

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE



***STUDII FARMACOLOGICE PRIVIND
DESCOPERIREA DE NOI ANTAGONIȘTI TRPV1
CU POSIBILĂ UTILIZARE ÎN TERAPIA DURERII
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. NEGREȘ SIMONA

Student-doctorand:

CORINA ANDREI

2023

Cuprinsul tezei de doctorat

Introducere	9
I. Partea generală	12
1. Durerea cronică.....	12
1.1. Introducere	12
1.2. Opțiuni de tratament în durerea cronică	13
1.3. Mecanismele biologice ale durerii	18
2. Receptorul TRPV1	21
2.1. Generalități.....	21
2.2. Caracteristici structurale ale canalului TRPV1	22
2.3. Agoniștii endogeni ai receptorului TRPV1	23
2.4. Agoniștii naturali și sintetici ai receptorului TRPV1.....	25
2.4.1. Studii preclinice	29
2.4.2. Studii clinice	29
2.5. Antagoniștii naturali și sintetici ai receptorului TRPV1	30
2.5.1. Studii preclinice	32
2.5.2. Studii clinice	34
II. Contribuții personale	37
3. Ipoteza de lucru și obiective generale.....	37
4. Studii <i>in silico</i> de <i>drug repurposing</i> pentru identificarea unor noi potențiali modulatori TRPV1	39
4.1. Introducere	39
4.2. Materiale și metode.....	40
4.2.1. Prelucrarea seturilor de date.....	40
4.2.2. Modele bazate pe liganzi	42
4.2.2.1. Scoruri de activitate	42
4.2.2.2. Model de clasificare binară.....	43
4.2.3. Metode bazate pe structură	43
4.2.4. Model integrat de <i>drug repurposing</i>	44
4.2.5. Analiză statistică, învățare automată și măsurători de performanță	45
4.3. Rezultate	45
4.3.1. Pregătirea setului de date	45
4.3.2. Scoruri de activitate	46
4.3.3. Clasificarea binară	49

4.3.4. Studii de docking molecular	51
4.3.5. Model predictiv integrat bazat pe rețele neuronale.....	53
4.3.6. Predicția potențialilor modulatori TRPV1 prin <i>drug repurposing</i>	54
4.4. Discuții.....	62
4.5. Concluzii	66
5. Validarea unui model animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel și evaluarea efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului în acest model.....	68
5.1. Validarea unui model animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel.....	68
5.1.1. Introducere	68
5.1.2. Materiale și metode.....	69
5.1.2.1. Animale de experiență și tratamente.....	69
5.1.2.2. Teste pentru evaluarea nocicepției viscerale	70
5.1.2.2.1. Scala durerii abdominale	71
5.1.2.2.2. Hipersensibilitatea tactilă.....	71
5.1.2.2.3. Hipersensibilitatea termică.....	72
5.1.2.3. Analiza statistică	72
5.1.3. Rezultate	73
5.1.3.1. Scala durerii abdominale	73
5.1.3.2. Hipersensibilitatea tactilă.....	75
5.1.3.3. Hipersensibilitatea termică	76
5.1.4. Discuții.....	77
5.1.5. Concluzii	80
5.2. Evaluarea efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului în modelul animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel	81
5.2.1. Introducere	81
5.2.2. Materiale și metode.....	81
5.2.2.1. Animale de experiență și tratamente.....	81
5.2.2.2. Evaluarea nocicepției viscerale – Scala durerii abdominale.....	82
5.2.3. Rezultate	82
5.2.4. Discuții.....	83
5.2.5. Concluzii	84
6. Evaluarea efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra durerii, inflamației și stresului oxidativ într-un model animal de osteoartrită.....	85
6.1. Evaluarea efectelor analgezice și antiinflamatoare ale agomelatinei și repaglinidului prin teste farmacologice, în modelul animal de osteoartrită	85

6.1.1. Introducere	85
6.1.2. Materiale și metode.....	86
6.1.2.1. Animale de experiență și tratamente.....	86
6.1.2.2. Teste pentru evaluarea efectului analgezic și antiinflamator.....	88
6.1.2.2.1. Hiperalgezia mecanică	88
6.1.2.2.2. Alodinia mecanică	89
6.1.2.2.3. Hiperalgezia termică	89
6.1.2.2.4. Inflamația labei posterioare.....	89
6.1.2.3. Analiza statistică.....	90
6.1.3. Rezultate	90
6.1.3.1. Hiperalgezia mecanică.....	90
6.1.3.2. Alodinia mecanică	92
6.1.3.3. Hiperalgezia termică	94
6.1.3.4. Inflamația labei posterioare	96
6.1.4. Discuții.....	98
6.1.5. Concluzii.....	101
6.2. Evaluarea radiologică a efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra inflamației în modelul animal de osteoartrită.....	101
6.2.1. Introducere	101
6.2.2. Materiale și metode.....	102
6.2.2.1. Animale de experiență	102
6.2.2.2. Analiza imaginilor	102
6.2.3. Rezultate	103
6.2.4. Discuții.....	109
6.2.5. Concluzii	109
6.3. Evaluarea histologică a efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra inflamației în modelul animal de osteoartrită.....	110
6.3.1. Introducere	110
6.3.2. Materiale și metode.....	110
6.3.2.1. Animale de experiență și tratamente.....	110
6.3.2.2. Prelucrarea probelor și obținerea secțiunilor	111
6.3.2.3. Deparafinarea și rehidratarea probelor.....	111
6.3.2.4. Colorarea secțiunilor.....	112
6.3.2.5. Substanțe și reactivi	112
6.3.2.6. Analiza secțiunilor	112

6.3.3. Rezultate	113
6.3.4. Discuții.....	118
6.3.5. Concluzii.....	119
6.4. Evaluarea biologică a efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra inflamației și stresului oxidativ în modelul animal de osteoartrită.....	119
6.4.1. Introducere	119
6.4.2. Materiale și metode.....	119
6.4.2.1. Nivelurile serice de IL-6 și TNF- α	120
6.4.2.2. Nivelurile serice de tioli totali	120
6.4.2.3. Conținutul de proteine	120
6.4.2.4. Substanțe și reactivi	120
6.4.3. Rezultate	120
6.4.3.1. Nivelurile serice de IL-6 și TNF- α	120
6.4.3.2. Nivelurile serice de tioli totali	123
6.4.4. Discuții.....	124
6.4.5. Concluzii.....	127
7. Evaluarea efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului într-un model animal de durere indusă cu capsaicină.....	128
7.1. Introducere	128
7.2. Materiale și metode.....	128
7.2.1. Animale de experiență și tratamente.....	128
7.2.2. Teste farmacologice pentru evaluarea efectului analgezic	129
7.2.2.1. Testul capsaicinei.....	130
7.2.2.2. Hiperalgezia termică	130
7.2.3. Analiza statistică	130
7.3. Rezultate	130
7.3.1. Testul capsaicinei.....	130
7.3.2. Hiperalgezia termică.....	131
7.4. Discuții.....	133
7.5. Concluzii.....	133
8. Evaluarea efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra activității canalelor TRPV1 și TRPA1	134
8.1. Introducere	134
8.2. Materiale și metode.....	134
8.2.1. Determinarea activității canalelor TRPV1 și TRPA1.....	134

8.2.2. Substanțe și reactivi	135
8.3. Rezultate	135
8.4. Discuții.....	138
8.5. Concluzii.....	138
Concluzii și contribuții personale.....	139
Bibliografie.....	143
ANEXE	176

Introducere

Managementul actual al durerii implică utilizarea tehnicilor non-farmacologice în asociere cu tratamentul farmacologic care include medicamente din clasele analgezicelor antipiretice, antiinflamatoarelor nesteroidiene, opioidelor, antidepressivelor și anticonvulsivantelor. Însă, reacțiile adverse precum hepatotoxicitatea, tulburările gastrointestinale, riscul crescut de evenimente cardiovasculare, dar și toleranța și farmacodependența limitează utilizarea acestor medicamente în tratamentul durerii. Mai mult decât atât, a fost raportată o eficacitate scăzută pentru cele mai multe opțiuni farmacologice existente.

Receptorul TRPV1 este un canal cationic neselectiv, ligand-dependent exprimat la nivel central, în talamus, striatum, amigdală sau periferic la nivelul ganglionului rădăcinii dorsale. TRPV1 prezintă un rol crucial în modularea durerii, fiind esențial pentru recunoașterea și integrarea stimulilor chimici și termici nociceptivi.

Avantajele multiple ale studiilor *in silico* de *drug repurposing* au stat la baza creșterii semnificative a utilizării acestor modele pentru descoperirea de noi modulatori pentru diferite ținte terapeutice.

De asemenea, modelele animale sunt utilizate în prezent pentru determinarea mecanismului de acțiune și caracteristicilor diferitelor tipuri de durere, dar și pentru evaluarea efectului analgezic al unei substanțe active.

Obiectivele principale ale cercetării au fost:

- implementarea unui model *in silico* de *drug repurposing* pentru descoperirea de noi antagoniști TRPV1, cu posibilă utilizarea în terapia durerii;
- validarea unui model animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel și evaluarea efectelor analgezice ale substanțelor identificate prin studii *in silico* de *drug repurposing* pe acest modelul animal;
- evaluarea efectelor analgezice și antiinflamatoare ale substanțelor de testat pe un model animal de osteoartrită indusă cu adjuvantul Freund complet prin utilizarea testelor farmacologice, determinărilor radiologice, biochimice și histologice;
- evaluarea efectelor analgezice ale substanțelor într-un model animal de durere indusă cu capsaicină prin intermediul testelor farmacologice;

- evaluarea *in vitro* a activității compușilor rezultați din studiile *in silico*.

