

ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი



ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

ტრანზიტორულ რეცეპტორულ პოტენციალთა
არხების როლი ტკივილის მოდულაციაში

ივლიანე ნოზაძე

მედიცინის ფაკულტეტი

სადოქტორო პროგრამა “კლინიკური და
ტრანსლაციური მედიცინა”

თბილისი

2022

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია ივანე ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის ტკივილისა და ანალგეზიის ლაბორატორიაში.

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

მერაბ ცაგარელი - ბიოლოგიის მეცნიერებათა
დოქტორი

თამარ კეზელი - მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა

ტკივილი ჯანმრთელობის სერიოზული პრობლემაა, რომელიც გავლენას ახდენს ადამიანის ცხოვრების ხარისხზე. იგი თან სდევს მრავალ მწვავე თუ ქრონიკულ დაავადებას. ცხოველებსა და ადამიანის ორგანიზმში ტკივილი გამოიწვევა სხვადასხვა გამლიზიანებელი ფაქტორით. სხვა სენსორული შეგრძნებების მსგავსად, ტკივილის შეგრძნებას აღიქვამენ სპეციალიზირებული რეცეპტორები, ნოციცეპტორები, რომლებიც ამოიცნობენ, გარდაქმნიან და გადასცემენ სიგნალებს ცენტრალურ ნერვულ სისტემას. ამდენად, ტკივილი ახდენს სხვადასხვა ფუნქციური სისტემის მობილიზაციას მავნე გამლიზიანებლების ზემოქმედების თავიდან ასაცილებლად.

გარდამავალ რეცეპტორულ პოტენციალთა (transient receptor potential-TRP) არხის, როგორც რეცეპტორის იდენტიფიკაციამ, დასაბამი მისცა ახალ ერას ტკივილის შეგრძნების მოლეკულური მექანიზმის გარკვევაში.

TRP არხები აქტიურად შეისწავლება და განიხილება, როგორც სამკურნალო პრეპარატების სამიზნეები. ისინი წარმოადგენენ ტემპერატურულ და ტკივილის რეცეპტორებში არსებულ TRP ცილარხების ძალიან დიდ ოჯახს. სულ ახლახანს ეს კვლევები დაგვირგვინდა 2021 წლის ნობელის პრემიის

მინიჭებით ფიზიოლოგიის დარგში ამერიკელი მეცნიერისთვის დავიდ ჯულიუსისთვის (David Julius) ტემპერატურისა და ტკივილის მიმართ მგრძობიარე არხების შესწავლისთვის.

მზარდმა გენეტიკურმა გამოკვლევებმა ცხოველებსა და ადამიანში უჩვენეს, რომ TRP არხების ფიზიოლოგიური როლი საკმაოდ სცილდება ნერვულ სისტემას; მეტიც, სულ უფრო დიდი რაოდენობის გამოკვლევები მიუთითებენ TRP არხების მონაწილეობაზე სხვადასხვა პათოლოგიურ პროცესებში, რომლებიც უკავშირდებიან კანს, შარდის ბუშტს, თირკმელებს, სუნთქვისა და საჭმლის მომნელებელ სისტემებს.

გარდამავალ რეცეპტორულ პოტენციალთა არხები წარმოადგენენ კათიონების (ძირითადად კალციუმისა და ნატრიუმის) გამტარი არხების ფართო ჯგუფს, რომლებიც ასრულებენ კარდინალურ სასიგნალო ფუნქციას გრძობათა ორგანოებში და ამდენად მნიშვნელოვნად განაპირობებენ ცხოველთა ქცევას. ეს არხები აქტიურდებიან მრავალფეროვანი მექანიზმების საშუალებით და მონაწილეობენ პრაქტიკულად ყველა სენსორულ სისტემაში, როგორებიცაა მხედველობა, სმენა, გემოვნება, ყნოსვა, ასევე სომატო-სენსორული შეგრძნებები (შეხება, ტკივილი, ქავილი, ტემპერატურა). შესაბამისად, ამ არხებს ძლიერი გავლენა აქვთ ცხოველთა ქცევაზე.

მიუხედავად იმისა, რომ TRP არხების ფიზიოლოგიური ფუნქციები ჯერ კიდევ ბოლომდე არ არის შესწავლილი, ცოცხალ ორგანიზმებში ამ არხების ფართო წარმომადგენლობა მიუთითებს მათ მნიშვნელოვან ბიოლოგიურ როლზე. მაგ., TRP არხები ჩართული არიან სენსორული სიგნალების ტრანსდუქციაში, ისინი აგრეთვე პასუხობენ აქტივაციით ტემპერატურულ, მტკივნეულ (ნოციცეპტურ), მექანიკურ სტიმულებზე და ქიმიურ ნივთიერებებზე (ფერომონები, ოდორანტები) და სხვა. TRPA1, TRPV1 და TRPM8 უაღრესად მგრძნობიარე არიან სხვადასხვა ტემპერატურის მიმართ, რის გამოც მათ თერმო-TRP არხებს უწოდებენ.

საინტერესოა ის გარემოებაც, რომ TRP არხები ამავე დროს ამჟღავნებენ მგრძნობელობას ისეთი ქიმიური ნივთიერებების მიმართ, რომლებიც აღძრავენ ტკივილს და ტკივილის მსგავს შეგრძნებებს. ასეთი ნივთიერებებია დარიჩინის ალდეჰიდი, მენტოლი, კოჭას ზეთი (ჯანჯაფილი), მდოგვის ზეთი, ქაფური, მიხაკის ზეთი, კაპსაიციინი და სხვა. ზოგიერთი TRP არხი აქტივდება *in vitro* პირობებში სხვა რეცეპტორთა გააქტივებით, რომლებიც ჩაირთვებიან ანთების დროს და იწვევენ ტკივილს. გარდა ამისა, ეს არხები ჩართული არიან მთელი რიგი მემკვიდრული და შეძენილი დაავადებების განვითარებაში.

სპეციფიკური და შერჩევითი ტკივილგამაყუჩებელი საშუალებების შექმნა და მათი სამედიცინო პრაქტიკაში დანერგვა მოითხოვს თეორიული ცოდნის გაღრმავებას ტკივილის ნეიროფიზიოლოგიური, ნეიროქიმიური და პათოფიზიოლოგიური მექანიზმების შესახებ. ამ მხრივ თერმო-TRP არხების შესწავლა უაღრესად აქტუალური და მნიშვნელოვანია, წარმოდგენილი კვლევის შედეგების საფუძველზე, ჩვენ ვფიქრობთ, რომ TRP არხების აქტივობის სპეციფიკური და შერჩევითი შეკავება გამოყენებული იქნება ტკივილის მოსახსნელად.

კვლევის მიზნები და ამოცანები

სულ მცირე ექვსი ტემპერატურისადმი მგრძობიარე TRP არხი არის ექსპრესირებული სენსორულ ნეირონებში და მათი უმრავლესობა აგრეთვე წარმოადგენს რეცეპტორებს სენსორულ-აქტიური ნივთიერებისადმი, როგორცაა დარიჩინის ალდეჰიდი, მენტოლი, მდოგვის ზეთი, კაპსაიცინი და სხვა ქიმიური გამღიზიანებლები. ეს არხები მთავარი მოლეკულებია ნოციცეპციაში. თერმული TRP არხები ახდენენ, როგორც ტემპერატურული, ასევე ქიმიური და მექანიკური ტკივილის დეტექციას.

წარმოდგენილი ნაშრომის ძირითად მიზანს შეადგენდა თერმო-TRP არხების როლის დადგენა ტკივილის მოდულაციაში. კერძოდ, ვირთაგვებში თერმო-TRP არხების აგონისტებისა და ანტაგონის-

ტების ეფექტებისა და არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო წამლებით (NSAIDs) ტრანზიტორულ რეცეპტრულ პოტენციალთა იონური არხების (TRP) ქცევითი შესწავლა.

კვლევის მიზნის განსახორციელებლად განისაზღვრა შემდეგი ამოცანები:

1. თერმული და მექანიკური ტკივილის ფენომენების შესწავლა დარიჩინის ალდეჰიდისა და მდოგვის ზეთის TRPA1 არხზე მოქმედებით, კაპსაიცინის TRPV1 არხზე მოქმედებით და მენტოლის TRPM8 არხზე მოქმედებით სითბური და მექანიკური ტკივილის განვითარებისას ვირთაგვებში.

2. TRPA1 არხის ანტაგონისტის HC-030031 ეფექტების შესწავლა, თუ რამდენად მოახდენს ეს ანტაგონისტი TRP1 არხის დოზა-დამოკიდებულ ბლოკირებას სითბური და მექანიკური ტკივილის დროს.

3. TRPV1 არხის ანტაგონისტის AMG-517-ის დოზა-დამოკიდებული მახლოკირებელი მოქმედების შესწავლა სითბური და მექანიკური ტკივილის დროს.

4. არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო წამლების (NSAIDs) (კეტოროლაკი, დიკლოფენაკი და ქსეფოკამი) გავლენის გამოკვლევა დარიჩინის ალდეჰიდისა და მდოგვის ზეთით გამოწვეულ TRPA1 არხის

გააქტივებაზე სითბური და მექანიკური ტკივილის დროს.

5. NSAIDs წამლების გავლენის დადგენა კაპსაიცინით გამოწვეულ TRPV1 არხის გააქტივებაზე სითბური და მექანიკური ტკივილის დროს.

კვლევის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა:

ნაშრომში კომპლექსურადაა გამოკვლეული ვირთავებში მტკივნეული თერმული და მექანიკური სტიმულაციით გამოწვეულ რეფლექსურ პასუხებზე TRP არხების აგონისტების, დარიჩინის ალდეჰიდისა და მდოგვის ზეთის (TRPA1 არხისთვის), მენტოლის (TRPM8 არხისთვის) და კაპსაიცინის (TRPV1 არხისთვის), და ასევე ამ არხების ანტაგონისტების მოქმედების ეფექტები. კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ თერმო-TRP არხების აგონისტების თათქვეშა ინექციები იწვევენ თათის მოცილების თერმული რეფლექსის ფარული პერიოდისა და თათის მექანიკური გაღიზიანების ზღურბლის სარწმუნო შემცირებას კონტროლთან ან კონტრალატერალურ თათთან შედარებით, ანუ ჰიპერალგეზიისა და ალოდინიის განვითარებას. გარდა ამისა ნაჩვენებია TRPA1 და TRPV1 არხების ანტაგონისტების, შესაბამისად HC-030031 და AMG-517, წინასწარი ინტრაპლანტური შეყვანის შედეგად გამოწვეული, აღნიშნული ჰიპერალგეზიისა და ალოდინიის სარწმუნო ბლოკირება.

სადისერტაციო ნაშრომის შედეგები უზრუნველყოფს ახალი ინფორმაციის მიღებას ფუნდამენტური ნერვული მექანიზმების შესახებ, რომლებიც საფუძვლად უდევს ტკივილს და აგრეთვე თერმული და ქიმიური სტიმულებით გამოწვეულ გაღიზიანებას. მიღებული შედეგები აგრეთვე მოგვცემს ახალ ინფორმაციას თერმული და ქიმიური სტიმულებით განპირობებული ეფექტების ურთიერთქმედების ბუნებისა და მოქმედების ადგილისა (პერიფერიული *vs* ცენტრალური სენსიტიზაცია) და მათზე NSAIDs-ის გავლენების შესახებ.

წარმოდგენილი მონაცემები უჩვენებს ახალ მექანიზმს, რომელიც ერთმანეთთან აკავშირებს NSAIDs-ის ანთების საწინააღმდეგო და ტკივილ გამაყუჩებელ ეფექტებს. ეს მექანიზმი შესაძლოა პირდაპირ იწვევდეს TRPA1 და TRPV1 არხების ინაქტივაციასა ან დესენსიტიზაციას. ჩვენ ვარაუდობთ, რომ კლინიკურად კარგად ცნობილ NSAIDs ფუნქციას დაემატა, მათი როგორც TRPA1 და TRPV1 არხის რეგულატორების ფუნქცია. NSAIDs მოქმედების შესწავლა TRPA1 და სხვა თერმომგრძობიარე TRP არხებზე სრულიად ახალ შუქს ჰფენს ტკივილის მექანიზმების რეგულირებისა და მოდულაციის საკითხების შესწავლას. ასეთი მონაცემები ხელს შეუწყობს ტკივილის მექანიზმების გარკვევას ახალი თერაპიული საშუალებების მისაგნებად ტკივილის

უფრო ადექვატურად სამკურნალოდ, რასაც ჩვენი საზოგადოებისთვის სამედიცინოსთან ერთად დიდი სოციალური მნიშვნელობაც გააჩნია.

კვლევის სიახლე

თერმული და მექანიკური ტკივილის ფენომენების შესასწავლად პირველად იქნა გამოცდილი TRPA1, TRPV1 და TRPM8 არხების აგონისტებისა და ანტაგონისტების ფართო სპექტრი. ექსპერიმენტების შემდგომ სერიებში ჩვენ პირველად შევისწავლეთ ვირთაგვას თათში NSAIDs-ის (კეტოროლაკი, ქსეფოკამი და დიკლოფენაკი) პრე- და პოსტ-ინექციების ეფექტები TRPA1 და TRPV1 არხების აგონისტებთან მიმართებაში თერმული და მექანიკური მტკივნეული სტიმულაციით გამოწვეულ რეფლექსურ პასუხებზე. აღმოჩნდა, რომ მხოლოდ NSAIDs წინასწარი შეყვანა (და არა პოსტ-ინექციები) ახდენს ზემოთ აღნიშნული არხების შესაბამისი აგონისტებით გააქტივების შესუსტებას ქცევითი ტესტების მიხედვით. TRP არხების აქტივობის სპეციფიკური და შერჩევითი შეკავება გამოყენებული იქნება ტკივილის მოსახსნელად, რაც მნიშვნელოვან წვლილს შეიტანს ახალი კლასის ტკივილგამაყუჩებელი პრეპარატების შესაქმნელად.

დისერტაციის მოკლე შინაარსი:

დისერტაცია მოიცავს საკვლევი პრობლემის შესახებ არსებული ლიტერატურის მიმოხილვას, ექსპერიმენ-

ტეზში გამოყენებული მეთოდების აღწერას, მიღებულ შედეგებს, მათ განხილვას და დასკვნებს, რომელთა ჩამოყალიბება შესაძლებელი გახდა ჩატარებული კვლევის შედეგად.

დისერტაციის სრული მოცულობა შეადგენს 99 გვერდს და მოიცავს 38 სურათს, 4 ცხრილს და ციტირებული ლიტერატურის სიას.

ნაშრომის აპრობაცია

ნაშრომში მოყვანილი ძირითადი შედეგები მოხსენებულ იქნა სხვადასხვა საერთაშორისო სამეცნიერო ფორუმზე და სასწავლო პროგრამით გათვალისწინებულ ორ კვლევით პროექტზე.

სამეცნიერო ფორუმებზე მონაწილეობა:

1. Tsagareli M.G. and **Nozadze I.** NSAIDs attenuate TRP channels activated by their agonists. International conference "Translational and Clinical Medicine", 5-7 May, 2022, Tbilisi. <https://tcm-conference.tsu.ge/>

2. Tsagareli M.G., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Iodi Carstens M., Tsiklauri N., Gurtskaia G., Carstens E. TRPA1 channel is involved in non-histaminergic itch-related thermal and mechanical hyperalgesia. *Prog. & Abstr. 10th World Congress on Itch.* November 17-19, 2019, Sydney, Australia. PP11, p. 47.

3. Tsagareli M., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E. NSAIDs attenuate nociceptive hyperalgesia evoked by TRP channels activation through their agonists. *Abstr. Int. Multidiscip. Conf. "BIOMED-2019*, May 18-19, 2019, Tsikhisdziri, Georgia, pp. 15-16.

4. Tsagareli M.G. **Nozadze I.**, Gurtskaia G., Tsiklauri N., Abzianidze E. TRP channels in pain and itch sensation. *Abstr. 2nd Int. Conf. Human Genome & Health: Transl. Med. in the Era of Omics*. May 11-12, 2019. Tbilisi, Georgia, p. 17.

5. Tsagareli M., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E. NSAIDs attenuate TRPA1 and TRPV1 channels activated by their agonists. Program#/Poster# 219.12/X11. *Neuroscience Meeting Planner*. November 11-15, 2017, Washington, DC: Society for Neuroscience, 2017. Online.

6. Tsagareli M.G., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G. TRPA1 channel deactivation by NSAIDs: A behavioral study. *Abstr. 14th World Congress on Pain*, 2014, Buenos Aires, Argentina, PT 136.

7. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E., Tsagareli M.G. Behavioral study of the effects of thermosensitive TRP channel agonists on temperature and pain sensations. *Proc. 3rd National Congress Beritashvili Physiological Society of Georgia*. Tbilisi, 26-28 September, 2013, p. 209.

სადისერტაციო თემაზე გამოქვეყნებულ შრომათა სია

1. **Nozadze I.**, Gurtskaia G., Tsagareli M.G. TRPV1 and TRPA1 channels are involved in pain sensations. *Bulletin Georgian National Acad. Sci.*, 2021, vol. 15, no. 4, pp. 131-139 124 (ISSN: 0321-1665).

