Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte Latvia University of Life Sciences and Technologies

> Veterinārmedicīnas fakultāte Faculty of Veterinary medicine



# Mg.med.vet. Gundega Štelfa

# PIRMSKLĪNISKO PĒTĪJUMU EKSPERIMENTĀLIE MODEĻI GALVAS TRAUMU PĒTĪJUMIEM AR JAUNĀM ZĀĻU VIELĀM

# EXPERIMENTAL MODELS FOR PRECLINICAL INVESTIGATIONS OF NOVEL DRUGS FOR TRAUMATIC BRAIN INJURY

Promocijas darba KOPSAVILKUMS Zinātnes doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai Veterinārmedicīnas zinātnē

SUMMARY of the Doctoral Thesis for the Doctoral degree of Science (*Ph.D.*)

Jelgava 2024

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā, doktorantūras studiju ietvaros Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Veterinārmedicīnas fakultātē laika periodā no 2018. līdz 2023.gadam. Pētījums izstrādāts ar Eiropas Savienības pētniecības un inovācijas atbalsta programmas Apvārsnis 2020 (granta Nr.857394), Eiropas Savienības ERA-NET projekta Trains un CnsAflame, un Latvijas Organiskās Sintēzes institūta studentu granta IG-2022-01 atbalstu. S1R-/- CD-1 peles nodrošināja *Laboratorios Esteve S.A.* (Barselona, Spānija).

The research was carried out Laboratory of Pharmaceutical Pharmacology, Latvian Institute of Organic Synthesis. The doctoral studies were carried out at Latvia University of Life Sciences and Technologies, Faculty of Veterinary medicine in period from 2018 to 2023. The research was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 857394, EU-ERA-NET NEURON projects TRAINS and CnsAflame and Latvian Institute of Organic Synthesis internal grant for PhD students No. IG-2022-01. The author thanks Laboratorios Esteve, S.A. (Barcelona, Spain) for providing CD-1 background S1R-/- mice.

#### Promocijas darba zinātniskie vadītāji/ Supervisors:

*Dr.med.vet.* **Ilmārs Dūrītis**, Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes profesors/ *Professor at Latvia University of Life Sciences and Technologies;* 

Dr.pharm. Maija Dambrova, Latvijas Organiskās sintēzes institūta (LOSI) Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītāja, Rīgas Stradiņa universitātes profesore/ Professor at Riga Stradins University, Head of Laboratory of Pharmaceutical Pharmacology ay Latvian Institute of Organic synthesis

#### Darba zinātniskā konsultante/ Scientific advisor:

*Dr.med.* Līga Zvejniece, LOSI Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijas vadošā pētniece/ *Leading researcher at Latvian Institute of Organic synthesis* Oficiālie recenzenti/ *Official reviewers*:

Dr.med.vet. Anda Valdovska – LBTU Veterinārmedicīnas fakultātes profesore/ Professor at Latvia University of Life Sciences and Technologies; Dr.med. Baiba Jansone – Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes profesore/ Professor at University of Latvia;

*PhD* **Monika Jürgenson** – Tartu Universitāte, Medicīnas fakultātes pētniece/ *Researcher at University of Tartu*  Promocijas darba aizstāvēšana notiks LBTU Veterinārmedicīnas zinātnes Promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 15.martā Veterinārmedicīnas fakultātē (Kristapa Helmaņa iela 8, Jelgava) A300 auditorijā plkst.10:00.

The defense of the doctoral thesis will be held at the open meeting of the LBTU Doctoral Council for Veterinary Medicine at 10:00 on March 15, 2024 at the Faculty of Veterinary Medicine, 8 Helmana Street, Jelgava, auditorium No A300.

# SATURS/ CONTENTS

DA OF	ARBA	APROBĀCIJA - PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES/ APPROBATION STUDY – PUBLICATIONS AND THESIS	1			
1.	IEV	ADS	)			
	1.1.	Traumatisks smadzeņu bojājums10	)			
	1.2.	Traumatiska smadzeņu bojājuma eksperimentālie modeļi 10	)			
	1.3.	Funkcionālais stāvoklis pēc traumatiska smadzeņu bojājuma 11	l			
	1.4.	Terapijas iespējas pēc traumatiska smadzeņu bojājuma12	<u>,</u>			
	1.4.1.	Mitohondriju aizsardzība12	2			
	1.4.2.	Sigma-1 receptors	3			
	1.5.	Promocijas darba mērķis14	1			
	1.6.	Promocijas darba uzdevumi14	1			
	1.7.	Promocijas darbā izvirzītā tēze14	1			
	1.8.	Promocijas darba zinātniskā novitāte 15	5			
	1.9.	Promocijas darba uzbūve15	5			
2.	MA	TERIĀLS UN METODES15	5			
	2.1.	Pētījuma laiks, vieta un pētījuma shēma 15	5			
	2.2.	Materiāla raksturojums	5			
	2.2.1.	Dzīvnieki16	5			
	2.2.2.	Ķīmiskie savienojumi	7			
	2.3.	Metodikas apraksts	7			
izra	2.3.1. aisīšana	Eksperimentālie modeļi traumatiska galvas smadzeņu bojājuma ai	ı 7			
2.3.2. R-fenibuta un BD-1063 kvantitatīvā analīze smadzeņu audu u asins plazmas paraugos						
ana	2.3.3. alīze	mRNS izolēšana un kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcijas	5			
izn	2.3.4. neklēša	Galvas smadzeņu histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā na19	i )			
	2.3.5.	Mitohondriju funkcionalitātes mērījumi	)			
	2.3.6.	Dzīvnieku uzvedības testi	I			

	2.3.7.	Datu apstrādes statistiskās metodes							
3.	8. REZULTĀTI UN DISKUSIJA								
tra	3.1. Neiroloģiskais stāvoklis un iekaisuma reakcija pēc kontūzijas tipa traumatiska smadzeņu bojājuma (I publikācija)24								
mc	<ol> <li>Fenibuta neiroprotektīvie efekti pēc vidēji smagas galvas traumas nodeļa (II publikācija)</li></ol>								
3.2.1. R-fenibuta ievadīšanas ietekme uz TSB izraisītiem funkcionāliem un morfoloģiskiem bojājumiem									
3.2.2. R-fenibuta ietekme uz smadzeņu mitohondriju funkciju normoksijas apstākļos un pēc anoksijas-reoksigenācijas									
3.3. Sigma-1 receptors kā potenciāls zāļu mērķis traumatiska smadzeņu bojājuma ārstēšanā (III publikācija)									
3.4. Ilgtermiņa uzvedības izmaiņas pēc šķidruma perkusijas traumatiska smadzeņu bojājuma (IV publikācija)									
SE	CINĀJ	UMI							
PR	IEKŠL	.IKUMI							
1.	INTRODUCTION4								
	1.1.	Traumatic Brain injury							
	1.2.	.2. Animal models of traumatic brain injury							
	Functional outcomes following traumatic brain injury								
	1.4. Treatment strategies after traumatic brain injury								
	1.4.1. Mitochondrial-targeted therapy								
	1.4.2. Sigma-1 receptor								
	1.5. Aim of the thesis								
1.6. Objectives of the thesis									
	1.7.	Hypothesis of the thesis							
	1.8.	Scientific novelty							
	1.9.	Structure of the thesis							
2.	MA	THERIAL AND METHODS51							
	2.1.	Study time, place and study scheme							
	2.2.	Materials							

2.2.1. Animals							
2.2.2. Chemicals							
2.3. Methods							
2.3.1. Experimental models of TBI							
2.3.2. Determination of R-phenibut and BD-1063 in plasma and brain tissue							
2.3.3. Quantitative real-time polymerase chain reaction							
2.3.4 Brain tissue preparation for histological analysis and immunohistochemistry of free-floating sections							
2.3.5. Measurements of mitochondrial functionality							
2.3.6. Behavioral tests							
2.3.7. Statistical analysis							
3. RESULTS AND DISCUSSION							
3.1. Neurological status and inflammatory response in the brain after weight-drop injury (Publication I)							
3.2. Neuroprotective effects of R-phenibut following moderate traumatic brain injury (Publication II)							
3.2.1. The effects of R-phenibut on TBI-induced functional deficits and morphological changes in the brain tissue							
3.2.2. The effects of R-phenibut on mitochondrial functionality in the brain tissue							
3.3. Sigma-1 receptor as a potential therapeutic target for traumatic brain injury (Publication III)							
3.4. Long-term behavioral outcomes following lateral fluid percussion injury (Publication IV)74							
CONCLUSIONS							
RECOMMENDATIONS							
LITERATŪRAS SARAKSTS/ REFERENCES							

# DARBA APROBĀCIJA - PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES/ APPROBATION OF THE STUDY – PUBLICATIONS AND THESIS

Promocijas darba pamatā ir 4 publikācijas, uz kurām atsauces tekstā veidotas, izmantojot romiešu ciparus:

This thesis is based on four publications, referred to by Roman numerals in the text:

- I. Zvejniece L, Stelfa G, Vavers E, Kupats E, Kuka J, Svalbe B, Zvejniece B, Albert-Weissenberger C, Sirén AL, Plesnila N, Dambrova M. Skull Fractures Induce Neuroinflammation and Worsen Outcomes after Closed Head Injury in Mice. J Neurotrauma. 2020; 37(2):295-304
- II. Kupats E, Stelfa G, Zvejniece B, Grinberga S, Vavers E, Makrecka-Kuka M, Svalbe B, Zvejniece L, Dambrova M. Mitochondrial-Protective Effects of R-Phenibut after Experimental Traumatic Brain Injury. Oxid Med Cell Longev. 2020; 2020:9364598
- III. Stelfa G, Vavers E, Svalbe B, Serzants R, Miteniece A, Lauberte L, Grinberga S, Gukalova B, Dambrova M, Zvejniece L. Reduced GFAP Expression in Bergmann Glial Cells in the Cerebellum of Sigma-1 Receptor Knockout Mice Determines the Neurobehavioral Outcomes after Traumatic Brain Injury. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 11611
- IV. Stelfa G, Svalbe B, Vavers E, Duritis I, Dambrova M, and Zvejniece L. Moderate traumatic brain injury triggers long-term risks for the development of peripheral pain sensitivity and depressive-like behavior in mice. Front. Neurol. 2022, 2044

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās starptautiskās konferencēs: *Results are reported in the following international conferences:* 

- Stelfa G, Svalbe B, Vavers E, Duritis I, Dambrova M, Zvejniece L. Timedependent development of remote pain sensitisation following the TBI in mice. FAT4BRAIN International summer school in functional pharmacology, 6-10.jūnijs, 2022.gads, Rīga, Latvija (mutisks ziņojums)
- 2. **Stelfa G**, Svalbe B, Vavers E, Zvejniece L, Dambrova M. Mitochondrial function in experimental traumatic brain injury. FAT4BRAIN Workshop on mitochondrial function in CNS-related applications: from pre-clinical to clinical studies, 2.-3.maijs, 2022.gads, Insbruka, Austrija (mutisks ziņojums)

- 3. **Stelfa G**, Vavers E, Svalbe B, Serzants R, Grinberga S, Gukalova B, Dambrova M, Zvejniece L. Amelioration of neurobehavioral deficits after traumatic brain injury in sigma-1 receptor knockout mice. 3rd European Symposium on the "Physiopathology of Sigma-1 Receptors", 7.-9.oktobris, 2021.gads, Bari, Itālija (mutisks ziņojums)
- 4. **Stelfa G**, Zvejniece L. Traumatic brain injury potentiates remote pain sensitization and induces depressive-like behavior in mice. Era-Net Neuron TRAINS Annual meeting, 3.novembris, 2020.gads, tiešsaistē (mutisks ziņojums)
- Stelfa G, Zvejniece L, Kupats E, Vavers E, Svalbe B, Dambrova M. The effects of R-phenibut in experimental model of fluid percussion injury. Mid-term Symposium of JTC2016: "External Insults to the Nervous System", 21.-23.janvāris, 2019.gads, Bonna, Vācija (stenda ziņojums)
- 6. Stelfa G, Vavers E, Svalbe B, Kupats E, Lauberte L, Zvejniece B, Dambrova M, Zvejniece L. The improved neurobehavioural outcome after traumatic brain injury in sigma-1 receptor knockout mice. 2nd European Symposium on Physiopathology of sigma-1 receptors, 31.maijs 2.jūnijs, 2019.gads, Rīga, Latvija (mutisks ziņojums)
- 7. **Stelfa G**. Weight-drop model of traumatic brain injury results in more severe inflammatory response in animals with skull fracture. EBS3+ Conference of Latvian Lithuanian and Estonian Biochemical Societies, Young Researchers Day, 17.-19.jūnijs, 2019.gads, Rīga, Latvija (mutisks ziņojums)
- 8. **Stelfa G**. Preclinical models of closed head injury in mice. Baltic Summer school on behavioural characterization of rodent models of major brain disorders, 26.-30.augusts, 2019.gads, Puhajarve, Igaunija (mutisks ziņojums)
- 9. Stelfa G, Makrecka-Kuka M, Zvejniece L, Svalbe B, Vavers E, Kupats E, Dambrova M. Neuroprotective compound R-phenibut protects brain mitochondria against anoxia-reoxygenation damage in vitro. 13th Conference on Mitochondrial Physiology: The role of mitochondria in health, disease and drug discovery, 18.-21.septembris, 2018.gads, Jūrmala, Latvija (mutisks ziņojums)
- 10. Vikmane G (pēc laulībām Stelfa), Vavers E, Zvejniece E, Kupats E, Zvejniece L, Dambrova M. Weight-drop model of TBI results in more severe outcomes in animals with skull fracture. 10th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, 9.-11.oktobris, 2018.gads, Drēzdene, Vācija (stenda ziņojums)

	Ι	п	ш	IV
Ideja/ Original idea	MD, LZ, CW, AS, NP	MD,LZ, EK	GS, MD, LZ	GS, MD, LZ
Pētījuma plāns/ Study design	MD, LZ, CW, AS, NP	MD, LZ, EK, EV, BS, MMK	GS, EV, BS, MD, LZ	GS, MD, LZ, EV, BS, ID
Datu ievākšana/ Data collection	EV, BS, JK, BZ	<b>GS</b> , EK, BZ, EV, BS	GS, EV, BS, RS, LL	GS, LZ, BS
Datu analīze/ Data analysis	GS, EV, EK, JK, BS, BZ, LZ	GS, EK, BZ, BS, EV, MMK, SG, LZ	<b>GS</b> , EV, BS, RS, AM, SG, BG, LZ	GS, LZ, EV, BS, ID
Manuskripta sagatavošana/ Manuscript preparation	<b>GS</b> , LZ, EV, EK, JK, BS, BZ, CW, AS, NP, MD	<b>GS</b> , EK, EV, MMK, BS, LZ, MD	<b>GS</b> , EV, BS, SG, MD, LZ	GS, MD, LZ, EV, BS, ID

# Autoru ieguldījums publikācijās/ The contribution of the authors

AM - Anna Miteniece, AS - Anna-Leena Siren, BK - Baiba Gukālova, BS - Baiba Švalbe, BZ - Baiba Zvejniece, CW - Christiane Albert-Weissenberger, EV - Edijs Vāvers, EK - Einārs Kupāts, GS - Gundega Štelfa, ID - Ilmārs Dūrītis, JK - Jānis Kūka, LL - Lāsma Ļauberte, LZ - Līga Zvejniece, MD - Maija Dambrova, MK -Marina Makrecka-Kūka, NP - Nikolaus Plesnila, RS - Rinalds Seržants, SG - Solveiga Grīnberga

### 1. IEVADS

#### 1.1. Traumatisks smadzeņu bojājums

Par traumatisku smadzeņu bojājumu (TSB) sauc ārēja spēka izraisītus smadzeņu funkcijas traucējumus. TSB ir heterogēns bojājums, kas saistāms ar daudzām etioloģijām un klīniskām izpausmēm un ietver difūzu, fokālu, penetrējošu vai viļņveida bojājumu (Berkner et al., 2016; De Guzman and Ament, 2017). Cilvēkiem visbiežāk sastopamas ir slēgtas vieglas un vidēji smagas galvas traumas, kas veido aptuveni 90% no visām galvas traumām (Dewan et al., 2018). Biežākie TSB cēloņi Eiropas Savienībā ir ceļu satiksmes negadījumi un kritieni, retāk TSB tiek iegūts sporta un karadarbības rezultātā (Brazinova et al., 2021). TSB ir viens no biežākajiem neiroloģisko traucējumu, invaliditātes un nāves cēloņiem bērnu, pieaugušo un gados vecāku cilvēku vidū, radot nopietnas sabiedrības veselības problēmas visā pasaulē (Majdan et al., 2022). Eiropā katru gadu aptuveni 1,5 miljoni iedzīvotāju gūst TSB, un no šiem pacientiem aptuveni 57 000 mirst un 100 000 kļūst par invalīdiem (Majdan et al., 2022). Eiropā TSB sastopamības biežums variē no 47,3 līdz 849 gadījumiem uz 100 000 iedzīvotāju gadā (Brazinova et al., 2021).

Mazajiem dzīvniekiem (suņiem un kaķiem) biežākie TSB cēloņi ir ceļu satiksmes negadījumi, kritieni no liela augstuma un cilvēku uzbrukumi (Santos et al., 2018; Elias et al., 2019). Nepietiekamas mazo dzīvnieku klīnisko datu informācijas dēļ TSB ārstēšana, galvenokārt, balstās uz datiem no pētījumiem eksperimentālajos dzīvniekos (mazajos grauzējos) un cilvēkos (Santos et al., 2018; Elias et al., 2019; Evans and Fernandez, 2019). Līdz ar to standartizētu eksperimentālo dzīvnieku modeļu izmantošana ir nozīmīga, lai noskaidrotu TSB bioķīmiskos un molekulāros mehānismus un novērtētu eksperimentālo zāļu efektivitāti un drošību humānajā un veterinārajā medicīnā.

#### 1.2. Traumatiska smadzeņu bojājuma eksperimentālie modeļi

Pēdējā desmitgadē liela uzmanība tiek pievērsta padziļinātiem TSB pētījumiem. Lai pētītu TSB, tiek izmantoti slēgtas un atvērtas galvas traumas dzīvnieku modeļi (Namjoshi et al., 2013). Slēgtas galvas traumas rezultātā galvaskauss netiek skarts (Namjoshi et al., 2013), tikmēr atvērtas galvas traumas gadījumā tiek izsaukta kraniotomija jeb galvaskausa atvēršana, kur trieciens tiek veikts pret smadzeņu cieto apvalku (Flierl et al., 2009a; Albert-Weißenberger et al., 2012). Lai ierosinātu slēgtu galvas traumu, tiek izmantoti dažādi kontūzijas tipa modeļi (Marmarou et al., 1994; Flierl et al., 2009b; Albert-Weißenberger et al., 2012), ar virzuli ierosināts bojājums (Ren et al., 2013; Namjoshi et al., 2014; Meconi et al., 2018) un viļņveida trieciena galvas traumas modeļi (Cernak et al., 2011). Slēgtas galvas traumas ierosināšanai

visplašāk izmanto kontūzijas tipa modeļus, kur tiek izmantots noteikta smaguma brīvi krītošs atsvars (Xiong et al., 2013). Lai gan kontūzijas tipa modeļi tiek izmantoti jau vairākus gadu desmitus, starp dažādām pētnieku grupām pastāv būtiskas protokola atšķirības TSB izraisīšanai. Piemēram, brīvi krītošā atsvara smagums svārstās no 5 līdz 500 g, bet kritiena augstums - no 0,5 līdz 167 cm (Schwarzbold et al., 2010; Kane et al., 2012; Wu et al., 2012; Midura et al., 2015). Līdz ar to dažādu protokolu ietvaros izraisītais TSB izsauc būtiskas bioķīmisko rādītāju atšķirības, t.i. iekaisuma citokīnu ekspresijas līmenus, piemēram, audzēja nekrozes faktora (TNF)α, interleikīna (IL)-6, IL-12 un IL-1b gadījumā (Albert-Weissenberger et al., 2012; Zhang et al., 2014; Baratz et al., 2015; Gyoneva and Ransohoff, 2015). Ir zināms, ka vaļējas galvas traumas modeļi, tādi kā kontrolēti kortikālā trieciena (CCI) un šķidruma perkusijas bojājumi (FPI), kur nepieciešams izsaukt kraniotomiju, izraisa salīdzināmi palielinātu iekaisuma ribonukleīnskābes (RNS) un proteīnu ekspresiju (Xiong et al., 2013; Rowe et al., 2016; Clausen et al., 2018; Garg et al., 2018). Iepriekšējos pētījumos mēs esam novērojuši, ka aptuveni 30% peļu pēc kontūzijas tipa trieciena gūst galvaskausa lūzumus (dati nav publicēti), kas varētu liecināt, ka galvaskausa lūzums ir viens no galvenajiem faktoriem, kas izraisa iekaisuma gēnu ekspresijas izmaiņas galvas smadzeņu audos, tādejādi izsaucot mainīgu iekaisuma markieru ekspresiju pēc kontūzijas tipa bojājuma.

#### 1.3. Funkcionālais stāvoklis pēc traumatiska smadzeņu bojājuma

Lielākoties TSB ir akūts un pārejošs stāvoklis, tomēr izdzīvojušie pacienti var saskarties ar ilgstošu aprūpi, rehabilitāciju un no tām izrietošām ilgtermiņa sekām. Pēdējos gados ir plaši atzīts, ka neiroloģiskie traucējumi var attīstīties arī nedēļas, mēnešus vai pat gadus pēc sākotnējā TSB (Blennow et al., 2016; Wilson et al., 2017). Atkarībā no bojājuma smaguma, izdzīvojušiem pacientiem (gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem) novēro psiholoģiskus, fiziskus, kognitīvus un uztveres traucējumus, epilepsijas lēkmes, kā arī personības izmainas (Sande and West, 2010; Wilson et al., 2017). Ir zināms, ka pacientiem pēc TSB bieži sastopams simptoms ir arī sāpes (Gironda et al., 2009). Lielākoties pacientiem novēro galvas sāpes, kas ir tieši saistītas ar galvas smadzeņu audu bojājumiem (Irvine and David Clark, 2018). Ir zināms, ka sāpes novēro arī šķietami neskartos reģionos, piemēram, augšējās un apakšējās ekstremitātēs (Ofek and Defrin, 2007; Irvine and David Clark, 2018). Tomēr pēc TSB sāpes ārpus galvas reģiona var būt saistītas arī ar lokāliem bojājumiem (piemēram, lūzumi, brūces), perifēro neiropātiju vai ar TSB saistītu mugurkaula traumu (Irvine and David Clark, 2018). Līdz ar to hronisku sāpju anatomiskais avots TSB pacientiem bieži nav nosakāms (Walker, 2004). Mehānismi, kas ierosina ilgstošas sāpes pēc TSB, nav zināmi (Irvine and David Clark, 2018). Ir pētījumi, kur tiek ziņots, ka psiholoģiski traucējumi, piemēram, depresija, bieži tiek diagnosticēti kopā ar ilgstošām sāpēm (Khoury and Benavides, 2018). Tiek uzskatīts, ka abas klīniskās pazīmes viena otru pastiprina, un abām ir kopīgi mehānismi: neiromediatoru signālceli periakvaduktālā apvidus pelēkajā vielā (no anglu valodas periaqueductal gray), kas ir viena no galvenajām smadzeņu struktūrām sāpju modulācijā (Bair et al., 2003; Sullivan-Singh et al., 2014). Dzīvnieku modeļos reakcija uz perifēro mehānisko un termisko sāpju jutību ir pētīta laika periodā līdz 2 mēnešiem pēc CCI un FPI (da Silva Fiorin et al., 2018). Līdz šim tikai daži pētījumi ir novērtējuši ilgtermiņa sekas pēc TSB (vairāk nekā 6 mēnešus pēc TSB). Ir parādīts, ka pelēm pēc CCI, kas raksturojas ar plašu smadzeņu audu zudumu, 12 mēnešus pēc TSB novēro dažādus uzvedības traucējumus: depresijai līdzīgo uzvedību, atmiņas un motorās funkcijas traucējumus (Shear et al., 2004; Pöttker et al., 2017; Pischiutta et al., 2018; Mao et al., 2020). Tomēr mērenāks CCI (audu zudums tikai smadzeņu garozas reģionā), rada mazāk izteiktus uzvedības traucējumus ilgstošā laika periodā pēc TSB (Leconte et al., 2020). Līdz šim tikai dažos pētījumos ir novērtētas ilgstošas uzvedības izmaiņas žurkās pēc FPI, galvenokārt novērtējot tikai noteiktus laika posmus vai kognitīvo funkciju (Pierce et al., 1998; Immonen et al., 2009; Johnstone et al., 2015). Jāņem vērā, ka uzvedības izmaiņas var būt atkarīgas no pētījumā izmantotās pelu līnijas (Fox et al., 2009). Lielākā dala ilgtermina TSB pētījumi ir veikti C57BL/6 līnijas pelēs. Ir zināms, ka dažādām peļu līnijām ir atšķirīgas uzvedības izpausmes (Bothe et al., 2005). Piemēram, C57BL/6 un BALB/c pelēm ir novērotas atšķirības trauksmes un depresijai līdzīgās uzvedības izpausmē, sāpju jutīgumā, motorā un kognitīvā funkcijā (Mogil et al., 1999; Lucki et al., 2001; An et al., 2011; Garcia and Esquivel, 2018).

# 1.4. Terapijas iespējas pēc traumatiska smadzeņu bojājuma

#### 1.4.1. Mitohondriju aizsardzība

TSB radīto komplikāciju ārstēšanai (Eiropas Zāļu Aģentūra) nav pieejama neviena apstiprināta terapija. TSB ārstēšanas iespējas ir ierobežotas tā sarežģītās patoģenēzes un izpausmju dēļ, kas ietver dažādus klīniskos simptomus un centrālās nervu sistēmas (CNS) bojājumus asinsvadu, aksonu un citu smadzeņu audu struktūru līmenī (Xiong et al., 2013; Berkner et al., 2016; De Guzman and Ament, 2017). Viens no patoloģiskiem procesiem, kas aizsākas jau pirmajās minūtēs pēc TSB, ir reaktīvo skābekļa radikāļu (ROS) veidošanās mitohondrijos, kā rezultātā tiek izjaukta kalcija jonu (Ca<sup>2+</sup>) homeostāze, kas izsauc toksisku šūnu degradāciju (Görlach et al., 2015; Granger and Kvietys, 2015). Neironu Ca<sup>2+</sup> homeostāzes un mitohondriju funkcionalitātes nodrošināšana ir svarīga, lai novērstu sekundārus neironu bojājumus (Bains and Hall, 2012; Weber, 2012). Līdz ar to TSB ārstēšanā varētu tikt izmantotas uz mitohondrijiem mērkētas zāles un zāles, kas iedarbojas uz specifiskiem iekššūnu Ca<sup>2+</sup> signalizācijas celiem vai subcelulāriem komponentiem (Hall et al., 2010; Cheng et al., 2012). Ir zināms, ka kalcija kanāla α<sub>2</sub>δ apakšvienības iesaistās mitohondriju Ca<sup>2+</sup> homeostāzes regulēšanā patoloģiskos apstākļos (D'Arco et al., 2015). Fenibuts tiek izmantots kā garastāvokli uzlabojošs, anksiolītisks un nootrops medikaments (Lapin, 2001a; Kupats et al., 2020a). Fenibutu ražo kā racemātu, kas sastāv no diviem optiskiem izomēriem. R-fenibuts ((3R)-fenil-4-aminosviestskābe) saistās ar GABA-B receptoriem un no sprieguma atkarīgo kalcija kanālu  $\alpha_2\delta$  apakšvienību (VDCC). Savukārt, S-fenibuts saistās tikai ar VDCC  $\alpha_2\delta$  apakšvienību (Dambrova et al., 2008; Zvejniece et al., 2015; Belozertseva et al., 2016). Tā kā abi fenibuta optiskie izomēri saistās ar VDCC a28 apakšvienību un tikai R-fenibuts saistās ar GABA-B receptoriem, šos abus izomērus var izmantot, lai noskaidrotu iespējamos fenibuta molekulāros mehānismus dažādos eksperimentālos modeļos. Līdz šim fenibuta terapeitiskie efekti nav pētīti eksperimentālā TSB modelī. Iepriekšējie pētījumi ir parādījuši, ka ārstēšana ar R-fenibutu ievērojami samazināja smadzeņu bojājuma lielumu un palielināja smadzeņu neirotrofiskā faktora un asinsvadu endotēlija augšanas faktora gēnu ekspresiju bojātajos smadzeņu audos pēc eksperimentālas cerebrālās išēmijas (Vavers et al., 2016). Tā kā cerebrālās išēmijas un TSB patoģenēzes mehānismi ir līdzīgi, R-fenibutam varētu piemist neiroprotektīvi efekti arī pēc eksperimentāla TSB.

# 1.4.2. Sigma-1 receptors

Sigma-1 receptors (S1R) ir jauns molekulārs mērķis neiroloģisko saslimšanu ārstēšanai (Nguyen et al., 2015). S1R ir endoplazmatiskā tīkla proteīns, kas ir plaši izplatīts dažādos orgānos, tostarp CNS (Su, 1994). Ir pierādīts, ka S1R piedalās gan neirodeģeneratīvo, gan išēmisko slimību patoģenēzē, tostarp Alcheimera slimībā, Parkinsona slimībā, amiotrofās laterālās sklerozes, insulta un TSB patoģenēzē (Nguyen et al., 2015; Shi et al., 2021). Genētiska S1R deaktivācija un farmakoloģiska tā inhibīcija ir saistīta ar neirodeģeneratīvu fenotipu (Nguyen et al., 2015; Vavers et al., 2017). Iepriekš ir pierādīts, ka specifiskiem S1R agonistiem piemīt neiroprotektīvas īpašības, samazinot neirodeģenerāciju un mikroglijas aktivāciju TSB dzīvnieku modeļos, kā arī jaundzimušo hipoksisku/išēmisku smadzeņu bojājumu gadījumā (Wegleiter et al., 2014; Dong et al., 2016). Tomēr arī S1R antagonistiem piemīt neiroprotektīva iedarbība eksperimentālos smadzeņu išēmijas modeļos. Piemēram, pelēm, kas tika ārstētas ar antagonistu S1RA, bija ievērojami samazināts smadzeņu infarkta lielums un neiroloģiskie traucējumi pēc vidējās smadzeņu artērijas oklūzijas (MCAO) (Sánchez-Blázquez et al., 2018). Turklāt haloperidolam, kas ir neselektīvs S1R antagonists, piemīt neiroprotektīvas īpašības eksperimentālas smadzeņu išēmijas gadījumā (Schetz et al., 2007). Interesanti, ka S1R ģenētiskas inaktivācijas un farmakoloģiskas blokādes gadījumā

novēro antinociceptīvu aktivitāti pelēm pēc traumatiska muguras smadzeņu bojājuma (TMSB) (Castany et al., 2018). Turpretim S1R aktivēšana samazina neironu izdzīvošanu un motoro funkciju atjaunošanos pēc TMSB (Lattard et al., 2021). Tādējādi dažādi S1R ligandi var radīt pretējus efektus atšķirīgos neirodeģeneratīvo slimību modeļos, tāpēc ir nepieciešami tālāki pētījumi, izmantojot S1R ligandus dažādos *in vivo* modeļos.

