



## ARAŞTIRMA / RESEARCH

### Bazı piperazin alkanol türevlerinin antinosiseptif etkinlikleri

The antinociceptive effects of some piperazine alkanol derivatives

Bürge Doğruer Akan<sup>1</sup>, Ümide Demir Özkay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Turkey

*Cukurova Medical Journal 2019;44(3):729-744.*

#### Abstract

**Purpose:** The aim of this study was to investigate probable antinociceptive activities of some piperazine alkanol derivatives in some nociceptive tests.

**Materials and Methods:** Potential antinociceptive activities of the piperazine alkanol derivatives (20 mg/kg) against mechanic, thermal and chemical nociceptive stimuli were evaluated by tail-clip, hot-plate, acetic acid-induced writhing, and formalin tests. Rota-Rod test was performed to evaluate probable effect of the test compounds on motor coordination of mice.

**Results:** Morphine used as a reference drug exhibited analgesic effect in tail-clip, hot-plate, acetic acid-induced writhing, and formalin tests, as expected. 2-(4-substituted-piperazin-1-yl)-1-phenylpropan-1-ol compounds, which carry 2-hydroxyethyl (C3), phenyl (C6), 4-methylphenyl (C7), 4-chlorophenyl (C8), 4-fluorophenyl (C9), 4-nitrophenyl (C10) and benzhydryl (C11) substituents, increased the reaction time of mice against mechanic and thermal nociceptive stimuli in tail-clip and hot-plate tests, respectively. The same test compounds decreased chemical stimulus-induced nociceptive response in acetic acid-induced writhing and formalin tests. Antinociceptive effects of the compounds C7, C8, and C11 were found to be statistically more significant than the compounds C3, C6, C9, and C10. Naloxone, non-selective opioid receptor antagonist (5 mg/kg), totally antagonized the antinociceptive effect observed in all of the nociceptive tests.

**Conclusion:** These findings revealed antinociceptive activity of the compounds C3, C6-C11, and pointed out that this effect was associated with both central and peripheral mechanisms. In addition, naloxone antagonism indicated the involvement of opioid mechanisms in the activity.

**Keywords:** Piperazine alkanol, acid-induced writhing test, formalin test, opioid, Rota-Rod test

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, bazı piperazin alkanol türevi bileşiklerin olası antinosiseptif etkinliklerinin bazı nosiseptif testler ile araştırılmasıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Piperazin alkanol türevlerinin (20 mg/kg) mekanik, termal ve kimyasal ağırlı uyarana karşı potansiyel antinosiseptif etkileri kuyruk sıkıştırma, sıcak plaka, asetik asit kıvrınma ve formalin testleri ile araştırılmıştır. Test edilen bileşiklerin farelerin motor koordinasyonları üzerine olası etkinliğini değerlendirmek üzere Rota-Rod testi yapılmıştır.

**Bulgular:** Referans ilaç olarak kullanılan morfin kuyruk sıkıştırma, sıcak plaka, asetik asit kıvrınma ve formalin testlerinde beklenen analjezik etkiyi göstermiştir. 2-(4-süstitüepiperazin-1-il)-1-fenilpropan-1-ol türevlerinden; 2-hidroksietyl (C3), fenil (C6), 4-metilfenil (C7), 4-klorofenil (C8), 4-florofenil (C9), 4-nitrofenil (C10) ve benzhidril (C11) süstitüentlerini taşıyan bileşikler, kuyruk sıkıştırma ve sıcak plaka testlerinde mekanik ve termal ağırlı uyarana karşı farelerin reaksiyon sürelerini artırmıştır. Aynı test bileşikleri asetik asit kıvrınma ve formalin testlerinde, kimyasal uyarı aracılıklı nosiseptif cevapları azaltmıştır. C7, C8 ve C11 kodlu test bileşiklerinin antinosiseptif etkileri C3, C6, C9 ve C10 kodlu test bileşiklerinden istatistiksel olarak daha anlamlı bulunmuştur. Non-selektif opioid reseptör antagonisti nalokson (5 mg/kg) tüm nosiseptif testlerde gözlenen antinosiseptif etkiyi tamamen antagonize etmiştir.

**Sonuç:** Bu bulgular, C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin antinosiseptif etkilerini ortaya koymuş ve bu etkinin hem santral hem de periferik mekanizmalar ile ilişkili olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca, nalokson antagonizması söz konusu aktiviteye opioid mekanizmaların katılımını göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Piperazin alkanol, asetik asit kıvrınma testi, formalin testi, opioid, Rota-Rod testi

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Ümide Demir Özkay, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Turkey , E-mail: udemir@anadolu.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 30.11.2018 Kabul tarihi/Accepted: 27.12.2018 Çevrimiçi yayın/Published online: 26.08.2019