I. Partea generală

1. Durerea cronică

1.1. Introducere

Durerea este definită ca o experiență senzorială și emoțională neplăcută, de cele mai multe ori, fiind corelată cu apariția unor leziuni tisulare [1, 2]. Conform Asociației Internaționale pentru Studiul durerii, durerea care persistă mai mult de 3 luni este considerată durere cronică [2, 3].

Conform datelor din literatură, s-a observat că există o strânsă corelație între durerea cronică și depresie, anxietate și insomnie [4, 5]. Această problemă majoră de sănătate este asociată cu un impact social și economic ridicat și necesită un management complex pentru îmbunătățirea calității vieții pacientului.

1.2. Opțiuni de tratament în durerea cronică

Managementul farmacologic al durerii cronice se bazează pe tratarea simptomelor pacientului sau a patologiei asociate durerii. În acest sens, scopul principal al terapiei este reprezentat de creșterea calității vieții pacientului [5].

Principalele clase de medicamente utilizate pentru tratamentul durerii sunt antiinflamatoarele nesteroidiene, anticonvulsivantele, antidepresivele și opiodele, dar se pot utiliza și alte medicamente [6].

Tratamentul non-farmacologic al durerii cronice asociat farmacoterapiei joacă un rol esențial în reducerea intensității durerii, creșterea mobilității, a forței musculare și a rezistenței [7, 8].

Mai mult decât atât, utilizarea abordărilor cognitiv-comportamentale ale durerii cronice a fost corelată cu o reducere a stresului și a dizabilităților asociate durerii în studiile clinice ce au inclus pacienți cu diferite tipuri de durere cronică [9–11].

1.3. Mecanismele biologice ale durerii

Durerea cronică persistă sau recidivează în timp. Aceasta poate fi rezultatul unei patologii (de exemplu artrită sau cancer), al unei leziuni inițiale sau disfuncției de la nivelul sistemului nervos [12].

În durerea cronică are loc sensibilizarea căilor nociceptive cu apariția hiperalgeziei sau alodiniei. Acest proces poate fi rezultatul unor modificări la nivelul nociceptorilor, în eliberarea neurotransmițătorilor sau mediatorilor inflamatori și la nivelul funcționării neuronale [13].

Inflamația joacă de asemenea un rol semnificativ în durerea cronică asociată cu multiple afecțiuni, incluzând artrita reumatoidă, osteoartrita, durerea lombară cronică, fibromialgia [14], dar și în durerea neuropată, post-chirurgicală sau post-traumatică [15].

2. Receptorul TRPV1

2.1. Generalități

Canalele ionice cu potențial tranzitoriu (TRP) sunt canalele de cationi exprimate în diferite tipuri de celule, inclusiv în neuroni. Pentru aceste canale au fost evidențiate multiple roluri fiziologice și patologice [16, 17].

Canalul TRPV1, numit și receptorul capsaicinei, este exprimat central, în talamus, amigdală și corpul striat, dar și periferic în ganglionii rădăcinii dorsale, intestin, piele, cornee și vezica urinară [18–24].

2.2. Caracteristici structurale ale canalului TRPV1

Din punct de vedere structural, TRPV1 este un canal homotetrameric. Fiecare dintre cele patru subunități este formată din șase domenii transmembranare [25, 26]. Fiecare lanț monomeric cuprinde în total 838 de aminoacizi, iar aminoacizii 433-684 sunt implicați în formarea domeniilor transmembranare [27, 28]. Astfel, regiunea transmembranară cuprinde șase structuri elicoidale care formează domeniul senzorului pentru voltaj și o regiune poroasă internă [29, 30].

În structura canalului TRPV1 există un domeniu citoplasmatic mare format din două secvențe terminale cu localizare intracelulară [31]: o regiune lungă N-terminală alcătuită din multiple repetări de ankirină, cu rol în activarea canalului sub acțiunea unor substanțe agoniste

precum capsaicina, resiniferatoxina (RTX) sau temperatura ridicată (50 °C) [32], și regiunea scurtă C-terminală implicată în stabilitatea și funcția receptorului [28, 33–35].

2.3. Agoniștii endogeni ai receptorului TRPV1

Liganzii endogeni ai canalului TRPV1 sunt anandamida (AEA), N-arachidonoil dopamina (NADA), N-oleoiletanolamina (OEA), acid lizofosfatidic, oleoildopamina (OLDA), dar și alte molecule (acidul 12-hidroperoxieicosatetraenoic (12-HPETE)) [36–38].

2.4. Agoniștii naturali și sintetici ai receptorului TRPV1

Activarea receptorului TRPV1 modulează diferite răspunsuri biologice, precum apoptoza și proliferarea celulară [39], nocicepția și temperatura corpului [40], homeostazia glucozei [41] și reglarea funcției vezicii urinare [38, 42].

Capsaicina (trans-8-metil-N-vanililil-6-nonenamidă), agonistul consacrat al receptorului TRPV1, este o substanță din genul *Capsicum*, care aparține familiei *Solanaceae* [43]. În urma formării interacțiunii ligand-receptor, receptorul este activat și apare un influx de calciu, ducând la senzație de durere. După stimularea inițială, capsaicina determină desensibilizarea receptorului cu instalarea unui efect analgezic [38, 44, 45].

Resiniferatoxina, izolată din *Euphorbia resinifera*, este un compus utilizat în medicina tradițională pentru tratarea durerii. Este considerată un puternic agonist TRPV1, având o potență semnificativ mai mare comparativ cu capsaicina [46].

Ghimbirul, *Zingiber officinale Roscoe*, din familia *Zingiberaceae* este utilizată frecvent în industria alimentară ca și condiment și în medicina tradițională pentru multiplele sale efecte terapeutice benefice [24, 47, 48]. Substanțele active, precum shogaoli, gingeroli, paradoli și zingeronă, izolați din *Zingiber officinalis* acționează ca agoniști ai canalului TRPV1 [49, 50].

2.5. Antagoniștii naturali și sintetici ai receptorului TRPV1

Interesul privind identificarea și descoperirea de antagoniști TRPV1 a crescut semnificativ în urma sesizării că *knockout*-ul receptorului TRPV1 la animalele de experiență atenuază hiperalgezia termică indusă de inflamație [51, 52].

Modulatorii TRPV1 modifică temperatura corpului [53–55].

Antagoniștii naturali ai canalului TRPV1 includ grifolin și neogrifolin, izolați din *Peperomia galioides*, *Rhododendrom dauricum* și *Albatrellus sp.* Inhibarea influxului de Ca²⁺

indus de capsaicină a fost observată în cazul yohimbinei [56], voacanginei [57], pelitorinei [58], monanchomicalinei B [59] și pulchraninelor [60].

Bisabolul, din uleiul esențial de *Matricaria chamomilla*, posedă o afinitate ridicată pentru centrul geometric al receptorului TRPV1, acționând prin blocarea sa [61].

Proprietăți antagoniste TRPV1 au fost raportate și pentru eucaliptol [62], naringenină [63], cochinchinemin A și B, loureirină B [64], gomisin A [65], eriodictiol [66], quercetină [67] și vitexină [68].

Primul antagonist competitiv sintetic TRPV1 identificat a fost capsazepina [69, 70].

Antagoniști TRPV1 cu potență mare au fost obținuți prin halogenarea agoniștilor, de exemplu, prin introducerea iodului în structura resiniferatoxinei [71, 72].

SB-705498 a inhibat activitatea TRPV1 stimulată de capsaicină, pH-ul acid și căldură și a fost primul antagonist TRPV1 utilizat în studii clinice pentru potențialul său analgezic [69, 70, 73].

AMG-517 este un antagonist selectiv TRPV1, dar în studiile clinice a produs hipertermie [74, 75].

SB-366791 este un antagonist TRPV1 cu selectivitate superioară capsazepinei și nu produce modificări ale temperaturii corpului, iar AMG-9810 inhibă activarea receptorului TRPV1 mediată de protoni, căldură și endovaniloide, însă a prezentat un profil farmacocinetic slab la animalele de laborator [76–79].

II. Contribuții personale

3. Ipoteza de lucru și obiective generale

Durerea cronică este corelată cu dizabilitatea și afectarea semnificativă a calității vieții pacientului. Mai mult decât atât, din ce în ce mai mulți pacienți solicită frecvent asistență medicală pentru tratarea durerii [80, 81].

În ultimii ani, mai multe studii au evidențiat receptorul capsaicinei, TRPV1, ca țintă terapeutică pentru descoperirea de noi analgezice [69, 82, 83].

Deși unii antagoniști TRPV1 au fost evaluați în studiile clinice de fază I și II pentru tratamentul durerii cronice, hipertermia severă observată în urma administrării acestor substanțe a condus la întreruperea studiilor clinice [84].

Pornind de la informațiile prezentate mai sus, obiectivele generale ale prezentei lucrări au fost reprezentate de identificarea de noi antagoniști TRPV1 prin studii *in silico* de *drug repurposing*, validarea unui model de durere viscerală indusă cu paclitaxel și determinarea efectelor analgezice și antiinflamatoare ale substanțelor în diferite modele animale de durere și ulterior evaluarea activității acestora asupra receptorului TRPV1 *in vitro*.

4. Studii *in silico* de *drug repurposing* pentru identificarea unor noi potențiali modulatori TRPV1

În studiul nostru a fost implementată o metodă de screening virtual de *repurposing* a medicamentelor pentru a identifica, printre medicamentele aprobate, noi potențiali liganzi care ar putea interacționa cu receptorul TRPV1, având în vedere că pentru aceste substanțe profilurile farmacotoxicologice sunt bine cunoscute [85].

