol.* 144, 908–18.
52. Skuza, G., 1990. Effect of sigma ligands on the cocaine-induced convulsions in mice. *Pol J Pharmacol.* 51, 477–83.
53. Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., Ruoho, A. E., 2010. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol Sci.* 31, 557–566.
54. Su, T.-P., London, E. D., Jaffe, J. H., 1988. Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* 240, 219–21.
55. Tiurenkov, I. N., Bagmetov, M. N., Epishina, V. V., 2007. [Comparative evaluation of the neuroprotective activity of phenotropil and piracetam in laboratory animals with experimental cerebral ischemia]. *Eksp Klin Farmakol.* 70, 24–9.
56. Todorovic, S. M., Lingle, C. J., 1998. Pharmacological properties of T-type Ca^{2+} current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol.* 79, 240–52.
57. Tunnicliff, G., 1996. Basis of the antiseizure action of phenytoin. *Gen Pharmacol.* 27, 1091–7.
58. Vamvakidès, A., 2002. [Mechanism of action of tetrahydro-N, N-dimethyl-5, 5-diphenyl-3-furanemethanamine, a putative nootropic, anti-epileptic and antidepressant compound]. *Ann Pharm Fr.* 60, 415–22.
59. Van Waarde, A., Ramakrishnan, N. K., Rybczynska, A. A., Elsinga, P. H., Ishiwata, K., Nijholt, I. M., Luiten, P. G. M., Dierckx, R. A., 2011. The cholinergic system, sigma-1 receptors and cognition. *Behav Brain Res.* 221, 543–554.

60. Villard, V., Espallergues, J., Keller, E., Vamvakides, A., Maurice, T., 2011. Anti-amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/sigma-1 ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative. *J Psychopharmacol.* 25, 1101–1117.
61. Zvejniece, L., Svalbe, B., Makrecka, M., Liepinsh, E., Kalvinsh, I., Dambrova, M., 2010. Mildronate exerts acute anticonvulsant and antihypnotic effects. *Behav Pharmacol.* 21, 548–55.
62. Zvejniece, L., Svalbe, B., Veinberg, G., Grinberga, S., Vorona, M., Kalvinsh, I., Dambrova, M., 2011. Investigation into stereoselective pharmacological activity of phenotropil. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 109, 407–12.