## GİRİŞ

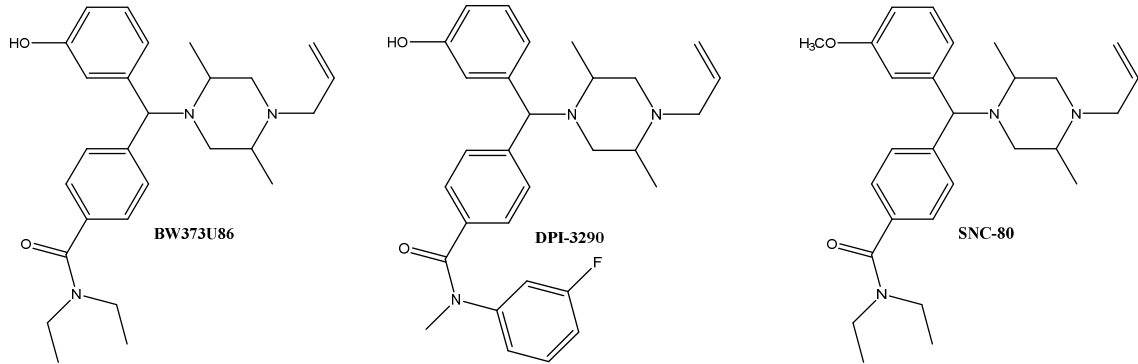
Ağrı, prevalansı ve neden olduğu yetersizlikler sebebi ile insanların yaşam kalitesini etkileyen en önemli sağlık sorunlarından birisidir<sup>1</sup>. Ağrı tedavisinde kullanılan ilaçlar non-steroidal antiinflatuvar (NSAİ) ilaçlar, opioid analjezikler ve analjezik adjuvanlar (antidepresanlar, lokal anesteziçiler gibi) olmak üzere üç başlık altında incelenebilir<sup>2-4</sup>.

Günümüzde ağrı tedavisinde kullanılan çeşitli analjezik ilaçlar olmasına rağmen, ilaçların yan etkileri nedeni ile ağrının tedavisi hala büyük bir problemdir<sup>2,3,5</sup>. NSAİ ilaçların gastrointestinal komplikasyonlar (kanama, lezyon, ülser gibi), renal hasar ve kardiyovasküler etkiler gibi ciddi yan etkileri varken; opioid analjeziklerin sedasyon, konstipasyon, solunum depresyonu, bağımlılık ve tolerans gibi yan etkileri vardır<sup>2,3,6,7</sup>. Bu nedenle, daha güçlü ve daha güvenli analjezik bileşiklerin keşfedilmesi ve

geliştirilmesi için farmasötik alanda çalışmalar yapılmakta ve yeni bileşikler sentezlenmektedir.

Piperazin, birinci ve dördüncü konumunda iki azot atomu ihtiva eden 6 üyeli doymuş bir halka sistemidir. Günümüzde kullanılan birçok ilaç bu halka sistemini içermektedir. Buspiron, amoksapin, trazodon, klozapin, setrizin, ranolazin, trimetazidin, imatinib ve sildenafil bu ilaçlara örnek olarak gösterilebilir<sup>8</sup>.

Piperazin halkasını taşıyan bileşiklerin farmakolojik etki potansiyelleri, araştırmacıları yeni piperazin türevleri sentezlemeye ve farmakolojik aktivitelerini incelemeye yöneltmiştir. Yapılan çalışmalarda, piperazin yapısı taşıyan çok sayıda bileşiğin antinosiseptif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir<sup>9-18</sup>. Bunlar arasında piperazin türevi bazı bileşiklerin antinosiseptif etkinliklerinin opioid sistem ile ilişkili olduğu bildiren çalışmalar yer almaktadır. Bu bileşiklerden BW373U86<sup>16</sup>, DPI-3290<sup>17</sup> ve SNC-80<sup>18</sup> (**Şekil 1**) kodlarına sahip olan türevler benzhidrilpiperazin ana yapısını taşımaktadırlar.



**Şekil 1.** Benzhidrilpiperazin yapısı taşıyan antinosiseptif etkili bileşikler.

Piperazin halka sistemini taşıyan bileşiklerden, piperazin alkanol grubu türevler de antinosiseptif etkinlikleri açısından incelenmektedir. Literatürde, piperazin alkanol yapısı taşıyan bazı bileşiklerin antinosiseptif aktivitelerini bildiren çalışmaların varlığı dikkat çekmektedir<sup>19,20</sup>.

2013 yılında çalışma grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, piperazin halkasının 1. konumunda fenil, 4-sübstitüe fenil veya 2-hidroksietil gruplarını taşıyan piperazin alkanol türevlerinin antidepresan-benzeri etkinlik gösterdikleri ortaya konulmuştur<sup>21</sup>. Çeşitli antidepresan ilaçların analjezik etkilerini bildiren raporlardan<sup>22-25</sup> hareketle; bu çalışmada sözü edilen bileşiklerin antinosiseptif etki potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülmüş ve bu etki açısından

incelenmeleri planlanmıştır. Antinosiseptif etkiye opioid mekanizmaların olası katılımını araştırmak üzere non-selektif opioid reseptör antagonist naloksone ile antagonizma çalışması yapılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Deney hayvanları

Çalışmalarda aynı yaşta, 30-35 g ağırlığında BALB/c erkek fareler kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan hayvanlar 24±1°C sıcaklıkta, iyi havalandırılan odalarda ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde bulundurulmuşlardır. Hayvanlar standart hayvan yemi ile beslenmişlerdir. Hayvanlar

deneyden en az 48 saat önce deney esnasında bulunacakları odalara alınmışlardır.

### Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışmada kullanılan morfin sülfat, nalokson hidroklorür, formalin solüsyonu, 1-fenilpiperazin, 1-(4-metilfenil)piperazin, 1-(4-florofenil)piperazin, 1-(4-klorofenil)piperazin, 1-(4-nitrofenil)piperazin, 1-benzhidrilpiperazin, 1-metilpiperazin, 1-etilpiperazin, 1-(2-hidroksietil)piperazin, 1-(2-dimetilaminoetil)piperazin ve 1-sikloheksilpiperazin Sigma (St. Louis, MO, ABD)'dan; asetik asid, propiyofenon, hidrobromik asid, kloroform, brom, potasyum karbonat, aseton, metanol, sodyum borhidrür, etanol ve anhidr sodyum sülfat Merck (Darmstadt, Almanya)'dan; serum fizyolojik ise Adeka (Samsun, Türkiye)'dan satın alınmıştır.