2. Tsagareli M.G., **Nozadze I.** An overview on transient receptor potential channels superfamily. *Behavioral Pharmacology*, 2020, vol 31, no 5, pp. 413–434 (doi: 10.1097/FBP.0000000000000524) Impact Factor: 2.293 (2020)

3. **Nozadze I.**, Tsagareli M.G. TRP channels in physiological nociception and pain. In: *Modern Advances in Pharmaceutical Research*. P.K. Sharma (ed). London: Book Publisher Intern., 2020, vol. 3, chapter 1, pp. 10-37 (doi: 10.9734/bpi/mapr/v3)

4. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. Agonist-evoked hyperalgesia and allodynia: The role of transient receptor potential channels in pain and itch. In: *Hyperalgesia and Allodynia: A Closer Look. Symptoms, Mechanisms and Treatment*. M.G. Tsagareli (ed.). New York: NOVA Medicine & Health, 2019, chapter 7, pp. 151-174 (ISBN: 978-1-53614-536-6)

5. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. NSAIDs attenuate agonist-evoked activation of the TRPA1 channel: Behavioral evidence. In: *Systemic, Cellular and*

Molecular Mechanisms of Physiological Functions and Their Disorders. Proc. Beritashvili Exp. BMC. New York: NOVA Biomedical, 2018, chapter 23, pp. 256-270 (ISBN: 978-1-53614-395-9)

6. Tsagareli M., **Nozadze I.**, Gurtskaia G., Tsiklauri N., Abzianidze E. The transient receptor potential channels' agonist-evoked hyperalgesia and allodynia in pain and itch. *Proc. Georgian National Acad. Sci., Biomed. Series*, 2018, vol. 44, nos. 3-4, pp. 291-305 (ISSN: 0321-1665)

7. Tsagareli M.G., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs attenuate agonist-evoked activation of transient receptor potential channels. *Biomed & Pharmacother*, 2018, vol. 97, pp. 745-751 (doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.131) Impact Factor: 6.5291 (2022)

8. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E., Tsagareli M.G. Role of transient receptor potential channels in itch and pain sensations. *Bulletin Georgian National Acad. Sci.*, 2018, New Series, vol. 12, no.1, pp. 118-124 (ISSN: 0321-1665)

9. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. NSAIDs attenuate hyperalgesia induced by TRP channel activation. *Data Brief*, 2016, vol. 6, pp. 668-673 (doi: 10.1016/j.dib.2015.12.055) Impact Factor: 1.133 (2022)

10. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. Role of thermo TRPA1 and TRPV1 channels in heat, cold and mechanical nociception of rats. *Behavioral*

Pharmacology, 2016, vol. 27, no. 1, pp. 29-36 (doi: 10.1097/FBP. 000000000000176) Impact Factor: 2.293 (2020)

11. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E., Tsagareli M.G. TRP channel in thermal pain sensation. In: Systemic, Cellular and Molecular Mechanisms of Physiological Functions and Their Disorders. *Proc. Beritashvili Exp. BMC*. New York: Nova Biomedical, 2016, chapter 22, pp. 271-287 (ISBN:978-1-63484-988-3)

12. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. Behavioral study of TRPA1 and TRPV1 channels relationship in Rats. *Bulletin Georgian National Acad. Sci.*, 2014, New Series, vol. 8, no. 1, pp 122-127 (ISSN: 0321-1447)

13. Tsagareli M.G., **Nozadze I.R.**, Gurtskaia G.P., Carstens M. I., Tsiklauri N.J., Carstens E.E. Behavioral and electrophysiological study of thermal and mechanical pain modulation by TRP channel agonists. *Нейрофизиология/Neurophysiology* (Kiev), 2013, vol. 45, no. 4, pp. 369-378; Republished in: *Neurophysiology* (Springer), 2013, 45(4): 329-339 (ISSN: 0028-2561) Impact Factor: 0.587 (2020)

ექსპერიმენტული მეთოდები

ცხოველები

ექსპერიმენტები ჩატარდა თეთრ ვირთაგვებზე, წონა 200-250 გრ. მათი გამრავლება წარმოებდა ივ. ბერიტაშვილის ბიომედიცინის ცენტრის ვივარიუმში.

ცხოველები იმყოფებიდნენ სტანდარტულ პირობებში ($22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% ტენიანობა, სინათლე - დილის 6:00 საათიდან საღამოს 8:00 საათამდე), იკვებებოდნენ სტანდარტული საკვებით, წყლის თავისუფალი მიღებით. ცხოველებზე ექსპერიმენტების ჩატარებისას სრულად იყო გათვალისწინებული ტკივილის შემსწავლელი საერთაშორისო ორგანიზაციის (IASP) მოთხოვნები (Zimmermann, 1983).

ექსპერიმენტები ჩატარდა რამდენიმე ეტაპად:

პირველი ეტაპი – საკონტროლო ჯგუფის ტესტირება.

მეორე ეტაპი – TRPM8, TRPV1 და TRPA1 არხების აგონისტების ტესტირება.

მესამე ეტაპი – TRPV1 და TRPA1 არხების ანტაგონისტების ეფექტების შესწავლა.

მეოთხე ეტაპი – NSAID-ის პრე- და პოსტინექციების გავლენა TRPA1 და TRPV1 არხის შესაბამისი აგონისტების მოქმედებით გამოწვეულ აქტივაციაზე. თითოეულ ექსპერიმენტულ და საკონტროლო ჯგუფში იყო ექვსი ვირთაგვა.

ქიმიური პრეპარატები

ქიმიური ნივთიერებების ინექცია: ყველა ქიმიურ ნივთიერება (მდოგვის ზეთი, დარიჩინის ალდეჰიდი, კაპსაიცინი, მენტოლი, TRPA1 არხის ანტაგონისტი – HC-030031, TRPV1 არხის ანტაგონისტი AMG-517 და

NSAID (დიკლოფენაკი, კეტოროლაკი, ესეფოკამი) შევიძინეთ კომპანიისგან Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). ამ ნივთიერებების სხვადასხვა დოზა შეგვყავდა ვირთაგვების უკანა თათში ნემსით, რომელიც ჰამილტონის მიკროშპრიცთან კანულით (PE50) იყო დაკავშირებული. საკონტროლო ცდებში ძირითადად ვიყენებდით ფიზიოლოგიურ ხსნარს, ან სპეციალურ გამხსნელებს (tween, DMSO), რომლებიც შეგვყავდა ანალოგიურადვე. NSAIDs ინექცია ხორციელდებოდა 5-10 წუთით ადრე TRP არხების აგონისტების შეყვანამდე.

ქვევითი ტესტირება

დასახული ამოცანების განსახორციელებლად გამოვიყენეთ თათის მოცილების თერმული ტესტი (Thermal paw withdrawal (Hargreaves) test), თათის მოცილების მექანიკური დაწოლის (Mechanical paw withdrawal threshold (VonFrey) test) ტესტი და ტემპერატურული უპირატესობის ტესტი (Thermal preference test).

მონაცემთა ანალიზი

თათის თერმული და მექანიკური მოცილების რეაქციები სტატისტიკურად გამოითვლებოდა განმეორებადი ვარიაციული ანალიზით. მონაცემთა შეჯერება წარმოებდა საკონტროლო და სატესტო

ჯგუფებს შორის *t*-Tukey-Kramer ტესტით. მიღებული მონაცემები გამოხატავენ საშუალოს±საშუალო კვადრატული გადახრას. სტატისტიკური სარწმუნოობა განისაზღვრებოდა $P<0,05$ შემთხვევისთვის. გამოვიყენეთ კომპიუტერული სტატისტიკური პაკეტი Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., USA).

მიღებული შედეგები

TRPA1 არხის აქტივაციის შესწავლა

დარიჩინის ალდეჰიდის (Cinnamom aldehyde (CA) (5%, 10% და 20%) უკანა თათში ტერფქვემა უნილატერალური ინექცია იწვევს იპსილატერალური თათის მოცილების რეფლექსის ფარული პერიოდის სარწმუნო, დოზა-დამოკიდებულ შემცირებას სითბური (ცხელი) ტკივილის სტიმულუმზე, ანუ ჰიპერალგეზიას. იგი ასევე ამცირებს თათის მექანიკური გაღიზიანების ზღურბლს, ე.ი. იწვევს მექანიკურ ალოდინიას. ამას გარდა, CA-ის ბილატერალურმა ინექციამ გამოავლინა ჰიპერალგეზია სიცივეზე (ცივი ფირფიტის ტესტი) და არამტკივნეულ სიცივეზე განრიდება (თერმული უპირატესობის ტესტი).

მდოგვის ზეთის ძირითადი კომპონენტის ალილ იზოთიოციანატის (Alyl isothiocyanate (AITC) (5%, 10% და 15%) უკანა თათში ტერფქვემა უნილატერალური ინექცია იწვევს იპსილატერალური თათის მოცილების თერმული რეფლექსის ფარული პერიოდის სარწმუნო,

დოზა-დამოკიდებულ შემცირებას სითბური ტკივილის სტიმულებზე, ანუ ჰიპერალგეზიას. იგი ასევე ამცირებს თათის მექანიკური გაღიზიანების ზღურბლს, ე.ი. იწვევს მექანიკურ ალოდინიას. AITC-ის ბილატერალურმა ინექციამ გამოავლინა ჰიპერალგეზია სიცივეზე (ცივი ფირფიტის ტესტი) და არამტკივნეულ სიცივეზე განრიდება (თერმული უპირატესობის ტესტი). TRPA1 არხის აგონისტებით გამოწვეული აქტივაციის ეფექტები მიუთითებს, რომ TRPA1 მნიშვნელოვან როლს ასრულებს თერმული, მექანიკური და ტკივილის შეგრძნებათა აღმოცენებაში.