Materiale și metode

A fost implementată o metodă de screening virtual cu scopul de a descoperi noi potențiali antagoniști și agoniști/desensibilizatori TRPV1, utilizând atât abordări *in silico* bazate pe liganzi, cât și pe structură. Metoda implementată s-a axat pe construirea unui algoritm de învățare automată (rețea neuronală artificială) bazat pe schelete structurale, flexofori, descriptori moleculari și afinități de legare precise. [85].

Rezultate și discuții

După prelucrarea inițială, seturile de date conțineau structurile chimice și valorile activității a 2377 de antagoniști TRPV1 (set ANT), 194 de agoniști (set AG) și 996 de molecule inactive determinate experimental (set IN). Pentru a stabili un set de molecule *decoy* cu proprietăți similare cu ale moleculele active, seturile ANT și AG au fost fuzionate și patru parametri ce caracterizează molecule de tip *druglike* au fost calculați cu DataWarrior: MW, logP, HBD și HBA. În continuare, a fost descărcat un set de molecule din ChEMBL, care conținea structuri cu valori MW cuprinse între 226,3 și 796,6 g/mol, valorile logP între 0,837 și 11,074, 1-12 HBA și 0-4 atomi HBD. Dintre aceste structuri, 500 de molecule diverse, probabil inactive pe TRPV1, au fost recuperate ca set *decoy* (DCY). Candidații pentru *repurposing* au fost preluați din baza de date DrugBank, aceasta fiind alcătuită dintr-un total de 1981 de medicamente aprobate.

Prima variabilă independentă care a fost stabilită în metoda propusă de noi a fost scorul mediu de activitate (AAS). Acest scor mediu a fost calculat ca medie aritmetică a trei scoruri bazate pe caracteristicile structurale ale antagoniștilor și agoniștilor TRPV1: scheletele structurale Bemis-Murcko, sistemele de inele simple și clusterizarea bazată pe descriptorii de tip flexofor.

Antagoniștii au avut în general valori AAS mai mari decât agoniștii, deoarece antagoniștii au reprezentat o populație semnificativ mai mare în rândul compușilor biologic activi.

Capacitatea predictivă a scorului mediu de activitate stabilit a fost evaluată prin generarea curbelor ROC și calcularea valorilor ROC AUC. Valoarea ROC AUC pentru scorurile de activitate ale antagoniștilor a fost de 0,963, în timp ce același parametru a fost de 0,986 pentru predicția agoniștilor, ceea ce denotă o acuratețe ridicată în ambele cazuri.

Curbele ROC au fost generate pe baza claselor de activitate și a descriptorilor moleculari pentru a construi modele de clasificare folosind valori prag. Am ales să includem un minim de trei și un maxim de opt descriptorii moleculari ca variabile independente. Valorile ROC AUC au fost calculate pentru toți descriptorii pentru a evalua capacitatea de discriminare a fiecărei variabile. Cei opt descriptorii au fost aleși pe baza a patru criterii: valori ROC AUC satisfăcătoare, diferențe semnificative din punct de vedere statistic între valorile specifice moleculelor active și inactive, coeficienți de corelație între fiecare pereche de descriptorii mai mici de 0,75 și ușurința de a descrie proprietatea moleculară respectivă.

Rezultatele *docking*-ului molecular au fost a treia și ultima variabilă independentă în modelul de predicție propus pentru *repurposing*. În acest studiu au fost utilizate două structuri cristaline: TRPV1 activat legat de agonistul RTX și TRPV1 în stare închisă legat de antagonistul CPZ. Au fost efectuate validări calitative și cantitative ale procedurii de *docking*. În primul rând, acuratețea predicțiilor modului de legare a fost evaluată prin docarea liganzilor co-cristalizați în situsul de legare și suprapunerea conformației prezise peste cea determinată experimental. Valorile RMSD calculate după suprapunere au fost de 1,1277 Å pentru CPZ și de 1,2564 Å pentru RTX, ceea ce arată abateri scăzute de la conformația originală și o precizie satisfăcătoare pentru predicția orientării spațiale. Energiile de legare pentru martorii pozitivi au fost de -9,13 kcal/mol pentru CPZ și, respectiv, -11,55 kcal/mol pentru RTX.

O a doua validare a protocolului de *docking* a fost realizată prin evaluarea capacității celor două conformații TRPV1 de a discrimina liganzii activi și inactivi prin analiza energiilor de

legare sau a eficienței ligandului prezise. Prin urmare, o selecție de agoniști TRPV1 (n = 194), antagoniști (n = 222), molecule inactive (n = 488) și molecule *decoy* (n = 500) au fost docați în situsurile de legare ale conformațiilor active (PDB ID 7MZC) și inactive (PDB ID 5IS0) ale TRPV1.

Curbele ROC au fost generate pentru a evalua performanța procedurii de *docking* în vederea diferențierii liganzilor activi și inactivi. În mod notabil, experimentul de *docking* molecular a arătat precizii mai mari în predicția antagoniștilor decât a agoniștilor.

După stabilirea scorurilor de activitate, a numărului de criterii descriptive îndeplinite, a afinității și eficacității de legare pentru antagoniști, agoniști și molecule inactive, datele au fost integrate într-un model predictiv global pentru a crește acuratețea predictivă prin adăugarea de ponderi pentru fiecare dintre parametrii menționați anterior. Deoarece seturile de date privind antagoniștii, agonistii și substanțele inactive sunt destul de dezechilibrate, am generat modelul de învățare automată utilizând doar compușii care au fost selectați pentru *docking* molecular, creând astfel un set de date de antrenament mai echilibrat. Algoritmul de învățare automată pe care l-am selectat pentru această sarcină a fost rețeaua neuronală de tip *multilayer perceptron*, deoarece permite, de asemenea, predicția mai multor clase. Arhitectura cu parametrii cei mai optimi a avut următoarele caracteristici: șase noduri de intrare (scorurile medii de activitate și criteriile descriptive satisfăcute atât pentru antagoniști, cât și pentru agoniști, energiile de legare pentru antagoniști, valorile LELP pentru agoniști), un strat ascuns cu patru neuroni (care, de fapt, reprezintă media geometrică între numărul de noduri de intrare și de ieșire) activat cu funcția tanh, iar stratul de ieșire cu trei noduri corespunzătoare probabilităților pentru fiecare din cele trei clase, generate cu funcția softmax.

Modelul de clasificare generat a prezentat valori mai mari pentru specificitate decât pentru sensibilitate și, astfel, algoritmul identifică adevărat negativii relativ mai precis decât adevărat pozitivii.

Variabilele independente cu cea mai mare importanță în prezicerea celor trei clase au fost scorurile medii de activitate pentru antagoniști și agoniști, urmate de energia de legare și LELP, în timp ce numărul de criterii îndeplinite dependente de descriptorii moleculari a avut cea mai mică pondere.

Cei mai promițători candidați pentru *repurposing* ca modulatori TRPV1 cu utilitate farmacoterapeutică în ameliorarea durerii au fost aleși pe baza a trei criterii: probabilitate

ridicată de a fi activi, interacțiuni favorabile cu resturile de aminoacizi relevanți de la nivelul situsului de legare al TRPV1 și profiluri de siguranță acceptabile. Prin urmare, trei potențiali antagoniști (repaglinid, telmisartan și agomelatina) și un potențial agonist (protokylol) au fost propuși drept candidați pentru *repurposing*.

Analiza modului de legare pentru repaglinid a evidențiat potențialul acestuia de a bloca competitiv situsul de legare pentru vaniloizi. Mai mult, analiza a arătat că repaglinid împărtășește caracteristici structurale relevante cu anumiți antagoniști TRPV1. În prezent nu există studii preclinice publicate care să fi analizat potențialul analgezic pentru repaglinid. Reacțiile adverse frecvente, cum ar fi hipoglicemia și creșterea în greutate, asociate cu tratamentul cu repaglinid [86] indică faptul că utilizarea sa ca agent analgezic ar putea fi limitată la pacienții care suferă de neuropatie diabetică.

Sisignano și colab. au utilizat tehnici de electrofiziologie și de imagistică a calciului pentru a investiga posibilitatea interacțiunii dintre telmisartan și canalul TRPV1 și nu au observat un efect al substanței asupra canalului ionic [87]. Având în vedere aceste constatări, telmisartan poate fi considerat un fals pozitiv descoperit de algoritmul nostru ca potențial antagonist TRPV1. Lipsa de activitate asupra TRPV1 ar putea fi explicată de rezultatele *docking*-ului molecular. Spre deosebire de alți liganzi, telmisartan nu are o substructură specifică capului vaniloidic și, prin urmare, conformația sa nu se poate încadra la fel de bine în situsul de legare pentru vaniloizi.

Agomelatina se potrivește în mod satisfăcător în situsul de legare pentru vaniloizi și prezintă o mare similaritate cu un antagonist TRPV1, radicalul metil din cadrul grupării acetamidă fiind înlocuit cu substructura trifluorometoxi-metil din antagonistul cunoscut. Agomelatina are un profil de siguranță optim, cu puține reacții adverse (cum ar fi amețeli, greață, diaree și uscăciunea gurii), care apar în special la începutul tratamentului [88].

Protokylol, un agonist β 2-adrenergic utilizat ca bronhodilatator [89] este compusul cu a doua cea mai mare probabilitate de a exercita o activitate agonistă asupra TRPV1. Pentru protokylol au fost observate două situsuri de legare diferite, parțial suprapuse, unul specific pentru vaniloizi și antagoniști competitivi și altul pentru fosfoinozotide [90]. Protokylol a format interacțiuni favorabile cu resturile de aminoacizi relevante din cadrul ambelor situsuri de legare. Prin urmare, protokylol ar putea prezenta o potențială activitate analgezică fie prin

desensibilizarea TRPV1 prin interacțiunea cu situsul de legare a vaniloizilor, fie prin inhibarea canalului prin modulare alosterică, similar fosfoinozitudelor [90].