### Test bileşiklerinin sentezi

Bu çalışma kapsamında etkinliği araştırılan bileşiklerinden, C3-C10 kodlu olanların sentezleri ve bazı türevlerin antidepresan-benzeri aktiviteleri, çalışma grubumuz tarafından daha önce bildirilmiştir<sup>21</sup>. Bu bileşiklere ek olarak, üç yeni bileşik (C1, C2 ve C11) (Şekil 2) antinosiseptif aktivitelerinin incelenmesi amacıyla seriye eklenmiştir. Bu bileşikler, eşdeğer miktarda 2-bromo-1-fenil-propan-1-on, uygun piperazin türevi ve potasyum karbonat'ın aseton içerisindeki reaksiyonları ile kazanılan ara ürünlerin, eşdeğer miktar sodyum borhidrür ile metanol içerisinde indirgenmesi sonucunda sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin kimyasal yapıları <sup>1</sup>H-NMR spektrumları alınarak ve Elemental analizleri gerçekleştirilerek doğrulanmıştır.

Bileşik	Kimyasal Formül	Bileşik	Kimyasal Formül
C1		C7	
C2		C8	
C3		C9	
C4		C10	
C5		C11	
C6			

Şekil 2. 2-(4-sübstitüepiperazin-1-il)-1-fenilpropan-1-ol türevlerinin (C1-C11) kimyasal yapıları.

### 1-Fenil-2-(4-metil-piperazin-1-il)propanol (C1)

Verim: % 63. E.D: Tespit edilemedi. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.83 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.58-2.88 (m, 9H, -CH ve piperazin), 2.95 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4.29 (d, H, -

CH) 5.06-5.12 (b, H, -OH), 7.24-7.40 (m, 5H, Ar-H). C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O için hesaplanan: C %72.38, H %8.68, N %12.06; bulunan: C %71.96, H %8.65, N %12.11.

**1-Fenil-2-(4-etil-piperazin-1-il)propanol (C2)**

Verim: % 66. E.D: Tespit edilemedi. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.83 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.06 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.59-2.87 (m, 9H, -CH ve piperazin), 2.94 (dd, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4,31 (d, H, -CH) 5.02-5.11 (b, H, -OH), 7.24-7.42 (m, 5H, Ar-H). C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O için hesaplanan: C %73.13, H %9.00, N %11.37; bulunan: C %73.69, H %9.02, N %11.42.

**1-Fenil-2-(4-benzhidril-piperazin-1-il)propanol (C11)**

Verim: % 76. E.D: 193 °C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.83 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.62-3.21 (m, 9H, -CH ve piperazin), 4,31 (d, H, -CH) 5.02-5.18 (m, 2H, -CH ve -OH), 7.21-7.43 (m, 15H, Ar-H). C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O için hesaplanan: C %81.21, H %7.34, N %7.29; bulunan: C %81.16, H %7.32, N %7.25.

**Test bileşiklerinin uygulanması**

Hayvanlara kimyasal maddelerin 20 mg/kg dozu oral gavaj yolu ile uygulanmıştır. Kimyasal maddeler çiçek yağı içerisinde çözülerek uygulandığı için kontrol solüsyonu olarak çiçek yağı kullanılmıştır. Elde edilecek sonuçların karşılaştırılması için referans ilaç olarak hayvanlara 10 mg/kg dozda morfin uygulanmıştır<sup>26</sup>. Kimyasal madde ve çiçek yağı uygulamalarından 60 dakika sonra ve morfin uygulamalarından 30 dakika sonra hayvanlar deneylere alınmıştır. Analjezik aktiviteye opioid mekanizmaların katılımını incelemek üzere kimyasal madde uygulamalarından 15 dakika önce intraperitoneal (i.p.) yolla 5 mg/kg dozda nalokson uygulaması yapılmıştır<sup>27</sup>. Bu çalışmanın deneysel protokolü Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri

Yerel Etik Kurulu'nun 14.05.2013 tarihli ve 2013-6 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

**Kuyruk sıkıştırma (Tail-clip) testi**

Kuyruk sıkıştırma testi, hayvanların mekanik ağırlı uyarana karşı verdikleri yanıtı ölçmek için kullanılan bir testtir<sup>28</sup>. Testte, deney hayvanlarının kuyruklarına metal klamp takılmış ve hayvanların dönüp klampı ısırma süreleri kronometre ile ölçülmüştür. Hayvanların reaksiyon süresinde meydana gelen uzama antinoseptif etki için parametre olarak kabul edilmiştir. Deneylerden önce duyarlılık testi uygulanmış ve klampe 10 saniye içerisinde yanıt vermeyen hayvanlar deneye alınmamıştır<sup>29</sup>. Testler sırasında kuyruğun hasar görmesini önlemek için uyarı maksimum 10 saniye süre ile uygulanmıştır<sup>30</sup>.

**Sıcak plaka (Hot-plate) testi**

Sıcak plaka testi, hayvanların termal ağırlı uyarana karşı verdikleri yanıtı ölçmek için kullanılan bir testtir<sup>31</sup>. Testte, sıcaklığı 55±1.0°C' ye ayarlanmış alüminyum bir plakanın (Ugo Basile, 35100, Verase, İtalya) üzerine konulan hayvanların, ayaklarını yalamaya başlama ve/veya zıplama süreleri kaydedilmiştir. Hayvanların reaksiyon süresinde meydana gelen uzama antinoseptif etki için parametre olarak kabul edilmiştir<sup>32,33</sup>. Deneylerden önce duyarlılık testi uygulanmış ve 15 saniye içerisinde yanıt veren hayvanlar deneye alınmıştır<sup>34</sup>. Doku hasarını önlemek amacıyla uyarı maksimum 30 saniye süre ile uygulanmıştır<sup>32,35</sup>.