ჩვენს მიერ წარმოდგენილი მონაცემები მხარს უჭერენ TRPA1-ის როლს სიცივის გამოვლენაში, რადგან TRPA1 აგონისტმა CA გაზარდა სიცივის მგრძნობელობა ორ ქვევით ტესტში. სრულიად უდავოა, რომ TRPA1 არხი ჩართულია ტკივილის შეგრძნებაში და TRPA1 აგონისტები ამლიერებენ მგრძნობელობას სითბურ ტკივილზე, შესაძლოა TRPV1 არხის არაპირდაპირი მოდულირებით, რომელიც TRPA1-თან ერთად ექსპრესირდება ნოციციკტორებში.

TRPA1, როგორც სენსორული ნეირონების ლიგანდ-დამოკიდებული არხი, თავდაპირველად მოხსენებული იყო, რომ აქტივდება ცივი, 18°C-ზე დაბალი ტემპერატურით, თუმცა ეს მოსაზრება სადავოა. TRPA1 რეცეპტორები პასუხისმგებელი არიან ცენტრალური ტკივილის ჰიპერმგრძნობელობაზე სხვადასხვა

პათოფიზიოლოგიურ პირობებში, როგორცაა ანთებითი და ნეიროპათიური ტკივილი. თუმცა, ჩვენი ქცევითი მონაცემები მხარს უჭერს TRPA1 რეცეპტორების როლს სიცივის გამოვლენაში, რადგან CA-ის ინტრაპლანტარული ინექცია ვირთავებში იწვევს ცივი ზედაპირის თავიდან არიდებას (ტემპერატურის უპირატესობის ტესტი) და მნიშვნელოვნად ამცირებს თათის მოცილების რეფლექსის ლატენტურ პერიოდებს 0°C-ზე და -5°C-ზე (ცივი ფირფიტის ტესტი), რაც მიუთითებს ჰიპერალგეზიაზე სიცივის მიმართ. ცივი ფირფიტის ტესტში, ჩვენ გამოვავლინეთ ცივი ჰიპერალგეზია AITC-ით დამუშავებულ ჯგუფში და არ დაფიქსირდა რაიმე ანტინოციცეპტური ეფექტი. ეს შედეგები შეესაბამება შესაძლებლობას, რომ TRPA1 არხის ანტაგონისტებს შეუძლიათ აწიონ TRPA1 არხების სიცივით გამოწვეული ზღურბლი, რათა გაზარდონ მათი სიცივისადმი მგრძობელობა.

მენტოლის მოქმედებით გამოწვეული TRPM8 არხის აქტივაცია

ექსპერიმენტებით გამოვლინდა, რომ მენტოლის სხვადასხვა კონცენტრაცია იწვევს (40%, 10% და 1%) თათის მოცილების რეფლექსის ფარული პერიოდის სარწმუნო, დოზა-დამოკიდებულ ზრდას. ე.ი. მენტოლს გააჩნია ანტინოციცეპტური ეფექტი. 10%-იანი

მენტოლის ჯგუფის მონაცემები მნიშვნელოვნად არ განსხვავდებოდა 1%-ისგან ($p = 0.07$), ისევე როგორც 0.1% და 0.01% ჯგუფები მნიშვნელოვნად არ განსხვავდება საკონტროლო ხსნარით დამუშავებული ჯგუფებისგან. კონტრალატერალური თათში შეიმჩნევა სარკისებური გამოსახულების აშკარა ეფექტი. მნიშვნელოვანი განსხვავებაა სხვადასხვა კონცენტრაციის საკონტროლო ხსნარით დამუშავებულ ჯგუფებს შორის ($p < 0.01$), 50% ეთანოლმა, როგორც საკონტროლო ხსნარმა, გამოიწვია თერმული რეფლექსის ლატენტური პერიოდის მნიშვნელოვანი შემცირება ($p < 0.01$). ეთანოლის სხვადასხვა კონცენტრაციების ეფექტი კონტრალატერალურ თათში იგივეა. თათის მოცილების მექანიკური ტესტის შემთხვევაში 0.1-10% მენტოლით დამუშავებული ვირთაგვების ინექცირებული უკანა თათის მონაცემები მნიშვნელოვნად არ განსხვავდება საკონტროლო ხსნარით დამუშავებული ჯგუფებისგან. მხოლოდ 40% მენტოლის ჯგუფის მონაცემები მნიშვნელოვნად განსხვავდება დანარჩენი კონცენტრაციის (0.1%, 1%, 10%) ეფექტებისგან ($p < 0.05$), რაც მიუთითებს მაღალი კონცენტრაციის მენტოლის მიერ გამოწვეულ ალოდინიაზე. კონტრა-ლატერალური უკანა თათისთვის, მენტოლის კონცენტრაციის არცერთი ჯგუფის ეფექტი არ განსხვავდება საკონტროლო ხსნარის ჯგუფებისგან. ასევე არ არის მნიშვნელოვანი განსხვავება საკონტროლო ხსნარის

ჯგუფებს შორის, როგორც იპსილატერალური, ისე კონტრალატერალური თათე-ბისტვის.

ტემპერატურული უპირატესობის ტესტით გამოვლინდა მენტოლის მოქმედების ბიფაზური ხასიათი. მენტოლის მაღალი კონცენტრაციამ (10% და 40%) გამოიწვია ვირთაგვების მნიშვნელოვნად ($p < 0.05$) შემცირებული დროის გატარება 30°-ზე, კონტროლთან შედარებით, რაც მიუთითებს სიცივის მიმართ ჰიპომგრძობელობაზე. დაბალ კონცენტრაციებში (0.01-1%) ვირთაგვები მნიშვნელოვნად მეტ დროს ატარებდნენ 30°C ზედაპირზე ($p < 0.05$), რაც მიუთითებს სიცივის მიმართ ჰიპერმგრძობელობაზე.

ცივი ფირფიტის ტესტში მენტოლმა გაზარდა შესაბამისი ტემპერატურის მქონე ზედაპირზე ცხოველის ყოფნის დრო ანუ ცივი ფირფიტის ლატენტური პერიოდი, რაც მიუთითებს მის ანტინოციცეპტურ ეფექტზე.

ამრიგად, მენტოლი დოზა-დამოკიდებულად ზრდის თათის მოცილების რეფლექსის ლატენტობას, ე.ი. გააჩნია ანტინოციცეპტური ეფექტი. ჩვენი მონაცემებით იგი არ უნდა მოქმედებდეს მექანორეცეპტორებზე, თუმცა მაღალ კონცენტრაციაზე (40%) გააჩნია სუსტი ალოდინური ეფექტი, რაც მიუთითებს მცირე ლოკალურ ანესთეზიურ უნარზე. სიცივისადმი განრიდების ტესტმა გამოავლინა მენტოლის ბიფაზური მოქმედება. მაღალ ტემპერატურაზე იგი ამცირებს სიცივეზე

განრიდებას, მაშინ როცა დაბალ სარწმუნოდ ზრდის ამ უკანასკნელ ეფექტს. წარმოდგენილი შედეგები ზოგადად შეესაბამება ნეიროფიზიოლოგიურ და ადამიანის ფსიქო-ფიზიოლოგიურ მონაცემებს და მხარს უჭერს TRPM8 არხის, როგორც ტკივილის მოდულაციის პოტენციურ პერიფერიულ სამიზნეს.

კაპსაიცინის მოქმედებით გამოწვეული TRPV1 არხის აქტივაცია

ჩვენს ექსპერიმენტებში კაპსაიცინის სხვადასხვა კონცენტრაცია (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%) დოზა-დამოკიდებულად ცვლის თათის მოცილების რეფლექსების პასუხებს მტკივნეულ სითბურ და მექანიკურ გაღიზიანებებზე. ტემპერატურული უპირატესობის ტესტით გამოვლინდა ამ ნივთიერების მოქმედების ბიფაზური ხასიათი. კაპსაიცინის 0.1% და 0.2% კონცენტრაციების ხსნარების ინექციის შემთხვევაში, ექსპერიმენტული ჯგუფის ცხოველები უპირატესობას ანიჭებენ თბილ (30°C) ფირფიტაზე ყოფნას, მაშინ როცა 0.3% ხსნარის შემთხვევაში უფრო მეტ დროს ატარებდნენ ცივ ფირფიტაზე (15°C). ეს შედეგები შეესაბამება მდოგვის ზეთის ინექციით მიღებულ მონაცემებს და ადასტურებს TRP არხებზე შესაბამისი აგონისტების მოქმედების დოზა და ტემპერატურა დამოკიდებულ მოქმედებას.