Datorită interacțiunilor optime prezise și a probabilităților crescute de a fi liganzi activi, studiul de față propune repaglinid și agomelatina ca potențiali antagoniști TRPV1 și protokylol ca potențial agonist/desensibilizator TRPV1. Sunt necesare studii suplimentare pentru a evalua experimental interacțiunile dintre moleculele propuse și TRPV1 și pentru a investiga activitatea acestora în diverse modele animale de durere.

5. Validarea unui model animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel și evaluarea efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului în acest model

5.1. Validarea unui model animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel

Studiul de față a fost conceput pentru a investiga reproductibilitatea studiilor anterioare și pentru a înțelege dacă paclitaxelul este potrivit pentru dezvoltarea unui model animal care ar permite o evaluare consecventă a comportamentului asociat durerii viscerale și a eficacității analgezicelor [91].

Materiale și metode

Procedurile experimentale au fost efectuate în conformitate cu normele de bioetică propuse de Ghidul NIH pentru Îngrijirea și Utilizarea animalelor de laborator.

Pentru acest studiu, am utilizat 40 de șobolani Wistar de sex feminin, repartizați în 5 loturi egale (8 animale/lot). Tratamentul a fost administrat intraperitoneal într-o singură doză, după cum urmează: Lot CTL (control/martor): ser fiziologic 1 mL/kg corp; Lot PAC1: paclitaxel 3 mg/kg corp; Lot PAC2: paclitaxel 5 mg/kg corp; Lot PAC3: paclitaxel 10 mg/kg corp; și Lot PAC4: paclitaxel 15 mg/kg corp.

Ca punct de plecare s-a folosit cea mai mare doză utilizată în durerea viscerală indusă de paclitaxel în studiile preclinice [92].

Nocicepția viscerală a fost evaluată calitativ cu ajutorul unei scale a durerii abdominale imediat după administrarea paclitaxelului. Hipersensibilitatea tactilă și termică induse de paclitaxel a fost determinată înainte de administrarea citostaticului (sensibilitate inițială) și după administrarea acestuia la 24 h (în ziua 3 a experimentului) și la 48 h (în ziua 4 a experimentului).

Rezultate și discuții

Scorurile reacției durerii abdominale au fost influențate semnificativ de administrarea paclitaxelului (**Fig. 5.2.A.**, ANOVA, $F_{(4,35)} = 32,3$, $p < 0,0001$). Cel mai pronunțat efect a fost observat la lotul PAC4 - 15 mg/kg corp ($p < 0,001$, corecție Bonferroni). Durerea viscerală indusă de paclitaxel este doză dependentă. Durerea acută observată la animalele de laborator a debutat la aproximativ 5-10 minute după administrare, cu o intensitate maximă la 20-30 minute și a avut o durată de aproximativ 40 minute pentru cea mai mare doză de paclitaxel utilizată în experiment (**Fig. 5.2.B.**) [91].

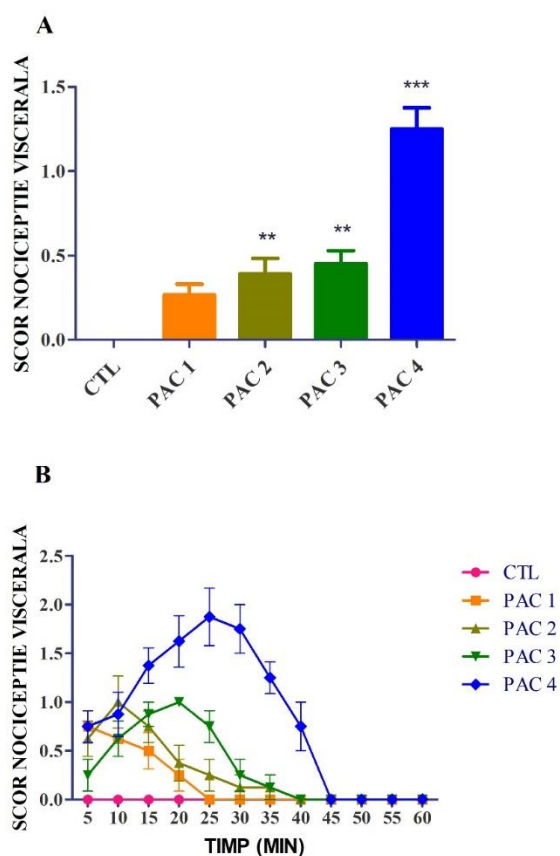


Fig. 5.2. Evaluarea durerii viscerele. **A** - Scala durerii abdominale – variația scorului nocicepției viscerele între loturile tratate. Datele sunt prezentate ca media scorului nocicepției viscerele \pm S.E.M. ** $p < 0,01$ față de CTL; *** $p < 0,001$ vs. CTL. **B** - Evoluția în timp a durerii abdominale după administrarea unei doze unice de paclitaxel.

Variațiile sensibilității tactile au fost semnificative după 48 h (**Fig. 5.3.** ANOVA, $F_{(4,35)} = 3,34$, $p = 0,0203$). O scădere semnificativă statistic a pragului de retragere de 50% a fost

observată pentru lotul PAC3 (10 mg/kg corp) ($p < 0,01$, corecție Bonferroni) în comparație cu lotul control la 48 h [91].

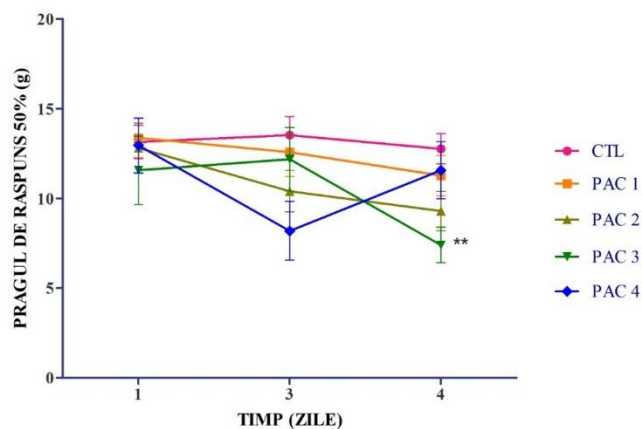


Fig. 5.3. Variația dependentă de timp a hipersensibilității tactile după administrarea unei singure doze de paclitaxel. Datele sunt prezentate ca media pragului de retragere a labei de $50\% \pm \text{S.E.M.}$ ** $p < 0,01$ față de CTL.

Nu au fost observate variații semnificative în ceea ce privește hipersensibilitatea termică după administrarea paclitaxelului comparativ cu lotul control în ziua 3 (ANOVA, $F_{(4,35)} = 0,350$, $p = 0,842$) sau în ziua 4 (ANOVA, $F_{(4,35)} = 1,43$, $p = 0,244$).

5.2. Evaluarea efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului în modelul animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel

Pornind de la ipoteza că durerea viscerală indusă de paclitaxel este mediată de activarea receptorilor TRPV1, iar agomelatina și repaglinidul ar putea fi antagoniști ai receptorului TRPV1, ne-am propus în experimentul de față să evaluăm efectele analgezice ale celor două substanțe pe modelul animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel.

Materiale și metode

În acest experiment au fost utilizați 40 de șobolani Wistar de sex feminin. Loturile experimentale au fost:

- Lot CTL: ser fiziologic 1 mL/kg corp i.p. + ser fiziologic 1 mL/kg corp per os;
- Lot PAC: paclitaxel 15 mg/kg corp i.p. + ser fiziologic 1 mL/kg corp per os;
- Lot PAC + TRM: paclitaxel 15 mg/kg corp i.p. + tramadol 80 mg/kg corp per os;

- Lot PAC + AGO: paclitaxel 15 mg/kg corp i.p. + agomelatină 40 mg/kg corp per os;
- Lot PAC + REPA: paclitaxel 15 mg/kg corp i.p. + repaglinid 16 mg/kg corp per os.

Substanțele utilizate în acest experiment au fost administrate în doză unică.

Pentru evaluarea calitativă a nocicepției viscerale a fost utilizată scala durerii abdominale.

Rezultate și discuții

În acest experiment au fost observate variații semnificative statistic în ceea ce privește nocicepția viscerală (ANOVA, $F_{(4,35)} = 12,89$, $p < 0,0001$). Administrarea intraperitoneală a paclitaxelului în doză de 15 mg/kg corp a produs durere viscerală comparativ cu lotul CTL ($p < 0,0001$, corecție Bonferroni). Doar tramadolul a prezentat un efect analgezic semnificativ ($p < 0,05$).

6. Evaluarea efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra durerii, inflamației și stresului oxidativ într-un model animal de osteoartrită

6.1. Evaluarea efectelor analgezice și antiinflamatoare ale agomelatinei și repaglinidului prin teste farmacologice, în modelul animal de osteoartrită

În studiul de față ne-am propus determinarea efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra durerii și inflamației, într-un model animal de osteoartrită.

Materiale și metode

Toate procedurile experimentale realizate au respectat normele de bioetică corespunzătoare Ghidului NIH pentru Îngrijirea și Utilizarea animalelor de laborator și liniile directoare ARRIVE.