Kuyruk sıkıştırma ve sıcak plaka testlerinden elde edilen veriler aşağıda verilen eşitlik kullanılarak maksimum olası etkinin (maximum possible effect, MPE) yüzdesi olarak ifade edilmiştir:

$$\% \text{ MPE} = \frac{(\text{uygulama sonrası süre} - \text{uygulama öncesi süre})}{(\text{cut-off süresi} - \text{uygulama öncesi süre})} \times 100$$

**Asetik asid kıvrınma testi**

Asetik asid kıvrınma testi, hayvanların kimyasal nitelikli ağırlı uyarana karşı verdikleri yanıtı ölçmek için kullanılan bir testtir<sup>36</sup>. Testte, deney hayvanlarında abdominal ağrı oluşturmak amacıyla %0.6'lık asetik asid solüsyonu (10 mL/kg) i.p. yolla uygulanmıştır. Asetik asid enjeksiyonundan 5 dakika sonra, hayvanların kıvrınma davranışı 10 dakika süre ile sayılarak kaydedilmiştir. Hayvanların kıvrınma

davranışlarında meydana gelen azalma antinoseptif etki için parametre olarak kabul edilmiştir<sup>37</sup>.

**Formalin Testi**

Formalin testi, hayvanların kimyasal nitelikli ağırlı uyarana karşı verdikleri yanıtı ölçmek için kullanılan bir testtir<sup>38</sup>. Testte, sağ arka pençelerinin dorsal yüzeyine subkütan olarak 20 mikrolitre %2.5'lik formalin solüsyonu enjekte edilen farelerin pençelerini yalama süreleri enjeksiyondan sonraki 30

dakikanın ilk 5 dakikası (erken faz) ve son 15 dakikası (geç faz) süresince kaydedilmiştir<sup>34,39</sup>. Hayvanların pençe yalama sürelerinde meydana gelen azalma antinosiseptif etki için parametre olarak kabul edilmiştir.

Asetik asid kıvranma ve formalin testlerinde, hayvanların kıvranma davranışlarının ve pençe yalama sürelerinin % inhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{kontrol grubu ortalama} - \text{tedavili grup ortalama})}{(\text{kontrol grubu ortalama})} \times 100$$

### Dönen mil (Rota-Rod) testi

Rota-Rod cihazı (Ugo Basile, 47600, Verase, İtalya), hayvanların motor koordinasyon parametrelerini ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. Hayvanlara deneye alınmadan üç gün önce Rota-Rod cihazına alışmaları için denemeler yaptırılmış ve dönen mil üzerinde 180 saniyeden daha uzun süre kalamayan hayvanlar deneye alınmamıştır. 4 rpm'den 40 rpm'e kadar hızlanarak dönen milin üzerine konulan farelerin cihaz üzerinden düşme süreleri cihaz tarafından otomatik olarak kaydedilmiştir. Hayvanların milin üzerinde kalma süreleri motor koordinasyon için parametre olarak kabul edilmiştir<sup>40,41</sup>.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel hesaplamalar için Graphpad Prism ver. 6.01 paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirme için, yedişer hayvandan alınan veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından

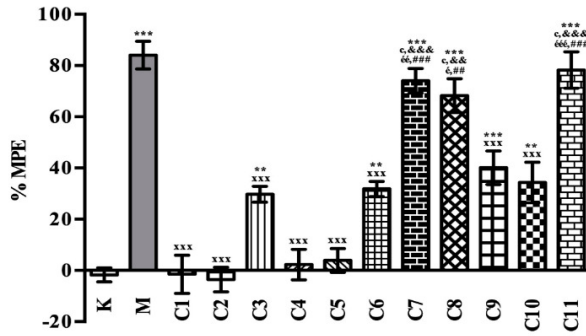
Tukey HSD çoklu karşılaştırma testleri uygulanarak analiz edilmiştir. Grafiklerin çizimleri için, GraphPad Prism ver. 6.01 programından yararlanılmıştır.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir.  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### Kuyruk sıkıştırma testi

Metil (C1), etil (C2), 2-hidroksietil (C3), 2-dimetilaminoetil (C4), sikloheksil (C5), fenil (C6), 4-metilfenil (C7), 4-klorofenil (C8), 4-florofenil (C9), 4-nitrofenil (C10) ve benzhidril (C11) süstitüentlerini taşıyan 2-(4-süstitüepiperazin-1-il)-1-fenilpropan-1-ol türevlerinin (20 mg/kg) ve morfin'in (10 mg/kg) farelerin kuyruk sıkıştırma testinde ölçülen reaksiyon süreleri üzerine etkileri Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. Kuyruk sıkıştırma testinde çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının hayvanların % MPE değerleri üzerine etkisi.

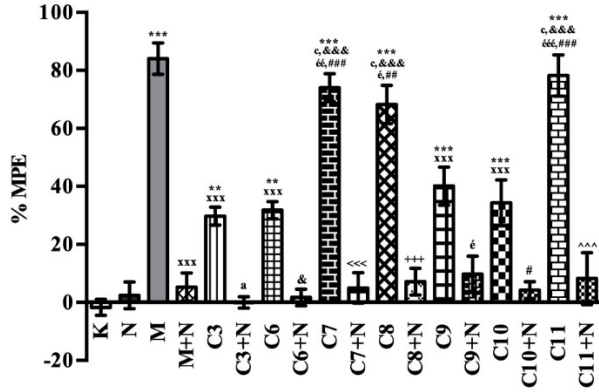
Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p < 0.001$ ; C3 grubuna göre anlamlı farklılık  $p < 0.001$ ; C6 grubuna göre anlamlı farklılık && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$ ; C9 grubuna göre anlamlı farklılık  $p < 0.05$ , && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$ ; C10 grubuna göre anlamlı farklılık ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ ,  $n = 7$ .