#### 1.5. Promocijas darba mērķis

Promocijas darba mērķis ir galvas traumu eksperimentālās modeļsistēmas pilnveidošana un jaunu potenciālo zāļu mērķu noskaidrošana galvas traumas un tās izraisīto neiroloģisko simptomu ārstēšanai vai attīstības aizkavēšanai.

#### 1.6. Promocijas darba uzdevumi

Promocijas darbā izvirzīti četri uzdevumi:

1.Raksturot iekaisuma reakcijas atbildi pēc kontūzijas tipa traumatiska smadzeņu bojājuma un salīdzināt rezultātus kā galvaskausa lūzums ietekmē neiroloģisko stāvokli un iekaisumu.

2.Novērtēt R-fenibuta terapijas ietekmi uz neiroloģisko stāvokli un smadzeņu audu mitohondriju funkcionalitāti pēc šķidruma perkusijas traumatiska smadzeņu bojājuma izraisīšanas.

3.Pētīt S1R lomu traumatiska smadzeņu bojājuma attīstībā un patoģenēzē.

4.Noteikt TSB izsauktās īstermiņa un ilgtermiņa (līdz 12 mēnešiem) uzvedības pārmaiņas pēc šķidruma perkusijas traumatiska smadzeņu bojājuma.

#### 1.7. Promocijas darbā izvirzītā tēze

Promocijas darbā izvirzīta viena tēze:

Eksperimentālais šķidruma perkusijas galvas traumas modelis ir izmantojams jaunu zāļu un TSB patoģenēzes mehānismu pētījumos.

#### 1.8. Promocijas darba zinātniskā novitāte

1. Promocijas darbā apkopotie rezultāti pirmo reizi starptautiskā līmenī sniedz informāciju un datus par jaunām terapijas iespējām traumatiska smadzeņu bojājuma radīto komplikāciju ārstēšanā humānajā un veterinārajā medicīnā.

2. Novērtēta R-fenibuta neiroprotektīvā ietekme (funkcionālais iznākums, mitohondriālā funkcija un neirodeģenerācija) pēc vidēji smagas galvas traumas eksperimentālajos dzīvniekos, izmantojot šķidruma perkusijas galvas traumas modeli.

3. Pētīta S1R loma traumatiska smadzeņu bojājuma patoģenēzē un funkcionālo traucējumu attīstībā akūti un ilgstošā laika periodā pēc bojājuma, izmantojot S1R izgrieztā gēna peles. 4. Noteiktas ilgstošas uzvedības pārmaiņas (līdz 12 mēnešiem) pēc šķidruma perkusijas bojājuma pelēs; turklāt pirmo reizi novērtēta perifēro sāpju jutība tik ilgā laika periodā pēc traumas.

5. Raksturota iekaisuma reakcijas atbilde pēc slēgtas un vaļējas (pēc galvaskausa lūzuma) galvas traumas, izmantojot kontūzijas tipa eksperimentālo modeli.

#### 1.9. Promocijas darba uzbūve

Promocijas darbs sastāv no četrām publikācijām, kas apvieno pētījumu par kontūzijas tipa un šķidruma perkusijas bojājuma eksperimentālās modeļsistēmas pilnveidošanu un jaunām terapijas iespējām pēc traumatiska smadzeņu bojājuma. Promocijas darba pirmajā publikācijā raksturota iekaisuma reakcijas atbilde un funkcionālais stāvoklis pēc slēgta un vaļēja (galvaskausa lūzums) traumatiska smadzeņu bojājuma, izmantojot kontūzijas tipa eksperimentālo galvas traumas modeli. Otrajā publikācijā novērtēta R-fenibuta neiroprotektīvā ietekme uz funkcionālo stāvokli un smadzeņu audu morfoloģiju un mitohondriju funkcionalitāti akūti pēc šķidruma perkusijas traumatiska smadzeņu bojājuma. Trešajā publikācijā raksturotas akūtas un ilgstošas funkcionālās pārmaiņas pēc šķidruma perkusijas traumatiska smadzeņu bojājuma. Ceturtajā publikācijā pētīta S1R loma traumatiska smadzeņu bojājuma radīto komplikāciju attīstībā akūti un ilgstoši pēc šķidruma perkusijas eksperimentālā galvas traumas modeļa.

# 2. MATERIĀLS UN METODES

#### 2.1. Pētījuma laiks, vieta un pētījuma shēma

Promocijas darbs izstrādāts laika posmā no 2018. – 2023.gadam – Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā.

Pētījums sastāv no 4 savstarpēji saistītiem eksperimentiem. 1.eksperimentā (Publikācija I) Swiss-Webster (SW) pelu tēviniem ierosināja slēgtu galvas traumu, izmantojot kontūzijas tipa TSB iekārtu. Dzīvniekus iedalīja divās grupās: viltus operētie (n=24) un TSB (n=85). Traumētie dzīvnieki tika iedalīti divās apakšgrupās: dzīvnieki bez galvaskausa lūzuma (n=52) un dzīvnieki ar lūzumu (viegls lūzums n=7, vidēji smags lūzums n=12, smags lūzums n=14). Pēc tam novērtēja neiroloģisko stāvokli un iekaisuma gēnu ekspresija galvas smadzeņu audos. 2.eksperimentā (Publikācija II) SW pelu tēviniem ierosināja vidēji smagu galvas traumu, izmantojot šķidruma perkusijas TSB iekārtu. Dzīvnieki iedalīja 4 grupās: viltus (n=8), TSB (kontroles grupa, n=8) un TSB grupas dzīvnieki, kas saņēma R-fenibutu devā 10 mg/kg (n=12) vai 50 mg/kg (n=10). R-fenibuts tika ievadīts intraperitoneāli (i.p.) 2 h pēc traumas ierosināšanas un vienu reizi dienā 7 dienas pēc kārtas. Pēc tam novērtēja neiroloģisko stāvokli un 7.dienā pēc bojājuma ievāca smadzeņu paraugus histoloģiskai izmeklēšanai. Papildus, SW pelu tēvini (n=6) tika izmantoti smadzenu homogenātu sagatavošanai un mitohondriju izolēšanai mitohondriju funkcionalitātes novērtēšanai. ICR peļu tēviņi (n=3 katrā laika punktā) tika izmantoti farmakokinētikas eksperimentam, lai noteiktu R-fenibuta (50 mg/kg) koncentrāciju smadzeņu audos un asins plazmā pēc i.p un perorālas ievadīšanas. 3.eksperimentā (Publikācija III) CD-1 peļu tēviņiem (wild-type WT/kontroles grupa) un Sigma-1 receptora izgrieztā gēna peļu tēviņiem (S1R-/-) tika ierosināta vidēji smaga galvas trauma, izmantojot šķidruma perkusijas TSB iekārtu. Dzīvnieki tika iedalīti 4 grupās: WT viltus (n=10), S1R-/- viltus (n=10), WT TSB (n=12) un S1R-/- TSB (n=12). Pēc tam dažādos laika punktos tika novērtēta peļu uzvedība un 12 mēnešus pēc traumas ievākti galvas smadzenu paraugi histoloģiskai izmeklēšanai. Papildus WT pelu tēviņi tika izmantoti, lai noskaidrotu S1R antagonista BD-1063 efektus pēc šķidruma perkusijas TSB. Dzīvnieki tika iedalīti 5 grupās: naive (n=6), viltus (n=12), TSB (n=18), TSB + BD-1063 10 mg/kg (n=16), TSB + BD-1063 30 mg/kg (n=16). Pēc tam novērtēja neiroloģisko stāvokli un 7.dienā pēc traumas ievāca galvas smadzeņu paraugus histoloģiskai izmeklēšanai. SW peļu tēviņi (n=36) tika izmantoti, lai noskaidrotu BD-1063 koncentrāciju un S1R ekspresiju smadzenu audos. 4.eksperimentā (Publikācija IV) Balb/c peļu tēviņiem tika ierosināta vidēji smaga galvas trauma, izmantojot šķidruma perkusijas TSB iekārtu. Dzīvnieki tika iedalīti 2 grupās: viltus (n=10) un TSB (n=10). Tūlītējas un ilgtermiņa uzvedības pārmainas tika novērtētas dažādos laika punktos līdz 12 mēnešiem pēc traumas.

### 2.2. Materiāla raksturojums

#### 2.2.1. Dzīvnieki

Dzīvnieki (peles) 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.

SW līnijas peļu tēviņus (10 nedēļas veci) iegādājās no Laboratory Animal Center, Tartu Universitāte, Igaunija. ICR peļu tēviņus iegādājās no Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas, Rīgas Stradiņa Universitāte, Latvija. Sigma-1 receptora izgrieztā gēna peļu tēviņus (8-10 nedēļas veci) ar CD-1 līnijas fonu (S1R-/- CD1) iegādājās no Laboratorios Dr.Esteve S.A., Barselona, Spānija. CD-1 un Balb/c peļu tēviņus (10 nedēļas veci) iegādājās no Envigo, Nīderlande. 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 (atļaujas Nr.76 (izdota 2015.gadā), Nr. 95 (izdota 2018.gadā), Nr.104 (izdota 2019.gadā), Nr.105 (izdota 2019.gadā)).

#### 2.2.2. Ķīmiskie savienojumi

R-fenibuts ((3R)-4-amino-3-fenilbutānskābe) tika iegādāts no JSC Olainfarm (Latvija). BD-1063, 1-[2-(3,4-Dihlorfenil) etil]-4-metilpiperazīna dihidrohlorīds tika iegādāts no Tocris Bioscience (Apvienotā Karaliste). BD-1063 un R-fenibuta šķīdumi tika pagatavoti, izmantojot fizioloģisko šķīdumu (Fresenius Kabi, Polija).

#### 2.3. Metodikas apraksts

# 2.3.1. Eksperimentālie modeļi traumatiska galvas smadzeņu bojājuma izraisīšanai

Pētījumā izmantoja 2 dažādus eksperimentālos modeļus traumatiska galvas smadzeņu bojājuma izraisīšanai — kontūzijas tipa traumatisku smadzeņu bojājumu (viegla galvas trauma) un šķidruma perkusijas traumatisku smadzeņu bojājumu (vidēji smaga galvas trauma).

Metode viegla galvas traumas bojājuma izraisīšanai ir aprakstīta Publikācijā I. Īsumā, 30 min pirms manipulāciju uzsākšanas dzīvniekam zem ādas (s.c.) skausta rajonā injicēja tramadola (25 mg/kg) šķīdumu, lai novērstu pēcoperācijas sāpes. Dzīvnieki tika iemidzināti, izmantojot inhalējamo izoflurāna anestēziju (3 – 1,5%, kas izšķīdināta N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub> (1:1) maisījumā). Galvaskausam pa vidu veica garenisku griezumu un vizuāli identificēja peles kreiso-pakauša kaulu (2 mm uz sāniem no viduslīnijas un 2 mm uz kaudālo pusi no bregmas šuves) kā mērķa apgabalu. Silikona uzgali (5 mm diametrā) novietoja uz mērķa apgabala, pēc tam atbrīvoja atsvaru (90 g), kas brīvi krita caur cilindru no 8 cm augstuma uz peles galvu. Pēc tam

makroskopiski tika novērtēts galvaskauss, un dzīvnieki tika iedalīti 4 grupās: bez lūzumiem (galvaskauss bez redzamām izmaiņām/lūzumiem), viegls lūzumus (izolēts, lineārs lūzums bez redzamiem intrakraniāliem bojājumiem, asins izplūdumiem), vidējs lūzums (lineārs, diastātisks vai kaula fragmenti iespiedušies smadzeņu audos, bez redzamiem intrakraniāliem bojājumiem, asins izplūdumiem), smags lūzums (komplekss lūzums ar redzamiem intrakraniāliem bojājumiem, asins izplūdumiem). Ja novēroja respiratoru depresiju, dzīvniekiem tika nodrošināta papildus skābekļa pieplūde. Pēc manipulācijas āda tika aizšūta ar 6-0 (SurgiproTM II, Mansfield, ASV) izmēra ķirurģiskajiem diegiem. Viltus operētiem dzīvniekiem veica visas manipulācijas, izņemot atsvara atbrīvošanu.

Vidēji smagas galvas traumas izraisīšanas metode ir aprakstīta Publikācijā II, III, IV. Īsumā, 30 min pirms manipulāciju uzsākšanas dzīvniekam s.c. skausta rajonā injicēja tramadola (25 mg/kg) šķīdumu, lai novērstu pēcoperācijas sāpes. Dzīvnieki tika iemidzināti, izmantojot inhalējamo izoflurāna anestēziju (3 - 1,5%, kas izškīdināta N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub> (1:1) maisījumā). Dzīvnieku fiksēja stereotakses aparātā, un tika uzturēta 36 °C ķermeņa temperatūra, dzīvniekam atrodoties uz apsildāmās virsmas, kas bija savienota ar rektālo zondi. Uz galvas virsmas tika noskūts apmatojums, un galvaskausam pa vidu veica garenisku griezumu. Kraniotomija (3 mm diametrā) tika veikta uz viduslīnijas starp bregma un lambda šuvēm, atstājot smadzeņu apvalku neskartu. Izmantojot zobu cementu, virs kraniotomijas rajona tika piestiprināta plastmasas piltuvīte, kas tika piepildīta ar fizioloģisko šķīdumu. Pēc tam piltuvīte tika savienota ar šķidruma perkusijas ierīci (AmScienInstruments, Richmond, ASV) un, atbrīvojot vārstu, tika nodrošināts fizioloģiskā šķīduma vilnis uz galvaskausa dobumu jeb šķidruma perkusija. Tūlīt pēc traumas ierosināšanas dzīvnieku novēroja un, atjaunojoties refleksiem un normālai elpošanai, dzīvnieks tika atkārtoti anestezēts ar izoflurāna narkozi. Pēc tam tika nonemta plastmasas piltuvīte ar cementu, kaula gabals ievietots atpakal kraniotomijas vietā, pārklāts ar audu līmi un aizšūta āda. Viltus operētajiem dzīvniekiem veica visas manipulācijas, iznemot škidruma perkusiju.

### 2.3.2. R-fenibuta un BD-1063 kvantitatīvā analīze smadzeņu audu un asins plazmas paraugos

Metode ir aprakstīta publikācijā II un III. Īsumā, lai noteiktu R-fenibuta koncentrāciju asins plazmā un smadzeņu audos, pelēm intraperitoneāli (i.p). un perorāli (p.o.) tika ievadīts R-fenibuts devā 50 mg/kg. 15 un 30 min un 1, 2, 4, 6 un 24 h pēc R-fenibuta ievadīšanas ņēma asins plazmas un smadzeņu audu paraugus. Lai noteiktu BD-1063 koncentrāciju smadzeņu audos, pelēm tika s.c. ievadīts BD-1063 devā 30 mg/kg 7 dienas pēc kārtas, un smadzeņu audi tika ievākti 1 h pēc pēdējās BD-1063 injekcijas. R-fenibuta un BD-1063 kvantitatīvai analīzei smadzeņu audu un asins plazmas paraugos izmantoja ultra augstas izšķirtspējas šķidruma

hromatogrāfijas-tandēmmasspektrometrijas metodi (UPLC/MS/MS) ar pozitīvās elektroizsmidzināšanas jonizāciju (ESI+). UPLC veica, izmantojot šķidruma hromatogrāfu (Acquity UPLC, Waters) un kolonnu (Acquity UPLC BEH C18 50 mm×2,1 mm; 1,7 µm, Waters), savukārt MS/MS veica, izmantojot tandēmmasspektrometru (Micromass Quattro micro, Waters) ar ESI+. Kvantitatīvā analīze tika veikta, izmantojot MassLynx 4.1. un QuanLynx4.1 programmatūru (Waters).

# 2.3.3. mRNS izolēšana un kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcijas analīze

Metode ir aprakstīta publikācijā I un III. Kopējais smadzeņu audu RNS daudzums tika izolēts, izmantojot *RNA mini kit* (Life Technologies, Ņujorka, ASV) atbilstoši ražotāja protokolam. cDNS sintēze tika veikta, izmantojot reversās transkripcijas reaģentu komplektu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ASV), vadoties pēc ražotāja instrukcijām. Gēnu ekspresijas kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcijas analīze tika veikta, sajaucot SYBR® *Green Master Mix* (Life Technologies, Ņujorka, ASV), sintezēto cDNS un tādus praimerus kā S1R, IL-6, IL-1b, TNF- $\alpha$  metaloproteināzes audu inhibitors-1 (TIMP-1), metaloproteināzes-9 (MMP-9) (Metabion, Vācija), un izmantojot *Mic Real-Time PCR* instrumentu (Bio Molecular Systems, Upper Coomera, Austrālija). Katra gēna relatīvie ekspresijas līmeņi tika aprēķināti ar  $\Delta\Delta$ Ct metodi un normalizēti pret  $\beta$ -aktīna references gēna ekspresijas līmeņa rādījumu.

# 2.3.4. Galvas smadzeņu histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Metode ir aprakstīta publikācijā II un III. Dzīvnieki tika anestezēti ar ketamīna (200 mg/kg) un ksilazīna (15 mg/kg) i.p. injekcijas palīdzību. Pēc anestēzijas iedarbošanās pelēm veica transkardiālu perfūziju (3 ml/min) ar 0,01 M fosfāta bufera šķīdumu (PBS, pH = 7,4). Pēc perfūzijas dzīvnieku smadzeņu audi tika fiksēti 4% formalīna šķīdumā 24 h +4°C. Pēc fiksācijas formalīna šķīdumā, audi tika ievietoti uz 72 h 10-20-30% saharozes šķīdumā. Smadzeņu koronālos griezumus (20-35  $\mu$ m) veica ar Leica CM1850 kriotomu (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, ASV). Lai novērtētu neirocītu bojājumu pēc galvas traumas, griezumi tika pārnesti uz Superfrost Plus priekšmetstikliņiem un izturēti 96% un 70% etanola šķīdumā 3 min. Pēc tam tie tika skaloti ar destilētu ūdeni (3 min), krāsoti ar 0,01 % krezil-violetā acetāta šķīdumu (14 min), un tad pārklāti ar segstikliņu.

Brīvi peldošie griezumi tika krāsoti ar primārajām antivielām - trušu rabbit anti-Iba1 (1:2000; Abcam, Cat# ab153696, Kembridža, Anglija), trušu anti-GFAP (1:2000, Abcam, Cat# ab7260, Kembridža, Anglija), peļu anti-Calbindin D28K (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc365360, Dalasa, ASV), trušu anti-EAAT2 (1:5000, Abcam, Cat# ab205248, Kembridža, Anglija). Griezumus pārnesa uz šķīdumu, kas saturēja atšķaidītu antivielu TBS buferī ar Triton X-100 (TBS-T). Griezumus inkubēja 15 h istabas temperatūrā uz šeikera, pēc tam 3 reizes skaloja TBS-T buferī (pH = 7.4) un pārnesa uz škīdumu ar attiecīgo sekundāro antivielu: kazas anti-peļu biotīns IgG (H + L) (1:1000, Invitrogen, Cat# 31800), kazas antitrušu biotīns IgG (H + L) (1:1000, Invitrogen, Cat# 65-6140, Carlsbad, CA, ASV) vai kazas anti-trušu biotīns IgG H&L (Alexa Fluor® 488, 1: 200; Abcam, Cat# ab150077). Pēc 2 h griezumus 3 reizes skaloja TBS-T buferī un pārnesa uz škīdumu. kas saturēja peļu ExtrAvidin (Sigma, ASV) un inkubēja 2 h. Pēc skalošanas griezumus 3 min inkubēja nikeli saturošā diaminobenzidīna škīdumā. Visu iekrāsotos griezumus pārnesa uz ar želatīnu pārklātiem priekšmetstikliņiem un pārsedza ar segstikliņu. Pētāmo smadzeņu struktūru identificēja, izmantojot Allen Mouse Brain atlasu (http://mouse.brain-map.org/static/atlas) un digitalizēja, izmantojot Nikon Eclipse TE300 digitālo kameru (Nikos Instruments, Tokija, Japāna). Lai noteiktu šūnu daudzumu un krāsošanas intensitāti (optiskais blīvums), mērījumus veica, izmantojot ImageJ programmatūru.

# 2.3.5. Mitohondriju funkcionalitātes mērījumi

Metode ir aprakstīta publikācijā II. Lai noteiktu R-fenibuta ietekmi uz mitohondriju funkcionalitāti smadzeņu homogenātā un izolētos smadzeņu mitohondrijos, tika veikta **augstas izšķirtspējas flourorespirometrija (37°C)**, izmantojot Oxygraph-2k (O2k, Oroboros Instruments, Austrija) instrumentu, kas papildināts ar O2k-Fluo-Modules fluorescences LED2 moduli. Mērījumiem tika izmantots MiR05Cr buferšķīdums (110mM saharoze, 601mM K-laktobionāts, 0.5mM EGTA, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM taurīns, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM HEPES, 0.1% govju seruma albumīns, 20 mM kreatīns, pH7,1). Vienlaikus ar skābekļa patēriņa mērījumiem tika mērīta ūdeņraža peroksīda izdalīšanās (ROS veidošanās), izmantojot H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jutīgo fluorescences zondi Ampliflu<sup>TM</sup> Red (AmR). Uzsākot eksperimentu, katrā kambarī tika pievienotas 1 U/ml mārrutku peroksidāzes (HRP) un 5 U/ml superoksīda dismutāzes (SOD). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O plūsmas attiecība (%) tika aprēķināta kā H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plūsma / (0,5 O<sub>2</sub> plūsma).

Mitohondriju elpošanas kapacitātes noteikšanai tika izmantots **substrātuatjūdzēja-inhibitoru titrēšanas (SUIT) protokols.** Lai noteiktu R-fenibuta ietekmi uz mitohondriālo elpošanu un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veidošanos, mērījumu sākumā kambarī tika pievienots 0,5  $\mu$ g/ml R-fenibuts. Papildus tika pievienots S-fenibuts (0,5  $\mu$ g/ml), lai noskaidrotu, vai R-fenibuta efekti ir saistīti ar GABA-B receptoru vai  $\alpha_2\delta$  apakšvienību saturošu no sprieguma atkarīgo kalcija kanāliem. Šajā eksperimentā tika izmantots SUIT protokols ar sekojošu reaģentu secību: piruvāts (P, 5mM) un malāts (M, 2mM) tika izmantoti, lai mērītu ar kompleksu I (CI) saistīto elpošanu (NAD atkarīgo, N-*pathway*) LEAK (ar oksidatīvo fosforilēšanu nesaistītā, substrāta atkarīgā) stāvoklī. Adenozīndifosfāts (D jeb ADP, 5mM) tika izmantots, lai noteiktu no oksidatīvās fosforilēšanās atkarīgo elpošanu (OXPHOS stāvoklis). Glutamāts (G, 10 mM) tika izmantots kā papildus CI substrāts, lai noteiktu mitohondriālo elpošanu OXPHOS stāvoklī un izvēŗtētu substrātu ietekmi uz CI atkarīgo elpošanu. Sukcināts (S, 10 mM, kompleksa II (CII) substrāts) tika pievienots, lai mērītu ar kompleksu I&II (C&CII) saistītu elpošanu. Titrēšana ar atjūdzēju (CCCP, U, 0,5-1  $\mu$ M) tika izmantota, lai noteiktu elektronu transporta sistēmas (ETS) maksimālo kapacitāti. Rotenons (Rot, 0,5 uM, CI inhibitors) tika pievienots, lai noteiktu ar CII saistītu elpošanu OXPHOS stāvoklī. Rotenons (0,5  $\mu$ M) un antimicīns (A, 2,5  $\mu$ M) tika pievienoti, lai, attiecīgi, bloķētu CI un CIII kompleksu un mērītu reziduālo skābekļa patēriņu (ROX).

Lai mērītu **Ca<sup>2+</sup>-inducēto mitohondriju membrānas caurlaidības maiņu**, mitohondriji (0,125 mg/ml) tika 15 min inkubēti buferšķīdumā (120 mM KCl, 10 mM Tris, 5 mM KH2PO4, piruvāts (5 mM), malāts (2 mM), ADP (5 mM), pH = 7,4) ar R- vai S-fenibutu 0,5  $\mu$ g/ml. Pēc tam tika pievienots 200 uM CaCl<sub>2</sub>, lai ierosinātu mitohondriju caurlaidības maiņu, un 10 min laika posmā mērītu absorbcijas izmaiņas.

Mitohondriju funkcionalitāte pēc anoksijas-reoksigenācijas bojājuma tika mērīta žurku smadzeņu homogenātā. Lai ierosinātu maksimālo mitohondriju elpošanu, paraugs tika stimulēts ar piruvātu un malātu (5+2 mM), sukcinātu (10mM) un ADP (5mM), 10-20 min laikā iestājoties anaerobiem apstākļiem. R-fenibuts (0,5  $\mu$ g/ml) tika pievienots 15 min pēc anoksijas iestāšanās, pirms reoksigenācijas uzsākšanas, atverot kambarus. 8 min pēc reoksigenācijas (skābekļa koncentrācijas atjaunošanas), kambari atkal tika noslēgti un 2 min veikti O<sub>2</sub> plūsmas mērījumi. Eksperimenta beigās sistēmai tika pievienots antimicīns A (2,5  $\mu$ M), lai noteiktu ROX.

#### 2.3.6. Dzīvnieku uzvedības testi

Pasīvā nosacījuma refleksa (PNR) testu izmantoja, lai novērtētu kontekstuālo atmiņu (IV 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 notika 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 laikā saņēma 0,1 mA strāvas kairinājumu, tādējādi nodrošinot nosacījuma refleksa veidošanos. Nākamajā

dienā dzīvnieku ievietoja gaišajā kamerā un novēroja līdz 540 s laika periodā, reģistrējot laiku, kad dzīvnieks iegāja tumšajā kamerā.

**Y-veida labirinta tests** tika izmantots, lai novērtētu darbības atmiņu (Publikācija III, IV). 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 procentuāli aprēķināta kā secīga ieiešana visās trīs ejās bez atkārtošanās: pareizi izvēlētais eju skaits / (kopējais ieiešanu skaits ejās – 2) x 100 %.

Ūdens labirinta tests (MWM) tika izmantots, lai novērtētu dzīvnieku mācīšanās spējas un telpisko atmiņu (Publikācija IV). Testu veica, izmantojot gaiši zilas krāsas baseinu (150 cm diametrs, 60 cm dziļš). Baseins tika virtuāli sadalīts 4 vienādos sektoros. Platforma (diametrs 10 cm) atradās pa vidu vienā no sektoriem. Izmēģinājumu iedalīja divās daļās – apmācības un eksperimenta norise/dienas. Dzīvniekus apmācīja 5 dienas, katrā dienā veicot 4 izmēģinājumus. Apmācības dienā dzīvniekam 90 s ļāva peldēt un meklēt platformu. Īslaicīgā un ilgstošā atmiņa tika pārbaudīta, attiecīgi, 24 h un 7 dienas pēc pēdējās apmācības sesijas. Platforma no baseina tika izņemta ārā, atļaujot dzīvniekam tajā atrasties 60 s. Apmācības un atmiņas procesu novērtēšanas laikā tika reģistrēts peldēšanas laiks, ātrums un distance līdz platformas atrašanai un atrašanās ilgums katrā no 4 sektoriem. Jo īsākā laikā dzīvnieks aizpeldēja līdz platformai un ilgāku laiku pavadīja platformas sektorā, jo labāk tas bija iemācījies un atcerējās tās atrašanās vietu. Uzvedības reģistrāciju un analīzi veica ar videokameras un *EthoVision* (XT versija, Noldus, Vāgeningena, Nīderlande) programmas palīdzību.

Dzīvnieku telpiskās vides mācīšanās un atmiņas procesu novērtēšanai izmantoja Barnes labirinta testu (BM) (Publikācija III). Uzvedības aparāts sastāvēja no apaļas arēnas (92 cm diametrs) ar 20 vienādiem caurumiem (5 cm diametrā), kas bija izvietoti simetriski apkārt uzvedības arēnai. Zem viena no caurumiem tika novietota tumša kaste (28 x 22 x 21 cm), kurā pelei bija iespēja paslēpties no papildus stimula - spožas, intensīvas gaismas, kas tika izmantota, lai veicinātu apmācības procesu. Uzvedības telpā pie sienas tika izvietoti dažāda veida, formas un krāsas plakāti, kas palīdzēja dzīvniekam orientēties. Arēna tika sadalīta virtuāli 4 vienādos sektoros. Dzīvnieki tika apmācīti 4 dienas, katrā dienā veicot 3 pārbaudījumus. Apmācības dienā dzīvniekam ļāva 2 min laikā izpētīt arēnu un sameklēt tumšo kasti. Ja dzīvnieks 2 min laikā neatrada tumšo kasti, tad tas tika maigi aizvirzīts līdz tumšajai kastei ar cilindra palīdzību, ļaujot 30 s tajā uzturēties. Pēc 30 s dzīvnieks tika izņemts no tumšās kastes un ievietots atpakaļ būrī. Pēc katra pārbaudījumu pelei nodrošināja vismaz 15 min pauzi, kuras laikā apmācīja nākamos dzīvniekus. Ar videokameras palīdzību reģistrēja laiku, kad pele atrada un iegāja tumšajā kastē. Īslaicīgā un ilgstošā atmiņa tika pārbaudīta, attiecīgi, 24 h un 7 dienas pēc pēdējās apmācības sesijas. Tumšā kaste tika noņemta no cauruma. Dzīvnieku novietoja arēnas centrā un

ļāva 2 min pārvietoties pa arēnu. Atmiņas procesu novērtēšanai ar *EthoVison* XT programmas palīdzību tika reģistrēts laiks līdz nokļūšanai tumšās kastes atrašanās vietā un atrašanās ilgums katrā kvadrantā.