Loturile experimentale au fost:

- Ulei de parafină 0,1 mL intraplantar (ipl) și apă distilată 1 mL/100 g corp per os (CTL);
- Adjuvant Freund complet 0,1 mL ipl și apă distilată 1 mL/100 g corp per os (CFA);
- Adjuvant Freund complet 0,1 mL ipl și tramadol 80 mg/kg corp per os (CFA + TRM);
- Adjuvant Freund complet 0,1 mL ipl și dexametazonă 1 mg/kg corp per os (CFA + DEXA);
- Adjuvant Freund complet 0,1 mL ipl și agomelatină 40 mg/kg corp per os (CFA + AGO);

- Adjuvant Freund complet 0,1 mL ipl și repaglinid 16 mg/kg corp per os (CFA + REPA).

Au fost evaluate alodinia și hiperalgezia mecanică prin utilizarea filamentelor von Frey și a testului Randall Selitto, hiperalgezia termică cu testul Hot plate (53⁰ C), edemul labei cu pletismometrul. Testele farmacologice au fost realizate inițial, la 7 și 14 zile de la administrarea intraplantară a adjuvantului Freund complet.

Rezultate și discuții

În urma evaluării hiperalgeziei mecanice s-au observat variații semnificative în ziua 7 a experimentului (ANOVA, $F_{(5, 54)} = 5,664$, $p = 0,003$), dar nu și în ziua 14 (Kruskal-Wallis, $H_{(5)} = 10,38$, $p = 0,065$).

Șobolanii din lotul CFA au prezentat hiperalgezie mecanică în ziua 7. Adjuvantul Freund complet a scăzut semnificativ pragul sensibilității mecanice comparativ cu lotul CTL. Un efect analgezic semnificativ a fost înregistrat pentru tramadol, dexametozonă și repaglinid, care au produs o creștere a pragului sensibilității mecanice comparativ cu lotul CFA.

În urma determinării alodinie mecanice, s-au observat variații semnificative ale pragului de răspuns de 50% după o săptămână (Kruskal-Wallis, $H_{(5)} = 19,65$, $p = 0,0015$) și 2 săptămâni de tratament (Kruskal-Wallis, $H_{(5)} = 21,42$, $p = 0,0007$).

Administrarea intraplantară a reactivului Freund a produs o reducere semnificativă a pragului de retragere a labei de 50% ($p = 0,0007$, corecție Bonferroni-Holm) după 7 zile, comparativ cu lotul CTL. Efectul înregistrat după 14 zile a fost mai scăzut.

O creștere a pragului de răspuns de 50% a fost înregistrată pentru toate substanțele utilizate în experiment, însă variațiile au fost semnificative doar pentru substanța de referință (tramadol).

De remarcat este faptul că după 2 săptămâni de tratament, au existat variații semnificative ale hiperalgeziei termice (Kruskal-Wallis, $H_{(5)} = 30,25$; $p < 0,001$). Animalele tratate cu reactivul Freund au prezentat hipersensibilitate termică, înregistrându-se o reducere a timpului de percepere a durerii comparativ cu lotul CTL ($p = 0,0324$, corecție Bonferroni-Holm). Un efect antihiperalgic semnificativ a fost observat în cazul substanțelor de referință și agomelatinei.

Rezultatele noastre sunt similare cu raportările din studiile preclinice [93, 94].

Volumul labei posterioare a prezentat variații semnificative atât la 7 zile (ANOVA, $F_{(5, 54)} = 19,15$, $p < 0,001$), cât și la 14 zile (Kruskal-Wallis, $H_{(5)} = 49,75$, $p < 0,001$).

Animalele din lotul CFA au prezentat o inflamație locală după 7 zile, manifestată prin edem al labei posterioare. Mai mult decât atât, în ziua 14 a studiului preclinic, inflamația indusă de adjuvantul Freund s-a menținut.

Efectul antiinflamator a fost evidențiat pentru o singură substanță, dexametazona.

6.2. Evaluarea radiologică a efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra inflamației în modelul animal de osteoartrită

Obiectivele principale ale evaluării imagistice cu raze X au fost confirmarea instalării osteoartritei după administrarea intraplantară a adjuvantului Freund complet și determinarea efectului antiinflamator al substanțelor de referință (tramadol și dexametazona) și al substanțelor testate (agomelatina și repaglinid).

Materiale și metode

Șobolani masculi Sprague-Dawley utilizați în experimentul prezentat în **Capitolul 6** au fost selectați după 18 zile pentru evaluarea imagistică cu raze X.

Examenul radiologic a fost realizat la Spitalul veterinar Pet Stuff București cu ajutorul aparatului Drager.

Imaginile obținute au fost examinate și interpretate de un medic radiolog. Modificările osteoarticulare au fost analizate și clasificate semicantitativ cu ajutorul scorurilor de la 0-3 [95–97].

Rezultate și discuții

Conform evaluării radiologice realizată în ziua 18 a experimentului, administrarea intraplantară a reactivului Freund complet în doză unică a indus osteoartrită, caracterizată prin modificări degenerative osoase și articulare, reacție periostală și edem la nivelul țesutului moale. Efectul înregistrat a fost semnificativ comparativ cu lotul CTL ($p = 0,001$, corecție Bonferroni).

Administrarea orală a tramadolului nu a influențat modificărilor osteoarticulare induse de reactivului Freund. Animalele din acest lot au prezentat un scor al osteoartritei cu valori cuprinse între 2 și 3.

Dexametazona, substanța de referință cu efect antiinflamator, a prezentat un efect protector față de acțiunea adjuvantul Freund complet. Pentru animalele din acest lot a fost înregistrat un scor cu valori scăzute, modificările osteoarticulare și edemul fiind minime. Efectul

antiinflamator al dexametazonei evaluat prin analiză radiologică a labei posterioare este în concordanță cu rezultatul determinat cu ajutorul pletismometrului. Mai mult decât atât, o reducere a inflamației induse de adjuvantul Freund în urma administrării dexametazonei a fost evidențiată și în alte studii preclinice [98]. Efectul benefic al dexametazonei este rezultatul scăderii nivelului de citokine proinflamatorii, implicate în inițierea și menținerea inflamației [99].

Nu a fost observat un efect protector pentru tramadol, agomelatină și repaglinid împotriva acțiunii adjuvantului Freund complet. Variațiile scorului de severitate a osteoartritei au fost ne semnificative comparativ cu lotul CFA ($p > 0,05$).

6.3. Evaluarea histologică a efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra inflamației în modelul animal de osteoartrită

În acest studiu ne-am propus să realizăm evaluarea histologică a probelor de țesut obținute în urma recoltării labei posterioare de la animalele de experiență testate în **Capitolul 6.**, pentru validarea inducerii osteoartritei în urma administrării adjuvantului Freund complet și determinarea unei posibile acțiuni protectoare a medicamentelor utilizate.

Materiale și metode

Au fost selectați 34 de șobolani masculi Sprague-Dawley pentru determinări histologice (primele 2 loturi – 5 animale/lot, ultimele 4 loturi – 6 animale/lot).

Animalele de experiență au fost eutanasiate prin disclocare cervicală. Au fost recoltate de la șobolani labele posterioare drepte prin tăiere la o distanță de 2-3 mm deasupra gleznei. După fixarea țesutului, a fost realizată decalcifierea. Probele au fost prelucrate, secționare și colorate conform protocoalelor în vigoare [100].

S-a utilizat colorația standard HE pentru evidențierea gradului de inflamație și prezenței și distribuției celulelor în țesuturi [100].

Probele de țesut au fost evaluate pentru stabilirea gradului de inflamație, iar analiza semicantitativă a fost realizată prin acordarea unui scor cu puncte cuprinse în intervalul 0-3 [97, 101, 102].

Gradul de inflamație a fost stabilit cu ajutorul scorurilor de către un analist, fără ca acesta să cunoască detalii despre secțiunile analizate.

Rezultate și discuții

Administrarea intraplantară a adjuvantului Freund complet a produs inflamație profundă, cu afectarea țesutului subcutanat, musculaturii striate, țesuturilor profunde periarticulare și a periostului. Infiltratul inflamator prezent la nivelul țesuturilor a fost alcătuit din limfocite, plasmocite, macrofage, celule polimorfonucleare și neutrofile. Histiocitele epitelioidale au fost implicate în formarea inflamației granulomatoase. Prin comparație cu lotul CTL, pentru lotul CFA a fost evidențiată o inflamație semnificativă a țesuturilor de la nivelul labei posterioare ($p < 0,001$, corecție Bonferroni). Rezultatele noastre sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate, studiile anterioare demonstrând modificări histopatologice similare în urma administrării reactivului Freund [101].

Dexametazona a prezentat efect antiinflamator, producând o reducere semnificativă a infiltratului inflamator indus de adjuvantul Freund ($p = 0,01$). Efectul antiinflamator al dexametazonei a fost evidențiat prin analiza histopatologică și în alte studii preclinice, rezultatele obținute în cadrul experimentului nostru fiind în concordanță cu cele din literatură [95, 103].

Pentru tramadol, agomelatină și repaglinid nu a fost identificat un efect antiinflamator.

6.4. Evaluarea biologică a efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra inflamației și stresului oxidativ în modelul animal de osteoartrită

În acest studiu, ne-am propus să evaluăm efectele medicamentelor asupra inflamației și stresului oxidativ în modelul animal de osteoartrită, descris anterior în **Capitolul 6**.

Materiale și metode

Au fost selectați 48 de șobolani masculi Sprague-Dawley pentru determinări biologice. În vederea realizării determinării nivelurilor de citokine proinflamatorii și tioli totali, animalele au fost eutanasiate prin dislocare cervicală.