20 mg/kg dozda uygulanan C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri, hayvanların %MPE değerlerinin, kontrol grubunun %MPE değerlerine göre istatistiksel olarak

anlamlı biçimde artmasına neden olmuştur. C7, C8 ve C11 kodlu test bileşiklerinin %MPE değerlerini C3, C6, C9 ve C10 kodlu test bileşiklerine göre

istatistiksel olarak daha anlamlı şekilde artırdığı görülmüştür. Referans ilaç olarak kullanılan morfin de kuyruk sıkıştırma testinde hayvanların reaksiyon sürelerini uzatarak beklenen analjezik etkiyi göstermiştir. Kuyruk sıkıştırma testinde C1, C2, C4

ve C5 kodlu bileşikler etkisiz bulunmuştur (Şekil 3). Test bileşikleri (C3, C6-C11) ve morfin uygulamalarının neden olduğu antinositif etki üzerine nalokson ön-tedavisinin etkileri Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. Kuyruk sıkıştırma testinde çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C3, C6-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının ve nalokson (N) ön-tedavisinin hayvanların % MPE değerleri üzerine etkisi.

Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\*p<0.001; C3 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>a</sup>p<0.05, <sup>c</sup>p<0.001; C6 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>&</sup>p<0.05, <sup>&&</sup>p<0.001; C7 grubuna göre anlamlı farklılık <sup><<</sup>p<0.001; C8 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>+++</sup>p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>ç</sup>p<0.05, <sup>çç</sup>p<0.01, <sup>ççç</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001; C11 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>^^</sup>p<0.001, n=7.

Nalokson ön-uygulaması, C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin ve morfin'in uygulanmasına bağlı olarak %MPE değerlerinde görülen artışı anlamlı biçimde antagonize etmiştir (Şekil 4).

#### Sıcak plaka testi

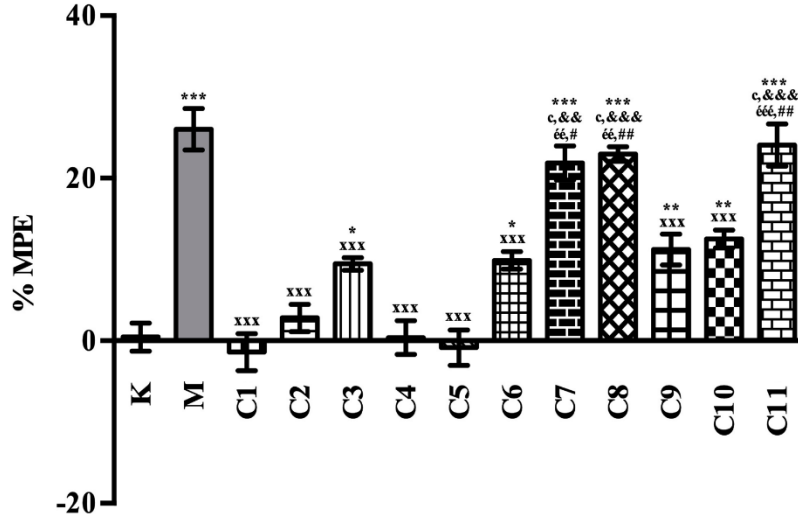
20 mg/kg dozda uygulanan test bileşiklerinin (C1-C11) ve 10 mg/kg dozda uygulanan morfin'in farelerin sıcak plaka testinde ölçülen reaksiyon süreleri üzerine etkileri Şekil 5'de verilmiştir. 20 mg/kg dozda uygulanan C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri, hayvanların %MPE değerlerinin, kontrol grubunun %MPE değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmasına neden olmuştur. C7, C8 ve C11 kodlu test bileşiklerinin %MPE değerlerini C3, C6, C9 ve C10 kodlu test bileşiklerine göre istatistiksel olarak daha anlamlı şekilde artırdığı görülmüştür. Referans ilaç olarak kullanılan morfin de sıcak plaka testinde hayvanların reaksiyon sürelerini uzatarak beklenen analjezik etkiyi göstermiştir. Sıcak plaka testinde C1, C2, C4 ve C5 kodlu bileşikler etkisiz bulunmuştur (Şekil 5). Test bileşikleri (C3, C6-C11) ve morfin uygulamalarının neden olduğu antinositif etki üzerine nalokson ön-tedavisinin etkileri Şekil 6'da verilmiştir. Nalokson

ön-uygulaması, C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin ve morfin'in uygulanmasına bağlı olarak %MPE değerlerinde görülen artışı anlamlı biçimde antagonize etmiştir (Şekil 6).