ამრიგად, ჩვენი კვლევებით დასტურდება რომ TRPV1 არხი, როგორც სითბოს სენსორი, რეაგირებს მის აგონისტ კაპსაიცინზე, რაც იწვევს გაცხელების შეგრძნებას და შესაბამისად ამცირებს ზღურბლს მაღალი ტემპერატურის მიმართ. ჩვენი კვლევის შედეგები ასევე მიუთითებს, რომ თერმოსენსიტიურ იონურ არხებს შეუძლიათ გარემოში ტემპერატურული ცვლილებების დიაპაზონის დაფიქსირება და ნერვულ სიგნალებად გარდაქმნა. ჩვენ განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს TRP არხის აგონისტების შესაძლებლობა განახორციელონ ტემპერატურული მგრძობელობის მოდულირება, რაც მნიშვნელოვანია ტკივილის შეგრძნების ფორმირებისთვის. TRPV1, როგორც სითბური გამღიზიანებლის სენსორი, აქტივდება შესაბამისი აგონისტით –კაპსაიცინით, რომელიც იწვევს სითბოს შეგრძნებას. TRPV1 წარმოადგენს რა თერმომგრძობიარე არხს, ამავე დროს კაპსაიცინის მიმართ ავლენს გააქტივების დაბალ ზღურბლს.

როგორც ავლნიშნეთ, მიუხედავად იმისა, რომ TRPA1 არხი არის დაბალი ტემპერატურის სენსორი, შესაბამისი აგონისტებით (მაგ., AITC, CA და სხვ.) მოქმედებისას აღმოცენდება ტკივილის შეგრძნება, ვიდრე სიცივის. TRPA1 არხის როლი ცივი სტიმულების მიმღებლობაში და ცივით განპირობებული ტკივილის ფორმირებაში ურთიერთსაწინააღმდეგოა. ჩვენი ბოლო მონაცემები ადასტურებს TRPA1-ის როლს სიცივის გამოვლენაში,

TRPA1 აგონისტმა CA გააძლიერა სიცივის მიმართ მგრძობელობა ორივე ქცევითი ტესტში. TRPA1 უდავოდ მონაწილეობს ტკივილის შეგრძნების ფორმირებაში, რადგან მისი აგონისტები იწვევენ სითბურ ტკივილს. ეს ფაქტი შეიძლება განპირობებული იყოს TRPV1 არხის მამოძღვრებელი გავლენით TRPA1-ზე, რადგან ისინი ერთად ექსპრესირდებიან პერიფერიულ ნოციცეპტორებში.

TRP არხების ანტაგონისტების ეფექტების შესწავლა

ჩვენი კვლევები აჩვენებს, რომ TRPV1 არხის ანტაგონისტის (AMG-517) წინასწარი ინექცია იწვევს ტკივილის თავდაცვითი რეფლექსური რეაქციების მნიშვნელოვან შემცირებას. ასევე TRPA1 არხის ანტაგონისტის (HC-030031) წინასწარი შეყვანა განაპირობებს დარიჩინის ალდეჰიდისა და ალილ იზოთიოციანიტის შედეგად გამოწვეული თერმული ჰიპერალგეზიისა და მექანიკური ალოდინიის სარწმუნო შემცირებას. ამით ჩვენ ვაჩვენებთ, რომ ორგანიზმისთვის დამაზიანებელი მტკივნეული სტიმულებით გამოწვეული თერმული ჰიპერალგეზია და მექანიკური ალოდინია განპირობებულია TRPV1 და TRPA1 კათიონური არხების გააქტივებით.

არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო პრეპარატების გავლენა TRP არხების შესაბამისი აგონისტების მოქმედებით გამოწვეულ აქტივაციაზე ექსპერიმენტების ამ სერიაში შეისწავლებოდა ვირთაგვებში TRP არხების არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო პრეპარატებით (NSAIDs) შესაძლო რეგულაციის საკითხები. კერძოდ, შევისწავლეთ ფართოდ გამოყენებული NSAIDs -ის (დიკლოფენაკი, კეტოროლაკი და ქსეფოკამი) გავლენა TRPA1 და TRPV1 არხების გააქტივებით განპირობებულ თერ-მულ და მექანიკურ ჰიპერალგეზიაზე.

ვირთაგვებზე ჩატარებული ქცევითი ტესტებით ჩვენ ვაჩვენეთ, რომ ფართოდ გამოყენებული NSAIDs პრეინიექცია ახდენს შესაბამისი აგონისტებით გააქტივებული TRPA1 და TRPV1 არხების ინაქტივაციას. აღნიშნული გულისხმობს იმას, რომ არხების მგრძობელობა შესაბამისი აგონისტების მიმართ (დარიჩინის ალდეჰიდი, მდოგვის ზეთი, კაპსაიცინი) დაქვეითებულია ორივე ქცევით ტესტში. ბაზისურ მაჩვენებელამდე ჰიპერალგეზია აღდგება დაახლოებით 40 წუთში. კერძოდ, კეტოროლაკის, დიკლოფენაკისა და ქსეფოკამის წინასწარი შეყვანა იწვევს ძლიერ ანტიინციცეპტურ ეფექტს.

ასევე შევისწავლეთ NSAIDs-ის პოსტ-მიკროინექციის ეფექტები, კაპსაიცინის, დარიჩინის ალდეჰიდისა ან ფიზიოლოგიური ხსნარის შეყვანაზე. ამ ნივთიერებების

ინექციიდან ოცი წუთის შემდგომ შეგვყავს NSAIDs და ვახდენთ მონაცემების აღრიცხვას ქცევით ტესტებით NSAIDs-ების შეყვანიდან 5, 15, 30, 45, 60 და 120 წუთებზე. კვლევის შედეგად აღმოჩნდა, რომ NSAIDs-ს პოსტინექცია გარდამავალ რეცეპტორულ პოტენციალთა არხების (TRPA1, TRPV1) აგონისტებით გამოწვეულ ტკივილს ნაკლებად ასუსტებენ ორივე ქცევით ტესტში.

ამრიგად, ჩვენს მიერ წარმოდგენილი წინამდებარე და ლიტერატურის მონაცემები ადასტურებს ახალ მექანიზმს, რომელიც მოიცავს არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო პრეპარატების ტკივილგამაყუჩებელ ეფექტებს TRPA1 არხზე მოქმედებით. ეს უკანასკნელი მექანიზმი მიიღწევა CA ან AITC-ით TRPA1 გააქტიურების შემდეგ, TRPA1 არხის დესენსიტიზაციის/ინაქტივაციის გზით ან პროსტაგლანდინების შემცირების გზით და შეიძლება გამოყენებულ იქნას თერაპიული თვალსაზრისით ტკივილის სამკურნალოდ.

ზოგადი დასკვნის სახით შეიძლება თქვას, რომ *Trp* გენის სუპეროჯახის აღმოჩენამ, თითქმის ოცდახუთი წლის წინ, დასაბამი მისცა ამ გენების მიერ TRP კათიონური არხების კოდირებისა და მრავალფეროვანი ფუნქციების შესწავლას; რეცეპტორული და სხვა ტიპის უჯრედების ფიზიოლოგიური და პათოფიზიოლოგიური ფუნდამენტური მექანიზმების

გაგებას, რაც ამ დრომდე შეუძლებელი იყო. TRP არხები წარმოადგენენ ერთ-ერთ ყველაზე სწრაფად მზარდ საკვლევ თემას იონურ არხებთან დაკავშირებით ტრანსლაციურ მედიცინის საკითხების ჩათვლით.

დასკვნები

1. გარდამავალ რეცეპტორულ პოტენციალთა არხები (TRPA1, TRPM8, TRPV1) ჩართულია თერ-მული, მექანიკური და ტკივილის შეგრძნების აღმოცენებაში, ვინაიდან ისინი ავლენენ მგრძნობელობას, როგორც მაღალი ან დაბალი ტემპერა-ტურის, ასევე რიგი ქიმიური ლიგანდების მიმართ. სახელდობრ, TRPA1 არხი ავლენს მგრძნობელობას დარიჩინის ალდეჰიდისა და მდოგვის ზეთის ძირითადი კომპონენტის (ალილ იზოთიოციანიტი) მიმართ; TRPM8 არხის აქტივდება მენტოლითა და დაბალი ტემპერატურით; TRPV1 არხი კი აქტივდება კაპსაიცინითა და მაღალი ტემპერატურით.