Lai novērtētu dzīvnieka neiroloģisko stāvokli akūti un ilgstošā periodā pēc TSB, tika izmantots **neiroloģiskā stāvokļa novērtējuma** (NSS) tests, kas sastāv no 9 klīniskajiem parametriem (Publikācija I, II, III, IV): platformas izpēte, izpētes uzvedība, monoparēze/hemiparēze, satrūkšanās reflekss, balansēšana uz vertikāla stieņa, staigāšana pa 1-, 2- un 3-cm platu laipu un balansēšana uz horizontāla stieņa. Ja dzīvnieks neizpildīja kādu no uzdevumiem, tam piešķīra 1 punktu. Vairāk punktu liecināja par izteiktākiem neiroloģiskiem traucējumiem.

Lai novērtētu lokomotoro jeb kustību aktivitāti, tika izmantots **atklātā lauka tests** (OF) (Publikācija I, III, IV). Dzīvnieku ievietoja atklātā lauka (45 x 45 cm) centrā un ar videokameru reģistrēja tā uzvedību. Ar video reģistrēšanas programmas *EthoVison* XT palīdzību noteica dzīvnieka noieto ceļa garumu (cm/4 min) un ātrumu (cm/s).

Rotējošā stieņa tests (RR) (aparāta modelis 7600, Ugo Basile, Itālija) tika izmantots, lai novērtētu dzīvnieku motoro funkciju un koordināciju (Publikācija III, IV). Dzīvnieki tika apmācīti dienu pirms eksperimenta veikšanas. Eksperimenta dienā dzīvniekus novietoja uz rotējošā stieņa (5-25 apgriezieni 240 sekundēs) un reģistrēja laiku, cik ilgi dzīvnieks spēja noturēties uz stieņa.

Lai noteikti dzīvnieka depresijai līdzīgo uzvedību, tika izmantots **astes fiksēšanas tests** (TS) (Publikācija III, IV). Lai novērtētu dzīvnieka imobilitātes ilgumu (miera stāvoklis jeb nekustīgums) dzīvnieka asti ar līmlentes palīdzību piestiprināja pie koka sijas, kas atrodas apmēram 50 cm augstumā no galda virsmas. Uzvedības izpausmes tika reģistrētas 6 min, izmantojot digitālo videokameru (Handycam HDR-CX11E, Sony Corporation, Tokija, Japāna). Imobilitātes ilgums tika reģistrēts ar hronometra palīdzību un noteikts pēdējo 4 min periodā.

Acetona tests tika izmantots, lai pārbaudītu termiski izraisītu jutības atbildi (Publikācija IV). Testa dienā dzīvnieku ievietoja četrstūrainā plastikāta kastē (10 x 10 x 14 cm) ar metāliska režģa grīdu un adaptēja 30 min. Acetonu iepildīja 1 ml šļircē bez adatas un 40 µl acetona uzpilināja dzīvnieka pakaļkājas plantārai virsmai. Atbildes reakcija acetona kairinātajai plantārai virsmai tika mērīta 45 s. Starp katru sekojošu mērījumu - acetona kairinājumu ievēroja vismaz 10 min pauzi. Katram dzīvniekam veica 3 mērījumus un noteica kājas pacelšanas un kratīšanas kopējo laiku (s) un reižu skaitu.

Von Frey tests tika izmantots, lai noteiktu mehāniski izraisītu jutības atbildi (Publikācija IV). Dzīvnieks pirms testa veikšanas tika 30 min adaptēts augstāk aprakstītajā būrī. Pēc tam dzīvnieka pakaļkājas plantārā virsma tika kairināta ar speciāli izveidotu matiņu (Dynamic Plantar Aesthesiometer, aparāta modelis 37400-002, Ugo Basile, Itālija), nosakot nepieciešamo laiku (s), lai dzīvnieks paceltu kāju no režģa grīdas. Katram dzīvniekam veica 3 mērījumus un starp katru mērījumu ievēroja vismaz 10 min pauzi.

#### 2.3.7. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datus izteica kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda (S.E.M.). Lai noteiktu datu atbilstību normālsadalījumam, izmantoja Šapīro-Vilka (*Shapiro-Wilk*) testu. Grupu salīdzināšanai tika izmantots Stjūdenta t-tests vai atbilstošā dispersijas analīze (ANOVA) ar sekojošu pēctestu (Tūkija vai Dunnau), kas norādīts pie attiecīgo rezultātu apkopojuma grafikos. P vērtība, kas mazāka par 0,05, tika uzskatīta par statistiski ticamu. Statistiskiem aprēķiniem izmantoja Prism 8.0 programmnodrošinājumu (*GraphPad Software*, Inc., La Jolla, Kalifornijas štats, ASV).

# 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

# 3.1. Neiroloģiskais stāvoklis un iekaisuma reakcija pēc kontūzijas tipa traumatiska smadzeņu bojājuma (I publikācija)

Lai pētītu TSB, kontūzijas tipa galvas traumas modeli tiek izmantoti jau vairākus gadu desmitus, tomēr starp laboratorijām pastāv būtiskas protokola atšķirības, kā rezultātā tiek konstatēta mainīga iekaisuma citokīnu ekspresija, piemēram, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 un IL-1b gadījumā (Albert-Weissenberger et al., 2012; Zhang et al., 2014; Baratz et al., 2015; Gyoneva and Ransohoff, 2015; Chhor et al., 2017). Tā kā pelēm pēc kontūzijas tipa galvas traumas modela novēro galvaskausa lūzumus, mēs izvirzījām hipotēzi, ka lūzums varētu būt viens no iekaisuma gēnu ekspresijas galvenajiem izraisītājiem smadzenu audos, tādējādi radot būtiskas iznākuma atškirības, izmantojot šo galvas traumas modeli. Mēs salīdzinājām neiroloģisko stāvokli un iekaisuma reakcijas atbildi pelu hipokampā un striatum pēc kontūzijas tipa galvas traumas un korelējām rezultātus ar parietālā kaula lūzuma klātbūtni un tā smaguma pakāpi. Dzīvnieki tika sadalīti divās grupās: dzīvnieki ar un bez galvaskausa lūzuma pēc TSB. Dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu bija ievērojami sliktāks neiroloģiskais stāvoklis (lielāks vidējais NSS -  $4.8 \pm 0.5$  punkti), salīdzinot ar dzīvniekiem bez galvaskausa lūzuma  $(2,5 \pm 0,2 \text{ punkti})$  2 h pēc traumas (3.1.A)attēls). Līdzīgi galvaskausa lūzums ievērojami palielināja NSS 24 h pēc traumas (bez lūzuma:  $2,9 \pm 0,2$ , ar lūzumu:  $4,8 \pm 0,4$  punkti) (3.1.A attēls). Turklāt NSS ievērojami palielinājās atkarībā no galvaskausa lūzuma smaguma pakāpes (3.1.B attēls). Līdz mūsu pētījuma rezultātu publicēšanai tikai vienā pētījumā bija ziņots par dzīvnieku sadalījumu grupās atkarībā no galvaskausa lūzuma esamības (McColl et al., 2018). Šajā pētījumā netika novērotas būtiskas atškirības starp viltus operētiem dzīvniekiem un dzīvniekiem ar un bez galvaskausa lūzumu 1 h pēc traumas (McColl et al., 2018). Jāatzīmē, ka McColl et al pētījumā NSS netika novērtēts vēlākos laika punktos pēc traumas, kas apgrūtināja lūzuma klātbūtnes ietekmes pierādīšanu uz NSS. Ir ziņots,

ka galvaskausa lūzums pelēm ir saistīts ar sliktāku TSB iznākumu – pelēm reģistrēta tūlītēja pēc traumas respiratorā depresija, sekundārs bojājums no kaula lūzuma un nāve (Flierl et al., 2009).



3.1. att. Funkcionālais iznākums 2 un 24 h pēc vieglas galvas traumas
(A) Neiroloģiskā stāvokļa novērtējums dzīvniekiem ar vai bez galvaskausa lūzuma.
Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M. (viltus n = 24; bez lūzuma n = 52; ar lūzumu n = 33). \*P < 0,05 pret viltus grupu, #P < 0,05 grupa bez lūzuma pret grupa ar lūzumu (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Tūkija tests). (B) Neiroloģiskā stāvokļa novērtējums atkarībā no galvaskausa lūzuma smaguma pakāpes. Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M. (viltus n = 24, bez lūzuma n = 52, viegls lūzums n = 7, vidēji smags lūzums n = 12, smags lūzums n = 14). \*P < 0,05 pret viltus grupu, #P < 0,05 grupa bez lūzuma pret grupa ar smagu lūzumu (Kruskala-Vallisa rangu dispersijas analīze, Dunna tests).</li>

Pacientiem ar TSB galvaskausa lūzums ir neatkarīgs intrakraniālās hemorāģijas riska faktors (Abdelmalik et al., 2019). Intrakraniālā asinošana ir saistīta ar paaugstinātu intrakraniālo spiedienu, oksidatīvu bojājumu, vazogēnu tūsku un citotoksisku bojājumu (Lok et al., 2011). Pacientiem galvaskausa lūzums ar asinošanu ierosina hemoglobīna sabrukšanu un ROS veidošanos, kas izraisa paaugstinātu iekaisumu un neironu uzbudināmību (Agrawal et al., 2006). Lai noteiktu galvaskausa lūzuma ietekmi uz iekaisuma gēnu ekspresijas izmaiņām smadzeņu audos, mēs veicām TIMP-1, TNF-α, IL-1b, IL-6 un MMP-9 mērījumus hipokampā un striatum 12 h un 1, 3 un 14 dienas pēc traumas. Līdz šim ir ziņoti atšķirīgi rezultāti par iekaisuma reakciju peļu galvas smadzeņu audos pēc slēgtas galvas traumas. Mūsu pētījumā dzīvniekiem bez galvaskausa lūzuma netika konstatētas iekaisuma gēnu ekspresijas pieaugums, salīdzinot ar viltus dzīvniekiem (3.2. attēls). Dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu bija ievērojami lielāka TIMP-1 ekspresija ipsilaterālajā hipokampā 12 h un 1 dienu pēc traumas, attiecīgi, 71 un 90 reizes lielāka ekspresija, salīdzinot ar viltus dzīvniekiem (3.2. attēls). Turklāt dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu TIMP-1 ekspresija bija ievērojami palielināta arī kontralaterālajā hipokampā 1 dienu pēc traumas (3.2. attēls). TIMP-1 ekspresija bija ievērojami palielināta arī ipsilaterālajā striatum 12 h un 1 dienu pēc traumas, attiecīgi

16 un 130 reizes (3.3. attēls). TIMP-1 palielinājums tika konstatēts arī kontralaterālajā striatum 1 un 3 dienas pēc traumas (3.3. attēls). TNF- $\alpha$  mRNS daudzums bija ievērojami lielāks ipsilaterālajā hipokampā 12 h un 1 dienu, attiecīgi, 13 un 16 reizes lielāka ekspresija, salīdzinot ar viltus dzīvniekiem (3.2. attēls). TNF- $\alpha$  ekspresijas pieaugumu striatum varēja novērot tikai 12 h pēc galvas traumas (ipsilaterālajā pusē - 67 reizes, kontralaterālajā - 5 reizes, 3.3. attēls).



3.2.att. TIMP-1 un TNF-α gēnu ekspresija ipsilaterālajā un kontralaterālajā hipokampā pēc vieglas galvas traumas

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M. (n = 5-9). \*P < 0,05 pret viltus grupu, #P < 0,05 grupa bez lūzuma pret grupa ar lūzumu (divfaktoru dispersijas analīze, Tūkija tests).



3.3. att. TIMP-1 un TNF-α gēnu ekspresija ipsilaterālajā un kontralaterālajā striatum pēc vieglas galvas traumas

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M. (n = 5-9). \*P < 0,05 pret viltus grupu, #P < 0,05 grupa bez lūzuma pret grupa ar lūzumu (divfaktoru dispersijas analīze, Tūkija tests).

Iepriekšējos pētījumos ir parādīta ievērojami augstāka iekaisuma reakcijas atbilde smadzeņu audos pirmajās stundās pēc traumas (Shohami et al., 1994; Knoblach et al., 1999; Homsi et al., 2009; Woodcock and Morganti-Kossmann, 2013; Baratz et al., 2015), bet tikai vienā pētījumā netika novēroti galvaskausa lūzumi (Homsi et al., 2009). Piemēram, TNF-α gēna un proteīna ekspresija bija ievērojami paaugstināta smadzeņu audos pirmajā dienā pēc traumas (Shohami et al., 1994; Ziebell et al., 2011; Baratz et al., 2015), savukārt citos pētījumos netika novērotas TNF-α ekspresijas izmainas starp grupām (Semple et al., 2010; Albert-Weissenberger et al., 2012; Chhor et al., 2017). Interesanti, ka dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu tika novērota ievērojami augstāka TNF-α ekspresija 4 un 48 h pēc kontūzijas tipa galvas traumas (Ziebell et al., 2011)(Ziebell et al., 2011). Turklāt kraniotomija pati par sevi ierosina palielinātu citokīnu (IL-1, IL-6, IL-10 un TNF-α) atbildes reakciju, salīdzinot ar neskartiem dzīvniekiem (Cole et al., 2011; Lagraoui et al., 2012). Šie rezultāti norāda uz to, ka kontūzijas tipa galvas traumas modela eksperimentos galvaskausa lūzumu klātbūtne atsevišķos dzīvniekos var izraisīt palielinātu iekaisuma reakciju un radīt rezultātu neviendabīgumu starp eksperimentālajām grupām.

Iepriekšējos pētījumos ir parādīts, ka pēc šķidruma perkusijas eksperimentālā galvas traumas modeļa palielināta TNF-α ekspresija korelē ar bojājuma smaguma pakāpi (Knoblach et al., 1999). Mēs novērojām korelāciju starp TNF-α un TIMP-1 gēnu ekspresiju un lūzuma smaguma pakāpi. TIMP-1 un TNF-α ekspresija būtiski palielinājās 12 un 24 h pēc traumas atkarībā no galvaskausa lūzuma smaguma pakāpes (3.4. attēls). TIMP-1 ekspresija ipsilaterālajā hipokampā bija, attiecīgi, 50 un 146 reizes lielāka dzīvniekiem ar vidēji smagu un smagu galvaskausa lūzumu (3.4.A attēls). Līdzīgi TIMP-1 ekspresija bija ievērojami palielināta ipsilaterālajā striatum (vidēji smaga lūzuma gadījumā 14 reizes, smaga lūzuma gadījumā - 173 reizes, 3.4.B attēls). TNF-α ekspresija bija ievērojami palielināta tikai dzīvniekiem ar smagu galvaskausa lūzumu ipsilaterālajā hipokampā (14 reizes, 3.4.C attēls) un striatum (130 reizes, 3.4.D attēls). Ņemot vērā, ka tika konstatētas būtiskas izmaiņas TIMP-1 un TNF-α gēnu ekspresijas līmeņos smadzeņu audos, mēs veicām šo proteīnu koncentrācijas mērījumus asins plazmā 12 h un 1, 3 un 14 dienas pēc traumas (datus skatīt I publikācija). Dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu tika konstatēts nedaudz paaugstināts TIMP-1 proteīna līmenis asins plazmā, tomēr būtiskas atškirības netika konstatētas, salīdzinot ar viltus dzīvniekiem. TNF-α proteīna līmenis asins plazmā būtiski nepalielinājās pēc traumas ( < 1,5 pg/ml).



3.4.att. Galvaskausa lūzuma un smaguma pakāpes ietekme uz iekaisuma gēnu ekspresiju smadzeņu audos 12 un 24 h pēc vieglas galvas traumas TIMP-1 gēna ekspresija ipsilaterālajā hipokampā (A) un striatum (B). TNF-α gēna ekspresija

ipsilaterālajā hipokampā (C) un striatum (D). Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M. (n = 5-13). \*P < 0,05 pret viltus grupu, aP < 0,05 pret grupa bez lūzuma (Kruskala-Vallisa rangu dispersijas analīze, Dunna tests).

Iepriekš ziņots, ka TIMP-1 gēna ekspresija ir paaugstināta 12 h pēc išēmiska smadzeņu insulta, sasniedzot maksimālo līmeni 2 dienas pēc bojājuma (Wang et al., 1998, 2016). Paaugstināts TIMP-1 seruma līmenis ir saistīts ar sliktāku prognozi pēc insulta (Rodríguez et al., 2013; Lorente et al., 2015). TIMP-1 gēna ekspresija parasti palielinās pēc audu traumas un iekaisuma, salīdzinot ar veseliem audiem (White et al., 2013; Masciantonio et al., 2017). Iekaisuma veicinošie citokīni palielina TIMP-1 ekspresiju smadzenēs (Gardner and Ghorpade, 2003). Šajā pētījumā paaugstināta TIMP-1 iekaisuma gēna ekspresija tika novērota pirmajās trīs dienās pēc TSB dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu, salīdzinot ar gēnu ekspresijas līmeni 14 dienas pēc TBI, parādot akūtu reakciju uz traumu. Tā kā smags galvaskausa lūzums tika novērots kopā ar kaulu iespiedumu smadzenēs un asiņošanu, paaugstināta TIMP-1 gēna ekspresija smadzenēs, iespējams, bija ātra un akūta reakcija uz masveida iekaisuma veicinošo citokīnu infiltrāciju, kas notika smadzenēs pēc smadzeņu cietā apvalka bojājuma un asiņošanas.

Mēs konstatējām, ka dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu bija ievērojami sliktāks neiroloģiskais stāvoklis un ievērojami lielāka iekaisuma atbildes reakcija smadzeņu audos, salīdzinot ar dzīvniekiem bez galvaskausa lūzumu pēc kontūzijas tipa galvas traumas modeļa. Šie rezultāti parāda, ka galvaskausa lūzums izraisa rezultātu izkliedi. Literatūras analīze (raksti, kas publicēti PubMed datu bāzē par slēgtu galvas traumu laika posmā no 2001.-2022.gadam) parādīja, ka galvaskausa lūzumi tika novērtēti tikai 26 no 144 pētījumiem (18,1%), un tajos lūzums bija izvēlēts kā izslēgšanas kritērijs. Ievērojams skaits pētījumu (81,9%) nepieminēja lūzuma esamību, parādot, ka lielākajā daļā slēgtas galvas traumas pētījumos galvaskauss netiek makroskopiski novērtēts. Turklāt tika novērotas ievērojamas atšķirības modeļa izpildījuma tehniskajos parametros – krītošā atsvara smagumā (5-500 g) un kritiena augstumā (0,5-167 cm), kas izraisa dažādu smadzeņu audiem vērsto trieciena enerģiju. Neviendabīgums modeļa izpildījumā neļauj salīdzināt pētījumu rezultātus starp dažādām laboratorijām. Tādējādi mūsu rezultāti parāda, ka galvaskausa lūzuma novērtēšana ir pirmais solis, lai standartizētu eksperimentālos protokolus un samazinātu datu izkliedi kontūzijas tipa galvas traumas modelī.

# 3.2. Fenibuta neiroprotektīvie efekti pēc vidēji smagas galvas traumas modeļa (II publikācija)

Vispirms tika noteikta R-fenibuta koncentrācija asins plazmā un smadzeņu audos pēc i.p. injekcijas un p.o. ievadīšanas. R-fenibuts asins plazmā bija izmērāms jau 15 min pēc vienreizējas i.p. un p.o. ievadīšanas (datus skatīt II publikācija). Maksimālā R-fenibuta koncentrācija pēc i.p injekcijas asins plazmā (16,8 µg/ml) tika sasniegta pēc 15 min. Maksimālā R-fenibuta koncentrācija pēc 30 min. Diennakti pēc i.p. un p.o. ievadīšanas R-fenibuta koncentrācija plazmā vairs nebija nosakāma. R-fenibuts smadzeņu audu ekstraktā bija izmērāms 15 min pēc vienreizējas i.p. un p.o. ievadīšanas. Maksimālā R-fenibuta koncentrācija pēc i.p. injekcijas smadzeņu audos tika sasniegta pēc 15 min (0,64 µg/g). Maksimālā R-fenibuta koncentrācija pēc p.o. injekcijas smadzeņu audos tika sasniegta pēc 60-240 min (0,17 µg/g). R-fenibuta koncentrācija bija 0,02 µg/g un pēc p.o. injekcijas 0,012 µg/g.

# 3.2.1. R-fenibuta ievadīšanas ietekme uz TSB izraisītiem funkcionāliem un morfoloģiskiem bojājumiem

R-fenibuta saistīšanās spējas ir pētītas ar radioaktīvi iezīmētu gabapentīnu, kas bija pirmais ligands, kas ar augstu afinitāti saistās ar  $\alpha_2\delta_1$  un  $\alpha_2\delta_2$  apakšvienībām (attiecīgi Kd = 59 un 153 nM), tajā pašā laikā neuzrādot saistīšanās aktivitāti ar  $\alpha_2\delta_3$ un  $\alpha_2\delta_4$  apakšvienībām (Marais et al., 2001; Qin et al., 2002). Patoloģijas, kas saistītas ar  $\alpha_2\delta_1$  proteīna gēnu traucējumiem, ietver neiropātiskas sāpes un sirds disfunkciju, savukārt,  $\alpha_2\delta_2$  proteīna patoloģijas ir saistītas ar epilepsiju un smadzenīšu ataksiju (Dolphin, 2013). Iepriekš ir parādīts, ka R-fenibuta farmakoloģiskā aktivitāte ir vairāk saistīta ar neiropātiskām sāpēm nekā epilepsiju (Zvejniece et al., 2015); tādējādi varētu spekulēt, ka R-fenibuta iedarbību nosaka saistīšanās ar  $\alpha_2\delta_1$  proteīnu. Uzbudinošie neironi plaši ekspresē VDCC  $\alpha_2\delta$  apakšvienības smadzeņu garozā, hipokampā un citos smadzeņu reģionos (Taylor and Garrido, 2008; Gurkoff et al., 2013). Turklāt ir pierādīts, ka VDCC  $\alpha 2\delta$  apakšvienības ir iesaistītas procesos, kas nav tieši saistīti ar proteīna kalcija kanālu funkciju, piemēram sinaptoģenēzē (Calikoglu et al., 2015). Ir ziņots, ka VDCC ligandu ievadīšana pelēm TBI modeļos samazina šūnu nāvi un uzlabo kognitīvo funkciju (Gurkoff et al., 2013). VDCC  $\alpha_2\delta$ apakšvienības ligandi, piemēram, pregabalīns, devā 60 mg/kg samazina neironu zudumu un uzlabo funkcionālo stāvokli 24 stundas pēc eksperimentālas galvas traumas modeļiem (Calikoglu et al., 2015; Shamsi Meymandi et al., 2018). Turklāt ir pierādīts, ka pregabalīns (30 mg/kg) uzlabo funkcionālo atveseļošanos un izsauc pretiekaisuma un antiapoptisku iedarbību žurkām pēc eksperimentāla muguras smadzeņu bojājuma (Ha et al., 2008, 2011).

pieejama informācija terapeitisku Nav par fenibuta izmantošanu veterinārmedicīnā. Līdz šim ir aprakstīts viens klīniskais gadījums par akūtu toksikozi sunim pēc perorālas fenibuta uzņemšanas mājas apstākļos (Sahagian et al., 2023). Ir zināms, ka fenibutam piemīt gabapentīnam līdzīga antinociceptīva aktivitāte caur VDCC (Zvejniece et al., 2015). Strukturāli R-fenibuts ir baklofēna ((R.S)-4-amino-3-(4-hlorfenil)sviestskābes) gabapentīna (2 - [1 un (aminometil)cikloheksil]acetskābes) analogs (Kupats et al.. 2020). Veterinārmedicīnā gabapentīns tiek izmantots kā nereglamentētas zāles (off-label) un to parasti izmanto kombinācijā ar citām zālēm krampju, trauksmes un neiropātisko sāpju mazināšanai (Cesare et al., 2023). Fenibuta farmakoloģiskā iedarbība in vivo eksperimentos ir novērojama devā sākot ar 10 mg/kg, tikmēr muskuļu funkcijas samazināšana konstatēta vairāk nekā 30 reizes lielākai devai (Dambrova et al., 2008). Nemot vērā, ka fenibuta terapeitiskais indekss ir augsts tā lietošanai varētu būt priekšrocības salīdzinājumā ar gabapentīnu tādu slimību ārstēšanā, kur sedācija un muskuļu atslābums ir nevēlams.

Mūsu pētījumā R-fenibuts devā 50 mg/kg ievērojami uzlaboja neiroloģisko stāvokli par 28%, 25% un 30%, attiecīgi, 1, 4 un 7 dienas pēc galvas traumas, salīdzinot ar traumētajiem dzīvniekiem bez terapijas (p < 0.05, 3.5. attēls).



3.5.att. **R-fenibuta ietekme uz neiroloģisko stāvokli pēc vidēji smagas galvas traumas** Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M. (n = 8-12). \*P < 0.05 viltus grupa pret TSB grupu, #P < 0.05 TSB\_50 grupa pret TSB grupu (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Dunneta tests).

Līdzīgi, ārstēšana ar R-fenibutu (50 mg/kg) ievērojami samazināja N-DNs (3,0  $\pm$  1,9/uz redzes lauku, 3.6. attēls) un IL-1b pozitīvo šūnu skaitu (246  $\pm$  31/uz redzes lauku, datus skatīt II publikācija) ipsilaterālajā garozā, salīdzinot ar viltus grupu (9,1  $\pm$  6,4/N-DNs uz redzes lauku, 379  $\pm$  82/IL-1b šūnas uz redzes lauku).



3.6. att. R-fenibuta ietekme uz bojāto neirocītu skaitu smadzeņu garozā pēc vidēji smagas galvas traumas

(A) Bojāto neirocītu kvantitatīvā analīze smadzeņu ipsilaterālās puses garozā un (B) reprezentatīvās mikrofotogrāfijas 7 dienas pēc galvas traumas. Ar bultu atzīmēta Nissl iekrāsota šūna. Attēliem ir x100 palielinājums. Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M. (n = 6-7). #P < 0,05 pret viltus grupu, \*P < 0,05 pret TSB grupu (vienfaktora dispersijas analīze, Tūkija tests).

Izteikta neironu bazofīlija un saraušanās (N-DN) ir tipiskas patomorfoloģiskas pārmaiņas pēc TSB (Hicks et al., 1996; Ooigawa et al., 2006). N-DN parādās neokorteksā uzreiz pēc TSB un tos var novērot līdz pat divām nedēļām pēc traumas (Ooigawa et al., 2006; Talley Watts et al., 2014)(Ooigawa et al., 2006; Talley Watts et al., 2014).(Ooigawa et al., 2006; Talley Watts et al., 2014). Turklāt IL-1 ir galvenais sekundāra neironu bojājuma ierosinātājs pēc TSB (Newell et al., 2018)(Newell et al., 2018). Tas ir iesaistīts citu imūnšūnu piesaistē, neironu apoptozē un asins-smadzeņu barjeras sagraušanā pēc TSB (Rothwell and Luheshi, 2000; Lu et al., 2005; Sun et al., 2017). Turklāt ir pieradīts, ka IL-1 $\beta$  neitralizācijai ir neiroprotektīva iedarbība klīniskajos apstākļos un pirmsklīniskajos grauzēju TSB modeļos (Tehranian et al., 2002; Lazovic et al., 2005; Clausen et al., 2011). Mūsu rezultāti pierāda, ka R-fenibuts samazina neironu bojājumu, iekaisumu un deģenerāciju pēc TSB.

# 3.2.2. R-fenibuta ietekme uz smadzeņu mitohondriju funkciju normoksijas apstākļos un pēc anoksijas-reoksigenācijas

Salīdzinot ar citiem šūnu veidiem, neironiem ir vājāka antioksidantu aizsardzības sistēma (Floyd and Carney, 1992). Tā kā ir pierādīts, ka mitohondriju disfunkcija ir iesaistīta TSB patoģenēzē, enerģijas metabolisma traucējumi, iespējams, sekmē TSB (Werner and Engelhard, 2007; Prins et al., 2013). TSB gadījumā pārmērīga ROS veidošanās un uzkrāšanās izraisa šūnu oksidatīvo bojājumu, un tieši mitohondriji ir galvenais iekššūnu ROS avots (Stelmashook et al., 2019)(Stelmashook et al., 2019). Ir parādīts, ka antioksidantu savienojumi un membrānu lipīdu peroksidācijas inhibitori, tādi kā tirilazads, U-78517F un U-83836E, ir efektīvi pirmsklīniskajos galvas traumas modeļos (Hall et al., 2010)(Hall et al., 2010). Ir pierādīts, ka uz mitohondrijiem mērkētas zāles, piemēram, mitohinonu un timohinonu saturoši antioksidanti, samazina neiroloģiskos traucējumus un β-amiloīdu izraisītu neirotoksicitāti pēc TSB (Genrikhs et al., 2015; Zhou et al., 2018)(Genrikhs et al., 2015; Zhou et al., 2018). Kavējot ROS veidošanos tiek samazināta arī IL-1β sekrēcija (Schmidt and Lenz, 2012)(Schmidt and Lenz, 2012). Ir parādīts, ka IL-1ß receptoru antagonists ciklosporīns A, samazina patoloģiskas izmaiņas smadzenēs pēc TSB, blokējot mitohondriālās caurlaidības pārejas poru (mPTP) (Veech et al., 2012)(Veech et al., 2012).

Lai noskaidrotu, vai R-fenibuta neiroprotektīvā iedarbība ir saistīta ar mitohondriju funkcionalitātes uzlabošanu, tika mērīta mitohondriju elpošana un ROS veidošanās pēc anoksijas-reoksigenācijas (A-R) modeļa *in vitro* apstākļos. R-fenibuts (0,5  $\mu$ g/ml vai 2,78 mM) ievērojami samazināja A-R ierosinātu ūdeņraža peroksīda/radikāļu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O) attiecības palielināšanos (3.7. attēls).



# 3.7. att. R-fenibuta (0,5 ug/ml vai 2,78 mM) ietekme uz ROS veidošanos pret patērēto skābekli pēc anoksijas-reoksigenācijas bojājuma *in vitro*

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M (n=6). \*P < 0,05 pret normoksiju, #P < 0,05 pret A-R kontroli (vienfaktora dispersijas analīze, Tūkija tests).