#### Asetik asid kıvranma testi

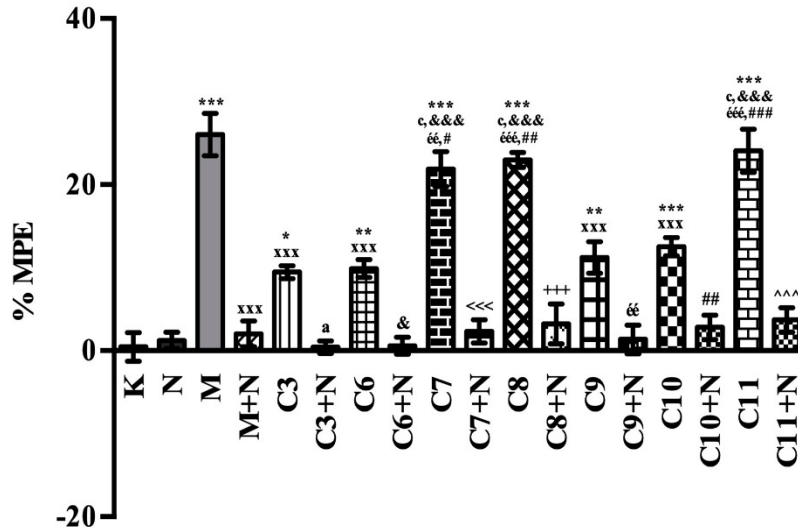
20 mg/kg dozda uygulanan test bileşiklerinin (C1-C11) ve 10 mg/kg dozda uygulanan morfin'in farelerin asetik asid kıvranma testinde ölçülen kıvranma sayıları üzerine etkileri Şekil 7'de verilmiştir. 20 mg/kg dozda uygulanan C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri, hayvanların kıvranma sayılarının, kontrol grubunun kıvranma sayılarına göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalmasına neden olmuştur. C7, C8 ve C11 kodlu test bileşiklerinin kıvranma sayılarını C3, C6, C9 ve C10 kodlu test bileşiklerine göre istatistiksel olarak daha anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. Referans ilaç olarak kullanılan morfin asetik asid kıvranma testinde hayvanların kıvranma sayılarını azaltarak beklenen analjezik etkiyi göstermiştir. Asetik asid kıvranma testinde C1, C2, C4 ve C5 kodlu bileşikler etkisiz bulunmuştur (Şekil 7). Asetik asid kıvranma testinde test bileşikleri (C1-C11) ve morfin uygulamalarının hayvanların

kıvrınma davranışlarını inhibe etme yüzdeleri Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 5. Sıcak plaka testinde çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının hayvanların % MPE değerleri üzerine etkisi.

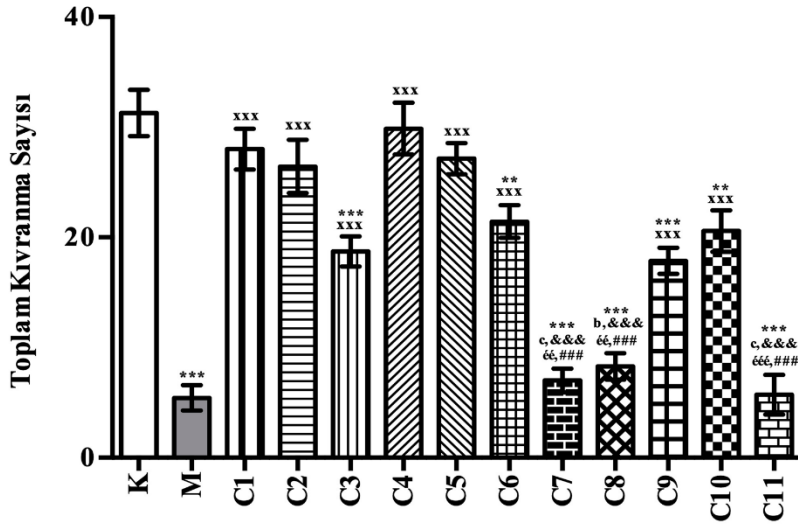
Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık xxx $p < 0.001$ ; C3 grubuna göre anlamlı farklılık † $p < 0.001$ ; C6 grubuna göre anlamlı farklılık &&& $p < 0.01$ , &&&& $p < 0.001$ ; C9 grubuna göre anlamlı farklılık éé $p < 0.01$ , ééé $p < 0.001$ ; C10 grubuna göre anlamlı farklılık # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , n=7.



Şekil 6. Sıcak plaka testinde çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C3, C6-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının ve nalokson (N) ön-tedavisinin hayvanların % MPE değerleri üzerine etkisi.

Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$ , ††† $p < 0.001$ ; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık xxx $p < 0.001$ ; C3 grubuna göre anlamlı farklılık a $p < 0.05$ , † $p < 0.001$ ; C6 grubuna göre anlamlı farklılık & $p < 0.05$ , &&&& $p < 0.001$ ; C7 grubuna göre anlamlı farklılık

<<<p<0.001; C8 grubuna göre anlamlı farklılık +++p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>cc</sup>p<0.01, <sup>ccc</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001; C11 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>^^</sup>p<0.001, n=7.



Şekil 7. Asetik asid kıvrınma testinde çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının hayvanların toplam kıvrınma sayıları üzerine etkisi.

Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık <sup>xxx</sup>p<0.001; C3 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001; C6 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>&&</sup>p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>cc</sup>p<0.01, <sup>ccc</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>###</sup>p<0.001, n=7.

Tablo 1. Morfin (10 mg/kg) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulanan grupların asetik asid kıvrınma testindeki % inhibisyon değerleri, n=7.

Tedavi	% İnhibisyon
Morfin	82.65
C1	10.50
C2	15.52
C3	40.18
C4	4.57
C5	13.24
C6	31.51
C7	77.63
C8	73.52
C9	42.92
C10	34.25
C11	81.74

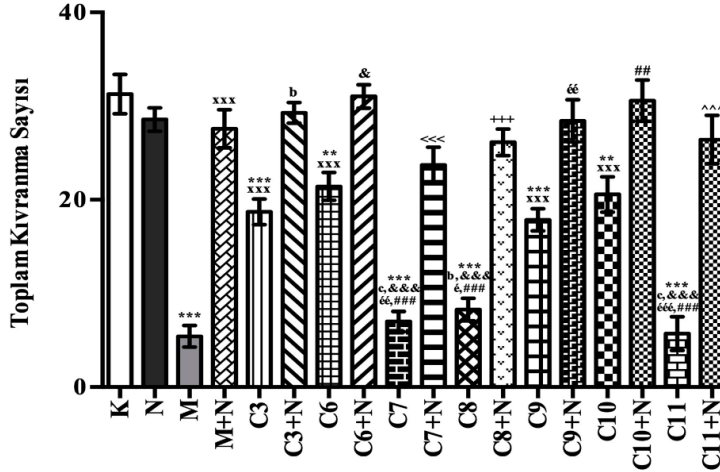
20 mg/kg dozda uygulanan C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin ve 10 mg/kg dozda uygulanan morfin'in

hayvanların kıvrınma davranışını inhibe ettiği görülmüştür.