2. TRPV1 არხის ანტაგონისტი AMG-517 და TRPA1 არხის ანტაგონისტი HC-030031 ასუსტებენ მათი აგონისტებით, შესაბამისად CAPS (TRPV1) და AITC და CA (TRPA1), გამოწვეულ თერმულ ჰიპერალგეზიას და მექანიკურ ალოდინიას. ეს შედეგები უახლოეს პერსპექტივაში შეიძლება საფუძვლად დაედოს სრულიად ახალი ტიპის ანალგეტიკების სინთეზს, რომლებიც მიმართული იქნება უშუალოდ TRP არხების

ბლოკირებაზე, რათა მინიმუმამდე შემცირ-დეს ტრადიციული ანალგეტიკებისათვის დამახასია-თებელი არასასურველი გვერდითი მოვლენები.

3. არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო პრეპარატების წინასწარი შეყვანა იწვევს აღნიშნული არხების შესაბამისი აგონისტებით გააქტივების შესუსტებას. ამ ეფექტს უნდა განაპირობებდეს NSAIDs მეშვეობით ამ არხების ინაქტივაცია ან დესენსი-ტიზაცია. ამით კლინიკურად კარგად ცნობილ NSAIDs მოქმედების ეფექტებს დაემატა TRP არხების რეგულაციის ფუნქცია.

4. TRP იონური არხების შესწავლის შედეგად მიღებული მონაცემები გვიჩვენებს, რომ ეს არხები წარმოადგენენ ახალი თაობის ტკივილგამაყუჩებელი წამლების საიმედო სამიზნეს და შესაბამისად ტკივილის მართვის პერსპექტიულ საშუალებას, როგორც პერიფერიაზე, ისე შესაძლოა ცენტრალური ნერვული სისტემის დონეზე.

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University



Abstract

**The role of transient receptor potential channels in
pain modulation**

Ivliane Nozadze

Faculty of Medicine

Doctoral Program "Clinical and Translational Medicine"

Tbilisi

2022

The dissertation was performed in the laboratory of pain and analgesia of Ivane Beritashvili Experimental Biomedicine Center.

Scientific supervisors:

Merab Tsagareli – Doctor of Biological Sciences

Tamar Kezeli – Doctor of Medicine

Short Description of the Work

Topicality of Research

Pain is a serious health problem that affects a person's quality of life. It accompanies many acute or chronic diseases. Pain in animals and the human body is caused by various irritating factors. Like other sensory sensations, pain sensations are perceived by specialized receptors, nociceptors that recognize, convert, and transmit signals to the central nervous system. Thus, pain mobilizes various functional systems to avoid exposure to harmful irritants.

The identification of the transient receptor potential (TRP) channel as a receptor has ushered in a new era in elucidating the molecular mechanism of pain sensation.

TRP channels are actively studied and considered as targets of medicinal products. They are a very large family of TRP protein channels in temperature and pain receptors. Most recently, these studies were crowned with the 2021 Nobel Prize in Physiology for American scientist David Julius for studying channels sensitive to temperature and pain.

Increasing genetic studies in animals and humans have shown that the physiological role of TRP channels extends far beyond the nervous system; Moreover, an increasing number of studies indicate the involvement of TRP channels

in various pathological processes related to the skin, bladder, kidneys, respiratory and digestive systems.

Transient receptor potential channels are a broad group of conduction channels for cations (mainly calcium and sodium) that perform a cardinal signaling function in the sense organs and thus significantly influence animal behavior. These channels are activated through a variety of mechanisms and participate in virtually every sensory system, such as sight, hearing, taste, smell, as well as somatosensory sensations (touch, pain, itching, temperature). Consequently, these channels have a strong influence on animal behavior.

Although the physiological functions of TRP channels have not yet been fully studied, the wide representation of these channels in living organisms indicates their important biological role. For example, TRP channels are involved in the transmission of sensory signals, they also respond by activation to temperature, pain (nociceptive), mechanical stimuli and chemicals (pheromones, odorants) and more. TRPA1, TRPV1 and TRPM8 are highly sensitive to different temperatures, which is why they are called thermo-TRP channels.

It is also interesting to note that TRP channels simultaneously exhibit sensitivity to chemicals that induce pain and pain-like sensations. Such substances are cinnamon

aldehyde, menthol, ginger oil (ginger), mustard oil, camphor, clove oil, capsaicin and others. Some TRP channels are activated in vitro by activating other receptors that are activated during inflammation and cause pain. In addition, these channels are involved in the development of a number of inherited and acquired diseases.

The development of specific and selective analgesics and their introduction into medical practice requires the deepening of theoretical knowledge about the neurophysiological, neurochemical and pathophysiological mechanisms of pain. In this regard, the study of thermo-TRP channels is highly relevant and important. Based on the results of the present study, we believe that specific and selective inhibition of TRP channel activity will be used to relieve pain.

Research goals and objectives

The TRP channel, which is sensitive to at least six temperatures, is expressed in sensory neurons, and most of them are also receptors for sensory-active substances such as cinnamon aldehyde, menthol, mustard oil, capsaicin, and other chemical irritants. These channels are the major molecules in nociception. Thermal TRP channels detect temperature as well as chemical and mechanical pain.

The main aim of the presented paper was to determine the role of thermo-TRP channels in pain modulation. In particular, behavioral study of the effects of thermo-TRP channel agonists and antagonists in rats and transient receptor potential ion channels (TRPs) with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs).

The following tasks have been identified for the purpose of the research:

1. Study of thermal and mechanical pain phenomena by the action of cinnamon aldehyde and mustard oil on the TRPA1 channel, the action of capsaicin on the TRPV1 channel and the action of menthol on the TRPM8 channel in the development of thermal and mechanical pain in rats.

2. Study of the effects of the TRPA1 channel antagonist HC-030031 on whether this antagonist will cause dose-dependent blockade of the TRPA1 channel during thermal and mechanical pain.

3. Study of dose-dependent blocking action of TRPV1 channel antagonist AMG-517 during thermal and mechanical pain.

4. Investigation of the effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (ketorolac, diclofenac and xefocam) on the activation of the TRPA1 channel induced

by cinnamon aldehyde and mustard oil during heat and mechanical pain.

5. To determine the effect of NSAIDs on capsaicin-induced TRPV1 channel activation during heat and mechanical pain.

Theoretical and practical significance of the research:

The paper comprehensively investigates the effects of TRP channel agonists, cinnamon aldehyde and mustard oil (for TRPA1 channel), the effects of menthol (TRPM8 channel) and also the action of capsaicin (capsaicin A1) on capillaries on painful reflexes induced by thermal and mechanical stimulation in rats. The study found that subcutaneous injections of thermo-TRP channel agonists resulted in a significant reduction in the latent period of the thermal reflex of the paw removal and the threshold of mechanical pacing of the paw compared to the control or contralateral paw, i.e. the development of hyperalgesia and allodynia. In addition, reliable blockade of said hyperalgesia and allodynia induced by pre-intraplanted injection of TRPA1 and TRPV1 channel antagonists, respectively, HC-030031 and AMG-517, is shown.

The results of the dissertation provide new information about the fundamental neural mechanisms underlying pain as well as irritation caused by thermal and chemical stimuli. The results obtained will also provide new information on

the nature and site of interaction of effects due to thermal and chemical stimuli (peripheral vs central sensitization) and the effects of NSAIDs on them.

The presented data demonstrate a new mechanism linking the anti-inflammatory and analgesic effects of NSAIDs. This mechanism may directly inactivate or desensitize the TRPA1 and TRPV1 channels. We suggest that clinically well-known NSAIDs have been added to their function as both TRPA1 and TRPV1 channel regulators. Study of the action of NSAIDs on TRPA1 and other thermosensitive TRP channels sheds a whole new light on the study of the regulation and modulation of pain mechanisms. Such data will help to understand the mechanisms of pain in order to find new therapies for more adequate treatment of pain, which is of great social importance for our society along with medicine.

The scientific novelty

A wide range of TRPA1, TRPV1 and TRPM8 channel agonists and antagonists were first tested to investigate the phenomena of thermal and mechanical pain. In subsequent series of experiments, we first studied the effects of pre- and post-injection effects of NSAIDs (ketorolac, xefocam, and diclofenac) in rats on the reflex in response to thermal and mechanical painful stimuli in response to TRPA1 and

TRPV1 channel agonists. It was found that only pre-administration of NSAIDs (and not post-injections) attenuated activation of the above channels by appropriate agonists according to behavioral tests. Specific and selective inhibition of TRP channel activity will be used to relieve pain, which will make a significant contribution to the development of a new class of analgesics.

Summary of the dissertation:

The dissertation includes a review of the existing literature on the research problem, a description of the methods used in the experiments, the results obtained, their discussion, and the conclusions that were made possible by the research conducted.

The full volume of the dissertation is 97 pages and includes 38 pictures, 4 tables and a list of cited literature.

Approval of the paper

The main results of the paper were reported at various international scientific forums and two research projects under the curriculum.