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetării au evidențiat pentru lotul CFA o creștere semnificativă statistic a concentrației IL6, comparativ cu lotul martor fără osteoartrită. Realizând comparația cu lotul martor CFA, s-a observat că substanțele testate în acest experiment nu au modificat semnificativ statistic concentrația IL6, cu excepția tramadolului care a scăzut concentrația IL6.

Concentrația serică a TNF α a fost redusă semnificativ statistic pentru loturile tratate cu repaglinid și dexametazonă, atât față de lotul martor non-osteoartritic, cât și față de lotul martor cu osteoartrită indusă de adjuvantul Freund complet. Rezultatele noastre au arătat faptul că repaglinidul reduce concentrațiile celor două citokine, fără a influența modificările radiologice specifice osteoartritei, ceea ce duce la concluzia că substanța nu are efect antiinflamator la nivel articular. Reducerea concentrației serice de TNF- α față de lotul CFA, realizată prin administrarea dexametazonei ($p < 0,0001$) se corelează cu reducerea severității osteoartritei indusă de adjuvantul Freund.

Rezultatele cercetării au arătat o reducere semnificativă a glutatationului la animalele cu osteoartrită față de lotul martor non-osteoartritic. Comparativ cu lotul CFA, numai dexametazona a produs creștere semnificativă statistic a concentrației glutatationului ($p = 0,0056$). Loturile tratate cu tramadol, agomelatină și repaglinid au indus creșteri ale glutatationului, dar ne semnificative față de lotul martor osteoartritic.

7. Evaluarea efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului într-un model animal de durere indusă cu capsaicină

Obiectivul principal al studiului de față a fost reprezentat de evaluarea efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului, doi potențiali antagoniști TRPV1, în modelul animal de durere indusă cu capsaicină.

Materiale și metode

Experimentul de față a fost efectuat în conformitate cu normele de bioetică privind cercetarea pe animalele de laborator în scop științific, conform Ghidului NIH pentru Îngrijirea și Utilizarea animalelor de laborator și liniile directoare ARRIVE.

Loturile experimentale au fost:

- Ser fiziologic 0,1 mL ipl. și ser fiziologic 0,1 mL per os (CTL);
- Capsaicină 10 μ g/0.1 mL ipl. și ser fiziologic 0,1 mL per os (CAP);
- Capsaicină 10 μ g/0.1 mL ipl. și capsazepină 1 μ g/mL ipl (CAP + CPZ);
- Capsaicină 10 μ g/0.1 mL ipl. și agomelatină 80 mg/kg corp per os (CAP + AGO);
- Capsaicină 10 μ g/0.1 mL ipl. și repaglinid 32 mg/kg corp per os (CAP + REPA).

În modelul animal de durere indusă prin administrarea intraplantară a capsaicinei au fost realizate teste farmacologice pentru determinarea efectului analgezic al medicamentelor administrate. Astfel a fost realizat testul capsaicinei și ulterior a fost determinată hiperalgezia termică cu ajutorul testului Hot plate.

Rezultate și discuții

S-au observat modificări semnificative statistic între loturile experimentale în cadrul testului capsaicinei (Kruskal-Wallis, $H_{(4)} = 22,40$, $p = 0,0002$). Comparativ cu lotul CTL, administrarea intraplantară a capsaicinei a produs o creștere semnificativă statistic a timpului corelat cu nocicepția spontană ($p < 0,001$, corecție Bonferroni). Această nocicepție spontană se caracterizează prin ridicarea, lingerea sau mușcarea labei injectate și are o durată de aproximativ 5 minute [104].

Rezultatele noastre au fost similare cu cele raportate în studiile preclinice [104]. Imediat după administrarea capsaicinei, animalele din lotul CAP au prezentat o creștere semnificativă a timpului asociat nocicepției spontane comparativ cu lotul CTL, urmată la 5 minute de o hiperalgezie la stimulul termic, dar care a dispărut după 30 de minute. Hiperalgezia termică după administrarea capsaicinei a fost evaluată și alte studii preclinice și s-a constatat că intensitatea hipersensibilității scade în timp, rezultatele noastre fiind în concordanță cu această observație [104, 105].

Efectul analgezic al substanțelor (capsazepina, agomelatina, repaglinid) a fost semnificativ statistic în testul Hot plate. Aceste substanțe au produs o creștere semnificativă a latenței reacției la durere față de valorile înregistrate pentru lotul CAP după 5 minute. Acțiunea analgezică apare probabil ca o consecință a blocării receptorilor TRPV1.

8. Evaluarea efectelor agomelatinei și repaglinidului asupra activității canalelor TRPV1 și TRPA1

În studiul de față ne-am propus evidențierea efectelor celor două substanțe, agomelatina și repaglinid, asupra activității canalelor TRPV1 și TRPA1. În vederea determinării mecanismului de acțiune a medicamentelor, am evaluat activitatea de agonist sau antagonist a substanțelor.

Materiale și metode

Evaluarea *in vitro* a fost realizată în colaborare cu Centrul de Fiziologie și Farmacologie, Institutul de Fiziologie, Universitatea de Medicină din Viena, Austria.

Au fost utilizate celule HEK293T netransfectate și transfectate în vederea determinării nivelurilor de calciu. Substanțele de testat au fost aplicate înaintea agoniștilor celor două canale (izotiocianatul de alil pentru TRPA1 și capsaicină pentru TRPV1).

Rezultate și discuții

Pentru agomelatină se observă o creștere a nivelului de calciu intracelular la concentrație de 10 μ M, fapt ce denotă o acțiune de tip agonist asupra receptorului TRPA1. În ceea ce privește activitatea TRPV1, s-a observat o reducere a concentrației de calciu intracelular în urma aplicării agomelatinei 100 μ M. Acest efect este corelat cu o acțiune de antagonist modestă asupra receptorului TRPV1. Lipsa selectivității poate fi explicată pe baza similarității structurale dintre cele două canale [106]. Efecte asemănătoare asupra celor două canale au fost evidențiate și pentru capsazepină [107, 108].

Variațiile activității canalelor TRPA1 și TRPV1 înregistrate pentru repaglinid sunt minime. Lipsa activității antagoniste asupra receptorului TRPV1 observată în experimentul de față relevă faptul că repaglinidul este un fals pozitiv identificat în studiile *in silico* de *drug repurposing*.

Concluzii și contribuții personale

Am realizat studii *in silico* de *drug repurposing* pentru identificarea unor noi potențiali modulatori TRPV1. Modelul predictiv propus a avut o acuratețe mai mare pentru clasificarea agoniștilor TRPV1 decât a antagoniștilor, valorile ROC AUC fiind de 0,980 pentru predicția agoniștilor, 0,972 pentru antagoniști și 0,952 pentru moleculele inactive. După screening-ul medicamentelor aprobate cu algoritmul validat, repaglinid (antidiabetic) și agomelatina (antidepresiv) au fost identificați ca potențiali antagoniști TRPV1, iar protokylol (bronhodilatator) ca agonist.

Cercetarea a continuat cu validarea unui model animal de durere viscerală indusă prin administrarea intraperitoneală în doză unică a paclitaxelului. Am constatat că paclitaxelul a indus durere viscerală semnificativă, urmată de hipersensibilitate mecanică și termică. În

modelul animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel în doză de 15 mg/kg corp, am evidențiat că agomelatina și repaglinidul au redus intensitatea durerii viscerale, însă variațiile nu au fost semnificative statistic.

Ulterior, efectele analgezice și antiinflamatoare ale agomelatinei și repaglinidului au fost cercetate într-un model animal de osteoartrită. Agomelatina a redus semnificativ statistic hipersensibilitatea termică după 14 zile și repaglinid hipersensibilitatea mecanică după 7. Substanțele testate nu au redus inflamația indusă de adjuvantul Freund complet, efect evidențiat și prin evaluare radiologică și histologică. Repaglinidul a produs însă o scădere semnificativă a citokinelor proinflamatorii din ser, iar variațiile înregistrate pentru agomelatina nu au fost semnificative statistic. Ambele substanțe au prezentat efect antioxidant.

În plus, agomelatina și repaglinidul au redus semnificativ hipersensibilitatea termică indusă de capsaicină.

Prin studii *in vitro* am arătat ca agomelatina acționează ca agonist TRPA1 și antagonist modest TRPV1, iar efectele repaglinidului sunt independente de activitatea celor două canale.

Pe baza rezultatelor obținute, se poate concluziona că agomelatina și repaglinid au prezentat un efect analgezic în cele două modele de durere, dar nu și un efect antiinflamator.