Test bileşikleri (C3, C6-C11) ve morfin uygulamalarının neden olduğu antinosiseptif etki

üzerine nalokson ön-tedavisinin etkileri Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. Asetik asid kıvrınma testinde çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C3, C6-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının ve nalokson (N) ön-tedavisinin hayvanların toplam kıvrınma sayıları üzerine etkisi.

Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\*p<0.001; C3 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>b</sup>p<0.01, <sup>p</sup>p<0.001; C6 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>&</sup>p<0.05, <sup>&&&</sup>p<0.001; C7 grubuna göre anlamlı farklılık <sup><<<</sup>p<0.001; C8 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>+++</sup>p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>ε</sup>p<0.05, <sup>εε</sup>p<0.01, <sup>εεε</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001; C11 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>^^</sup>p<0.001, n=7.

Nalokson ön-uygulaması, C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin ve morfin'in uygulanmasına bağlı olarak toplam kıvrınma sayılarında görülen azalmayı anlamlı biçimde antagonize etmiştir (Şekil 8).

#### Formalin testi

20 mg/kg dozda uygulanan test bileşiklerinin (C1-C11) ve 10 mg/kg dozda uygulanan morfin'in farelerin formalin testinin birinci fazında ölçülen pençe yalama süreleri üzerine etkileri Şekil 9'da verilmiştir. 20 mg/kg dozda uygulanan C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri, hayvanların pençe yalama sürelerinin, kontrol grubunun pençe yalama sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalmasına neden olmuştur. C7, C8 ve C11 kodlu test bileşiklerinin pençe yalama sürelerini C3, C6, C9 ve C10 kodlu test bileşiklerine göre istatistiksel olarak daha anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. Referans ilaç olarak kullanılan morfin formalin testinin birinci fazında hayvanların pençe yalama sürelerini azaltarak beklenen analjezik etkiyi göstermiştir. Formalin testinin birinci fazında C1, C2, C4 ve C5 kodlu bileşikler etkisiz bulunmuştur (Şekil 9). Test bileşikleri (C3, C6-C11) ve morfin uygulamalarının formalin testinin birinci fazında neden olduğu

antinoseptif etki üzerine nalokson ön-tedavisinin etkileri Şekil 10'da verilmiştir. Nalokson ön-uygulaması, C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin ve morfin'in uygulanmasına bağlı olarak formalin testinin birinci fazında pençe yalama sürelerinde görülen azalmayı anlamlı biçimde antagonize etmiştir (Şekil 10). 20 mg/kg dozda uygulanan test bileşiklerinin (C1-C11) ve 10 mg/kg dozda uygulanan morfin'in farelerin formalin testinin ikinci fazında ölçülen pençe yalama süreleri üzerine etkileri Şekil 11'de verilmiştir.

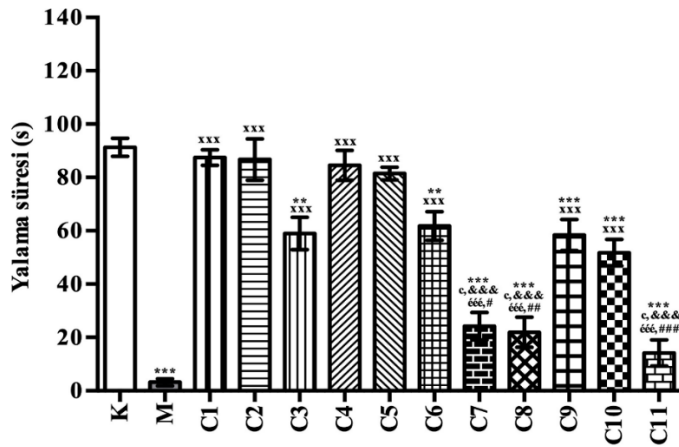
20 mg/kg dozda uygulanan C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri, hayvanların pençe yalama sürelerinin, kontrol grubunun pençe yalama sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalmasına neden olmuştur. C7, C8 ve C11 kodlu test bileşiklerinin pençe yalama sürelerini C3, C6, C9 ve C10 kodlu test bileşiklerine göre istatistiksel olarak daha anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. Referans ilaç olarak kullanılan morfin de formalin testinin ikinci fazında hayvanların pençe yalama sürelerini azaltarak beklenen analjezik etkiyi göstermiştir. Formalin testinin ikinci fazında C1, C2, C4 ve C5 kodlu bileşikler etkisiz bulunmuştur (Şekil 11).

Test bileşikleri (C3, C6-C11) ve morfin uygulamalarının formalin testinin ikinci fazında neden olduğu antinösetif etki üzerine nalokson ön-tedavisinin etkileri **Şekil 12'**de verilmiştir.