R- un S-fenibuts koncentrācijā 0,5 ug/ml neietekmēja smadzeņu mitohondriju elpošanu (3.8.A. attēls), bet ievērojami samazināja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O attiecību par 31% LEAK un 53% OXPHOS stāvoklī (3.8.B. attēls). Iegūtie rezultāti parāda, ka R un S-fenibuts samazina ROS veidošanos, neietekmējot mitohondriju elektronu transporta sistēmas darbību, kas norāda uz uzlabotu mitohondriju funkcionalitāti/sajūgšanu.





Turklāt gan R-, gan S-fenibuts samazināja Ca<sup>2+-</sup>ierosinātu mitohondriju iekšējās membrānas caurlaidības maiņu (3.9. attēls).



3.9. att. R- un S-fenibuta ietekme uz Ca<sup>2+</sup> ierosinātu mitohondriju iekšējās membrānas caurlaidības maiņu

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M (n=7). \*P < 0,05 pret kontroli (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Dunneta tests).

Iegūtie rezultāti liecina par to, ka R-fenibuta aizsargājošie efekti mitohondrijos neietver ar GABA-B receptoriem saistīto aktivitāti (atšķirībā no R-fenibuta, S-fenibuts nesaistās ar GABA-B receptoriem), bet efekts varētu būt saistīts ar VDCC  $\alpha_2\delta_1$  apakšvienību. Iepriekš ir parādīts, ka mitohondriji spēj ātri atbrīvoties no palielinātas iekššūnu Ca<sup>2+</sup> koncentrācijas, kas ir radusies dēļ paaugstinātas  $\alpha_2\delta_1$  aktivitātes, un saglabāt normālu Ca<sup>2+</sup> signālu pārnesi (D'Arco et al., 2015). Tas varētu izskaidrot, kāpēc R- un S-fenibuta klātbūtnē tika novērots samazināts Ca<sup>2+</sup> izraisīts mitohondriju pietūkums. Gan R-, gan S-fenibutam piemīt mitohondriju aizsargājošas īpašības pret anoksiju-reoksigenāciju un Ca<sup>2+</sup> izraisītu stresu. Tā kā nav pierādījumu par  $\alpha_2\delta$  lokalizāciju mitohondriju membrānā, iespējams, ka savienojumi varētu ietekmēt Ca<sup>2+</sup> signālceļus un aizsargāt mitohondrijus, mērķējot uz mitohondrijiem specifiskiem vai ar mitohondriju endoplazmatiskajiem tīkliem saistītiem Ca<sup>2+</sup> transportieriem.

# 3.3. Sigma-1 receptors kā potenciāls zāļu mērķis traumatiska smadzeņu bojājuma ārstēšanā (III publikācija)

Zāļu vielas, kas mijiedarbojas ar S1R, var izmantot neiroloģisko slimību, tostarp TSB, ārstēšanā (Wegleiter et al., 2014; Moritz et al., 2015; Dong et al., 2016). Veterinārmedicīnā tiek izmantoti tādi S1R ligandi kā fenitoīns un ropizīns (eksperimentāli kaķos un bīglu suņos) krampju mazināšanai (Craig, 1967; Edmonds et al., 1978; Blades Golubovic and Rossmeisl, 2017). Tā kā S1R tiek ekspresēts lielākajā daļā zīdītāju audos, tad pirmsklīniskie dati par S1R pētījumiem ir noderīgi gan humānajā, gan veterinārajā medicīnā.

Mēs paradījām, ka S1R deficīts ir saistīts ar uzlabotu motoro funkciju un samazinātu neiroloģisko deficītu akūtajā fāzē pēc TSB. WT (kontroles dzīvnieki) TSB pelēm bija ievērojami sliktāks neiroloģiskais stāvoklis (NSS) 24 h pēc galvas traumas, salīdzinot ar viltus grupu (p = 0,006, 3.10.A. attēls). S1R-/- traumētajiem un viltus grupas dzīvniekiem NSS neatšķīrās 24 h pēc galvas traumas (p = 0,191, 3.10.A. attēls). Turklāt NSS bija ievērojami mazāks S1R-/- TSB dzīvniekiem (1,78  $\pm$  0,57), salīdzinot ar WT TSB (4,20  $\pm$  0,79) 24 h pēc galvas traumas (p = 0,024). Vēlākos laika punktos netika novērotas būtiskas atškirības starp WT TSB un S1R-/-TSB grupu dzīvniekiem. Motorā koordinācija rotējošā stiena testā bija ievērojami labāka S1R-/- dzīvniekiem, salīdzinot ar WT dzīvniekiem. WT TSB dzīvnieki pavadīja būtiski mazāk laika uz rotējošā stieņa 24 h pēc galvas traumas, salīdzinot ar viltus grupu (p = 0,038, 3.10.B. attēls). Starp S1R-/- TSB un viltus grupas dzīvniekiem nebija būtiskas atšķirības nevienā no laika punktiem pēc galvas traumas. Turklāt pavadītais laiks uz rotējošā stiena bija nemainīgs līdz pat 12 mēnešiem pēc galvas traumas, salīdzinot ar mērījumiem pirms galvas traumas. Turpretim WT TSB un viltus dzīvnieki pavadīja būtiski mazāku laiku uz rotējošā stieņa, attiecīgi, sākot ar 24 h un 6 mēnešiem pēc galvas traumas (3.10.B. attēls). Iepriekšējie pētījumi arī parāda, ka S1R deficīts mazina neirodeģeneratīvos procesus. Piemēram, S1R-/pelēm bija mazāk izteikta motorā disfunkcija un dopamīnerģisko neironu nāve nekā WT pelēm pēc MPTP ierosinātas Parkinsona slimības (Hong et al., 2015). Cits pētījums parādīja, ka S1R-/- pelēm ir samazināta mehāniskā alodīnija, makrofāgu/monocītu infiltrācija un hemokīna CCL2 līmenis muguras ganglijos pēc muguras smadzeņu traumas (Bravo-Caparrós et al., 2020).



3.10. att. Neiroloģiskā stāvokļa (A) un motorās funkcijas (B) novērtējums S1R-/- pelēm pēc vidēji smagas galvas traumas

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M (n=6-10). \**P* < 0,05, \*\* < 0,01, \*\*\* < 0,001 WT TSB grupa pret WT viltus grupu, #*P* < 0,05, ## < 0,01 S1R-/- TSB grupa pret S1R-/- viltus grupu, &*P* < 0,05, && < 0,01 S1R-/- TSB grupa pret WT TSB grupa, ^*P* < 0,05, ^^ < 0,01 WT viltus grupa pret S1R-/- viltus grupu (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Fišera LSD tests).

Iepriekšējie pētījumi parāda, ka S1R deficīts ietekmē kognitīvo funkciju, īpaši vecākām pelēm (Chevallier et al., 2011), un tas ir saistīts arī ar izteiktākiem mācīšanās traucējumiem un toksicitāti pēc eksperimentāla Alcheimera modeļa pelēs (Maurice et al., 2018). Barnes labirinta tests tika izmantots, lai novērtētu telpiskās atmiņas funkciju ilgstoši pēc galvas traumas. Mēs nenovērojām kognitīvos traucējumus S1R-/- pelēs līdz 10 mēnešiem pēc TSB. WT TSB dzīvniekiem 7 mēnešus pēc galvas traumas bija ietekmēta īslaicīgā atmiņa (24 h pēc pēdējās apmācības dienas); WT TSB dzīvnieki pavadīja ievērojami mazāk laika mērka zonā, salīdzinot ar viltus grupu (p < 0.01, 3.11.A. attēls). Īslaicīgā atmiņa nebija ietekmēta S1R-/- dzīvniekiem (3.11.A. attēls). Ilgstošā atmiņa (7 dienas pēc pēdējās apmācības dienas) nebija ietekmēta nevienā no pētījuma grupām (3.11.B. attēls). Atšķirībā no WT dzīvniekiem S1R-/- pelēm novēroja atmiņas uzlabošanos 10 mēnešus pēc galvas traumas. S1R-/- viltus un TSB grupas dzīvnieki pavadīja būtiski ilgāku laiku mērķa zonā 10 mēnešus pēc galvas traumas, salīdzinot ar mērījumiem, kas izdarīti 7 mēnešus pēc galvas traumas (3.11.A. attēls). Papildus Barnes labirinta testam, lai novērtētu telpisko darbības atminu, mēs izmantojām arī Y-labirinta testu. Netika novērotas būtiskas rezultātu atšķirības starp pētījuma grupām (datus skatīt III publikācija).





Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M (n=7-10). \*\*P < 0,01 S1R-/- TSB grupa pret WT TSB grupu, ##P < 0,01 WT TSB grupa pret WT viltus grupu, aP < 0,05, aa<

0,01 7 mēneši pret 10 mēnešiem,  $^P < 0,05 \text{ S1R-/- viltus grupa pret WT viltus grupu (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Fišera LSD tests).$ 

Lai arī pēc traumas nebija ietekmēta depresijai līdzīgā uzvedība un trauksmes līmenis, tika novērotas būtiskas fenotipiskas atšķirības starp WT un S1R-/dzīvniekiem. S1R-/- dzīvniekiem līdz pat 12 mēnešiem pēc galvas traumas bija būtiski samazināts imobilitātes laiks astes fiksēšanas testā, salīdzinot ar WT grupu
(3.12. attēls). WT dzīvniekiem imobilitātes laiks palielinājās laika gaitā, maksimumu sasniedzot 12 mēnešus pēc galvas traumas.



3.12. att. Depresijai līdzīgās uzvedības novērtējums S1R-/- pelēm pēc vidēji smagas galvas traumas

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M (n=6-9). \**P* < 0,05 WT TSB grupa pret S1R-/- TSB grupu, ^*P* < 0,05, ^^ < 0,01 WT viltus grupa pret S1R-/- viltus grupu (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Fišera LSD tests).

Motorās funkcijas un koordinācijas traucējumi ir bieži sastopamas sekas pēc TSB, un tie parasti ir saistīti ar sensorimotorās smadzeņu garozas traucējumiem (Carron et al., 2016). Tomēr smadzenītēm arī ir svarīga loma kustību kontrolē un koordinācijā, kas var būt saistīta ar motoru disfunkciju pēc TSB (Rapoport et al., 2000). Šajā darbā mēs parādījām, ka gan viltus operētām, gan traumētām WT pelēm ar vecumu attīstījās kustību koordinācijas traucējumi, savukārt S1R-/- pelēm motorā funkcija ar vecumu nemainījās. Viens no iespējamiem motorās disfunkcijas iemesliem ir palielināta astrocītu aktivācija smadzenītēs. Astrocītu aktivitāte (GFAP, GLT-1) un Purkinjē šūnu skaits (Calbindin D28K) tika novērtēts smadzenīšu pelēkajā vielā. GFAP krāsošanas intensitāte smadzenīšu molekulārajā slānī bija ievērojami lielāka WT grupas dzīvniekiem, salīdzinot ar S1R-/- grupu (p < 0,001 S1R-/- viltus grupa pret WT viltus grupu, p = 0,019 S1R-/- TSB grupa pret WT TSB grupu, 3.13.A. attēls). S1R-/- dzīvnieku smadzenēs tika atrasta pārsteidzoši zema GFAP krāsošanās intensitāte (3.13.A. un B. attēls), bet netika novērotas būtiskas atšķirības GLT-1 ekspresijā (datus skatīt III publikācija). Iegūtie rezultāti parāda, ka S1R-/- peļu smadzenītēs nav izmainīts astrocītu skaits, bet samazināta astrocītu GFAP ekspresija. Palielināts astrocītu skaits smadzenītēs samazina Purkinjē šūnu izdzīvošanu, kas ir saistītas ar kustību un koordināciju, un izraisa smadzenīšu disfunkciju un motoros traucējumus pēc TSB (Mautes et al., 1996; Park et al., 2006; Cerrato, 2020). S1R-/- pelēm bija saglabāta motorā koordinācija un gandrīz nebija GFAP ekspresijas smadzenīšu molekulārajā slānī pēc TSB. Tāpat GFAP ekspresija bija ievērojami samazināta S1R-/- viltus operētām pelēm, salīdzinot ar WT pelēm. Nemot vērā GFAP pozitīvo astrocītu lokalizāciju smadzenītēs, var uzskatīt, ka tā ir Bergmann glija (Nolte et al., 2001). Bergmann glija tieši regulē Purkinjē šūnas un

ietekmē motoro funkciju (Sasaki et al., 2012; Wang et al., 2012). Mēs neatradām būtiskas atškirības kopējā Purkinjē šūnu skaitā starp WT un S1R-/- pelēm. Tas atbilst iepriekšējiem pētījumiem, kuros Purkinjē šūnu deģenerācija un motorā disfunkcija bija saistīta gan ar palielinātu GFAP ekspresiju, gan Bergmann glijas izslēgšanu (Cui et al., 2001; Wang et al., 2011; Tyszkiewicz et al., 2021). Mūsu rezultāti parāda, ka S1R-/- peļu uzlabotā motorā koordinācija varētu būt saistīta ar samazinātu GFAP ekspresiju Bergmann glijas šūnās smadzenīšu molekulārajā slānī. Šie rezultāti liecina par nozīmīgu S1R iesaistīšanos informācijas apstrādes regulēšanā un motorās kontroles mehānismos smadzenītēs. Tāpēc uzvedības GFAP ekspresijas samazināšana Bergmann glijā var būt jauna terapeitiska stratēģija motorās disfunkcijas novēršanai novecošanās laikā.



3.13. att. GFAP krāsošanās intensitāte (A) un reprezentatīvas mikrofotogrāfijas S1R-/- peļu smadzenīšu molekulārajā slānī 12 mēnešus pēc vidēji smagas galvas traumas

Attēliem ir x100 palielinājums. Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības  $\pm$  S.E.M (n=5). #P < 0.05 WT viltus grupa pret WT TSB grupu, \*\*P < 0.01, \*\*\* < 0.001 WT grupa pret S1R-/- grupu (Manna-Vitnija U-tests).

Tā kā mēs novērojām akūtu neiroloģiskās funkcijas uzlabojumu S1R-/- pelēm pēc TSB, mēs gribējām pārbaudīt vai farmakoloģiska inhibīcija ar S1R antagonistu (BD-1063) ietekmē uzvedības un morfoloģisko pārmaiņu iznākumu pēc galvas traumas. Ārstēšana ar BD-1063 neietekmēja TSB izraisītos neiroloģiskos deficītus (datus skatīt III publikācija). Lai arī BD-1063 koncentrācija smadzeņu audos bija pietiekami liela  $(6,3 \pm 0,03 \ \mu g/g)$ , netika novērotas būtiskas atšķirības starp kontroles un BD-1063 grupām S1R gēna ekspresijā. Tas varētu liecināt par nepietiekamu BD-1063 koncentrāciju un/vai ievadīšanas ilgumu, lai bloķētu S1R smadzeņu audos. Iespējams, ka BD-1063 ir jāvada lielākās devās un ilgāku laiku (vairāki mēneši), lai ietekmētu S1R gēna ekspresiju smadzeņu audos (zinātniska komunikācija ar spāņu kolēģiem). Ir zināms, ka S1R agonisti samazina neiroloģiskos traucējumus un TSB izraisītu neirodeģenerāciju, samazinot mikroglijas aktivāciju pēc galvas traumas *in*  vivo (Wegleiter et al., 2014; Moritz et al., 2015; Dong et al., 2016). Iepriekšējos pētījumos BD-1063 tika izmantots, lai bloķētu S1R agonistu darbību (Katnik et al., 2014; Nardai et al., 2020). Nesenā pētījumā tika parādīts, ka BD-1063 piemīt neiroprotektīvas īpašības muguras smadzeņu traumas modelī, palielinot izdzīvojošo motoro neironu skaitu un samazinot mikroglijas aktivāciju L4-L5 mugurkaula segmentu ventrālajos ragos (Gaja-Capdevila et al., 2021). Līdz ar to jāsecina, ka dažādi S1R ligandi var darboties atšķirīgi un pat pretēji, veicinot vai samazinot neiroaizsardzību.

# 3.4. Ilgtermiņa uzvedības izmaiņas pēc šķidruma perkusijas traumatiska smadzeņu bojājuma (IV publikācija)

Lai novērtētu uzvedības izmaiņas pēc FPI, izmantojām dažādus uzvedības testus neiroloģiskā stāvokļa, perifērās termiskās un mehāniskās jutības, depresijai līdzīgās uzvedības un kognitīvās funkcijas noteikšanai uzreiz pēc smadzeņu bojājuma izraisīšanas un ilgākā laika periodā pēc tam.

Traumētajiem dzīvniekiem līdz pat 12 mēnešiem pēc galvas traumas bija ievērojami lielāks NSS, salīdzinot ar viltus grupu (p < 0,0001, 3.14.A attēls). Abu pētījuma grupu dzīvniekiem būtiski neatšķīrās noietais laiks uz rotējošā stieņa (3.14.B. attēls).



3.14. att. Peļu neiroloģiskā stāvokļa (A) un motorās funkcijas novērtējums (B) ilgstošā laika periodā pēc vidēji smagas galvas traumas

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M (n=7-10). \*\*P < 0,01, \*\*\* < 0,001, \*\*\*\* < 0,0001 pret viltus grupu (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Fišera LSD tests).

Sāpes ir viena no visvairāk apspriestām, bet tajā pašā brīdī maz pētītām ilgtermiņa sekām pēc TSB (Irvine and David Clark, 2018). Sāpes ir akūta reakcija uz galvas smadzeņu traumu, un pacientiem tās parasti ilgst vairākas nedēļas pēc traumas (Ofek

and Defrin, 2007). Tomēr nelielai daļai pacientu sāpes turpinās arī pēc bojāto audu sadzīšanas un kļūst hroniskas (Irvine and David Clark, 2018). Visbiežākais sāpju veids TSB pacientiem ir pēctraumatiskas galvassāpes, kas lielākajā dalā gadījumu ir tieši saistītas ar smadzeņu audu traumu (Irvine and David Clark, 2018; Khoury and Benavides, 2018). Tomēr galvassāpes nav vienīgais sāpju veids pēc TSB. Klīniskie pētījumi liecina, ka hroniskas sāpes var rasties arī reģionos, kas nav cietuši galvas traumas laikā, piemēram, mugurā un apakšējās ekstremitātēs (Ofek and Defrin, 2007; Nampiaparampil, 2008; Kwan et al., 2018). Nav skaidri zināmi mehānismi, kas veicina hronisku sāpju attīstību ekstremitātēs, vai tās varētu būt izsauktas caur mehānismiem CNS vai sekundāri dēļ tiešas audu traumas. Neskatoties uz skaidriem pierādījumiem, ka pēc TSB sāpes ārpus galvas reģionā ir izplatītas, tikai nesen ir sākti pētījumi ar dzīvniekiem, lai noskaidrotu sāpju attīstības mehānismus pēc TSB. Turklāt šie pētījumi ir veikti akūtos laika punktos pēc TSB, un sāpes visbiežāk tiek novērtētas periorbitālajā reģionā (Feliciano et al., 2014; Macolino et al., 2014; Meidahl et al., 2017, 2018; Wang et al., 2017; da Silva Fiorin et al., 2018). Dažos pētījumos ir novērtēta sāpēm līdzīgā uzvedība ārpus galvas reģiona, piemēram, pakaļkājās (Liang et al., 2017; Meidahl et al., 2017; Irvine et al., 2019). Palielināta mehāniskā jutība ir novērota 3 nedēļas pēc TSB, kas liecina, ka šiem dzīvniekiem ir akūtas sāpes, kas saistītas ar signālceļu traucējumiem starp galvas un muguras smadzenēm (Irvine et al., 2019). Mēs konstatējām, ka latFPI izraisa termisku un mehānisku jutību ķermeņa reģionos, kas atrodas ārpus galvas reģiona. Lai noteiktu perifēro termisko jutību, tika izmantots acetona tests. Traumētajiem dzīvniekiem bija būtiski lielāks kopējais atbildes laiks kontralaterālajā pakaļkājā (pretējā puse trieciena pusei), salīdzinot ar viltus grupu 3 mēnešus  $(4,1 \pm 0,6 \text{ s pret } 2,3 \pm 0,5 \text{ s, p})$ = 0,026), 6 mēnešus  $(3,3 \pm 0,7 \text{ s pret } 1,0 \pm 0,2 \text{ s}, p = 0,007)$  un 9 mēnešus  $(3,8 \pm 0,9)$ s pret 1,2  $\pm$  0,2 s, p = 0,014) pēc galvas traumas (3.15.A. attēls). Lai noteiktu perifēro mehānisko jutību, tika izmantots von Frey tests. Traumētie dzīvnieki būtiski ātrāk reaģēja ar kontralaterālo pakaļkāju uz mehānisko stimulu, salīdzinot ar viltus grupu 9 mēnešus  $(3,4 \pm 0,3 \text{ s pret } 5,9 \pm 0,7 \text{ s}, p = 0,001)$  un 12 mēnešus  $(2,6 \pm 0,4 \text{ s pret})$  $4.9 \pm 0.4$  s, p = 0.0113) pēc galvas traumas (3.15.B. attēls). Mehāniskā jutība bija izteiktāka arī ipsilaterālajā pakaļkājā (atbilst trieciena pusei), salīdzinot ar viltus grupu 12 mēnešus pēc galvas traumas  $(3,6 \pm 0,6 \text{ s pret } 5,9 \pm 0,7 \text{ s}, p = 0,0157, 3.15.B.$ attēls). Interesanti, ka mehāniskā jutība tika novērota gan kontralaterālajā, gan ipsilaterālajā pakaļkājā, turpretim, termiskā jutība tika novērota tikai kontralaterālajā pusē. Klīniskie pētījumi liecina, ka termiskā un taustes jutība parasti mēdz būt vienpusēja, galvenokārt atrodoties ķermeņa pusē, kas ir pretēja TSB pusei (kontralaterālā puse) (Ofek and Defrin, 2007). Ir pierādīts, ka kraniotomija pati par sevi var izraisīt paaugstinātu sāpju jutību periorbitālajā un plantārajos reģionos žurkām (da Silva Fiorin et al., 2018) un pelēm (Macolino et al., 2014). Tomēr paaugstinātā jutība ir novērota agrīnos laika punktos pēc TSB, un tos var izskaidrot ar tiešu audu bojājumu un iekaisuma reakciju uz traumu.



3.15. att. Peļu perifērās jutības novērtējums ilgstošā laika periodā pēc vidēji smagas galvas traumas

(A) Kontralaterālās (pretējā puse traumas skartajai smadzeņu puslodei) un ipsilaterālās (puse atbilst traumas skartajai smadzeņu puslodei) pakaļkājas kopējais atbildes laiks acetona testā un (B) atbildes reakcija von Frey testā. Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M (n=7-10). \*P < 0,05, \*\* < 0,001 kontralaterālā pakaļkāja latFPI pret viltus grupu, #P <0,05, ## < 0,001 ipsilaterālā pakaļkāja latFPI pret viltus grupu (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Fišera LSD tests).</li>

Jāatzīmē, ka gan sāpes, gan depresija ir bieža klīniskā pazīme pēc TSB. Nozīmīgs paliekošu sāpju rādītājs pacientiem ir agrīni depresijas simptomi pēc TSB (Tham et al., 2013). Depresijai līdzīgi simptomi un pēctraumatiskas sāpes bieži tiek ziņotas kā blakus slimības pēc TBS (Bodnar et al., 2018; Khoury and Benavides, 2018). Mūsu pētījumā vidēji smaga galvas trauma izraisīja progresējošu depresijai līdzīgu uzvedību, sākot no 6 mēnešiem pēc traumas. Proti, traumētajiem dzīvniekiem bija ievērojami lielāks imobilitātes laiks, salīdzinot ar viltus grupu 6 mēnešus ( $94.7 \pm 7.9$ pret  $66,4 \pm 10,0$ ; p = 0,040) un 12 mēnešus (136,8 ± 10,5 pret 70,2 ± 13,3; p = 0,001; p = 0,001) pēc galvas traumas (3.16. attēls). Viltus grupas dzīvniekiem imobilitātes laiks palika nemainīgs līdz pat 12 mēnešiem pēc galvas traumas, salīdzinot ar 1 mēnesi. Iegūtie rezultāti atbilst nesen publicētiem rezultātiem, kur pelēm novēroja progresējošu un smagu depresijai līdzīgu uzvedību sākot ar 6 mēnešiem pēc CCI (Mao et al., 2020). Turklāt mēs parādījām, ka vidēji smags FPI arī izraisa depresijai līdzīgo uzvedību CD-1 līnijas peļu tēviņos (Publikācija III). Tomēr ir arī ziņojumi, ka depresijai līdzīga uzvedība netiek novērota 12 mēnešu laikā pēc slēgtas galvas traumas (Tucker et al., 2019). Mūsu rezultāti liecina, ka vidēji smags FPI izraisa progresējošu depresijai līdzīgu uzvedību, un šis modelis ir piemērots, lai pētītu depresijas simptomus, kas tiek diagnosticēti pēc TSB.



3.16. att. Depresijai līdzīgās uzvedības novērtējums ilgstošā laika periodā pēc vidēji smagas galvas traumas

Rezultāti attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± S.E.M (n=7-10). \*P < 0,05, \*\* <0,01 pret viltus grupu, #P < 0,05, ## < 0,001 pret 1 mēnesi (divfaktoru atkārtotu mērījumu dispersijas analīze, Fišera LSD tests).

Mācīšanās un atmiņas novērtēšana tiek plaši izmantota pirmsklīniskajos pētījumos, lai noteiktu kognitīvo traucējumu ilgumu un smagumu pēc TSB. Kognitīvie traucējumi eksperimentālajos TSB modelos ir novēroti līdz 1 gadam vai ilgāk pēc sākotnējās traumas. Šajos ilgtermiņa pētījumos kognitīvie traucējumi tika novēroti pēc smaga TSB, kas raksturojas ar plašu smadzenu audu zudumu (Bramlett and Dietrich, 2004; Dixon et al., 2009; Pischiutta et al., 2018; Campos-Pires et al., 2019; Mao et al., 2020). Gadījumos, kad smadzenu audu bojājumi nav plaši (piemēram, audu zudums ipsilaterālajā garozā), kognitīvie traucējumi ir mazāk izteikti vai vispār netiek novēroti (Leconte et al., 2020; Publikācija III). Šajā pētījumā mēs nenovērojām kognitīvos traucējumus nevienā no veiktajiem atminas testiem. No hipokampa atkarīgā atmina, piemēram, telpiskā mācīšanās un atmina, netika ietekmēta līdz 6 mēnešiem pēc traumas (datus skatīt IV publikācija). Tikai viens pētījums parādīja, ka no hipokampa atkarīgā atmiņa tika ietekmēta no 2 līdz 12 mēnešiem pēc FPI žurkām; tomēr dzīvniekiem tika ierosināta smaga galvas trauma, par ko liecina progresējošs audu zudums (Pierce et al., 1998). Lai gan daži spekulē, ka Moris ūdens labirinta testa veiktspēja un jutība ir atkarīga no protokola sarežģītības (Kamper et al., 2013), mēs uzskatām, ka vidēji smags FPI modelis nav piemērots, lai pētītu atmiņas traucējumus pēc TSB pelēm. Turklāt mēs nenovērojām būtiskas atškirības starp traumētajām un viltus operētām pelēm Y-labirinta un PNR testos, kas liecina par to, ka vidēji smags FPI neietekmēja kognitīvo funkciju (datus skatīt IV publikācija). Ir svarīgi atzīmēt, ka, veicot FPI, kraniotomijas lokalizācijai ir būtiska nozīme. Lai gan ķirurģiskā procedūra dzīvniekiem tiek veikta līdzīgi, mediālās un rostrālās nobīdes var palielināt vai mazināt no traumām atkarīgos hipokampa bojājumus (Thompson et al., 2005).

Šajā pētījumā iegūtie rezultāti parāda, ka FPI rada nopietnas ilgstošas sekas, rezultējoties perifērās sāpēs un depresijai līdzīgā uzvedībā, kas turpinās līdz pat 12 mēnešiem pēc TSB. Neskatoties uz to, klīniskajos un pirmsklīniskajos TSB pētījumos sāpes citos ķermeņa reģionos, izņemot galvu, bieži netiek sistemātiski novērtētas. Ir svarīgi, lai šis faktors tiktu ņemts vērā, novērtējot pēc traumatiskas sāpes. Pacienti ar TSB dzīves kvalitāti var uzlabot, savlaicīgi diagnosticējot sāpes, lai mazinātu un novērstu sāpju attīstību un to ietekmi uz kopējo veselības stāvokli. Akūtu un ilgstošu sāpju mazināšana un novēršana var būt svarīga, lai novērstu depresijas simptomus vai citus neiroloģiskus traucējumus pēc TSB.

## SECINĀJUMI

1.Galvaskausa lūzums ir ietekmējošs faktors iekaisuma reakcijai un neiroloģiskajiem traucējumiem pelēs pēc kontūzijas tipa bojājuma (viegls traumatisks smadzeņu bojājums). Dzīvniekiem ar galvaskausa lūzumu ir ievērojami augstāka iekaisuma reakcija hipokampā un striatum (TIMP-1 un TNF-α) un sliktāks neiroloģiskais stāvoklis pēc traumas.

2.Šķidruma perkusijas bojājums (vidēji smags traumatisks smadzeņu bojājums) izraisa ilgstošus sensorimotoros traucējumus, progresējošu depresijai līdzīgo uzvedību un perifērās sāpes. Šis modelis ir piemērots pirmsklīniskajiem eksperimentiem, lai pētītu ilgstošas sekas pēc galvas traumas, kā depresija un perifērās sāpes.

3.R-fenibuts uzlabo sensorimotoro funkciju, samazina smadzeņu neirodeģenerāciju (*Nissl* iekrāsotie neirocīti, IL-1 $\beta$  pozitīvās šūnas) akūtajā fāzē pēc šķidruma perkusijas bojājuma, izmantojot darbības mehānismus, kas saistīti ar Ca<sup>2+</sup> homeostāzi un mitohondriju toleranci pret oksidatīvo stresu. R-fenibuts ir perspektīvs neiroprotektīvs savienojums TSB ārstēšanai humānajā un veterinārajā medicīnā.

4.S1R deficīts pelēs samazina šķidruma perkusijas TSB ierosinātas ilgstošas sekas uzlabo neiroloģisko stāvokli un motoro koordināciju, samazina depresijai līdzīgo uzvedību un saglabā kognitīvo funkciju. Veiktie pētījumi apstiprina, ka S1R iesaistās motorās uzvedības veidošanā caur astrocītu GFAP regulēšanu smadzenīšu molekulārajā slānī.