Participation in scientific forums:

1. Tsgareli M.G. and **Nozadze I.** NSAIDs attenuate TRP channels activated by their agonists. International conference "Translational and Clinical Medicine", 5-7 May, 2022, Tbilisi. <https://tcm-conference.tsu.ge/>

2. Tsagareli M.G., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Iodi Carstens M., Tsiklauri N., Gurtskaia G., Carstens E. TRPA1 channel is involved in non-histaminergic itch-related thermal and mechanical hyperalgesia. *Prog. & Abstr. 10th World Congress on Itch*. November 17-19, 2019, Sydney, Australia. PP11, p. 47.

3. Tsagareli M., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E. NSAIDs attenuate nociceptive hyperalgesia evoked by TRP channels activation through their agonists. *Abstr. Int. Multidiscip. Conf. "BIOMED-2019*, May 18-19, 2019, Tsikhisdziri, Georgia, pp. 15-16.

4. Tsagareli M.G. **Nozadze I.**, Gurtskaia G., Tsiklauri N., Abzianidze E. TRP channels in pain and itch sensation. *Abstr. 2nd Int. Conf. Human Genome & Health: Transl. Med. in the Era of Omics*. May 11-12, 2019. Tbilisi, Georgia, p. 17.

5. Tsagareli M., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E. NSAIDs attenuate TRPA1 and TRPV1 channels activated by their agonists. Program#/Poster# 219.12/X11. *Neuroscience Meeting Planner*. November 11-15, 2017, Washington, DC: Society for Neuroscience, 2017. Online.

6. Tsagareli M.G., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G. TRPA1 channel deactivation by NSAIDs: A behavioral

study. *Abstr. 14th World Congress on Pain*, 2014, Buenos Aires, Argentina, PT 136.

7. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E., Tsagareli M.G. Behavioral study of the effects of thermosensitive TRP channel agonists on temperature and pain sensations. *Proc. 3rd National Congress Beritashvili Physiological Society of Georgia*. Tbilisi, 26-28 September, 2013, p. 209.

List of papers published on the topic of the dissertation

1. **Nozadze I.**, Gurtskaia G., Tsagareli M.G. TRPV1 and TRPA1 channels are involved in pain sensations. *Bulletin Georgian National Acad. Sci.*, 2021, vol. 15, no. 4, pp. 131-139 124 (ISSN: 0321-1665)

2. Tsagareli M.G., **Nozadze I.** An overview on transient receptor potential channels superfamily. *Behavioral Pharmacology*, 2020, vol 31, no 5, pp. 413–434 (doi: 10.1097/FBP.0000000000000524) Impact Factor: 2.293 (2020)

3. **Nozadze I.**, Tsagareli M.G. TRP channels in physiological nociception and pain. In: *Modern Advances in Pharmaceutical Research*. P.K. Sharma (ed). London: Book Publisher Intern., 2020, vol. 3, chapter 1, pp. 10-37 (doi: 10.9734/bpi/mapr/v3)

4. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. Agonist-evoked hyperalgesia and allodynia: The role of transient receptor potential channels in pain and itch. In: *Hyperalgesia and Allodynia: A Closer Look. Symptoms, Mechanisms and Treatment*. M.G. Tsagareli (ed.). New York: NOVA Medicine & Health, 2019, chapter 7, pp. 151-174 (ISBN: 978-1-53614-536-6)

5. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. NSAIDs attenuate agonist-evoked activation of the TRPA1 channel: Behavioral evidence. In: *Systemic, Cellular and Molecular Mechanisms of Physiological Functions and Their Disorders*. Proc. Beritashvili Exp. BMC. New York: NOVA Biomedical, 2018, chapter 23, pp. 256-270 (ISBN: 978-1-53614-395-9)

6. Tsagareli M., **Nozadze I.**, Gurtskaia G., Tsiklauri N., Abzianidze E. The transient receptor potential channels' agonist-evoked hyperalgesia and allodynia in pain and itch. *Proc. Georgian National. Acad. Sci., Biomed. Series*, 2018, vol. 44, nos. 3-4, pp. 291-305 (ISSN: 0321-1665)

7. Tsagareli M.G., **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs attenuate agonist-evoked activation of transient receptor potential channels. *Biomed & Pharmacother*, 2018, vol. 97, pp. 745-751 (doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.131) Impact Factor: 6.5291 (2022)

8. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E., Tsagareli M.G. Role of transient receptor potential channels in itch and pain sensations. *Bulletin Georgian National Acad. Sci.*, 2018, New Series, vol. 12, no.1, pp. 118-124 (ISSN: 0321-1665)

9. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. NSAIDs attenuate hyperalgesia induced by TRP channel activation. *Data Brief*, 2016, vol. 6, pp. 668-673 (doi: 10.1016/j.dib.2015.12.055) Impact Factor: 1.133 (2022)

10. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. Role of thermo TRPA1 and TRPV1 channels in heat, cold and mechanical nociception of rats. *Behavioral Pharmacology*, 2016, vol. 27, no. 1, pp. 29-36 (doi: 10.1097/FBP. 000000000000176) Impact Factor: 2.293 (2020)

11. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Abzianidze E., Tsagareli M.G. TRP channel in thermal pain sensation. In: Systemic, Cellular and Molecular Mechanisms of Physiological Functions and Their Disorders. *Proc. Beritashvili Exp. BMC*. New York: Nova Biomedical, 2016, chapter 22, pp. 271-287 (ISBN:978-1-63484-988-3)

12. **Nozadze I.**, Tsiklauri N., Gurtskaia G., Tsagareli M.G. Behavioral study of TRPA1 and TRPV1 channels relationship in Rats. *Bulletin Georgian National Acad. Sci.*, 2014, New Series, vol. 8, no. 1, pp 122-127 (ISSN: 0321-1447)

13. Tsagareli M.G., **Nozadze I.R.**, Gurtskaia G.P., Carstens M. I., Tsiklauri N.J., Carstens E.E. Behavioral and electrophysiological study of thermal and mechanical pain modulation by TRP channel agonists. *Нейрофизиология/Neurophysiology* (Kiev), 2013, vol. 45, no. 4, pp. 369-378; Republished in: *Neurophysiology* (Springer), 2013, 45(4): 329-339 (ISSN: 0028-2561) Impact Factor: 0.587 (2020)

Experimental methods

Animals

Experiments were performed on white rats, weighing 200-250 g. Their reproduction was produced by Iv. In the vivarium of Beritashvili Biomedicine Center. The animals were in standard conditions ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% humidity, light - from 6:00 am to 8:00 pm), fed standard food, free water intake. The requirements of the International Organization for the Study of Pain (IASP) were fully taken into account when conducting animal experiments (Zimmermann, 1983).

The experiments were conducted in several stages:

The first stage – testing the control group.

The second stage – testing of agonists of TRPM8, TRPV1 and TRPA1 channels.

The third stage is to study the effects of TRPV1 and TRPA1 channel antagonists.

Stage 4 – Effect of pre- and post-injection NSAIDs on activation induced by the corresponding agonists of the TRPA1 and TRPV1 channels. There were six rats in each experimental and control group.

Chemicals

Injection of Chemicals: All Chemicals (Mustard Oil, Cinnamon Aldehyde, Capsaicin, Menthol, TRPA1 Channel Antagonist - HC-030031, TRPV1 Channel Antagonist AMG-517 and NSAID (Diclofenac, Ketofenac) Louis, MO, USA) Different doses of these substances were injected into the back of the rats with a needle connected to a Hamilton cannula (PE50) with a needle. 5-10 minutes before insertion of TRP channel agonists.

Behavioral testing

We used the Thermal paw withdrawal test (Hargreaves) test, Mechanical paw withdrawal threshold test (VonFrey) test and Thermal preference test to perform the set tasks.

Data analysis

Thermal and mechanical removal reactions of the toe were statistically calculated by repeated variance analysis.

Data reconciliation was performed between control and test groups by t-Tukey-Kramer test. The obtained data express the mean \pm mean square deviation. Statistical reliability was determined for $P < 0.05$ cases. We used the computer statistics package Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc., USA).

Results

TRPA1 channel activation study

Unilateral injection of cinnamon aldehyde (CA) (5%, 10% and 20%) into the hind paw causes a reliable, dose-dependent reduction of the latent period of the ipsilateral paw removal reflex to heat (hot) pain stimuli as well as hyperalgesia. The threshold for mechanical irritation, i.e., causes mechanical allodynia. In addition, bilateral injection of CA has shown hyperalgesia on cold (cold plate test) and aberration on painless cold (thermal advantage test).

Unilateral subcutaneous injection of the allyl isothiocyanate (AITC) (5%, 10%, and 15%) of the main component of the mustard oil causes a reliable, dose-dependent reduction of the latent period of the ipsilateral toe removal thermal reflex. Reduces the threshold of mechanical irritation of the toe, i.e. causes mechanical allotment. Bilateral injection of AITC has shown hyperalgesia on cold (cold plate test) and aberration on painless cold (thermal

advantage test) with significant effects on TRPA1. In the onset of thermal, mechanical, and pain sensations.