Contribuțiile personale din cadrul cercetării sunt:

- Am stabilit unui model *in silico* de *drug repurposing* utilizând strategii bazate pe liganzi, pe structură și pe învățare automată pentru identificarea unor noi modulatori ai receptorului TRPV1. Pe baza acestui model au fost identificate pentru prima dată două molecule cu potențial efect analgezic: repaglinid și agomelatina, cu acțiune potențial antagonistă asupra receptorilor TRPV1. De asemenea, am identificat protokylolul, un potențial agonist al acestor receptori (**Capitolul 4**);

- Am validat un model de inducere a durerii viscerale prin administrarea intraperitoneală a paclitaxelului în doză unică. Pentru validarea acestei metode am realizat relația doză-efect privind intensitatea durerii viscerale induse de citostatic. De asemenea, am evaluat efectul analgezic al agomelatinei și repaglinidului în modelul animal de durere viscerală indusă cu paclitaxel. Acest model poate servi pentru determinările diversilor compuși cu potențială acțiune analgezică (**Capitolul 5**);

- Am indus osteoartrită prin administrarea adjuvantului Freund complet la șobolan și am făcut o evaluare comparativă asupra efectului analgezic și antiinflamator a două substanțe de

referință: tramadol și dexametazona și a substanțelor de testat: repaglinid și agomelatina (**Capitolul 6**);

- Am evidențiat efectul analgezic al repaglinidului agomelatinei în durerea indusă de osteoartrită, efect comparabil cu al tramadolului (**Capitolul 6**);

- Am demonstrat că repaglinidul, agomelatina, dar și tramadolul nu prezintă efect antiinflamator și nu protejează împotriva progresiei osteoartritei, efect observat la dexametazonă (**Capitolul 6**);

- Am demonstrat că repaglinidul produce o scădere a nivelului de citokine proinflamatorii din sânge (**Capitolul 6**);

- Am concluzionat că ambele substanțe testate au redus stresul oxidativ, ca o consecință a efectului antioxidant (**Capitolul 6**);

- Pe modelul animal de durere indusă de capsaicină, am demonstrat apariția efectelor analgezice ale agomelatinei și repaglinidului (**Capitolul 7**);

- Am demonstrat prin studii *in vitro* că agomelatina acționează ca agonist TRPA1 și antagonist modest TRPV1, iar efectul analgezic al repaglinidului este independent de activitatea celor două canale dependente de ionul de calciu (**Capitolul 8**).

Bibliografie selectivă

1. Hylands-White N, Duarte R V., Raphael JH. An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatol Int* 2017; 37(1):29–42.
2. Nicholas M, Vlaeyen JWS, Rief W, *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. *Pain* 2019; 160(1):28–37.
3. Raja SN, Carr DB, Cohen M, *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 2020; 161(9):1976–1982.
4. Hadi MA, McHugh GA, Closs SJ. Impact of Chronic Pain on Patients' Quality of Life: A Comparative Mixed-Methods Study. *J Patient Exp* 2019; 6(2):133–141.
5. Cohen SP, Vase L, Hooten WM. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *Lancet* 2021; 397(10289):2082–2097.
6. Fornasari D. Pain mechanisms in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig* 2012; 32(SUPPL. 1):45–52.
7. Clauw DJ, Essex MN, Pitman V, Jones KD. Reframing chronic pain as a disease, not a symptom: rationale and implications for pain management. *Postgrad Med* 2019; 131(3):185–198.

8. Coulter ID, Crawford C, Hurwitz EL, *et al.* Manipulation and mobilization for treating chronic low back pain: a systematic review and meta-analysis. *Spine J* 2018; 18(5):866–879.
9. Williams DA, Cary MA, Groner KH, *et al.* Improving physical functional status in patients with fibromyalgia: a brief cognitive behavioral intervention. *J Rheumatol* 2002; 29(6):1280–1286.
10. Waters SJ, McKee DC, Keefe FJ. Cognitive behavioral approaches to the treatment of pain. *Psychopharmacol Bull* 2007; 40(4):74–88.
11. Eccleston C, Fisher E, Craig L, Duggan GB, Rosser BA, Keogh E. Psychological therapies (Internet-delivered) for the management of chronic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014.
12. Flor H, Birbaumer N, Turk DC. The psychobiology of chronic pain. *Adv Behav Res Ther* 1990; 12(2):47–84.
13. Vardeh D, Naranjo JF. Peripheral and Central Sensitization. In: *Pain Medicine*. Cham: Springer International Publishing, 2017:15–17.
14. Lee YC, Nassikas NJ, Clauw DJ. Importance of chronic pain in the rheumatic diseases Basic biology of pain in healthy individuals. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(211):1–10.
15. Sommer C, Leinders M, Üçeyler N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. *Pain* 2018; 159(3):595–602.
16. Li H. TRP channel classification. *Adv Exp Med Biol* 2017; 976:1–8.
17. Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2007; 1772(8):805–812.
18. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; 21(3):531–543.
19. Guo A. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 1999; 11(3):946–958.
20. Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2007; 1772(8):989–1003.
21. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389(6653):816–824.
22. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, *et al.* A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science (80-)* 2002; 296(5575):2046–2049.
23. Benarroch EE. CGRP: Sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology* 2011; 77(3):281–287.
24. Andrei C, Zănfirescu A, Nițulescu GM, Negreș S. Understanding the Molecular Mechanisms Underlying the Analgesic Effect of Ginger. *Nutraceuticals* 2022; 2(4):384–403.

25. Carnevale V, Rohacs T. TRPV1: A target for rational drug design. *Pharmaceuticals* 2016; 9(3):1–20.
26. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 2013; 504(7478):107.
27. Moiseenkova-bell VY, Stanciu LA, Serysheva II, Tobe BJ, Wensel TG. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. 2008; 105(21):7451–7455.
28. Bagood MD, Isseroff RR. TRPV1: Role in Skin and Skin Diseases and Potential Target for Improving Wound Healing. *Int J Mol Sci* 2021; 22(11).
29. Bevan S, Quallo T, Andersson DA. *Trpv1.*, 2014.
30. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2005; 451(1):143–150.
31. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389(6653):816–824.
32. Schumacher MA, Moff I, Sudanagunta SP, Levine JD. Molecular Cloning of an N-terminal Splice Variant of the Capsaicin Receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(4):2756–2762.
33. Szolcsányi J, Sándor Z. Multimeric TRPV1 nociceptor: A target for analgesics. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33(12):646–655.
34. Benítez-Angeles M, Morales-Lázaro SL, Juárez-González E, Rosenbaum T. TRPV1: Structure, endogenous agonists, and mechanisms. *Int J Mol Sci* 2020; 21(10):1–18.
35. Zheng J. Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol* 2013; 3(1):221–242.
36. Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 2007; 114(1):13–33.
37. Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids: Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 2004; 271(10):1827–1834.
38. Andrei C, Zămbrescu A, Nițulescu GM, Olaru OT, Negreș S. Natural Active Ingredients and TRPV1 Modulation: Focus on Key Chemical Moieties Involved in Ligand–Target Interaction. *Plants* 2023; 12(2):339.
39. Omari SA, Adams MJ, Geraghty DP. TRPV1 Channels in Immune Cells and Hematological Malignancies. In: *Advances in Pharmacology*. Vol 79., 2017:173–198.
40. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; 21(3):531–543.
41. Suri A, Szallasi A. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29(1):29–36.
42. Birder LA, Kanai AJ, De Groat WC, *et al.* Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(23):13396–13401.

43. Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief: Farewell or revival? *Clin J Pain* 2008; 24(2):142–154.
44. Jara-Oseguera A, Simon S, Rosenbaum T. TRPV1: On the Road to Pain Relief. *Curr Mol Pharmacol* 2010; 1(3):255–269.
45. Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. A Ca^{2+} -Cute Ca^{2+} D; Desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 12(1):122–129.
46. Szallasi A, Blumberg PM. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 1989; 30(2):515–520.
47. Begum T, Pandey SK, Borah A, Paw M, Lal M. Essential Oil Composition of Different Accessions of Ginger Collected from Northeast Region of India. *J Essent Oil-Bearing Plants* 2018; 21(6):1475–1486.
48. Menon V, Elgharib M, El-awady R, Saleh E. Ginger: From serving table to salient therapy. *Food Biosci* 2021; 41:100934.
49. Yang F, Xiao X, Cheng W, *et al.* Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol* 2015; 11(7):518–524.
50. Dong Y, Yin Y, Vu S, *et al.* A distinct structural mechanism underlies TRPV1 activation by piperine. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 516(2):365–372.
51. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288(5464):306–313.
52. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, *et al.* Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000; 405(6783):183–187.
53. Garami A, Shimansky YP, Rumbus Z, *et al.* Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacol Ther* 2020; 208:107474.
54. Fattori V, Hohmann MSN, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA. Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules* 2016; 21(7):1–33.
55. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(5):357–372.
56. Jaffal S, Oran S, Alsalem M, Al-Najjar B. Effect of *Arbutus andrachne* L. methanolic leaf extract on TRPV1 function: Experimental and molecular docking studies. *J Appl Pharm Sci* 2022; 12(10):069–077.
57. Terada Y, Horie S, Takayama H, Uchida K, Tominaga M, Watanabe T. Activation and inhibition of thermosensitive TRP channels by voacangine, an alkaloid present in *Voacanga africana*, an african tree. *J Nat Prod* 2014; 77(2):285–297.
58. Oláh Z, Rédei D, Pecze L, *et al.* Pellitorine, an extract of *Tetradium daniellii*, is an antagonist of the ion channel TRPV1. *Phytomedicine* 2017; 34:44–49.