## PRIEKŠLIKUMI

1.Izmantojot kontūzijas tipa slēgtu galvas traumas modeli, dzīvnieki ar galvaskausa lūzumu jāanalizē atsevišķi vai jāizslēdz no eksperimenta, lai samazinātu datu izkliedi.

2.Galvaskausa lūzuma noteikšana pacientiem ir būtiska, lai prognozētu TSB iznākumu humānajā un veterinārajā medicīnā.

3.Ņemot vērā to, ka fenibutam piemīt neiroprotektīvas īpašības eksperimentālajos neiroloģisko saslimšanu modeļos, tas ir perspektīvs savienojums TSB radīto komplikāciju ārstēšanai humānajā un veterinārajā medicīnā.

4.Savienojumi, kas samazina Sigma-1 receptora aktivitāti ir perspektīvi TSB radīto neiroloģisko un motoro traucējumu samazināšanai gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem.

5.Pacientiem ar TSB dzīves kvalitāti var uzlabot, savlaicīgi diagnosticējot sāpes, lai mazinātu un novērstu sāpju attīstību un to ietekmi uz kopējo veselības stāvokli. Akūtu un ilgstošu sāpju mazināšana un novēršana var būt svarīga, lai novērstu depresijas simptomus vai citus neiroloģiskus traucējumus pēc TSB gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem.

### 1. INTRODUCTION

#### **1.1. Traumatic Brain injury**

Traumatic brain injury (TBI) is defined as an alteration in brain function caused by an external force. The TBI is heterogeneous with many etiologies and clinical presentations and encompasses diffuse, focal, penetrating, or blast injury (Berkner et al., 2016; De Guzman and Ament, 2017). In Europe Union (EU) around 1.5 million head injuries occur yearly, with 70-90% of patients having mild to moderate TBI (Dewan et al., 2018; Majdan et al., 2022). TBI is one of the leading causes of traumarelated permanent disability and mortality worldwide in all age groups (Majdan et al., 2022). The leading causes of TBI are motor vehicle accidents, falls, sports injuries and explosions (Brazinova et al., 2021). Crude incidence rates ranged from 47.3 to 849 per 100 000 population per year (Brazinova et al., 2021).

TBI occurs frequently in small animals (dogs and cats) due to road traffic accidents, falls, crush injuries and assaults by humans (Santos et al., 2018; Elias et al., 2019). Due to the scarcity of prospective or retrospective clinical data in the veterinary literature, treatment recommendations for small animals with TBI are mainly based on human and experimental studies in small rodents (Santos et al., 2018; Elias et al., 2019; Evans and Fernandez, 2019).

Therefore, experimental animal models of TBI are crucial to studying pathophysiological mechanisms and finding novel therapeutic targets and strategies for treating TBI-induced impairments in humane and veterinary medicine.

#### 1.2. Animal models of traumatic brain injury

During the last decade, substantial attention has been paid to the study of TBI. Numerous animal models have been used to study TBI, including open and closed head injury (CHI) (Namjoshi et al., 2013). While mechanical force is delivered to the intact skull in CHI (Namjoshi et al., 2013), in open head injury, a craniotomy has to be performed, and the impact is directed toward the dura mater (Flierl et al., 2009a; Albert-Weißenberger et al., 2012). To perform CHI, several models are used, such as variations in weight drop (WD) (Marmarou et al., 1994; Flierl et al., 2009b; Albert-Weißenberger et al., 2012), piston-driven (Ren et al., 2013; Namjoshi et al., 2014; Meconi et al., 2018) and blast injury TBI models (Cernak et al., 2011). The WD models that use a free-falling weight are used most widely to induce CHI (Xiong et al., 2013). Although WD models have been used for several decades, there is a substantial difference in performance and protocols between laboratories. For example, the weight of the falling cylinder varies from 5 g to 500 g, and the drop height varies from 0.5 cm to 167 cm (Schwarzbold et al., 2010; Kane et al., 2012;

Wu et al., 2012; Midura et al., 2015). As a consequence, the biochemical outcome, i.e., the expression of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-12, and IL-1 $\beta$ , is highly variable (Albert-Weissenberger et al., 2012; Zhang et al., 2014; Baratz et al., 2015; Gyoneva and Ransohoff, 2015). Controlled cortical impact and fluid percussion injury models, procedures that need a craniotomy, induce comparable high cytokine expression (Xiong et al., 2013; Rowe et al., 2016; Clausen et al., 2018; Garg et al., 2018). Because in a previous study, we observed that approximately 30% of mice experienced skull fractures after WD injury (unpublished data), we hypothesize that injury to the skull may be one of the primary triggers for the expression of inflammatory genes in the brain after WD injury and may thus contribute to the variability observed in this valuable TBI model.

#### **1.3. Functional outcomes following traumatic brain injury**

Brain injury is commonly viewed as an acute self-limiting problem; however, the consequences of adult brain injuries can develop over years or even decades after the initial insult (Blennow et al., 2016; Wilson et al., 2017). Long-term consequences (in both humans and animals) include motor dysfunction, depression, cognitive deficits, and emotional changes (Sande and West, 2010; Wilson et al., 2017). It is widely recognized that the experience of pain is a frequent occurrence in TBI patients (Gironda et al., 2009). In most of these instances, chronic pain is located in the head and is associated with brain tissue damage (Irvine and David Clark, 2018). Pain in TBI patients has also been reported in seemingly intact body regions, such as the upper and lower limbs (Ofek and Defrin, 2007; Irvine and David Clark, 2018). However, chronic post-TBI pain in non-head body regions could also be associated with local injury (e.g., fractures, wounds), peripheral neuropathy or a related spinal injury (Irvine and David Clark, 2018). Therefore, the anatomical source of pain in TBI patients is often not identifiable when pain is chronic (Walker, 2004). The mechanisms for chronic pain in TBI patients are largely unknown (Irvine and David Clark, 2018). Psychological disorders, including depression, following TBI are commonly reported comorbidities of posttraumatic pain (Khoury and Benavides, 2018). Depression and pain following TBI are believed to exacerbate each other, and both are rooted in common biological mechanisms, such as shared neurotransmitter pathways in the periaqueductal grey, which is a key anatomic structure in the pain modulation system (Bair et al., 2003; Sullivan-Singh et al., 2014). In animal models of TBI, the response to the peripheral pain reflex, such as mechanical and thermal sensitivity, has been studied up to 2 months after controlled cortical injury (CCI) and fluid percussion injury (FPI) (da Silva Fiorin et al., 2018). Only a small subset of experimental TBI models evaluated long-term consequences after injury (>6 months after TBI). It has been demonstrated that mice subjected to cortical impact injury (CCI), which is often characterized by extensive brain tissue loss, demonstrate

persisting behavioral deficits, such as depressive-like behavior, cognitive decline and motor dysfunction, up to 12 months after injury (Shear et al., 2004; Pöttker et al., 2017; Pischiutta et al., 2018; Mao et al., 2020). However, more moderate CCI produces less extensive morphological damage (tissue loss at the cortical region) and less prominent behavioral deficits (Leconte et al., 2020). Only a few studies have evaluated long-term behavioral changes in rats following FPI, mainly limited to single time points or memory evaluation (Pierce et al., 1998; Immonen et al., 2009; Johnstone et al., 2015). It should be noted that behavioral outcomes after TBI could depend on the background strains of mice (Fox et al., 2009). Most long-term follow up TBI studies have been performed on C57BI/6 background mice. It is known that different mouse strains vary in their inherent behavioral characteristics (Bothe et al., 2005). For example, C57BL/6 and BALB/c mice exhibit differences in anxiety-like and depressive-like behavior, pain sensitivity, motor performance, learning and memory (Mogil et al., 1999; Lucki et al., 2001; An et al., 2011; Garcia and Esquivel, 2018).

## **1.4.** Treatment strategies after traumatic brain injury

#### **1.4.1.** Mitochondrial-targeted therapy

Currently, no effective treatment is available (European Medicines Agency) for TBI-induced deficits other than supportive therapy. Treatment options for TBI are limited due to its complex pathogenesis and the heterogeneity of its presentation, which includes hematomas, contusions, hypoxia, and vascular, axonal, and other types of central nervous system injuries (Xiong et al., 2013; Berkner et al., 2016; De Guzman and Ament, 2017). Among the processes that impact TBI, the generation of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria occurs within the first minutes after TBI. It thus leads to the disruption of calcium ion (Ca2+) homeostasis, which is the "final common pathway" for toxic cellular degradation (Görlach et al., 2015; Granger and Kvietys, 2015). Maintaining regional neuronal Ca2+ homeostasis and mitochondrial function is crucial to prevent secondary neuronal injury (Bains and Hall, 2012; Weber, 2012). Thus, mitochondrial-targeted drugs and drugs acting on specific intracellular Ca2+ signaling pathways or subcellular components are promising therapeutic interventions for TBI (Hall et al., 2010; Cheng et al., 2012). In fact, upregulation of the neuronal calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunit modulates the activation of mitochondrial Ca2+ buffering in pathological conditions (D'Arco et al., 2015). Phenibut, a nootropic prescription drug with anxiolytic activity, is used in clinical practice in Eastern European countries for the treatment of anxiety, tics, stuttering, insomnia, dizziness, and alcohol abstinence (Lapin, 2001a; Kupats et al., 2020a). R-phenibut ((3R)-phenyl-4-aminobutyric acid), which is one of the optical

isomers of phenibut, binds to gamma-aminobutyric acid B (GABA-B) receptors and the  $\alpha 2\delta$  subunit of voltage-dependent calcium channels (VDCC), while S-phenibut binds only to the  $\alpha 2\delta$  subunit of VDCC (Dambrova et al., 2008; Zvejniece et al., 2015; Belozertseva et al., 2016). Since both isomers of phenibut bind to the  $\alpha 2\delta$ subunit of VDCC and only R-phenibut binds to the GABA-B receptor, both isomers could be used to specify the possible molecular mechanisms of phenibut in different experimental models. Our previous studies have shown that R-phenibut treatment significantly decreased the brain infarct size and increased brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor gene expression in damaged brain tissue in an experimental stroke mod (Vavers et al., 2016). The similarity of the pathogenic mechanisms of TBI and cerebral ischaemia indicates that therapeutic strategies that are successful in treating one may also be beneficial in treating the other.

### 1.4.2. Sigma-1 receptor

Among the putative targets of neuroprotective drugs, the Sigma-1 receptor (S1R) has attracted increasing attention as a novel molecular target for treating neurological disorders (Nguyen et al., 2015). S1R is a unique endoplasmic reticulum protein that is widely expressed in multiple organs, including the central nervous system (Su, 1994). S1R has been reported to play a role in both neurodegenerative and ischemic diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, stroke, and TBI (Nguyen et al., 2015; Shi et al., 2021). Genetic inactivation and pharmacological inhibition of S1R are associated with neurodegenerative phenotypes (Nguyen et al., 2015; Vavers et al., 2017). Specific agonists of S1R have previously been shown to provide potent neuroprotection by attenuating neurodegeneration and preventing microglial cell activation in adult animal models of TBI and in neonatal hypoxic/ischemic brain damage (Wegleiter et al., 2014; Dong et al., 2016). However, S1R antagonists also exert neuroprotective effects on experimental models of brain ischemia. For example, mice treated with the antagonist S1RA presented significantly reduced cerebral infarct size and neurological deficits caused by permanent middle cerebral artery occlusion (Sánchez-Blázquez et al., 2018). The nonselective S1R antagonist haloperidol also induces neuroprotection after brain ischemia (Schetz et al., 2007). Interestingly, after genetic inactivation and pharmacological blockade of S1R, antinociceptive effects on mice with traumatic spinal cord injury (SCI) were detected (Castany et al., 2018). On the other hand, activation of S1R after SCI is presumed to be detrimental for neuron survival and motor function recovery (Lattard et al., 2021). Thus, different S1R ligands may exert various effects in a variety of neurodegenerative disease models. Further studies are needed to better highlight the function of S1R in different in vivo models.

### 1.5. Aim of the thesis

To improve experimental animal models of traumatic brain injury and evaluate potential therapeutic targets for treating TBI-induced neurological impairments.

## 1.6. Objectives of the thesis

1.To compare the inflammatory response after weight-drop injury and correlate these findings with the presence and severity of skull fractures.

2.To evaluate the potential therapeutic effects of R-phenibut on neurological status and mitochondrial functionality *in vitro* following the lateral fluid percussion injury model of TBI in mice.

3.To evaluate the role of Sig1R in the development and pathogenesis of TBI.

4.To determine short- and long-term behavioural consequences after lateral fluid percussion injury over a 12-month period.

## 1.7. Hypothesis of the thesis

The lateral fluid percussion injury experimental model provides a relevant preclinical setting for the exploration of novel therapeutics and mechanisms of TBI.

## 1.8. Scientific novelty

Within the research framework, the novel therapeutic strategies for treating TBIinduced impairments in humane and veterinary medicine were studied. The current study resulted in the following novel findings:

1. The neuroprotective effects of R-phenibut (functional outcome, mitochondrial functionality and neurodegeneration) were evaluated after fluid percussion injury in mice.

2. The role of S1R in the pathogenesis of TBI and the development of short- and long-term neurological deficits in S1R knock-out mice was investigated.

3. The long-term alterations (up to 12 months post-injury) in mice behavior were evaluated following lateral fluid percussion injury. This is the first study to examine the prevalence of persistent peripheral pain over long-term follow-up in mice after experimental TBI.

4. The inflammatory response in the brain tissue was assessed after closed and open (skull fracture) head injury using the weight-drop injury model.

#### 1.9. Structure of the thesis

The thesis consists of four papers. In the first paper, inflammatory response in the brain tissue and neurobehavioral response after closed and open (skull fracture) head injury using weight-drop experimental model was analyzed. In the second paper, effects of R-phenibut on functional outcome, brain tissue and mitochondrial functionality following the lateral fluid percussion injury were evaluated. In the third paper, short and long-term behavioral impairments following lateral fluid percussion injury were characterized. In the fourth paper, the role of S1R in the development of neurological deficits immediately and long-term after lateral fluid percussion injury was investigated.

#### 2. MATHERIAL AND METHODS

#### 2.1. Study time, place and study scheme

The doctoral thesis was carried out in the period from 2018 to 2023 – at the Laboratory of Pharmaceutical Pharmacology, Latvian Institute of Organic Synthesis.

The thesis consists of four experiments. In the first study (Publication I), the experimental design was to expose Swiss-Webster (SW) male mice to CHI using a weight-drop device. Animals were divided into two groups: sham (n = 24) and CHI (n = 85). The skull was then examined for evidence of visible fractures, as defined below. For comparison, animals with CHI were subdivided into non-fracture (n = 52) and fracture (mild n = 7, moderate n = 12, severe n = 14) groups. In the second study (Publication II), SW male mice were used in a latFPI model of TBI. Mice were randomly assigned to four experimental groups: sham-operated (sham, n = 8), salinetreated latFPI mice (control group, n = 8), and latFPI mice that received R-phenibut at a dose of 10 mg/kg (n = 12) or 50 mg/kg (n = 10). R-phenibut and saline were initially administered intraperitoneally (i.p.) 2 h after injury and then once daily for an additional 7 days for a total treatment period of 1 week. Additionally, SW male mice (n = 6) were used to prepare brain homogenate and isolate brain mitochondria to assess mitochondrial functionality. ICR male mice (n = 3 at each time point) were used in a pharmacokinetic study to determine the concentration of R-phenibut (50 mg/kg) in the brain tissue extracts and plasma after i.p. and per oral (p.o.) administration. In the third study (Publication III), CD-1 male mice (WT/control group) and Sigma-1 receptor knock-out (S1R-/-) male mice were subjected to latFPI and randomly separated into four experimental groups: WT sham (n = 10), S1R-/sham (n = 10), WT TBI (n = 12) and S1R-/- TBI (n = 12). Additionally, WT male mice were used to evaluate the effects of the S1R antagonist BD-1063 on latFPI. Mice were randomly divided into five groups: naïve (n = 6), sham (n = 12), TBI (n = 12)

= 18), TBI + BD-1063 10 mg/kg (n = 16), TBI + BD-1063 30 mg/kg (n = 16). SW male mice (n = 36) were used to investigate BD-1063 concentrations and S1R expression in brain tissue. In the fourth study (Publication IV), Balb/c male mice were subjected to latFPI and randomly separated into two experimental groups: sham (n = 10) and latFPI (n = 10). Then, the acute and long-term behavior of mice was evaluated at different time-points up to 12 months post-injury.

#### 2.2. Materials

#### 2.2.1. Animals

All animals were housed under standard conditions (21–23 °C, 12 h light-dark cycle) with unlimited access to standard food (Lactamin AB, Mjölby, Sweden) and water. Male Swiss-Webster mice (10-week-old) were obtained from Laboratory Animal Center, University of Tartu, Estonia. ICR male mice were obtained from Riga Stradins University, Laboratory of Experimental Animals, Latvia. Sigma-1 receptor knock-out male mice (8-10-week-old) were obtained from Laboratorios Dr.Esteve S.A., Barcelona, Spain. CD-1 and Balb/c male mice (10-week-old) were obtained from Envigo, Netherlands. All animals were adapted to local conditions for two weeks before the start of experiments. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the guidelines reported in the EU Directive 2010/63/EU and in accordance with local laws and policies. All procedures were approved by the Latvian Animal Protection Ethical Committee of Food and Veterinary Service in Riga, Latvia (No. of license 76, 95, 104 and 105).

#### 2.2.2. Chemicals

R-phenibut ((3R)-phenyl-4-aminobutyric acid) was purchased from JSC Olainfarm (Olaine, Latvia). 1-[2-(3,4-Dichlorophenyl) ethyl]-4-methylpiperazine dihydrochloride was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

#### 2.3. Methods

#### 2.3.1. Experimental models of TBI

To induce TBI, weight-drop injury (mild TBI) and lateral fluid percussion injury (moderate TBI) were used.

The method to induce mild TBI is described in Publication I. Briefly, the mice were anesthetized with 4% isoflurane in a mixture of 50% nitrous oxide and 50% oxygen, and 3 - 1.5 % isoflurane was maintained during the surgical procedure using a face mask. Before trauma induction, the mice received a subcutaneous (s.c.) injection of tramadol (10 mg/kg). A midline longitudinal scalp incision was made, and the skull was exposed. A cone with a tip diameter of 5 mm was placed 2 mm posterior and lateral to bregma, and a weight of 90 g was dropped from a height of 8 cm onto the cone (figure 2.2.A). Then skull was examined for visible fractures and divided into four groups: non (skull bone without changes/no signs of fracture), mild (isolated linear fracture with no evidence of intracranial lesion), moderate (linear depressed or diastatic fracture with minimal dural tear, no macroscopic evidence of hematoma or parenchyma injury), and severe (complicated fracture with macroscopic intracranial lesions, including parenchyma injury and hematomas). Oxygen was applied for 20-40 s immediately after TBI. Then, the scalp wound was closed with a polypropylene 6-0 suture (SurgiproTM II, Mansfield, USA), and the mice were returned to their home cages with free access to water and food. Sham animals underwent the same procedures as the animals in the TBI group, but without the release of the weight.

The method to induce moderate TBI is described in Publication II, III and IV. Briefly, the mice were anesthetized with 4% isoflurane in a mixture of 50% nitrous oxide and 50% oxygen, and 3 - 1.5% isoflurane was maintained during the surgical procedure using a face mask. Before trauma induction, mice received subcutaneous (s.c.) administration of tramadol (10 mg/kg). A midline longitudinal scalp incision was made, and the skull was exposed. A craniectomy that was centered at 2 mm posterior to bregma and 2 mm right of midline was performed using a 3 mm outer-diameter trephine. A plastic cap was attached over the craniotomy using dental cement, and a mild or moderate severity brain injury was induced with a commercially available fluid percussion device (AmScien Instruments, Richmond, USA). Immediately after the injury, apnea was noted, and when spontaneous breathing returned, anesthesia was resumed. The cement and cap were removed, and the skin was sutured using resorbable sutures (6-0, silk). Sham-injured animals were subjected to an identical procedure as the latFPI animals except for the induction of trauma.

## 2.3.2. Determination of R-phenibut and BD-1063 in plasma and brain tissue

The method is described in Publication II and III. To determine the concentration of R-phenibut in the plasma and brain, mice received an i.p. and p.o. R-phenibut at a dose of 50 mg/kg 15 and 30 min and 1, 2, 4, 6, and 24 h before the plasma and brain tissue collection. To determine the concentration of BD-1063 in the brain tissue, mice

received a s.c. BD-1063 at a dose of 30 mg/kg for 7 consecutive days prior to tissue collection. Animals were euthanized 1 h after the last s.c. administration of BD-1063. UPLC was carried out using the Waters Acquity UPLC system equipped with the Acquity BEH C18 column ( $2.1 \times 50$ mm,  $1.7 \mu$ m) with a gradient elution from 5 to 98 % acetonitrile in 0.1 % formic acid aqueous solution. The analyte was ionized by electrospray ionization in positive ion mode on a Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters). Quantitative analysis was achieved using QuanLynx4.1 software (Waters).

### 2.3.3. Quantitative real-time polymerase chain reaction

The method is described in Publication I and III. Total RNA was isolated from brain tissues using an RNA mini kit (Life Technologies, Grand Island, New York, USA). First-strand cDNA was synthesized using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The quantitative PCR analysis of gene expression was performed by mixing SYBR Green Master Mix (Life Technologies, New York, USA), synthesized cDNA, forward and reverse primers specific for S1R, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), matrix metallopeptidase 9 (MMP-9) (Metabion, Germany) and running the reactions on a Mic Real-Time PCR instrument (Bio Molecular Systems, Upper Coomera, Australia). The relative expression levels for each gene were calculated using the  $\Delta\Delta$ Ct method, normalized to the expression of  $\beta$ -actin, and compared to the expression levels of control group animals.

## **2.3.4.** Brain tissue preparation for histological analysis and immunohistochemistry of free-floating sections

The method is described in Publication II and III. Mice were anaesthetized using i.p. administration of ketamine (200 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg). Animals were transcardially perfused at a rate of 3 ml/minutes with 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH = 7:4) for 5 minutes until the blood was completely removed from the tissue. After perfusion, the brains were carefully dissected and postfixed in 4% PFA overnight at 4° C. The brains were cryoprotected with a 10-20-30% sucrose-PBS gradient for 72 hours. Coronal sections of the brain (20 - 35  $\mu$ m) were made using a Leica CM1850 cryostat (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, United States) and mounted on Superfrost Plus microscope slides (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The coronal brain sections were incubated in graded ethanol solutions (96% ethanol for 3 minutes and 70% ethanol for 3 minutes). After washing with

distilled water for 3 minutes, the sections were stained with 0.01% cresyl violet acetate (ACROS organics) solution for 14 minutes. The sections were then washed with distilled water for 3 minutes and dehydrated in ethanol. The stained sections were cover slipped using DPX mounting medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

The immunohistochemistry of free-floating sections was determined based on a method described in Publication II and III. The following primary antibodies were used in this study: rabbit anti-Iba1 antibody (1:2000; Abcam, Cat# ab153696, Cambridge, UK), rabbit anti-GFAP antibody (1:2000, Abcam, Cat# ab7260, Cambridge, UK), mouse anti-Calbindin D28K antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc365360, Dallas, TX, USA), rabbit anti-EAAT2 antibody (1:5000, Abcam, Cat# ab205248, Cambridge, UK). The goat anti-rabbit IgG (H + L) (1:1000, Invitrogen, Cat# 65-6140, Carlsbad, CA, USA) and goat anti-mouse IgG (H + L) (1:1000, Invitrogen, Cat# 31800, Carlsbad, CA, USA) biotinylated antibodies were used as secondary antibodies. Samples stained with biotinylated antibody and incubated with streptavidin (HRP) (1:1000, Abcam, Cat# ab7403, Cambridge, UK) were processed with freshly prepared DAB reagent. The structures were validated using Allen Mouse Brain atlas (http://mouse.brain-map.org/static/atlas) and images were taken with a Nikon Eclipse TE300 microscope (Nikon Instruments, Tokyo, Japan). Optical density (OD) and number of cells was quantified using ImageJ software (ImageJ v1.52a).

#### 2.3.5. Measurements of mitochondrial functionality

The method is described in Publication II. To evaluate effects on R-phenibut on mitochondrial functionality, mouse brain homogenate or isolated brain mitochondria were prepared. **Mitochondrial respiration and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production measurements** were performed at 37°C using Oxygraph-2k (O2k; Oroboros Instruments, Austria) with O2k-Fluo-Modules in MiR05Cr (110mM sucrose, 601mM K-lactobionate, 0.5mM EGTA, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM taurine, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM HEPES, pH7.1, 0.1% BSA essentially fatty acid free, and creatine 20 mM). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> flux (ROS flux) was measured simultaneously with respirometry in the O2k-fluorometer using the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive probe Ampliflu<sup>TM</sup> Red (AmR). 10  $\mu$ M AmR, 1 U/ml horse radish peroxidase (HRP), and 5U/ml superoxide dismutase (SOD) were added to the chamber. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O flux ratio (%) was calculated as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> flux/ (0.5 O<sub>2</sub>flux).

To determine the effect of R-phenibut on mitochondrial electron transfer system functionality, **Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration (SUIT) protocol** was used. Mitochondria were isolated from mouse brain as described previously, and mitochondrial respiration and  $H_2O_2$  production measurements were performed in the presence or absence of R-phenibut at 0.5 µg/ml concentration. In addition, effects of S-phenibut (0.5 µg/ml) were tested to determine whether the effects of R-phenibut in

mitochondria involve the GABA-B receptor or the  $\alpha 2\delta$  subunit of VDCC. Pyruvate and malate (5 mM and 2 mM, respectively) were used to determine N-pathway complex I (CI) linked LEAK (L) respiration. ADP was added at 5 mM concentration to determine oxidative phosphorylation-dependent respiration (OXPHOS state, P). Then, glutamate (10 mM) was added as an additional substrate for N-pathway. Succinate (10 mM, complex II (CII) substrate) was added to reconstitute convergent NS-pathway CI&II-linked respiration. Titrations with the uncoupler CCCP (0.5–1  $\mu$ M steps) were performed to determine the electron transfer system (ETS) capacity. Rotenone (0.5  $\mu$ M, inhibitor of complex I) was added to determine the CII-linked OXPHOS capacity. Then, antimycin A (2.5  $\mu$ M, inhibitor of complex III) was added to evaluate residual (non-mitochondrial) oxygen consumption (ROX).

Swelling of isolated brain mitochondria was assessed by measuring changes in absorbance at 540 nm. Mitochondria (0.125 mg/ml) were preincubated with R- or S-phenibut at a concentration of 0.5  $\mu$ g/ml for 15 min in a buffer containing 120 mM KCl, 10 mM Tris, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, and pyruvate (5 mM), malate (2 mM), and ADP (5 mM) as substrates. Swelling was induced by the addition of 200  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, and changes in absorbance were monitored for 10 min.

**Mitochondrial functionality after anoxia-reoxygenation** was determined in mouse brain tissue homogenate. To induce anoxia maximal respiration rate, the sample was stimulated by the addition of substrates, pyruvate + malate (5+2 mM), succinate (10 mM), and ADP (5 mM), and preparation was left to consume all O<sub>2</sub> in the respiratory chamber (within 10-20 min), thereby entering into an anoxic state. 15 minutes after anoxia, the vehicle or R-phenibut (0.5  $\mu$ g/ml) was added to the chamber and O<sub>2</sub> was reintroduced to the chamber by opening the chamber to achieve reoxygenation. After 8 minutes of reoxygenation, the chamber was closed and O<sub>2</sub> flux was monitored for additional 2 minutes. At the end of the experiment, antimycin A (2.5  $\mu$ M) was added to determine residual oxygen consumption (ROX).

### 2.3.6. Behavioral tests

Behavioral testing was performed by experienced scientists blinded to the experimental group.

**Passive avoidance (PA) test** was used to evaluate contextual memory (Publication IV). Briefly, on the training day, each mouse was individually placed in the light compartment of an apparatus with no access to the dark compartment and allowed to explore for 60 s (Model A775, Ugo Basile, Italy). When 60 s had expired, the sliding door was automatically opened and the mouse was allowed to cross over into the dark compartment. Upon entering the dark compartment, the mouse received a shock of 0.1 mA for 3 s, the door was closed, and the mouse was returned to its home cage after 20 s. A retention test was performed on the next day (24 hours later)

without any shock. The time taken to enter the dark compartment was recorded as the retention latency. The maximum retention latency was set at 540 s.

**The Y-maze test** was used to evaluate working memory (Publication III and IV). The mice were individually placed at the end of one arm in a symmetrical Y-shaped runway (arm length 35 cm, width 5 cm, height 21 cm) and allowed to explore the maze for 5 min. A spontaneous alternation behavior was defined as the entry into all three arms on consecutive choices in overlapping triplet sets (i.e., ABC, BCA, CBA). The percent spontaneous alternation behavior was calculated as the ratio of actual to possible alternations (defined as the total number of arm entries -2) × 100.

The Morris water maze (MWM) test was used to assess spatial learning and memory (Publication IV). The MWM apparatus was a blue-painted circular fiberglass pool (height: 60 cm, diameter: 150 cm). The pool was virtually divided into four equal imaginary quadrants identified as a target, opposite, left and right. During the training trials, the animals were trained to find the hidden platform in the pool for four consecutive days, four trials per day. The trials were performed for up to a maximum of 90 s. The results were expressed as latency in finding the hidden platform. Probe trials were performed 24 h and 6 days after the last training trial with removal of the platform from the pool. In the probe trial, time in the target quadrant and swimming distance were analyzed using EthoVision video tracking system (version XT 11.5, Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands).

**Barnes maze (BM)** was another test used for assessment of spatial learning and memory (Publication III). The test was performed on a brightly lit grey circular platform (diameter 92 cm) with 20 equally spaced holes (diameter 5 cm) located around the perimeter, an escape box fitted under in one of the holes, and visual cues in the periphery. On the first day, the animal was placed at the center of the platform using a glass beaker and allowed to acclimate for 2 min; the mouse was then guided to the target hole and allowed to stay there for 1 min. Mice then underwent four days of learning consisting of three consecutive trials separated by brief returns to their home cages. If the mouse did not enter the escape box (defined as all four paws leaving the surface of the platform) within the 180 s trial, the experimenter guided the mouse to the escape hole as before and allowed it to rest for 1 min before returning the animal to its home cage. During the 90 s probe trials (24 h and 7 days after the last learning), the escape box was removed, and the time spent in the area of the target hole was recorded using the EthoVision XT video tracking system.