The data presented by us support the role of TRPA1 in detecting cold because the TRPA1 agonist CA increased cold sensitivity in a two-behavior test. It is completely indisputable that the TRPA1 channel is involved in pain sensation and TRPA1 agonists enhance sensitivity to heat pain, possibly by indirect modulation of the TRPV1 channel, which is expressed with TRPA1 in nociceptors.

TRPA1, as a ligand-dependent channel of sensory neurons, was initially reported to be activated at cold, temperatures below 18°C, although this view is controversial. TRPA1 receptors are responsible for central pain hypersensitivity to various pathophysiological conditions such as inflammatory and neuropathic pain. However, our behavioral data support the role of TRPA1 receptors in the detection of colds, as intra-implant injection of CA in rats avoids the cold surface (temperature advantage test) and significantly reduces the latent reflex reflection periods at 0°C and 0°C. (Cold plate test), indicating hyperalgesia with respect to cold. In the cold plate test, we detected cold hyperalgesia in the AITC-treated group and no antinociceptive effect was observed. These results are consistent with the possibility that TRPA1 channel

antagonists may raise the cold-induced threshold of TRPA1 channels to increase their sensitivity to cold.

Activation of the TRPM8 channel induced by the action of menthol

Experiments have shown that different concentrations of menthol cause (40%, 10% and 1%) a reliable, dose-dependent increase in the latent period of the toe removal reflex. Ie Menthol has an antinociceptive effect. The 10% menthol group data did not differ significantly from the 1% ($p = 0.07$), just as the 0.1% and 0.01% groups did not differ significantly from the control solution-treated groups. An obvious effect of mirror image is observed in the contralateral toe. There was a significant difference between the groups treated with the control solution of different concentrations ($p < 0.01$), 50% ethanol as the control solution resulted in a significant reduction in the latency period of the thermal reflex ($p < 0.01$). The effect of different concentrations of ethanol on the contralateral thorax is the same. In the case of mechanical paw removal test, the injected hind paw data of mice treated with 0.1-10% menthol did not differ significantly from the groups treated with the control solution. Only 40% of the menthol group data differed significantly from the effects of the rest of the concentration (0.1%, 1%, 10%) ($p < 0.05$), indicating an

allodynia induced by high concentrations of menthol. For the contralateral posterior toe, the effect of none of the menthol concentration groups is different from that of the control solution groups. There is also no significant difference between the control solution groups for both ipsilateral and contralateral toes.

The temperature advantage test revealed the biphasic nature of the menthol action. High concentrations of menthol (10% and 40%) caused the rats to spend significantly ($p < 0.05$) less time at 30 ° compared to controls, indicating hypersensitivity to cold. At low concentrations (0.01-1%) rats spent significantly more time at 30 ° C ($p < 0.05$), indicating hypersensitivity to cold.

In the cold plate test, menthol increased the animal's time on the surface at the appropriate temperature, or the latent period of the cold plate, indicating its antinociceptive effect.

Thus, menthol dose-dependently increases the latency of the toe removal reflex, i.e. has an antinociceptive effect. According to our data, it should not act on mechanoreceptors, although at high concentrations (40%) it has a weak allodynamic effect, indicating a small local anesthetic ability. The cold deflection test revealed the biphasic action of menthol. At high temperatures it reduces the deflection to cold, while at low temperatures it reliably increases the latter effect. The presented results are generally consistent

with neurophysiological and human psycho-physiological data and support the TRPM8 channel as a potential peripheral target for pain modulation.

Capsaicin-induced activation of the TRPV1 channel

In our experiments, different concentrations of capsaicin (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%) dose-dependently alter the responses of the toe removal reflexes to painful thermal and mechanical irritations. The temperature advantage test revealed the biphasic nature of the action of this substance. In the case of injection of 0.1% and 0.2% concentrations of capsaicin solution, the animals in the experimental group preferred to be on a warm (300C) plate, whereas in the case of 0.3% solution they spent more time on the cold plate (150C). These results are consistent with data obtained from mustard oil injection and confirm the dose- and temperature-dependent action of the corresponding agonists on TRP channels.

Thus, our studies confirm that the TRPV1 channel, as a heat sensor, responds to its agonist capsaicin, causing a sensation of heating and consequently lowering the threshold for high temperatures. The results of our study also indicate that thermosensitive ion channels can detect the range of temperature changes in the environment and convert them into neural signals. We are particularly

interested in the ability of TRP channel agonists to modulate temperature sensitivity, which is important for the formation of pain sensations. TRPV1, as a sensor of heat stimulation, is activated by the corresponding agonist - capsaicin, which causes a sensation of heat. TRPV1 is a thermosensitive channel and at the same time shows a low activation threshold for capsaicin.

As mentioned above, although the TRPA1 channel is a low temperature sensor, there is more pain than cold when acting with appropriate agonists (e.g., AITC, CA, etc.). The role of the TRPA1 channel in the reception of cold stimuli and in the formation of cold-induced pain is contradictory. Our recent data confirm the role of TRPA1 in the detection of cold, the TRPA1 agonist CA enhanced cold sensitivity in both behavioral tests. TRPA1 is undoubtedly involved in the formation of pain sensation as its agonists cause heat pain. This fact may be due to the modulatory effect of the TRPV1 channel on TRPA1 as they are expressed together in peripheral nociceptors.

Study of the effects of TRP channel antagonists

Our studies show that pre-injection of the TRPV1 channel antagonist (AMG-517) results in a significant reduction in pain defense reflex reactions. Also pre-administration of the TRPA1 channel antagonist (HC-

030031) results in a reliable reduction of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia caused by cinnamon aldehyde and allyl isothiocyanite. Thus we have shown that thermal hyperalgesia and mechanical allodynia caused by painful stimuli damaging the body are due to the activation of the TRPV1 and TRPA1 cation channels.

The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on activation induced by the action of appropriate agonists on TRP channels

This series of experiments will explore the possible regulation of TRP channels in non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in rats. In particular, we investigated the effect of widely used NSAIDs (diclofenac, ketorolac, and xefocam) on thermal and mechanical hyperalgesia induced by activation of the TRPA1 and TRPV1 channels.

Behavioral tests in rats have shown that pre-injection of widely used NSAIDs inactivates the TRPA1 and TRPV1 channels activated by the corresponding agonists. This implies that the sensitivity of the channels to the corresponding agonists (cinnamon aldehyde, mustard oil, capsaicin) is impaired in both behavioral tests. Hyperalgesia returns to baseline in about 40 minutes. In particular, pre-

administration of ketorolac, diclofenac, and xefocam has potent antinociceptive effects.

We also studied the post-microinjection effects of NSAIDs on the administration of capsaicin, cinnamom aldehyde, or saline. Twenty minutes after injection of these substances, we inject NSAIDs and record the data by behavioral tests at 5, 15, 30, 45, 60, and 120 minutes after NSAID administration. The study found that post-injection NSAIDs significantly reduced pain induced by agonists of transient receptor potential channels (TRPA1, TRPV1) in both behavioral tests.

Thus, the present and literature data presented by us confirm a new mechanism involving the analgesic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs acting on the TRPA1 channel. The latter mechanism is achieved after activation of TRPA1 by CA or AITC, by desensitization / inactivation of the TRPA1 channel, or by reduction of prostaglandins, and can be used therapeutically to treat pain.

As a general conclusion, the discovery of the superfamily of the Trp gene, almost twenty-five years ago, gave rise to the study of the coding of TRP cation channels and a variety of functions by these genes; Understanding the fundamental physiological and pathophysiological mechanisms of receptors and other cell types that was previously impossible. TRP channels are one of the fastest growing

research topics on ion channels including translational medicine issues.

Conclusions

1. Transient receptor potential channels (TRPA1, TRPM8, TRPV1) are involved in the onset of thermal, mechanical, and pain sensations, as they are sensitive to both high and low temperatures as well as a number of chemical ligands. Namely, the TRPA1 channel reveals sensitivity to the main component of cinnamon aldehyde and mustard oil (allyl isothiocyanate); The TRPM8 channel is activated by menthol and low temperature; The TRPV1 channel is activated by capsaicin and high temperature.

2. The TRPV1 channel antagonist AMG-517 and the TRPA1 channel antagonist HC-030031 are attenuated by their agonists CAPS (TRPV1) and AITC and CA (TRPA1), respectively, induced by thermal hyperalgesia and mechanical allodynia. These results may in the near future form the basis for the synthesis of completely new types of analgesics aimed directly at blocking TRP channels in order to minimize the adverse side effects of traditional analgesics.

3. Pre-administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs leads to attenuation of activation of these channels by appropriate agonists. This effect should be induced by

inactivation or desensitization of these channels through NSAIDs. This added to the effects of clinically well-known NSAIDs on the function of regulating TRP channels.

4. The data obtained from the study of TRP ion channels show that these channels are a reliable target for a new generation of analgesics and therefore a promising means of pain management, both at the periphery and possibly at the level of the central nervous system.