59. Korolkova Y, Makarieva T, Tabakmakher K, *et al.* Marine cyclic guanidine alkaloids monanchomycalin B and urupocidin a act as inhibitors of TRPV1, TRPV2 and TRPV3, but not TRPA1 receptors. *Mar Drugs* 2017; 15(4):87.
60. Guzii AG, Makarieva TN, Korolkova Y V., *et al.* Pulchranin A, isolated from the Far-Eastern marine sponge, *Monanchora pulchra*: The first marine non-peptide inhibitor of TRPV-1 channels. *Tetrahedron Lett* 2013; 54(10):1247–1250.
61. Teixeira GFD, Vieira-Neto AE, da Costa FN, e Silva ARA, Campos AR. Antinociceptive effect of (-)- α -bisabolol in nanocapsules. *Biomed Pharmacother* 2017; 91:946–950.
62. Melo Júnior J de M de A de, Damasceno M de BMV, Santos SAAR, *et al.* Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. *Inflammopharmacology* 2017; 25(2):247–254.
63. Eom S, Lee B-B, Lee S, *et al.* Antioxidative and Analgesic Effects of Naringin through Selective Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid Member 1. *Antioxidants* 2021; 11(1):64.
64. Wan Y, Yu Y, Pan X, *et al.* Inhibition on acid-sensing ion channels and analgesic activities of flavonoids isolated from dragon's blood resin. *Phyther Res* 2019; 33(3):718–727.
65. Lee SB, Noh S, Yeom HD, *et al.* A Molecular Basis for the Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 by Gomisin A. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2017; 2017:1–8.
66. Rossato MF, Trevisan G, Walker CIB, *et al.* Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem Pharmacol* 2011; 81(4):544–551.
67. Gao W, Zan Y, Wang ZJJ, Hu XY, Huang F. Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKC ϵ -dependent activation of TRPV1. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37(9):1166–1177.
68. Borghi SM, Carvalho TT, Staurengo-Ferrari L, *et al.* Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *J Nat Prod* 2013; 76(6):1141–1146.
69. Iftinca M, Defaye M, Altier C. TRPV1-Targeted Drugs in Development for Human Pain Conditions. *Drugs* 2021; 81(1):7–27.
70. Gharat LA, Szallasi A. Advances in the design and therapeutic use of capsaicin receptor TRPV1 agonists and antagonists. *Expert Opin Ther Pat* 2008; 18(2):159–209.
71. Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-Resiniferatoxin, a New Potent Vanilloid Receptor Antagonist. *Mol Pharmacol* 2001; 59(1):9–15.
72. Appendino G, Harrison S, De Petrocellis L, *et al.* Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 2003; 139(8):1417–1424.
73. Kort ME, Kym PR. TRPV1 Antagonists. In: *Progress in Medicinal Chemistry*. Vol 51. 1st ed. Elsevier B.V., 2012:57–70.
74. Steiner AA, Turek VF, Almeida MC, *et al.* Nonthermal activation of transient receptor

potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* 2007; 27(28):7459–7468.

75. Gavva NR, Treanor JJS, Garami A, *et al.* Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 2008; 136(1–2):202–210.

76. Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, *et al.* Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology* 2004; 46(1):133–149.

77. Doherty EM, Fotsch C, Bo Y, *et al.* Discovery of potent, orally available vanilloid receptor-1 antagonists. Structure-activity relationship of N-aryl cinnamides. *J Med Chem* 2005; 48(1):71–90.

78. Tejada De Rink MM, Naumann U, Kollmar R, *et al.* A Single Injection of N-Oleoyldopamine, an Endogenous Agonist for Transient Receptor Potential Vanilloid-1, Induced Brain Hypothermia, but No Neuroprotective Effects in Experimentally Induced Cerebral Ischemia in Rats. *Ther Hypothermia Temp Manag* 2020; 10(2):91–101.

79. Ding Z, Cowan A, Rawls SM. Capsaicin evokes hypothermia independent of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Brain Res* 2005; 1065(1–2):147–151.

80. Finnerup NB, Scholz J, First MB, *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11) Rolf-Detlef. *Pain* 2018; 160(1):19–27.

81. Szallasi A, Sheta M. Targeting TRPV1 for pain relief: Limits, losers and laurels. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21(9):1351–1369.

82. Trevisani M, Szallasi A. Targeting trpv1: Challenges and issues in pain management. *Open Drug Discov J* 2010; 2(SPEC. ISS.2):37–49.

83. Premkumar L, Sikand P. TRPV1: A Target for Next Generation Analgesics. *Curr Neuropharmacol* 2008; 6(2):151–163.

84. Trevisani M, Gatti R. TRPV1 Antagonists as Analgesic Agents. *Open Pain J* 2013; 6(1):108–118.

85. Andrei C, Mihai DP, Zandfirescu A, Nitulescu GM, Negres S. In Silico Drug Repurposing Framework Predicts Repaglinide, Agomelatine and Protokylol as TRPV1 Modulators with Analgesic Activity. *Pharmaceutics* 2022; 14(12):2563.

86. Scott LJ. Repaglinide: A review of its use in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2012; 72(2):249–272.

87. Sisignano M, Angioni C, Park CK, *et al.* Targeting CYP2J to reduce paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(44):12544–12549.

88. Kasper S, Hamon M. Beyond the monoaminergic hypothesis: Agomelatine, a new antidepressant with an innovative mechanism of action. *World J Biol Psychiatry* 2009; 10(2):117–126.

89. Burkes RM, Panos RJ. Ultra Long-Acting β -Agonists in Chronic Obstructive Pulmonary

Disease. *J Exp Pharmacol* 2020; Volume 12:589–602.

90. Yazici AT, Gianti E, Kasimova MA, Lee BH, Carnevale V, Rohacs T. Dual regulation of TRPV1 channels by phosphatidylinositol via functionally distinct binding sites. *J Biol Chem* 2021; 296(4):100573.
91. Andrei C, Zanfircu A, Mihai DP, Negreş S. Paclitaxel—A Valuable Tool for Inducing Visceral Pain in Preclinical Testing? *Int J Transl Med* 2023; 3(1):108–119.
92. Rossato MF, Rigo FK, Oliveira SM, *et al.* Participation of transient receptor potential vanilloid 1 in paclitaxel-induced acute visceral and peripheral nociception in rodents. *Eur J Pharmacol* 2018; 828:42–51.
93. Bölcskei K, Tékus V, Dézsi L, Szolcsányi J, Pethő G. Antinociceptive desensitizing actions of TRPV1 receptor agonists capsaicin, resiniferatoxin and N -oleoyldopamine as measured by determination of the noxious heat and cold thresholds in the rat. *Eur J Pain* 2010; 14(5):480–486.
94. Helyes Z, Szabó Á, Németh J, *et al.* Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum* 2004; 50(5):1677–1685.
95. Pradheeban NAASPN and LDBS. Free Radical Scavenging Activity of Albizia Lebbeck Methanolic. 2014; 25(12):1–8.
96. Almarestani L, Fitzcharles MA, Bennett GJ, Ribeiro-Da-Silva A. Imaging studies in Freund's complete adjuvant model of regional polyarthritis, a model suitable for the study of pain mechanisms, in the rat. *Arthritis Rheum* 2011; 63(6):1573–1581.
97. Snehalatha U, Anburajan M, Venkatraman B, Menaka M. Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model: Comparison of thermography and histopathology. *Z Rheumatol* 2013; 72(4):375–382.
98. E V, M S, C B, K S, P L. Radio-histopathological evaluation of anti-arthritic activity of apigenin in Freund's induced arthritis in Wistar Albino Rats. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 2022; 12(10):1.
99. Danquah CA, Woode E, Boakye-Gyasi E. Anti-arthritic effects of an ethanolic extract of capparid erythrocarpos isert roots in freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J Pharmacol Toxicol* 2011; 6(3):201–217.
100. Hayer S, Vervoordeldonk MJ, Denis MC, *et al.* SMASH recommendations for standardised microscopic arthritis scoring of histological sections from inflammatory arthritis animal models. *Ann Rheum Dis* 2021; 80(6):714–726.
101. Laste, G., Souza, I. C. C., Santos, V. S. D., Caumo, W., & Torres ILS. Histopathological Changes in Three Variations of Wistar Rat Adjuvant-Induced Arthritis Model. *Int J Pharm Res Sch* 2014; 3(2):780–790.
102. Noh ASM, Chuan TD, Khir NAM, *et al.* Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis. Di Paola R, ed. *PLoS One* 2021; 16(12):e0260423.

103. Lam FFY, Ng ESK. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. *Br J Pharmacol* 2010; 159(4):958–969.
104. Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 1996; 67(1):179–188.
105. Massaad CA, Safieh-Garabedian B, Poole S, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Neuroimmunol* 2004; 153(1–2):171–182.
106. Muller C, Morales P, Reggio PH. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front Mol Neurosci* 2019; 11.
107. Kistner K, Siklosi N, Babes A, *et al.* Systemic desensitization through TRPA1 channels by capsazepine and mustard oil - a novel strategy against inflammation and pain. *Sci Rep* 2016; 6(1):28621.
108. Schwarz MG, Namer B, Reeh PW, Fischer MJM. TRPA1 and TRPV1 Antagonists Do Not Inhibit Human Acidosis-Induced Pain. *J Pain* 2017; 18(5):526–534.

Lucrări științifice publicate în reviste de specialitate

1. **Andrei C**, Zanfirescu A, Nițulescu GM, Negreș S. Understanding the Molecular Mechanisms Underlying the Analgesic Effect of Ginger. *Nutraceuticals* 2022; 2(4):384–403, <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals2040029>. BDI. (Capitolul 2, pag. 25, 31, 33)
2. **Andrei C**, Zanfirescu A, Nițulescu GM, Olaru OT, Negreș S. Natural Active Ingredients and TRPV1 Modulation: Focus on Key Chemical Moieties Involved in Ligand–Target Interaction. *Plants* 2023; 12(2):339, <https://doi.org/10.3390/plants12020339>. FI = 4,5. Q1. (Capitolul 2, pag. 26-31, 35, 38)
3. **Andrei C**, Mihai DP, Zanfirescu A, Nitulescu GM, Negres S. In Silico Drug Repurposing Framework Predicts Repaglinide, Agomelatine and Protokylol as TRPV1 Modulators with Analgesic Activity. *Pharmaceutics* 2022; 14(12):2563, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122563>. FI = 5,4. Q1. (Capitolul 4, pag. 43-70)

4. **Andrei C**, Zanzfirescu A, Mihai DP, Negreş S. Paclitaxel—A Valuable Tool for Inducing Visceral Pain in Preclinical Testing? *Int J Transl Med* 2023; 3(1):108–119, <https://doi.org/10.3390/ijtm3010010>. BDI. (Capitolul 5, pag. 72-84)