The neurobehavioral status of mice was obtained by **Neurological severity score** (NSS) (Publication I, II, III, IV). The animals were trained on the NSS beams and equipment prior to the testing. The NSS consists of 9 individual parameters, including motor function, alertness and physiological behavior tasks. The following items were assessed: presence of paresis; impairment of seeking behavior; absence of perceptible startle reflex; inability to get down from a rectangle platform (34 x 27 cm); inability to walk on 3-, 2-, and 1-cm wide beams; and inability to balance on a 0.7-cm-wide beam and a 0.5 cm-diameter round beam for at least 15 s. If a mouse

showed impairment in one of these items, then a value of 1 was added to its NSS. Thus, higher values for the NSS indicate more severe neurological impairment.

Locomotor and anxiety-like behavior was assessed using the **open field** (OF) test (Publication I, III, IV). The test apparatus was a square arena (45 x 45 cm) with a black floor. The distance traveled (cm/4 min) and velocity (cm/s) were recorded and analyzed using an EthoVision XT video tracking system.

Accelerating rota-rod test (RR) was used to measure motor coordination (Publication III, IV) (Model 7600, Ugo Basile, Comerio, Italy). Mice were pretrained on the RR apparatus (5 rpm) with 2 sessions per animal, each lasting for 240 s. On the experimental day, mice were placed on the rod with an accelerating rotating speed from 5 to 25 rpm over a period of 240 s with a 30 min rest between trials. Time spent walking on the accelerating RR before falling off was measured.

Despair-like behavior was assessed by **tail suspension test** (TST) (Publication III, IV). Each animal was suspended with tape from a horizontal rod elevated 50 cm above a clean cage. Mice were recorded for 6 min using the digital HD video camera recorder (Handycam HDR-CX11E, Sony Corporation, Tokyo, Japan) and immobilization was analyzed during the last 4 min. Immobility included motionless time as well as passive swinging caused by momentum from movement.

Acetone evaporation test was used to evaluate cold-evoked pain-like behavior (cold sensitivity) (Publication IV). One day before the experiment and on the experimental day, mice were placed in individual plastic cages on an elevated wire mesh metal floor and habituated for at least 30min. On the experimental day, acetone was loaded into a 1-ml syringe without a needle and one drop of acetone (approximately 40  $\mu$ l) was applied to the plantar surface of the hind paw. For 45 s, the mouse was scored on lifting, biting, and licking the paw. Each hind paw was measured three times with an interstimulation interval of approximately 10 min. The reaction duration was measured and analyzed as a cumulative reaction time.

**Electronic von Frey test** was used to evaluate mechanically evoked pain-like behavior (mechanical sensitivity) (Dynamic Plantar Aesthesiometer Model 37400-002, Ugo Basile, Gemonio VA, Italy) (Publication IV). During the test, the mice were placed on a metallic grid floor in an individual plastic observation chamber and allowed to habituate to the environment for 30min. The von Frey filament was applied to the midplantar surface of the hind paw. The withdrawal threshold was defined as the average latency time (s) required for causing withdrawal of the stimulated paw over three trials.

#### 2.3.7. Statistical analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) The statistical calculations were performed using the GraphPad Prism 8.1 software package (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA). The Shapiro-Wilk

test was used to examine the distribution of the data. If data did not meet the assumption for normal distribution, the non-parametric Kruskall-Wallis Analysis of Variance of Ranks was used for overall comparisons between the groups. For statistical analysis, the Student's t-test or one or two-way ANOVA with post-hoc tests (Tukey's or Dunn's) were used. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

## **3.1.** Neurological status and inflammatory response in the brain after weight-drop injury (Publication I)

WDI models have been used for several decades, however, there is a substantial difference in performance and protocols between laboratories. As a consequence, the biochemical outcome, i.e., the expression of inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, and IL-1 $\beta$ , is highly variable (Albert-Weissenberger et al., 2012; Zhang et al., 2014; Baratz et al., 2015; Gyoneva and Ransohoff, 2015; Chhor et al., 2017). Since mice experience skull fractures after the WDI model, we hypothesize that injury to the skull may be one of the main triggers for the expression of inflammatory genes in the brain after WDI and may thus contribute to the variability observed in this valuable TBI model. In this study, we compared the neurological status and inflammatory response after WDI in the hippocampus and striatum of mice and correlated these findings with the presence and severity of skull fractures.

The animals were divided into two groups: animals with and without skull fractures after TBI. The NSS was significantly higher in traumatized than shamoperated mice at 2 and 24 h after surgery. Two hours after TBI, the average scores for animals without and with skull fractures were  $2.5 \pm 0.2$  and  $4.8 \pm 0.5$  points, respectively (Figure 3.1.A). Twenty-four hours after TBI, the NSS for animals without and with skull fracture was  $2.9 \pm 0.2$  and  $4.8 \pm 0.4$  points, respectively, and there was a significant difference between the groups (Figure 3.1.A). In addition, we observed that the NSS significantly increased depending on the skull fracture severity (Figure 3.1.B).

Only one study reported animals with and without skull fractures and divided these animals into separate groups (McColl et al., 2018). There was no difference in NSS between animals with or without skull fracture and sham-operated animals at 1 h post-injury (McColl et al., 2018). Notably, NSS was not assessed at later time points after an injury; thus, it is difficult to compare the impact of fracture on NSS in this study (McColl et al., 2018). Moreover, skull fracture was associated with more severe TBI outcomes, including immediate posttraumatic respiratory depression, secondary rebound injury and death in mice (Flierl et al., 2009).





A skull fracture is an independent risk factor for intracranial hemorrhage in TBI patients (Abdelmalik et al., 2019). Intracranial hemorrhage is associated with increased intracranial pressure, oxidative damage, vasogenic edema and cytotoxic edema (Lok et al., 2011). In patients, skull fractures with hemorrhage result in increased inflammation and neuronal excitability due to the toxic effects of hemoglobin breakdown and the generation of reactive oxygen species (Agrawal et al., 2006). To detect the impact of skull fracture on inflammatory gene expression in brain tissue, we measured TNF- $\alpha$ , TIMP-1, IL-6, IL-1 $\beta$  and MMP-9 gene expression in the hippocampus and striatum at 12 h, 1, 3 and 14 days after TBI. To date, contrasting results on the neuroinflammatory response in brain tissues have been reported after CHI in mice. Our results clearly showed a significant increase in TNF- $\alpha$  and TIMP-1 gene expression in animals with skull fractures at 12 h and 24 h after injury, while gene expression was unchanged in animals without fracture (Figure 3.2). Moreover, no significant changes for IL-6, IL-1β and MMP-9 gene expression were observed at 12 h and 1, 3 and 14 days after TBI (data not shown, see Publication I). A significant 71- and 90-fold increase was observed for TIMP-1 at 12 h and 1 day after injury, respectively, in the ipsilateral hippocampus of animals with skull fractures (Figure 3.2). In addition, TIMP-1 was increased in the contralateral hippocampus 1 day after injury (Figure 3.2). TIMP-1 mRNA expression in the ipsilateral striatum of animals with skull fractures was increased 16- and 130-fold at 12 h and 1 day after injury, respectively (Figure 3.3). In addition, TIMP-1 mRNA was increased in the contralateral striatum at 1 and 3 days after injury (Figure 3.3).

TNF- $\alpha$  mRNA expression in animals with skull fractures was significantly increased 13- and 6-fold in the ipsilateral hippocampus at 12 h and 1 day after injury, respectively (Figure 3.2). TNF- $\alpha$  mRNA expression was significantly increased 67- and 5-fold in the ipsilateral and contralateral striatum, respectively, in animals with skull fractures at 12 h after injury (Figure 3.3).



Fig. 3.2. TIMP-1 and TNF-α gene expression in the ipsilateral and contralateral hippocampus after TBI

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5-9). \*P < 0.05 vs. sham; #P < 0.05 TBI without vs TBI with skull fracture (ordinary two-way ANOVA followed by Tukey's test).



Fig. 3.3. TIMP-1 and TNF-α gene expression in the ipsilateral and contralateral striatum after TBI

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5-9). \*P < 0.05 vs. sham; #P < 0.05 TBI without vs. TBI with skull fracture (ordinary two-way ANOVA followed by Tukey's test).

Many studies have demonstrated a significantly increased neuroinflammatory response in brain tissue, reaching levels greater than physiological levels within

hours of injury (Shohami et al., 1994; Knoblach et al., 1999; Homsi et al., 2009; Woodcock and Morganti-Kossmann, 2013; Baratz et al., 2015). However, only one study did not observe skull fractures (Homsi et al., 2009). For example, significantly increased brain levels of TNF- $\alpha$  gene and protein expression were observed on the first day after trauma (Shohami et al., 1994; Ziebell et al., 2011; Baratz et al., 2015), while no changes in TNF- $\alpha$  expression were observed in other studies (Semple et al., 2010; Albert-Weissenberger et al., 2012; Chhor et al., 2017). Interestingly, a significant increase in TNF- $\alpha$  expression at 4 h and 48 h after WD injury was observed using only animals with skull fractures in a WD model (Ziebell et al., 2011)(Ziebell et al., 2011). Moreover, there is a significant increase in IL-1, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  cytokines in response to craniotomy per se compared to those in naïve animals (Cole et al., 2011; Lagraoui et al., 2012), indicating that skull fractures could cause inflammation and create outcome heterogeneity within the groups in the WD model.

Previous research demonstrated that the overexpression of TNF- $\alpha$  was correlated with the severity of trauma in fluid percussion-induced TBI (Knoblach et al., 1999). We observed a correlation between the levels of TNF- $\alpha$  and TIMP-1 gene expression and the severity of fracture. The TIMP-1 and TNF- $\alpha$  genes significantly correlated with TBI severity at 12 h and 24 h after injury (Figure 3.4). In the ipsilateral hippocampus, 50- and 146-fold increases in TIMP-1 gene expression were observed after moderate and severe skull fractures, respectively (Figure 3.4.A). Similarly, 14and 173-fold increases in TIMP-1 gene expression in the ipsilateral striatum were observed after moderate and severe skull fractures, respectively (Figure 3.4.B). After severe skull fracture, TNF-a mRNA showed 14- and 130-fold increases in the ipsilateral hippocampus and striatum, respectively (Figure 3.4.C and D). We also measured TIMP-1 and TNF-a protein concentrations in plasma at 12 h and 1, 3 and 14 days after TBI. Slightly increased TIMP-1 plasma levels were observed in animals with fractures; however, there were no significant differences when compared to sham-operated animals (data not shown, see Publication I). Plasma levels of TNF-α were not elevated after TBI (<1.5 pg/ml, data not shown, see Publication I).



Fig. 3.4. Inflammation-related gene expression in the ipsilateral brain at 12 and 24 h after TBI with various severities of skull fracture

(A) TIMP-1 gene expression in the ipsilateral hippocampus and (B) striatum and (C) TNF- $\alpha$  gene expression in the hippocampus (D) and striatum. Data are expressed as the  $\pm$  S.E.M. (n = 5-13). \*P < 0.05 vs. sham; aP < 0.05 vs. nonfracture (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

A previous study demonstrated that the TIMP-1 gene is overexpressed in the brain at 12 h after middle cerebral artery occlusion, reaching a peak level at 2 days after stroke (Wang et al., 1998, 2016). High serum TIMP-1 levels are also associated with a worse prognosis after stroke (Rodríguez et al., 2013; Lorente et al., 2015). TIMP-1 is constitutively expressed at a low level in many tissues, but after tissue injury and inflammation, TIMP-1 gene expression generally increases compared to healthy tissue (White et al., 2013; Masciantonio et al., 2017). Prothat in inflammatory cytokines increase the expression of TIMP-1 in the brain (Gardner and Ghorpade, 2003). In the present study, high TIMP-1 inflammatory gene expression was observed in the first three days after TBI with skull fracture compared to the gene expression levels at 14 days after TBI, showing an acute response to injury. Since severe skull fracture was observed together with skull depression and bleeding, the high TIMP-1 gene expression in the brain was probably a rapid and acute response to the massive infiltration of proinflammatory cytokines that occurred in the brain after dural injury and bleeding.

Our results demonstrated that animals experiencing skull fractures after being subjected to the WD model show a substantial inflammatory response in the brain, while animals without skull fractures do not, thus demonstrating how skull fractures contribute to the heterogeneity of the WD model. When reviewing published literature (papers published on the CHI model in PubMed from 2001 to 2022), skull fractures were evaluated in only 26 of 144 studies (18.1%), and animals with fractures were excluded. A significant number of studies (81.9%) did not mention the incidence of skull fractures, showing that injury to the skull has been neglected

in most CHI experiments. Moreover, significant heterogeneity was observed in falling weight, drop height and impact tip diameter parameters that led to different impact energies delivered to brain tissue. The falling weight ranged from 5 to 500 g, and the drop height ranged from 0.5 to 167 cm. Thus, these studies do not share a common methodological indicator that would allow a comparison of the results of experiments between laboratories. Thus, our current study investigating the influence of skull fractures after WD represents a first step to reduce heterogeneity in this very useful CHI model.

# **3.2.** Neuroprotective effects of R-phenibut following moderate traumatic brain injury (Publication II)

First, we determined the concentration of R-phenibut in the plasma and brain after i.p. and p.o. administration. R-phenibut in plasma could be detected 15 min after a single i.p. and p.o. administration (data not shown, see Publication II). The maximal concentrations of R-phenibut in the plasma were observed 15 min after the i.p. injection (16.8  $\mu$ g/ml) and 30 min after the p.o. administration (24  $\mu$ g/ml). R-phenibut in the plasma was not detected 24 h after both the i.p. and p.o. administrations. R-phenibut in the brain tissue extracts was detected already 15 min after a single i.p. and p.o. administration. The maximal concentrations of R-phenibut in the brain tissues were observed 15 min after i.p. injection (0.64  $\mu$ g/g) and 60 till 240 min after p.o. administration (0.17  $\mu$ g/g). 24 h after both the i.p. and p.o. administrations, R-phenibut in the brain tissues was 0.02  $\mu$ g/g and 0.012  $\mu$ g/g, respectively.

# **3.2.1.** The effects of R-phenibut on TBI-induced functional deficits and morphological changes in the brain tissue

The binding characteristics of R-phenibut were previously investigated using radiolabeled gabapentin that was the first ligand shown to bind to the  $\alpha 2\delta 1$  and  $\alpha 2\delta 2$  subunits with high affinity (Kd = 59 and 153 nM, respectively), while at the same time demonstrating no binding activity to the  $\alpha 2\delta 3$  and  $\alpha 2\delta 4$  subunits (Marais et al., 2001; Qin et al., 2002). The pathologies associated with gene disruption of  $\alpha 2\delta 1$  protein include neuropathic pain and cardiac dysfunction, while in the case of  $\alpha 2\delta 2$  protein, the pathologies are related to epilepsy and cerebellar ataxia (Dolphin, 2013). We showed previously that the pharmacological activity of R-phenibut is associated with neuropathic pain rather than epilepsy (Zvejniece et al., 2015); thus, we could speculate that the effects of R-phenibut are  $\alpha 2\delta 1$  protein binding-related. The  $\alpha 2\delta$  subunits of VDCC are widely expressed by excitatory neurons in the cerebral cortex,

hippocampus, and other brain regions (Taylor and Garrido, 2008; Gurkoff et al., 2013). Furthermore, the  $\alpha 2\delta$  subunits of VDCC have been shown to be involved in processes that are not directly linked to calcium channel function, such as synaptogenesis (Calikoglu et al., 2015). Other studies have reported that the administration of VDCC ligands in rodent models of TBI reduced cell death and improved cognitive function (Gurkoff et al., 2013). Similar to phenibut, ligands of the  $\alpha 2\delta$  subunit of VDCC, such as pregabalin, at a high dose of 60 mg/kg reduce neuronal loss and improve functional outcomes 24 h after trauma in experimental models of TBI (Calikoglu et al., 2015; Shamsi Meymandi et al., 2018). Moreover, pregabalin at a dose of 30 mg/kg has been shown to improve functional recovery and to demonstrate anti-inflammatory and antiapoptotic effects in a rat model of spinal cord injury (Ha et al., 2008, 2011).

There is no clinical data on the therapeutic use of phenibut in veterinary medicine. To date, one clinical case of phenibut toxicosis in a dog has previously been described (Sahagian et al., 2023). Phenibut exhibits gabapentin-like antinociceptive activity via VDCC (Zvejniece et al., 2015). Phenibut is structurally similar to gabapentin (2-[1-(aminomethyl) cyclohexyl] acetic acid) and baclofen ((RS)-4-amino-3-(4-chlorophenyl) butanoicacid) (Kupats et al., 2020). In veterinary medicine, gabapentin is extra-label used in combination with other treatments to control seizures or for neuropathic pain treatment and anxiety (Cesare et al., 2023). Pharmacological effects of phenibut in *in vivo* experiments have been observed at a dose of 10 mg/kg, while inhibitory activity on muscle function has been detected at doses more than 30-fold higher (Dambrova et al., 2008). This finding suggests that phenibut has advantages over gabapentin in the treatment of disorders in which sedation and muscle relaxation are not desirable. In addition, the therapeutic index of phenibut is high (Lapin, 2001).

In the present study, R-phenibut treatment at a dose of 50 mg/kg significantly ameliorated functional deficits by 28%, 25%, and 30% after TBI on post-injury days 1, 4, and 7, respectively (p < 0.05, Figure 3.5).



Fig. 3.5. Effects of R-phenibut on the neurological severity score after moderate traumatic brain injury

Data are shown as the mean  $\pm$  S.E.M (n = 8 – 12). \*P < 0.05 vs. TBI, #P < 0.01 vs. sham (two-way repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test).

R-phenibut treatment at a dose of 50 mg/kg significantly reduced the number of N-DNs ( $3.0 \pm 1.9$ /per field of vision, Figure 3.6) and cells expressing IL-1 $\beta$  (246  $\pm$  31/per field of vision, data not shown, see Publication II) in the neocortex after TBI compared to sham group ( $9.1 \pm 6.4$ /per field of vision for N-DNs and  $379 \pm 82$ /per field of vision for IL-1 $\beta$ -expressing cell).



Fig. 3.6. The effect of R-phenibut on the number of nissl-stained dark neurons 7 days after latFPI

(A) Quantitative assessment of N-DNs and (B) representative sections of ipsilatereal cortex 7 days post-injury. Black arrows indicate representative Nissl-stained dark neurons. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 7 for the R-phenibut 50 mg/kg group and n = 6 for the sham, control, and R-phenibut 10 mg/kg groups). #P < 0.05 vs. sham, \*P < 0.05 vs. TBI group (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

N-DNs represent a typical pathomorphological change in injured neurons after TBI, showing abnormal basophilia and shrinkage (Hicks et al., 1996; Ooigawa et al., 2006). N-DNs appear in the neocortex immediately after TBI and can be observed even two weeks post-injury (Ooigawa et al., 2006; Talley Watts et al., 2014). In addition, IL-1 is a major driver of the secondary neuronal injury cascade after TBI (Newell et al., 2018). It is involved in the recruitment of other types of immune cells, neuronal apoptosis, and blood-brain barrier disruption after TBI (Rothwell and Luheshi, 2000; Lu et al., 2005; Sun et al., 2017). Furthermore, IL-1 $\beta$  antagonism was shown to be neuroprotective in clinical trials and in rodent models of TBI (Tehranian et al., 2002; Lazovic et al., 2005; Clausen et al., 2011). The present study shows that treatment with R-phenibut at a dose of 50mg/kg significantly reduced the number of N-DNs and significantly reduced IL-1 $\beta$  expression in the neocortex after TBI. The histopathological findings of the current study revealed that R-phenibut could attenuate neuronal damage, inflammation, and degeneration.

## 3.2.2. The effects of R-phenibut on mitochondrial functionality in the brain tissue

Compared with other types of cells, neurons are endowed with less robust antioxidant defense systems (Floyd and Carney, 1992). As mitochondrial dysfunction has been shown to be involved in TBI, perturbations in energy metabolism are likely to contribute to the pathogenesis of TBI (Werner and Engelhard, 2007; Prins et al., 2013). In TBI, oxidative cell damage is caused by an imbalance between the production and accumulation of ROS, in which mitochondria are the major intracellular source of ROS (Stelmashook et al., 2019). Accordingly, there is accumulating evidence that antioxidant agents and membrane lipid peroxidation inhibitors, such as tirilazad, U-78517F and U-83836E, are effective in treating preclinical models of TBI (Hall et al., 2010). Mitochondrial-targeted drugs, such as mitoquinone and thymoquinone-containing antioxidants, have been shown to decrease neurological deficits and β-amyloid-induced neurotoxicity after TBI (Genrikhs et al., 2015; Zhou et al., 2018). Meanwhile, the inhibition of ROS production has been shown to inhibit the secretion of IL-1ß (Schmidt and Lenz, 2012). Notably, the immunosuppressant drug cyclosporine A, which is an IL-1 $\beta$ receptor antagonist, has been shown to decrease pathological changes in the brain after TBI by blocking the mitochondrial permeability transition pore (Veech et al., 2012).

To determine whether R-phenibut induced neuroprotection could be a result of the preservation of mitochondrial functionality, ROS production and the mitochondrial respiration rate were assessed after anoxia-reoxygenation *in vitro*. R-phenibut treatment (0.5  $\mu$ g/ml or 2.78 mM) significantly decreased the anoxia-reoxygenation-induced increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O ratio (Figure 3.7).



Fig. 3.7. The effect of R-phenibut (0.5 ug/ml or 2.78 mM) on ROS production in an *in vitro* anoxia-reoxygenation model

The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6). \*P < 0.05 vs. normoxia, #P < 0.05 vs. A-R control group (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

R-phenibut and S-phenibut at 0.5  $\mu$ g/ml did not induce any changes in the mitochondrial respiration rate (Figure 3.8.A), while the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O ratio was significantly decreased by 31% in the LEAK and 53% in the OXPHOS state (Figure 3.8.B). These results show that R-phenibut and S-phenibut reduce ROS production without affecting the mitochondrial electron transfer system capacities, indicating the improvement of mitochondrial coupling.



Fig. 3.8. The effects of R-phenibut and S-phenibut on mitochondrial functionality in the brain tissue

The results are presented as the mean ± S.E.M (n=5). P pyruvate, M malate, D adenosine diphosphate, G glutamate, S succinate, U uncoupler, Rot rotenone, CI complex I, CII complex II, LEAK substrate metabolism-dependent state, OXPHOS oxidative phosphorylation-dependent state, ET electron transfer capacity state. \*P < 0.05 vs. control (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

In addition, both R- and S-phenibut attenuated Ca<sup>2+</sup>-induced brain mitochondrial swelling (Figure 3.9).



Fig. 3.9. The effect of R- and S-phenibut on Ca<sup>2+</sup>induced swelling in isolated brain mitochondria

The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=7). \*P < 0.05 vs. control (two-way repeated-measures ANOVA followed by Dunnett's test).

Our results suggest that the protective effects of R-phenibut in mitochondria do not involve the GABA-B receptor (in contrast to R-phenibut, S-phenibut does not bind to the GABA-B receptor) and might be mediated by the  $\alpha 2\delta 1$  subunit of VDCC. It was shown previously that increased intracellular Ca<sup>2+,</sup> as a result of increased activity of  $\alpha 2\delta 1$ , could be rapidly taken up by mitochondria and subsequently released into the cytoplasm avoiding Ca<sup>2+</sup> accumulation and maintaining intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling (D'Arco et al., 2015). This could explain why, in the presence of R- and S-phenibut, reduced Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial swelling was observed. Both R-phenibut and S-phenibut demonstrate mitochondrial-protective properties against anoxia-reoxygenation and Ca<sup>2+</sup>- induced stress. Since there is no evidence of  $\alpha 2\delta$  localization in the mitochondrial membrane, it is possible that compounds could alter Ca<sup>2+</sup> signaling pathways and protect mitochondria by targeting mitochondrial-specific or mitochondrial endoplasmatic reticulumassociated Ca<sup>2+</sup> transporters.

## **3.3. Sigma-1 receptor as a potential therapeutic target for** traumatic brain injury (Publication III)

Drugs interacting with S1R have potential as treatments for neurological diseases, including TBI (Wegleiter et al., 2014; Moritz et al., 2015; Dong et al., 2016). In veterinary medicine, different S1R ligands are used, such as phenytoin and ropizine (experimentally in cats and beagle dogs), for the treatment of seizures (Craig, 1967; Edmonds et al., 1978; Blades Golubovic and Rossmeisl, 2017). As the membrane bound S1R is expressed in most mammalian tissues, the data from experimental animals are useful for humane and veterinary medicine (Mishra et al., 2015).

Here, S1R deficiency was associated with improved motor function and diminished neurological deficits in the acute phase after TBI. TBI induced significant neurological impairments in WT TBI mice (p = 0.006) but not in S1R-/- TBI mice 24 h after injury compared to the respective sham groups (p = 0.006, Figure 3.10.A). In addition, S1R-/- TBI mice exhibited a significantly decreased NSS ( $1.78 \pm 0.57$ ) compared to WT TBI mice ( $4.20 \pm 0.79$ ) at 24 h post-injury (p = 0.024, Figure 3.10.A). No differences were observed at 12 months post-injury across all experimental groups.

In the accelerating RR test, WT TBI animals spent less time on the RR 24 h after injury compared to WT sham animals (p = 0,038, Figure 3.10.B). We did not observe any impairment of motor coordination in S1R-/- TBI animals compared to S1R-/- sham animals. Moreover, motor coordination was not significantly different at any time point after injury compared to baseline values in S1R-/- sham and TBI animals. WT TBI and sham animals spent significantly less time on RR starting at 24 h and 6 months post-injury, respectively (Figure 3.10.B). Previous studies have also shown that S1R deficiency attenuates neurodegenerative processes. For example, in the MPTP-induced Parkinsonism model, motor deficits and dopaminergic neuron death were less pronounced in S1R-/- mice than in WT mice (Hong et al., 2015). Another study indicated that S1R-/- mice present reduced mechanical allodynia, macrophage/monocyte infiltration, and levels of the chemokine CCL2 in dorsal root ganglia after spinal nerve injury (Bravo-Caparrós et al., 2020).



Fig. 3.10. Evaluation of neurological status (A) and motor function (B) of S1R-/-mice after moderate TBI

The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6-10). \*P < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001 WT TBI vs. WT sham, #P < 0.05, ## < 0.01 S1R-/- TBI vs. S1R-/- sham, &P < 0.05, && < 0.01 S1R-/- TBI vs. WT TB, ^P < 0.05, ^^ < 0.01 WT sham vs. S1R-/- sham (two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher's least-significant difference (LSD) test).

S1R deficiency alters cognitive function, especially in older mice (Chevallier et al., 2011), and is associated with more pronounced learning deficits and toxicity in APPSwe AD mice (Maurice et al., 2018). Spatial learning and memory function were evaluated using the Barnes maze (BM) to test whether any long-term effects on cognitive function were present in WT and S1R-/- mice after TBI. TBI induced short-term memory (24 h after the last training day) impairments in WT mice. WT TBI animals spent significantly less time in the target hole than WT sham animals at 7 months post-injury (p < 0.01, Figure 3.11.A). Short-term memory was not impaired in S1R KO TBI mice compared to S1R-/- sham mice after injury (Figure 3.11.A). Long-term memory (7 days after the last training day) was not affected in any experimental groups after injury (Figure 3.11.B). We also observed that S1R-/- sham and TBI mice displayed improvements in short-term memory function at 10 months compared to 7 months, while WT sham and TBI mice performed similarly over time (Figure 3.11.A and B).

In addition, we used the y-maze test to evaluate spatial working memory. We did not observe any differences in spontaneous alternations between the experimental groups (data not shown, see Publication III), indicating that spatial working memory was not affected after TBI.



Fig. 3.11. Evaluation of spatial memory of S1R-/- mice at (A) seven and (B) ten months after moderate TBI

The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=7-10). \*\*P < 0.01 WT TBI vs. S1R-/-TBI, ^P < 0.05 S1R-/- sham vs. WT sham, ##P < 0.01 WT sham vs. WT TBI, aP < 0.05, aa < 0.01 7 vs. 10 months (two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher's LSD test).

Regardless of injury status, S1R-/- mice showed reduced depressive-like behavior. Throughout the experiment, immobility time was unchanged in the S1R-/- sham and TBI mice in the tail suspension test (Figure 3.12). In addition, the immobility time was significantly decreased in S1R-/- sham mice compared to WT sham mice at 3 (p = 0.047), 8 (p = 0.045) and 12 months post-injury (Figure 3.12). WT sham and TBI mice showed a time-dependent increase in immobility time after

injury. Our findings indicate an important role for S1R in the development of TBIinduced neurobehavioral deficits in the acute and chronic phases after TBI.



Fig. 3.12. Evaluation of depressive-like behavior of S1R-/- mice after moderate TBI

The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6-9). \*P < 0.05 WT TBI vs. S1R-/-TBI, #P < 0.05, ## < 0.01 WT sham vs. S1R-/- sham (two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher's LSD test).

Impairments in motor function and coordination are common consequences of TBI and are usually associated with injury to the sensorimotor cortex (Carron et al., 2016). However, the cerebellum also plays an important role in the control and coordination of movement that may be specifically related to motor dysfunction after TBI (Rapoport et al., 2000). Here, we showed that both sham and TBI WT mice developed impairments in motor coordination with age, while S1R-/- mice exhibited preserved motor function. One of the possible explanations for motor dysfunction in WT mice is increased astrocyte activation in the cerebellum. We evaluated the astrocyte (GFAP, Glt-1) staining intensity and the number of Purkinje cells (Calbindin D28K) in the grey matter of the cerebellum. Surprisingly, S1R -/- animals displayed almost no GFAP staining in the molecular layer of the cerebellum after injury (Figure 3.13.A and B). GFAP staining in the cerebellum of S1R-/- mice was significantly different from that in WT animals (p < 0.001 S1R-/- sham vs. WT sham, p = 0.019 S1R-/- TBI vs. WT TBI, Figure 3.13.A). There were no significant differences in Glt-1 staining intensity in the grey matter of the cerebellum between experimental groups (data not shown, see Publication III). Our results suggest that deficiency of S1R only attenuates GFAP expression rather than the number of astrocytes in the cerebellum of S1R-/- mice. Cerebellar astrocytosis reduces the survival of Purkinje cells, which are associated with movement and coordination, and leads to cerebellar dysfunction and motor impairments after TBI (Mautes et al., 1996; Park et al., 2006; Cerrato, 2020). Here, S1R-/- mice displayed preserved motor coordination and almost no GFAP expression in the molecular layer of the cerebellum after TBI. Similarly, GFAP expression was substantially decreased in S1R-/- sham mice compared to WT mice. Based on localization, GFAP-positive
astrocytes are Bergmann glia (Nolte et al., 2001). Bergmann glia directly regulate Purkinje cells and influence motor behavior (Sasaki et al., 2012; Wang et al., 2012). We found no significant difference in the total number of PCs in S1R-/- mice. This is in line with previous findings in which PC degeneration and motor dysfunction was associated with both increased GFAP expression and ablation of Bergmann glia (Cui et al., 2001; Wang et al., 2011; Tyszkiewicz et al., 2021). Our data show that the improved motor coordination exhibited by S1R-/- mice could be due to decreased GFAP expression in Bergmann glial cells in the molecular layer of the cerebellum. These results suggest important involvement of S1R in the regulation of information processing in the cerebellum and control mechanisms of motor behavior. Therefore, decreasing GFAP expression in Bergmann glia may represent a novel therapeutic strategy for motor dysfunction during ageing.



Fig. 3.13. Staining intensity of GFAP antibodies (A) and representative images in the molecular layer of the S1R-/- mice cerebellum at 12 months post-injury

Image magnification 100x. The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=5). \*\*P < 0.01, \*\*\* < 0.001 WT vs. S1R-/-, #P < 0.05 WT sham vs. WT TBI (Mann–Whitney U-test).

Since S1R-/- mice showed acute improvements in neurological function after TBI, we examined whether pharmacological treatment with an S1R antagonist influenced behavioral and histological outcomes after injury. Treatment with BD-1063 did not affect TBI-induced neurological deficits (data not shown, see Publication III). Although we measured a sufficient concentration of BD- 1063 in the brain tissue  $(6.3 \pm 0.03 \text{ ug/g})$ , no significant difference in S1R gene expression was observed between saline- and BD-1063-treated animals. It is possible, that a higher dose of BD-1063 and/or a longer administration period should be used to affect expression of S1R in the brain tissue (scientific communication with Spanish colleagues). S1R agonists are able to attenuate neurological deficits and lessen TBI-induced neurodegeneration by reducing microglial activation following brain injury *in vivo* (Wegleiter et al., 2014; Moritz et al., 2015; Dong et al., 2016). In previous studies, BD-1063 was used to block the effect of S1R agonists (Katnik et al., 2014; Nardai et al., 2020). Recently, oral treatment with BD-1063 induced neuroprotection

in an SCI model by increasing the number of surviving motor neurons and decreasing microglial activation in the ventral horns of L4-L5 spinal segments (Gaja-Capdevila et al., 2021). Thus, different S1R ligands may act differently and even adversely in neuroprotection.

## 3.4. Long-term behavioral outcomes following lateral fluid percussion injury (Publication IV)

To characterize the extent of long-term behavioral impairments induced by latFPI, sensory-motor function, cold and mechanical peripheral sensitivity, depressive-like behavior, motor coordination and cognitive function were assessed at different time points up to 12 months post-injury.

The NSS was significantly higher for the latFPI group than the sham-operated mice up to 12 months post-injury (p < 0.0001, Figure 3.14.A). Time on rotarod was not significantly different between latFPI and sham animals at any time point post-injury (Figure 3.14.B).



Fig. 3.14. Long-term evaluation of neurological status (A) and motor function (B) after moderate TBI in mice

The results are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=7-10). \*\*P < 0.01, \*\*\* < 0.001, \*\*\*\* < 0.0001 vs. sham (two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher's LSD test).

Among the long-term consequences of TBI, one of the most recently debated yet severely understudied is pain (Irvine and David Clark, 2018). Pain is an acute response to brain injury and typically lasts several weeks in patients (Ofek and Defrin, 2007). However, in a small group of patients, pain persists beyond the healing of damaged tissue and becomes chronic (Irvine and David Clark, 2018). The most common long-term pain condition reported in TBI patients is a posttraumatic headache, and in most cases, it is associated with a direct brain tissue injury (Irvine

and David Clark, 2018; Khoury and Benavides, 2018). However, headache is not the only type of pain present after TBI. Clinical studies indicate that chronic pain is located in body regions that have not been injured during trauma, such as the back and lower extremities (Ofek and Defrin, 2007; Nampiaparampil, 2008; Kwan et al., 2018). The mechanisms that drive the development of chronic pain are not well understood, whether the pain is due to neuropathy, central pain, or secondary to direct tissue injury. Despite emerging evidence that nonhead pain is common after TBI, animal studies have recently begun to explore the mechanisms supporting the development of pain after TBI. Moreover, these studies were limited by short-term follow-up assessment points and pain evaluation in periorbital regions (Feliciano et al., 2014; Macolino et al., 2014; Meidahl et al., 2017, 2018; Wang et al., 2017; da Silva Fiorin et al., 2018). A few studies have examined pain-like behavior in peripheral regions, such as hind paws (Liang et al., 2017; Meidahl et al., 2017; Irvine et al., 2019). Increased mechanical sensitivity has been observed within 3 weeks after TBI, suggesting that these animals experience acute pain associated with disrupted communication between the brain and spinal cord (Irvine et al., 2019). Here, we showed that latFPI causes cold and mechanical sensitization in body regions distant from the central nervous system. Peripheral cold sensitivity was evaluated by acetone test. The cumulative reaction time of the contralateral hind paw (opposite side to the lesion) was increased in the latFPI group compared to the sham group at 3 months  $(4.1 \pm 0.6 \text{ s vs. } 2.3 \pm 0.5 \text{ s}, p = 0.026), 6 \text{ months} (3.3 \pm 0.7 \text{ s vs. } 1.0 \pm 0.2 \text{ s}, p = 0.007)$ and 9 months post-injury (3.8  $\pm$  0.9 s vs. 1.2  $\pm$  0.2 s, p = 0.014, Figure 3.15.A). Peripheral mechanical sensitivity was evaluated by the von Frey test. A significant decrease in the mechanical withdrawal latency of the contralateral hind paw was observed in the latFPI group compared to the sham group at 9 months ( $3.4 \pm 0.3$  s vs.  $5.9 \pm 0.7$  s, p = 0.001) and 12 months post-injury ( $2.6 \pm 0.4$  s vs.  $4.9 \pm 0.4$  s, p = 0.0113, Figure 3.15.B). The withdrawal latency was also significantly decreased in the ipsilateral hind paw in latFPI mice compared to sham mice 12 months post-injury  $(3.6 \pm 0.6 \text{ s vs}, 5.9 \pm 0.7 \text{ s}, p = 0.0157$ , Figure 3.15.B). Interestingly, cold sensitivity was observed only in the contralateral hind paw, and significant differences were observed starting 3 months after injury. Clinical research shows that sensation to thermal and tactile stimulation tends to be unilateral, mainly located on the side of the body that was contralateral to the TBI side (Ofek and Defrin, 2007). There is evidence that the surgical procedure per se may lead to increased pain sensitivity in the periorbital and plantar regions in rats (da Silva Fiorin et al., 2018) and mice (Macolino et al., 2014). However, these findings have been observed at early time points post-TBI and could be explained by direct tissue damage and the inflammatory response to injury.



Fig. 3.15. Long-term evaluation of peripheral sensitivity after moderate TBI in mice (A) The cumulative reaction time of contralateral and ipsilateral hind paw licking or shaking in the acetone test and (B) latency of contralateral and ipsilateral hind paw withdrawal in the electronic von Frey test. The contralateral hind paw corresponds to the opposite side of the lesion, and the ipsilateral hind paw corresponds to the lesion side. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=7-10). \*P < 0.05, \*\* < 0.001 contralateral latFPI vs. contralateral sham hind paw. #P <0.05, ## < 0.001 ipsilateral latFPI vs. ipsilateral sham hind paw (two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher's LSD test).

It is noteworthy that both pain and depression are often cooccurring after TBI, and a significant predictor of persistent pain in patients is an early presence of depressive symptoms after TBI (Tham et al., 2013). Depressive-like symptoms following TBI have commonly been reported as comorbidities of posttraumatic pain (Bodnar et al., 2018; Khoury and Benavides, 2018). In our study, moderate latFPI induced progressive depressive-like behavior starting at 6 months post-injury. Namely, immobility time was significantly increased in the latFPI group 6 months  $(94.7 \pm 7.9 \text{ vs. } 66.4 \pm 10.0, \text{ p} = 0.040)$  and 12 months  $(136.8 \pm 10.5 \text{ vs. } 70.2 \pm 13.3, \text{ s})$ p = 0.001, p = 0.001) post-injury compared to the sham group (Figure 3.16). Immobility time remained unchanged over time in sham animals. These data are consistent with recently published results in mice suffering from progressive and severe depression-like behavior 6 months after CCI (Mao et al., 2020). In addition, we showed that moderate latFPI also induces depressive-like behavior in male CD-1 mice (Publication III). However, there are also reports where depression-like behavior is not observed within 12 months after closed head injury (Tucker et al., 2019). Our results suggest that moderate latFPI induces progressive depressionlike behavior, and this model is suitable for studying common clinical symptoms of depression that are diagnosed following TBI.



Fig. 3.16. Evaluation of long-term depressive-like behavior after moderate TBI in mice The results are presented as the mean ± S.E.M. (n=7-10). \*\*P < 0.05, \*\* < 0.01 vs. sham, #P < 0.05, ## < 0.001 compared to 1 month (two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher's LSD test).

Assessment of learning and memory is widely used in preclinical research to determine the duration and severity of cognitive impairments following TBI. Cognitive deficits in experimental TBI models have been observed up to 1 year or longer after the initial injury. In these long-term studies, cognitive impairments have been observed after severe TBI accompanied by extensive brain tissue loss (Shear et al., 2004; Bramlett and Dietrich, 2004; Dixon et al., 2009; Pischiutta et al., 2018; Campos-Pires et al., 2019; Mao et al., 2020). In cases where brain tissue damage is not extensive (e.g., tissue loss in the ipsilateral cortex), cognitive impairments are less prominent or not observed (Leconte et al., 2020; Publication III). In the present study, we did not observe cognitive impairments in any of the evaluated memory tests. Hippocampal-dependent cognitive tasks, such as spatial learning and memory, were not affected up to 6 months post-injury (data not shown, see Publication IV). Only one study showed that hippocampal-dependent learning tasks were affected from 2 to 12 months after latFPI in rats; however, the injury was accompanied by progressive tissue loss resembling severe brain injury (Pierce et al., 1998). While some speculate that water maze performance and sensitivity depend on the difficulty of the protocol (Kamper et al., 2013), we believe that the moderate latFPI model is not suitable to study memory deficits after TBI in mice. Furthermore, we were unable to find any differences between the performance of injured and sham mice on the Ymaze and passive avoidance tests, suggesting that moderate latFPI in the present study did not produce cognitive impairments. It is important to note that localization of craniotomy is crucial while performing latFPI. Even though the surgery is performed similarly between animals, medial and rostral shifts can worsen or lessen injury-dependent hippocampal damage (Thompson et al., 2005).

The present study demonstrates that moderate TBI in mice elicits long-lasting impairment of sensory-motor function, results in progressive depression and potentiates peripheral pain. Nevertheless, pain in body regions other than the head is often not assessed systematically in clinical and preclinical TBI research. This factor must be taken into consideration in evaluating posttraumatic pain. Patients with TBI may benefit from timely assessment and intervention to minimize the development and impact of pain. Acute and continued pain management may be paramount for addressing depression or other neurological impairments in TBI patients.

## CONCLUSIONS

1.A skull fracture is one of the primary triggers for the neurological deficits and expression of inflammatory genes in the brain tissue after weight-drop injury (mild traumatic brain injury). Compared with TBI without fractures, TBI with skull fractures resulted in a more severe neurobehavioral response (higher neurological severity score) and a considerable increase in inflammatory gene expression (TNF- $\alpha$ , TIMP-1) in the hippocampus and striatum.

2.Lateral fluid percussion injury (moderate traumatic brain injury) elicits longlasting impairment of sensory-motor function, results in progressive depression and potentiates peripheral pain. latFPI model provides a relevant preclinical setting for studying the link between brain injury and chronic sequelae such as depression and peripheral pain.

3.R-phenibut treatment reduces TBI-induced neuronal death (Nissl-stained dark neurons) and inflammation (IL-1 $\beta$  positive cells) in the brain tissue and improves sensorimotor functional outcome in the acute phase after TBI via mechanisms related to Ca<sup>2+</sup> homeostasis and oxidative stress.

4.S1R deficiency reduced TBI-induced long-term consequences in mice – improved neurological and motor coordination, reduced depressive-like behavior and preserved long-term cognitive function. S1R deficiency was associated with reduced GFAP expression in Bergmann glial cells in the molecular layer of the cerebellum. These findings suggest a role for S1R in the pathogenesis of TBI and cerebellum-mediated motor behavior.

## RECOMMENDATIONS

1. When using the WDI model, the data from animals with skull fractures must be analyzed separately from those without skull fractures to reduce the heterogeneity of the model.

2. Evaluation of skull fracture is crucial to predict the outcome of TBI in humane and veterinary medicine.

3.R-phenibut is a promising drug candidate for treating TBI-induced impairments in humane and veterinary medicine.

4.S1R antagonists are promising drug candidates for treating TBI-induced neurological and motor impairments in humane and veterinary medicine.

5.Patients with TBI may benefit from timely assessment and intervention to minimize the development and impact of pain. Acute and continued pain management may be paramount for addressing depression or other neurological impairments in humans and animals.

## LITERATŪRAS SARAKSTS/ REFERENCES

- Abdelmalik, P. A., Draghic, N., and Ling, G. S. F. (2019). Management of moderate and severe traumatic brain injury. Transfusion 59, 1529–1538. doi:10.1111/TRF.15171.
- Agrawal, A., Timothy, J., Pandit, L., and Manju, M. (2006). Post-traumatic epilepsy: An overview. Clin. Neurol. Neurosurg. 108, 433–439. doi:10.1016/J.CLINEURO.2005.09.001.
- Albert-Weissenberger, C., Stetter, C., Meuth, S. G., Göbel, K., Bader, M., Sirén, A. L., and Kleinschnitz, C. (2012). Blocking of bradykinin receptor B1 protects from focal closed head injury in mice by reducing axonal damage and astroglia activation. J. Cereb. Blood Flow Metab. 32, 1747. doi:10.1038/JCBFM.2012.62.
- Albert-Weißenberger, C., Várrallyay, C., Raslan, F., Kleinschnitz, C., and Sirén, A. L. (2012). An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice. Exp. Transl. Stroke Med. 4. doi:10.1186/2040-7378-4-1.
- An, X. L., Zou, J. X., Wu, R. Y., Ying, Y., Tai, F. D., Zeng, S. Y., Rui, J., Xia, Z., Liu, E. Q., and Hugh, B. (2011). Strain and sex differences in anxietylike and social behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ mice. Exp. Anim. 60, 111–123. doi:10.1538/EXPANIM.60.111.
- 6. Bains, M., and Hall, E. D. (2012). Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. Biochim. Biophys. Acta 1822, 675–684. doi:10.1016/J.BBADIS.2011.10.017.
- Bair, M. J., Robinson, R. L., Katon, W., and Kroenke, K. (2003). Depression and pain comorbidity: a literature review. Arch. Intern. Med. 163, 2433–2445. doi:10.1001/ARCHINTE.163.20.2433.
- Baratz, R., Tweedie, D., Wang, J. Y., Rubovitch, V., Luo, W., Hoffer, B. J., Greig, N. H., and Pick, C. G. (2015). Transiently lowering tumor necrosis factor-α synthesis ameliorates neuronal cell loss and cognitive impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice. J. Neuroinflammation 12. doi:10.1186/S12974-015-0237-4.
- Belozertseva, I., Nagel, J., Valastro, B., Franke, L., and Danysz, W. (2016). Optical isomers of phenibut inhibit [H3]-Gabapentin binding in vitro and show activity in animal models of chronic pain. Pharmacol. Reports 68, 550– 554. doi:10.1016/J.PHAREP.2015.12.004.
- Berkner, J., Mannix, R., and Qiu, J. (2016). Clinical Traumatic Brain Injury in the Preclinical Setting. Methods Mol. Biol. 1462, 11–28. doi:10.1007/978-1-4939-3816-2\_2.
- 11. Blades Golubovic, S., and Rossmeisl, J. H. (2017). Status epilepticus in dogs and cats, part 2: treatment, monitoring, and prognosis. J. Vet. Emerg. Crit. Care 27, 288–300. doi:10.1111/VEC.12604.

- Blennow, K., Brody, D. L., Kochanek, P. M., Levin, H., McKee, A., Ribbers, G. M., Yaffe, K., and Zetterberg, H. (2016). Traumatic brain injuries. Nat. Rev. Dis. Prim. 2, 16084. doi:10.1038/nrdp.2016.84.
- Bodnar, C. N., Morganti, J. M., and Bachstetter, A. D. (2018). Depression following a traumatic brain injury: uncovering cytokine dysregulation as a pathogenic mechanism. Neural Regen. Res. 13, 1693. doi:10.4103/1673-5374.238604.
- 14. Bothe, G. W. M., Bolivar, V. J., Vedder, M. J., and Geistfeld, J. G. (2005). Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models. Comp. Med. 55, 326–334.
- Bramlett, H. M., and Dietrich, W. D. (2004). Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences. J. Cereb. Blood Flow Metab. 24, 133–150. doi:10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04/ASSET/IMAGES/LARGE/10. 1097\_01.WCB.0000111614.19196.04-FIG2.JPEG.
- Bravo-Caparrós, I., Ruiz-Cantero, M. C., Perazzoli, G., Cronin, S. J. F., Vela, J. M., Hamed, M. F., Penninger, J. M., Baeyens, J. M., Cobos, E. J., and Nieto, F. R. (2020). Sigma-1 receptors control neuropathic pain and macrophage infiltration into the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. FASEB J. 34, 5951–5966. doi:https://doi.org/10.1096/fj.201901921R.
- Brazinova, A., Rehorcikova, V., Taylor, M. S., Buckova, V., Majdan, M., Psota, M., Peeters, W., Feigin, V., Theadom, A., Holkovic, L., and Synnot, A. (2021). Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. J. Neurotrauma 38, 1411–1440. doi:10.1089/NEU.2015.4126.
- Calikoglu, C., Aytekin, H., Akgül, O., Akgül, M. H., Gezen, A. F., Akyuz, F., and Cakir, M. (2015). Effect of Pregabalin in Preventing Secondary Damage in Traumatic Brain Injury: An Experimental Study. Med. Sci. Monit. 21, 813. doi:10.12659/MSM.893887.
- Campos-Pires, R., Hirnet, T., Valeo, F., Ong, B. E., Radyushkin, K., Aldhoun, J., Saville, J., Edge, C. J., Franks, N. P., Thal, S. C., and Dickinson, R. (2019). Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation, and improves survival after traumatic brain injury in mice. BJA Br. J. Anaesth. 123, 60. doi:10.1016/J.BJA.2019.02.032.
- Carron, S. F., Alwis, D. S., and Rajan, R. (2016). Traumatic Brain Injury and Neuronal Functionality Changes in Sensory Cortex . Front. Syst. Neurosci. 10, 47. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2016.00047.
- Castany, S., Gris, G., Vela, J. M., Verdú, E., and Boadas-Vaello, P. (2018). Critical role of sigma-1 receptors in central neuropathic pain-related behaviours after mild spinal cord injury in mice. Sci. Rep. 8, 3873. doi:10.1038/s41598-018-22217-9.

- Cernak, I., Merkle, A. C., Koliatsos, V. E., Bilik, J. M., Luong, Q. T., Mahota, T. M., Xu, L., Slack, N., Windle, D., and Ahmed, F. A. (2011). The pathobiology of blast injuries and blast-induced neurotrauma as identified using a new experimental model of injury in mice. Neurobiol. Dis. 41, 538– 551. doi:10.1016/J.NBD.2010.10.025.
- Cerrato, V. (2020). Cerebellar Astrocytes: Much More Than Passive Bystanders In Ataxia Pathophysiology. J. Clin. Med. 9. doi:10.3390/jcm9030757.
- Cesare, F. Di, Negro, V., Ravasio, G., Villa, R., Draghi, S., and Cagnardi, P. (2023). Gabapentin: Clinical Use and Pharmacokinetics in Dogs, Cats, and Horses. Anim. an Open Access J. from MDPI 13, 2045. doi:10.3390/ANI13122045.
- Cheng, G., Kong, R. H., Zhang, L. M., and Zhang, J. N. (2012). Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. Br. J. Pharmacol. 167, 699–719. doi:10.1111/J.1476-5381.2012.02025.X.
- Chevallier, N., Keller, E., and Maurice, T. (2011). Behavioural phenotyping of knockout mice for the sigma-1 (σ<sub>1</sub>) chaperone protein revealed genderrelated anxiety, depressive-like and memory alterations. J. Psychopharmacol. 25, 960–975. doi:10.1177/0269881111400648.
- Chhor, V., Moretti, R., Le Charpentier, T., Sigaut, S., Lebon, S., Schwendimann, L., Oré, M. V., Zuiani, C., Milan, V., Josserand, J., Vontell, R., Pansiot, J., Degos, V., Ikonomidou, C., Titomanlio, L., Hagberg, H., Gressens, P., and Fleiss, B. (2017). Role of microglia in a mouse model of paediatric traumatic brain injury. Brain. Behav. Immun. 63, 197. doi:10.1016/J.BBI.2016.11.001.
- Clausen, F., Hånell, A., Israelsson, C., Hedin, J., Ebendal, T., Mir, A. K., Gram, H., and Marklund, N. (2011). Neutralization of interleukin-1β reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. Eur. J. Neurosci. 34, 110–123. doi:10.1111/J.1460-9568.2011.07723.X.
- 29. Clausen, F., Marklund, N., and Hillered, L. (2018). Acute Inflammatory Biomarker Responses to Diffuse Traumatic Brain Injury in the Rat Monitored by a Novel Microdialysis Technique. https://home.liebertpub.com/neu 36, 201–211. doi:10.1089/NEU.2018.5636.
- Cole, J. T., Yarnell, A., Kean, W. S., Gold, E., Lewis, B., Ren, M., McMullen, D. C., Jacobowitz, D. M., Pollard, H. B., O'Neill, J. T., Grunberg, N. E., Dalgard, C. L., Frank, J. A., and Watson, W. D. (2011). Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham? J. Neurotrauma 28, 359–369. doi:10.1089/NEU.2010.1427.

- Craig, C. R. (1967). Anticonvulsant properties of some benzhydryl piperazine and benzhydryl piperidine compounds. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 165, 328–336.
- Cui, W., Allen, N. D., Skynner, M., Gusterson, B., and Clark, A. J. (2001). Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. Glia 34, 272–282. doi:10.1002/glia.1061.
- D'Arco, M., Margas, W., Cassidy, J. S., and Dolphin, A. C. (2015). The upregulation of α2δ-1 subunit modulates activity-dependent Ca2+ signals in sensory neurons. J. Neurosci. 35, 5891–5903. doi:10.1523/JNEUROSCI.3997-14.2015.
- da Silva Fiorin, F., do Espírito Santo, C. C., Santos, A. R. S., Fighera, M. R., and Royes, L. F. F. (2018). Implication of surgical procedure in the induction of headache and generalized painful sensation in a fluid percussion injury model in rats. J. Neurosci. Methods 307, 23–30. doi:10.1016/J.JNEUMETH.2018.06.004.
- Dambrova, M., Zvejniece, L., Liepinsh, E., Cirule, H., Zharkova, O., Veinberg, G., and Kalvinsh, I. (2008). Comparative pharmacological activity of optical isomers of phenibut. Eur. J. Pharmacol. 583, 128–134. doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.015.
- 36. De Guzman, E., and Ament, A. (2017). Neurobehavioral Management of Traumatic Brain Injury in the Critical Care Setting: An Update. Crit. Care Clin. 33, 423–440. doi:10.1016/J.CCC.2017.03.011.
- Dewan, M. C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R. E., Hung, Y.-C., Punchak, M., Agrawal, A., Adeleye, A. O., Shrime, M. G., Rubiano, A. M., Rosenfeld, J. V., and Park, K. B. (2018). Estimating the global incidence of traumatic brain injury. J. Neurosurg., 1–18. doi:10.3171/2017.10.JNS17352.
- Dixon, C. E., Kochanek, P. M., Yan, H. Q., Schiding, J. K., Griffith, R. G., Baum, E., Marion, D. W., and DeKosky, S. T. (2009). One-Year Study of Spatial Memory Performance, Brain Morphology, and Cholinergic Markers After Moderate Controlled Cortical Impact in Rats. https://home.liebertpub.com/neu 16, 109–122. doi:10.1089/NEU.1999.16.109.
- Dolphin, A. C. (2013). The α2δ subunits of voltage-gated calcium channels. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1828, 1541–1549. doi:10.1016/J.BBAMEM.2012.11.019.
- Dong, H., Ma, Y., Ren, Z., Xu, B., Zhang, Y., Chen, J., and Yang B. (2016). Sigma-1 Receptor Modulates Neuroinflammation After Traumatic Brain Injury. Cell. Mol. Neurobiol. 36, 639–645. doi:10.1007/s10571-015-0244-0.
- Edmonds, H. L., Bellin, S. I., Chen, F. M., and Hegreberg, G. A. (1978). Anticonvulsant properties of ropizine in epileptic and nonepileptic beagle dogs. Epilepsia 19, 139–146. doi:10.1111/J.1528-1157.1978.TB05024.X.

- 42. Elias, N., Rotariu, A.-M., and Grave, T. (2019). Traumatic brain injury in dogs and cats. Companion Anim. 24, 480–487. doi:10.12968/COAN.2019.0015.
- 43. Evans, E. K., and Fernandez, A. L. (2019). Current trends in the management of canine traumatic brain injury: An Internet-based survey. Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can. 60, 73–79.
- 44. Feliciano, D. P., Sahbaie, P., Shi, X., Klukinov, M., Clark, J. D., and Yeomans, D. C. (2014). Nociceptive sensitization and BDNF up-regulation in a rat model of traumatic brain injury. Neurosci. Lett. 583, 55–59. doi:10.1016/J.NEULET.2014.09.030.
- Flierl, M. A., Stahel, P. F., Beauchamp, K. M., Morgan, S. J., Smith, W. R., and Shohami, E. (2009). Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. Nat. Protoc. 4, 1328–1337. doi:10.1038/NPROT.2009.148.
- Floyd, R. A., and Carney, J. M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. Ann. Neurol. 32 Suppl, S22–S27. doi:10.1002/ANA.410320706.
- 47. Fox, G. B., Levasseur, R. A., and Faden, A. I. (2009). Behavioral Responses of C57BL/6, FVB/N, and 129/SvEMS Mouse Strains to Traumatic Brain Injury: Implications for Gene Targeting Approaches to Neurotrauma. https://home.liebertpub.com/neu 16, 377–389. doi:10.1089/NEU.1999.16.377.
- Gaja-Capdevila, N., Hernández, N., Zamanillo, D., Vela, J. M., Merlos, M., Navarro, X., and Herrando-Grabulosa, M. (2021). Neuroprotective Effects of Sigma 1 Receptor Ligands on Motoneuron Death after Spinal Root Injury in Mice. Int. J. Mol. Sci. 22. doi:10.3390/ijms22136956.
- 49. Garcia, Y., and Esquivel, N. (2018). Comparison of the Response of Male BALB/c and C57BL/6 Mice in Behavioral Tasks to Evaluate Cognitive Function. Behav. Sci. (Basel). 8. doi:10.3390/BS8010014.
- 50. Gardner, J., and Ghorpade, A. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. J. Neurosci. Res. 74, 801–806. doi:10.1002/JNR.10835.
- Garg, C., Seo, J. H., Ramachandran, J., Loh, J. M., Calderon, F., and Contreras, J. E. (2018). Trovafloxacin attenuates neuroinflammation and improves outcome after traumatic brain injury in mice. J. Neuroinflammation 15. doi:10.1186/S12974-018-1069-9.
- 52. Genrikhs, E. E., Stelmashook, E. V., Popova, O. V., Kapay, N. A., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Skrebitsky, V. G., Skulachev, V. P., and Isaev, N. K. (2015). Mitochondria-targeted antioxidant SkQT1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat and prevents amyloid-β-induced

impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices. J. Drug Target. 23, 347–352. doi:10.3109/1061186X.2014.997736.

- Gironda, R. J., Clark, M. E., Ruff, R. L., Chait, S., Craine, M., Walker, R., and Scholten J. (2009). Traumatic Brain Injury, Polytrauma, and Pain: Challenges and Treatment Strategies for the Polytrauma Rehabilitation. Rehabil. Psychol. 54, 247–258. doi:10.1037/A0016906.
- 54. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., and Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. Redox Biol. 6, 260–271. doi:10.1016/J.REDOX.2015.08.010.
- 55. Granger, D. N., and Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. Redox Biol. 6, 524–551. doi:10.1016/J.REDOX.2015.08.020.
- 56. Gurkoff, G., Shahlaie, K., Lyeth, B., and Berman, R. (2013). Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists and Traumatic Brain Injury. Pharmaceuticals 6, 788. doi:10.3390/PH6070788.
- 57. Gyoneva, S., and Ransohoff, R. M. (2015). Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. Trends Pharmacol. Sci. 36, 471–480. doi:10.1016/J.TIPS.2015.04.003.
- Ha, K. Y., Carragee, E., Cheng, I., Kwon, S. E., and Kim, Y. H. (2011). Pregabalin as a Neuroprotector after Spinal Cord Injury in Rats: Biochemical Analysis and Effect on Glial Cells. J. Korean Med. Sci. 26, 404. doi:10.3346/JKMS.2011.26.3.404.
- Ha, K. Y., Kim, Y. H., Rhyu, K. W., and Kwon, S. E. (2008). Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. Eur. Spine J. 17, 864. doi:10.1007/S00586-008-0653-6.
- 60. Hall, E. D., Vaishnav, R. A., and Mustafa, A. G. (2010). Antioxidant therapies for traumatic brain injury. Neurotherapeutics 7, 51–61. doi:10.1016/J.NURT.2009.10.021.
- 61. Hicks, R., Soares, H., Smith, D., and McIntosh, T. (1996). Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. Acta Neuropathol. 91, 236–246. doi:10.1007/S004010050421.
- 62. Homsi, S., Federico, F., Croci, N., Palmier, B., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., and Jafarian-Tehrani, M. (2009). Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. Brain Res. 1291, 122–132. doi:10.1016/J.BRAINRES.2009.07.031.
- Hong, J., Sha, S., Zhou, L., Wang, C., Yin, J., and Chen, L. (2015). Sigma-1 receptor deficiency reduces MPTP-induced parkinsonism and death of dopaminergic neurons. Cell Death Dis. 6, e1832. doi:10.1038/cddis.2015.194.

- Immonen, R. J., Kharatishvili, I., Gröhn, H., Pitkänen, A., and Gröhn, O. H. J. (2009). Quantitative MRI predicts long-term structural and functional outcome after experimental traumatic brain injury. Neuroimage 45, 1–9. doi:10.1016/J.NEUROIMAGE.2008.11.022.
- Irvine, K. A., and David Clark, J. (2018). Chronic Pain After Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Pain Mechanisms. Pain Med. 19, 1315–1333. doi:10.1093/PM/PNX153.
- Irvine, K. A., Sahbaie, P., Ferguson, A. R., and Clark, J. D. (2019). Enhanced descending pain facilitation in acute traumatic brain injury. Exp. Neurol. 320, 112976. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2019.112976.
- Johnstone, V. P. A., Wright, D. K., Wong, K., O'Brien, T. J., Rajan, R., and Shultz, S. R. (2015). Experimental Traumatic Brain Injury Results in Long-Term Recovery of Functional Responsiveness in Sensory Cortex but Persisting Structural Changes and Sensorimotor, Cognitive, and Emotional Deficits. J. Neurotrauma 32, 1333–1346. doi:10.1089/NEU.2014.3785.
- Kamper, J. E., Pop, V., Fukuda, A. M., Ajao, D. O., Hartman, R. E., and Badaut, J. (2013). Juvenile traumatic brain injury evolves into a chronic brain disorder: Behavioral and histological changes over 6 months. Exp. Neurol. 250, 8–19. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2013.09.016.
- Kane, M. J., Angoa-Pérez, M., Briggs, D. I., Viano, D. C., Kreipke, C. W., and Kuhn, D. M. (2012). A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. J. Neurosci. Methods 203, 41–49. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.09.003.
- 70. Katnik, C., Garcia, A., Behensky, A. A., Yasny, I. E., Shuster, A. M., Seredenin, S. B., Petrov, A. V., Seifu, S., McAleer, J., Willing, A., and Cuevas, J. (2014). Treatment with afobazole at delayed time points following ischemic stroke improves long-term functional and histological outcomes. Neurobiol. Dis. 62, 354–364. doi:10.1016/j.nbd.2013.10.011.
- Khoury, S., and Benavides, R. (2018). Pain with traumatic brain injury and psychological disorders. Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry 87, 224–233. doi:10.1016/J.PNPBP.2017.06.007.
- Knoblach, S. M., Fan, L., and Faden, A. I. (1999). Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. J. Neuroimmunol. 95, 115–125. doi:10.1016/S0165-5728(98)00273-2.
- Kupats, E., Vrublevska, J., Zvejniece, B., Vavers, E., Stelfa, G., Zvejniece, L., and Dambrova M. (2020). Safety and tolerability of the anxiolytic and nootropic drug phenibut: A systematic review of clinical trials and case reports. Pharmacopsychiatry 53, 201–208. doi:10.1055/A-1151-5017.
- Kwan, V., Vo, M., Noel, M., and Yeates, K. (2018). A Scoping Review of Pain in Children after Traumatic Brain Injury: Is There More Than Headache? J. Neurotrauma 35, 877. doi:10.1089/NEU.2017.5281.

- 75. Lagraoui, M., Latoche, J. R., Cartwright, N. G., Sukumar, G., Dalgard, C. L., and Schaefer, B. C. (2012). Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. Front. Neurol. 3. doi:10.3389/FNEUR.2012.00155.
- Lapin, I. (2001). Phenibut (β-Phenyl-GABA): A Tranquilizer and Nootropic Drug. CNS Drug Rev. 7, 471–481. doi:10.1111/j.1527-3458.2001.tb00211.x.
- 77. Lattard, A., Poulen, G., Bartolami, S., Gerber, Y. N., and Perrin, F. E. (2021). Negative Impact of Sigma-1 Receptor Agonist Treatment on Tissue Integrity and Motor Function Following Spinal Cord Injury. Front. Pharmacol. 12, 614949. doi:10.3389/fphar.2021.614949.
- Lazovic, J., Basu, A., Lin, H. W., Rothstein, R. P., Krady, J. K., Smith, M. B., and Levison S. W. (2005). Neuroinflammation and both cytotoxic and vasogenic edema are reduced in interleukin-1 type 1 receptor-deficient mice conferring neuroprotection. Stroke 36, 2226–2231. doi:10.1161/01.STR.0000182255.08162.6a.
- Leconte, C., Benedetto, C., Lentini, F., Simon, K., Ouaazizi, C., Taib, T., Cho, A., Plotkine, M., Mongeau, R., Marchand-Leroux, C., Besson, and Valérie C. (2020). Histological and Behavioral Evaluation after Traumatic Brain Injury in Mice: A Ten Months Follow-Up Study. https://home.liebertpub.com/neu 37, 1342–1357. doi:10.1089/NEU.2019.6679.
- Liang, D. Y., Shi, X., Liu, P., Sun, Y., Sahbaie, P., Li, W. W., Yeomans, D. C., and Clark, J. D. (2017). The Chemokine Receptor CXCR2 Supports Nociceptive Sensitization after Traumatic Brain Injury. Mol. Pain 13. doi:10.1177/1744806917730212.
- Lok, J., Leung, W., Murphy, S., Butler, W., Noviski, N., and Lo, E. H. (2011). Intracranial hemorrhage: mechanisms of secondary brain injury. Acta Neurochir. Suppl. 111, 63–69. doi:10.1007/978-3-7091-0693-8\_11.
- 82. Lorente, L., Martín, M. M., Ramos, L., Cáceres, J. J., Solé-Violán, J., Argueso, M., Jiménez, A., Borreguero-León, J. M., Orbe, J., Rodríguez, J. A., and Páramo, J. A. (2015). Serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels are associated with mortality in patients with malignant middle cerebral artery infarction. BMC Neurol. 15. doi:10.1186/S12883-015-0364-7.
- Lu, K. T., Wang, Y. W., Yang, J. T., Yang, Y. L., and Chen, H. I. (2005). Effect of Interleukin-1 on Traumatic Brain Injury–Induced Damage to Hippocampal Neurons. https://home.liebertpub.com/neu 22, 885–895. doi:10.1089/NEU.2005.22.885.
- Lucki, I., Dalvi, A., and Mayorga, A. J. (2001). Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. Psychopharmacology (Berl). 155, 315–322. doi:10.1007/S002130100694.
- 85. Macolino, C. M., Daiutolo, B. V., Albertson, B. K., and Elliott, M. B. (2014). Mechanical allodynia induced by traumatic brain injury is independent of

restraint stress. J. Neurosci. Methods 226, 139–146. doi:10.1016/J.JNEUMETH.2014.01.008.

- Majdan, M., Melichova, J., Plancikova, D., Sivco, P., Maas, A. I. R., Feigin, V. L., Polinder, S., and Haagsma, J. A. (2022). Burden of Traumatic Brain Injuries in Children and Adolescents in Europe: Hospital Discharges, Deaths and Years of Life Lost. Children 9, 105. doi:10.3390/CHILDREN9010105/S1.
- 87. Mao, X., Terpolilli, N. A., Wehn, A., Cheng, S., Hellal, F., Liu, B., Seker, B., and Plesnila, N. (2020). Progressive Histopathological Damage Occurring Up to One Year after Experimental Traumatic Brain Injury Is Associated with Cognitive Decline and Depression-Like Behavior. J. Neurotrauma 37, 1331– 1341. doi:10.1089/NEU.2019.6510.
- Marais, E., Klugbauer, N., and Hofmann, F. (2001). Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. Mol. Pharmacol. 59, 1243–1248. doi:10.1124/MOL.59.5.1243.
- Marmarou, A., Abd-Elfattah Foda, M. A., Van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., and Demetriadou, K. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats: Part I: Pathophysiology and biomechanics. J. Neurosurg. 80, 291–300. doi:10.3171/JNS.1994.80.2.0291.
- Masciantonio, M. G., Lee, C. K. S., Arpino, V., Mehta, S., and Gill, S. E. (2017). The Balance Between Metalloproteinases and TIMPs: Critical Regulator of Microvascular Endothelial Cell Function in Health and Disease. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 147, 101–131. doi:10.1016/BS.PMBTS.2017.01.001.
- 91. Maurice, T., Strehaiano, M., Duhr, F., and Chevallier, N. (2018). Amyloid toxicity is enhanced after pharmacological or genetic invalidation of the  $\sigma(1)$  receptor. Behav. Brain Res. 339, 1–10. doi:10.1016/j.bbr.2017.11.010.
- Mautes, A. E., Fukuda, K., and Noble, L. J. (1996). Cellular response in the cerebellum after midline traumatic brain injury in the rat. Neurosci. Lett. 214, 95–98. doi:10.1016/0304-3940(96)12916-5.
- 93. McColl, T. J., Brady, R. D., Shultz, S. R., Lovick, L., Webster, K. M., Sun, M., McDonald, S. J., O'Brien, T. J., and Semple, B. D. (2018). Mild traumatic brain injury in adolescent mice alters skull bone properties to influence a subsequent brain impact at adulthood: A pilot study. Front. Neurol. 9, 25. doi:10.3389/FNEUR.2018.00372/FULL.
- 94. Meconi, A., Wortman, R. C., Wright, D. K., Neale, K. J., Clarkson, M., Shultz, S. R., and Christie, B. R. (2018). Repeated mild traumatic brain injury can cause acute neurologic impairment without overt structural damage in juvenile rats. PLoS One 13. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0197187.
- 95. Meidahl, A. C., Eisenried, A., Klukinov, M., Cao, L., Tzabazis, A. Z., and Yeomans, D. C. (2018). Intranasal Oxytocin Attenuates Reactive and

Ongoing, Chronic Pain in a Model of Mild Traumatic Brain Injury. Headache 58, 545–558. doi:10.1111/HEAD.13248.

- Meidahl, A. C., Klukinov, M., Tzabazis, A. Z., Sorensen, J. C., and Yeomans, D. C. (2017). Nasal application of HSV encoding human preproenkephalin blocks craniofacial pain in a rat model of traumatic brain injury. doi:10.1038/gt.2017.55.
- Midura, E. F., Jernigan, P. L., Kuethe, J. W., Friend, L. A., Veile, R., Makley, A. T., Caldwell, C. C., and Goodman, M. D. (2015). Microparticles impact coagulation after traumatic brain injury. J. Surg. Res. 197, 25–31. doi:10.1016/j.jss.2015.02.064.
- Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bon, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., Elmer, G. I., Chung, J. M., and Devor, M. (1999). Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. Pain 80, 67–82. doi:10.1016/S0304-3959(98)00197-3.
- Moritz, C., Berardi, F., Abate, C., and Peri, F. (2015). Live imaging reveals a new role for the sigma-1 (σ1) receptor in allowing microglia to leave brain injuries. Neurosci. Lett. 591, 13–18. doi:10.1016/j.neulet.2015.02.004.
- 100. Namjoshi, D. R., Cheng, W. H. an., McInnes, K. A., Martens, K. M., Carr, M., Wilkinson, A., Fan, J., Robert, J., Hayat, A., Cripton, P. A., and Wellington, C. L. (2014). Merging pathology with biomechanics using CHIMERA (Closed-Head Impact Model of Engineered Rotational Acceleration): a novel, surgery-free model of traumatic brain injury. Mol. Neurodegener. 9, 55. doi:10.1186/1750-1326-9-55/FIGURES/9.
- 101. Namjoshi, D. R., Good, C., Cheng, W. H., Panenka, W., Richards, D., Cripton, P. A., and Wellington, C. L. (2013). Towards clinical management of traumatic brain injury: a review of models and mechanisms from a biomechanical perspective. Dis. Model. Mech. 6, 1325–1338. doi:10.1242/DMM.011320.
- 102. Nampiaparampil, D. E. (2008). Prevalence of Chronic Pain After Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. JAMA 300, 711–719. doi:10.1001/JAMA.300.6.711.
- Nardai, S., László, M., Szabó, A., Alpár, A., Hanics, J., Zahola, P., Merkely, B., Frecska, E., and Nagy, Z. (2020). N,N-dimethyltryptamine reduces infarct size and improves functional recovery following transient focal brain ischemia in rats. Exp. Neurol. 327, 113245. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113245.
- 104. Newell, E. A., Todd, B. P., Mahoney, J., Pieper, A. A., Ferguson, P. J., and Bassuk, A. G. (2018). Combined Blockade of Interleukin-1α and -1β Signaling Protects Mice from Cognitive Dysfunction after Traumatic Brain Injury. Eneuro 5, ENEURO.0385-17.2018. doi:10.1523/ENEURO.0385-17.2018.

- Nguyen, L., Lucke-Wold, B. P., Mookerjee, S. A., Cavendish, J. Z., Robson, M. J., Scandinaro, A. L., and Matsumoto, R. R. (2015). Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. J. Pharmacol. Sci. 127, 17–29. doi:10.1016/j.jphs.2014.12.005.
- 106. Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., Kirchhoff, F., and Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. Glia 33, 72—86. doi:10.1002/1098-1136(20010101)33:1<72::aid-glia1007&gt;3.0.co;2-a.
- 107. Ofek, H., and Defrin, R. (2007). The characteristics of chronic central pain after traumatic brain injury. Pain 131, 330–340. doi:10.1016/J.PAIN.2007.06.015.
- 108. Ooigawa, H., Nawashiro, H., Fukui, S., Otani, N., Osumi, A., Toyooka, T., and Shima K. (2006). The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. Acta Neuropathol. 112, 471–481. doi:10.1007/S00401-006-0108-2.
- Park, E., McKnight, S., Ai, J., and Baker, A. J. (2006). Purkinje cell vulnerability to mild and severe forebrain head trauma. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 65, 226–234. doi:10.1097/01.jnen.0000202888.29705.93.
- 110. Pierce, J. E. S., Smith, D. H., Trojanowski, J. Q., and McIntosh, T. K. (1998). Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. Neuroscience 87, 359–369. doi:10.1016/S0306-4522(98)00142-0.
- 111. Pischiutta, F., Micotti, E., Hay, J. R., Marongiu, I., Sammali, E., Tolomeo, D., Vegliante, G., Stocchetti, N., Forloni, G., De Simoni, M. G., Stewart, W., and Zanier, E. R. (2018). Single severe traumatic brain injury produces progressive pathology with ongoing contralateral white matter damage one year after injury. Exp. Neurol. 300, 167–178. doi:10.1016/j.expneurol.2017.11.003.
- 112. Pöttker, B., Stöber, F., Hummel, R., Angenstein, F., Radyushkin, K., Goldschmidt, J., and Schäfer, M. K. E. (2017). Traumatic brain injury causes long-term behavioral changes related to region-specific increases of cerebral blood flow. Brain Struct. Funct. 2017 2229 222, 4005–4021. doi:10.1007/S00429-017-1452-9.
- 113. Prins, M., Greco, T., Alexander, D., and Giza, C. C. (2013). The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. DMM Dis. Model. Mech. 6, 1307–1315. doi:10.1242/DMM.011585/-/DC1.
- 114. Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M. Lou, Codd, E. E., and D'Andrea, M. R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. Mol. Pharmacol. 62, 485–496. doi:10.1124/MOL.62.3.485.

- Rapoport, M., van Reekum, R., and Mayberg, H. (2000). The Role of the Cerebellum in Cognition and Behavior. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 12, 193–198. doi:10.1176/jnp.12.2.193.
- 116. Ren, Z., Iliff, J. J., Yang, L., Yang, J., Chen, X., Chen, M. J., Giese, R. N., Wang, B., Shi, X., and Nedergaard, M. (2013). "Hit & Run" model of closedskull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. J. Cereb. Blood Flow Metab. 33, 834–845. doi:10.1038/JCBFM.2013.30.
- 117. Rodríguez, J. A., Sobrino, T., Orbe, J., Purroy, A., Martínez-Vila, E., Castillo, J., and Páramo, J. A. (2013). proMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke. J. Thromb. Haemost. 11, 1464–1473. doi:10.1111/JTH.12312.
- 118. Rothwell, N. J., and Luheshi, G. N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. Trends Neurosci. 23, 618–625. doi:10.1016/S0166-2236(00)01661-1.
- 119. Rowe, R. K., Ellis, G. I., Harrison, J. L., Bachstetter, A. D., Corder, G. F., Van Eldik, L. J., Taylor, B. K., Marti, F., and Lifshitz, J. (2016). Diffuse traumatic brain injury induces prolonged immune dysregulation and potentiates hyperalgesia following a peripheral immune challenge. Mol. Pain 12. doi:10.1177/1744806916647055.
- 120. Sahagian, M., Mastrocco, A., and Prittie, J. (2023). Phenibut toxicosis in a dog. J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio). 33. doi:10.1111/VEC.13313.
- 121. Sánchez-Blázquez, P., Pozo-Rodrigálvarez, A., Merlos, M., and Garzón, J. (2018). The Sigma-1 Receptor Antagonist, S1RA, Reduces Stroke Damage, Ameliorates Post-Stroke Neurological Deficits and Suppresses the Overexpression of MMP-9. Mol. Neurobiol. 55, 4940–4951. doi:10.1007/s12035-017-0697-x.
- 122. Sande, A., and West, C. (2010). Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio). 20, 177–190. doi:10.1111/j.1476-4431.2010.00527.x.
- 123. Santos, L. O. Dos, Caldas, G. G., Santos, C. R. O., and Junior, D. B. (2018). Traumatic brain injury in dogs and cats: a systematic review. Vet. Med. (Praha). 63, 345–357. doi:10.17221/20/2017-VETMED.
- 124. Sasaki, T., Beppu, K., Tanaka, K. F., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., and Matsui, K. (2012). Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 20720 LP – 20725. doi:10.1073/pnas.1213458109.
- 125. Schetz, J. A., Perez, E., Liu, R., Chen, S., Lee, I., and Simpkins, J. W. (2007). A prototypical Sigma-1 receptor antagonist protects against brain ischemia. Brain Res. 1181, 1–9. doi:10.1016/j.brainres.2007.08.068.

- 126. Schmidt, R. L., and Lenz, L. L. (2012). Distinct Licensing of IL-18 and IL-1β Secretion in Response to NLRP3 Inflammasome Activation. PLoS One 7, 45186. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0045186.
- 127. Schwarzbold, M. L., Rial, D., De Bem, T., Machado, D. G., Cunha, M. P., dos Santos, A. A., dos Santos, D. B., Figueiredo, C. P., Farina, M., Goldfeder, E. M., Rodrigues, A. L. S., Prediger, R. D. S., and Walz, R. (2010). Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. J. Neurotrauma 27, 1883–1893. doi:10.1089/neu.2010.1318.
- 128. Semple, B. D., Bye, N., Ziebell, J. M., and Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Deficiency of the chemokine receptor CXCR2 attenuates neutrophil infiltration and cortical damage following closed head injury. Neurobiol. Dis. 40, 394–403. doi:10.1016/J.NBD.2010.06.015.
- 129. Shamsi Meymandi, M., Soltani, Z., Sepehri, G., Amiresmaili, S., Farahani, F., and Moeini Aghtaei, M. (2018). Effects of pregabalin on brain edema, neurologic and histologic outcomes in experimental traumatic brain injury. Brain Res. Bull. 140, 169–175. doi:10.1016/J.BRAINRESBULL.2018.05.001.
- Shear, D. A., Tate, M. C., Archer, D. R., Hoffman, S. W., Hulce, V. D., Laplaca, M. C., and Stein D. G. (2004). Neural progenitor cell transplants promote long-term functional recovery after traumatic brain injury. Brain Res. 1026, 11–22. doi:10.1016/J.BRAINRES.2004.07.087.
- 131. Shi, M., Chen, F., Chen, Z., Yang, W., Yue, S., Zhang, J., and Chen X. (2021). Sigma-1 Receptor: A Potential Therapeutic Target for Traumatic Brain Injury. Front. Cell. Neurosci. 15, 402. doi:10.3389/FNCEL.2021.685201/BIBTEX.
- Shohami, E., Novikov, M., Bass, R., Yamin, A., and Gallily, R. (1994). Closed head injury triggers early production of TNF alpha and IL-6 by brain tissue. J. Cereb. Blood Flow Metab. 14, 615–619. doi:10.1038/JCBFM.1994.76.
- 133. Stelfa, G., Vavers, E., Svalbe, B., Serzants, R., Miteniece, A., Lauberte, L., Grinberga, S., Gukalova, B., Dambrova, M., and Zvejniece, L. (2021). Reduced GFAP expression in bergmann glial cells in the cerebellum of sigma-1 receptor knockout mice determines the neurobehavioral outcomes after traumatic brain injury. Int. J. Mol. Sci. 22. doi:10.3390/IJMS222111611/S1.
- 134. Stelmashook, E. V., Isaev, N. K., Genrikhs, E. E., and Novikova, S. V. (2019). Mitochondria-Targeted Antioxidants as Potential Therapy for the Treatment of Traumatic Brain Injury. Antioxidants 8. doi:10.3390/ANTIOX8050124.
- 135. Su, T. P. (1994). Sigma receptors in the central nervous system and the periphery. Sigma Recept., 21–44.

- 136.Sullivan-Singh, S. J., Sawyer, K., Ehde, D. M., Bell, K. R., Temkin, N., Dikmen, S., Williams, R. M., and Hoffman, J. M. (2014). Comorbidity of Pain and Depression Among Persons With Traumatic Brain Injury. Arch. Phys. Med. Rehabil. 95, 1100–1105. doi:10.1016/J.APMR.2014.02.001.
- Sun, M., Brady, R. D., Wright, D. K., Kim, H. A., Zhang, S. R., Sobey, C. G., Johnstone, M. R., O'Brien, T. J., Semple, B. D., McDonald, S. J., and Shultz, S. R. (2017). Treatment with an interleukin-1 receptor antagonist mitigates neuroinflammation and brain damage after polytrauma. Brain. Behav. Immun. 66, 359–371. doi:10.1016/J.BBI.2017.08.005.
- 138. Talley Watts, L., Long, J. A., Chemello, J., Van Koughnet, S., Fernandez, A., Huang, S., Shen, Q., and Duong, T. Q. (2014). Methylene Blue Is Neuroprotective against Mild Traumatic Brain Injury. J. Neurotrauma 31, 1063. doi:10.1089/NEU.2013.3193.
- 139. Taylor, C. P., and Garrido, R. (2008). Immunostaining of rat brain, spinal cord, sensory neurons and skeletal muscle for calcium channel alpha2-delta  $(\alpha 2-\delta)$  type 1 protein. Neuroscience 155, 510–521. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.05.053.
- 140. Tehranian, R., Andell-Jonsson, S., Beni, S. M., Yatsiv, I., Shohami, E., Bartfai, T., Lundkvist, J., and Iverfeldt, K. (2002). Improved recovery and delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist. J. Neurotrauma 19, 939–951. doi:10.1089/089771502320317096.
- 141. Tham, S. W., Palermo, T. M., Wang, J., Jaffe, K. M., Temkin, N., Durbin, D., and Rivara F. P. (2013). Persistent Pain in Adolescents Following Traumatic Brain Injury. J. Pain 14, 1242. doi:10.1016/J.JPAIN.2013.05.007.
- 142. Thompson, H. J., Lifshitz, J., Marklund, N., Grady, M. S., Graham, D. I., Hovda, D. A., and Mcintosh, T.K. (2005). Lateral Fluid Percussion Brain Injury: A 15-Year Review and Evaluation. https://home.liebertpub.com/neu 22, 42–75. doi:10.1089/NEU.2005.22.42.
- 143. Tucker, L. B., Velosky, A. G., Fu, A. H., and McCabe, J. T. (2019). Chronic Neurobehavioral Sex Differences in a Murine Model of Repetitive Concussive Brain Injury. Front. Neurol. 10, 509. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2019.00509.
- 144. Tyszkiewicz, C., Pardo, I. D., Ritenour, H. N., Liu, C.-N., and Somps, C. (2021). Increases in GFAP immunoreactive astrocytes in the cerebellar molecular layer of young adult CBA/J mice. Lab. Anim. Res. 37, 24. doi:10.1186/s42826-021-00100-5.
- 145. Vavers, E., Svalbe, B., Lauberte, L., Stonans, I., Misane, I., Dambrova, M., and Zvejniece L. (2017). The activity of selective sigma-1 receptor ligands in seizure models in vivo. Behav. Brain Res. 328, 13–18. doi:10.1016/j.bbr.2017.04.008.

- 146. Vavers, E., Zvejniece, L., Svalbe, B., Volska, K., Makarova, E., Liepinsh, E., Dambrova M. (2016). The neuroprotective effects of R-phenibut after focal cerebral ischemia. Pharmacol. Res. 113, 796–801. doi:10.1016/J.PHRS.2015.11.013.
- 147. Veech, R. L., Valeri, C. R., and Vanitallie, T. B. (2012). The mitochondrial permeability transition pore provides a key to the diagnosis and treatment of traumatic brain injury. IUBMB Life 64, 203–207. doi:10.1002/IUB.590.
- Walker, W. C. (2004). Pain pathoetiology after TBI: neural and nonneural mechanisms. J. Head Trauma Rehabil. 19, 72–81. doi:10.1097/00001199-200401000-00007.
- 149. Wang, F., Xu, Q., Wang, W., Takano, T., and Nedergaard, M. (2012). Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via Ca<sup&gt;2+&lt;/sup&gt;-dependent K&lt;sup&gt;+&lt;/sup&gt; uptake. Proc. Natl. Acad. Sci., 201120380. doi:10.1073/pnas.1120380109.
- 150. Wang, L., Kang, S., Zou, D., Zhan, L., Li, Z., Zhu, W., and Su, H. (2016). Bone Fracture Pre-Ischemic Stroke Exacerbates Ischemic Cerebral Injury in Mice. PLoS One 11, e0153835. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0153835.
- 151. Wang, X., Barone, F. C., White, R. F., and Feuerstein, G. Z. (1998). Subtractive cloning identifies tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) increased gene expression following focal stroke. Stroke 29, 516– 520. doi:10.1161/01.STR.29.2.516.
- 152. Wang, X., Imura, T., Sofroniew, M. V, and Fushiki, S. (2011). Loss of adenomatous polyposis coli in Bergmann glia disrupts their unique architecture and leads to cell nonautonomous neurodegeneration of cerebellar Purkinje neurons. Glia 59, 857–868. doi:10.1002/glia.21154.
- 153. Wang, Z., Wang, Q., Wang, C., Xu, X., and Yu, H. (2017). Tetramethylpyrazine attenuates periorbital allodynia and neuroinflammation in a model of traumatic brain injury. J. Inflamm. (Lond). 14. doi:10.1186/S12950-017-0161-8.
- 154. Weber, J. T. (2012). Altered calcium signaling following traumatic brain injury. Front. Pharmacol. 3. doi:10.3389/FPHAR.2012.00060.
- 155. Wegleiter, K., Hermann, M., Posod, A., Wechselberger, K., Stanika, R. I., Obermair, G. J., Kiechl-Kohlendorfer, U., Urbanek, M., and Griesmaier, E. (2014). The sigma-1 receptor agonist 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) protects against newborn excitotoxic brain injury by stabilizing the mitochondrial membrane potential in vitro and inhibiting microglial activation in vivo. Exp. Neurol. 261, 501–509. doi:10.1016/j.expneurol.2014.07.022.
- 156. Werner, C., and Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. BJA Br. J. Anaesth. 99, 4–9. doi:10.1093/BJA/AEM131.
- 157. White, T. E., Ford, G. D., Surles-Zeigler, M. C., Gates, A. S., LaPlaca, M. C., and Ford, B. D. (2013). Gene expression patterns following unilateral

traumatic brain injury reveals a local pro-inflammatory and remote antiinflammatory response. BMC Genomics 14, 1–21. doi:10.1186/1471-2164-14-282/TABLES/3.

- Wilson, L., Stewart, W., Dams-O'Connor, K., Diaz-Arrastia, R., Horton, L., Menon, D. K., and Polinder S. (2017). The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. Lancet. Neurol. 16, 813–825. doi:10.1016/S1474-4422(17)30279-X.
- 159. Woodcock, T., and Morganti-Kossmann, M. C. (2013). The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. Front. Neurol. 4. doi:10.3389/FNEUR.2013.00018.
- Wu, Q., Xuan, W., Ando, T., Xu, T., Huang, L., Huang, Y.-Y., Dai, T., Dhital, S., and Sharma, S. K. (2012). Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths. Lasers Surg. Med. 44, 218–226. doi:10.1002/lsm.22003.
- 161. Xiong, Y., Mahmood, A., and Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. Nat. Rev. Neurosci. 14, 128. doi:10.1038/NRN3407.
- Zhang, Q., Zhou, C., Hamblin, M. R., and Wu, M. X. (2014). Low-level laser therapy effectively prevents secondary brain injury induced by immediate early responsive gene X-1 deficiency. J. Cereb. Blood Flow Metab. 34, 1391. doi:10.1038/JCBFM.2014.95.
- 163. Zhou, J., Wang, H., Shen, R., Fang, J., Yang, Y., Dai, W., Zhu, Y., and Zhou, M. (2018). Mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ provides neuroprotection and reduces neuronal apoptosis in experimental traumatic brain injury possibly via the Nrf2-ARE pathway. Am. J. Transl. Res. 10, 1887. Available at: /pmc/articles/PMC6038061/ [Accessed October 18, 2022].
- 164. Ziebell, J. M., Bye, N., Semple, B. D., Kossmann, T., and Morganti-Kossmann, M. C. (2011). Attenuated neurological deficit, cell death and lesion volume in Fas-mutant mice is associated with altered neuroinflammation following traumatic brain injury. Brain Res. 1414, 94– 105. doi:10.1016/J.BRAINRES.2011.07.056.
- 165. Zvejniece, L., Vavers, E., Svalbe, B., Veinberg, G., Rizhanova, K., Liepins, V., Kalvinsh, I., and Dambrova, M. (2015). R-phenibut binds to the  $\alpha 2-\delta$  subunit of voltage-dependent calcium channels and exerts gabapentin-like anti-nociceptive effects. Pharmacol. Biochem. Behav. 137, 23–29. doi:10.1016/J.PBB.2015.07.014.