Nalokson ön-uygulaması, C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin ve morfin'in uygulanmasına bağlı olarak formalin testinin ikinci fazında pençe yalama sürelerinde görülen azalmayı anlamlı biçimde

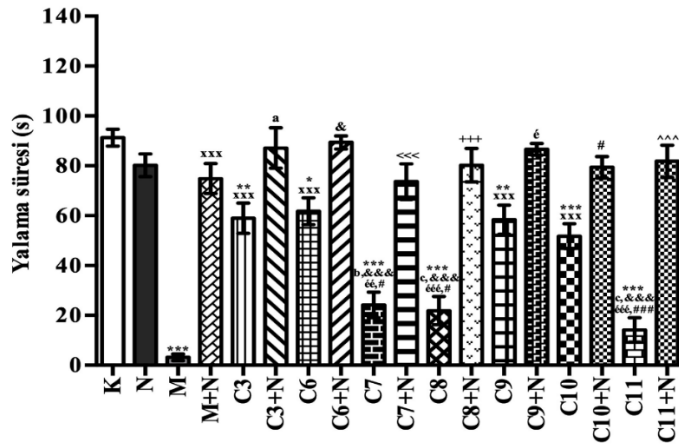
antagonize etmiştir (**Şekil 12**). Formalin testinde test bileşikleri (C1-C11) ve morfin uygulamalarının hayvanların pençe yalama sürelerini inhibe etme yüzdeleri **Tablo 2'**de verilmiştir.

20 mg/kg dozda uygulanan C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin ve 10 mg/kg dozda uygulanan morfin'in hayvanların pençe yalama sürelerini inhibe ettiği görülmüştür.



**Şekil 9.** Formalin testinin birinci fazında çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının hayvanların pençe yalama süreleri üzerine etkisi.

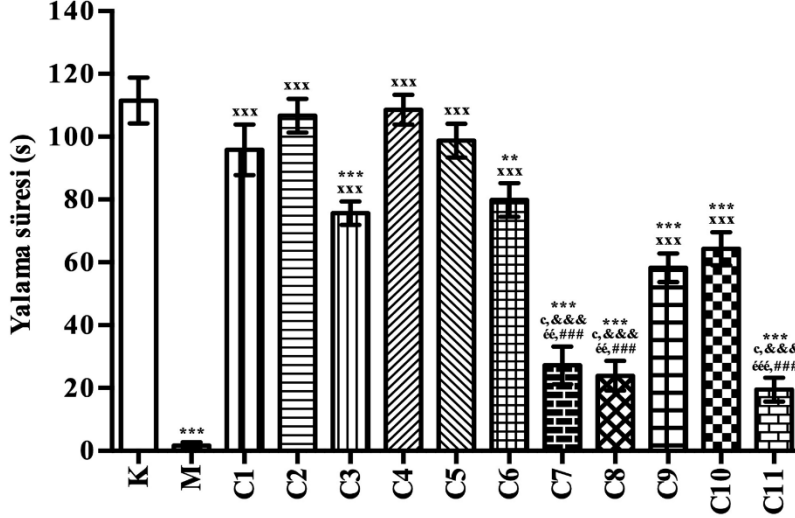
Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\*p<0.001; C3 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>c</sup>p<0.001; C6 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>&&&</sup>p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>ééé</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001, n=7.



**Şekil 10.** Formalin testinin birinci fazında çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C3, C6-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının ve nalokson (N) ön-tedavisinin hayvanların pençe yalama süreleri üzerine etkisi.

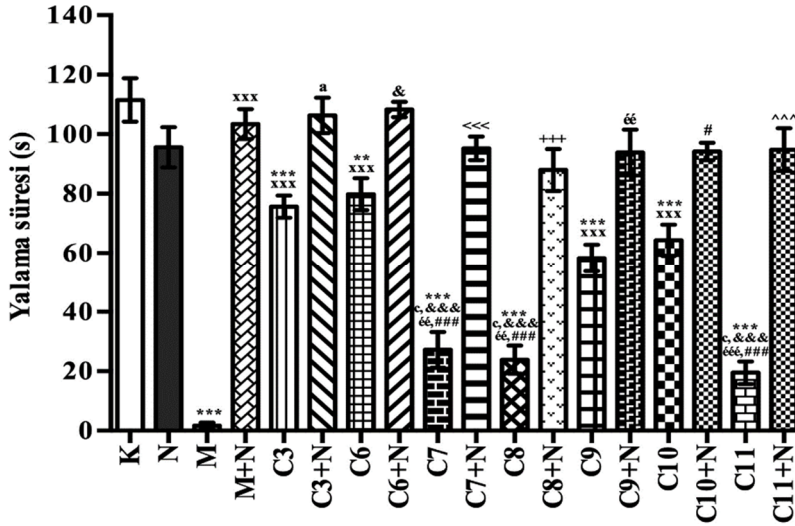
Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık <sup>a</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık <sup>xxx</sup>p<0.001; C3 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001; C6 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>&</sup>p<0.05, <sup>&&&</sup>p<0.001; C7 grubuna göre anlamlı

farklılık <<<p<0.001; C8 grubuna göre anlamlı farklılık +++p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>ε</sup>p<0.05, <sup>εε</sup>p<0.01, <sup>εεε</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık #p<0.05, ###p<0.001; C11 grubuna göre anlamlı farklılık ^^p<0.001, n=7.



Şekil 11. Formalin testinin ikinci fazında çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının hayvanların pençe yalama süreleri üzerine etkisi.

Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık <sup>xxx</sup>p<0.001; C3 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>ε</sup>p<0.05, <sup>εε</sup>p<0.01; C6 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>&&&</sup>p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>εε</sup>p<0.01, <sup>εεε</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>###</sup>p<0.001, n=7.



Şekil 12. Formalin testinin ikinci fazında çiçek yağı (K, kontrol), morfin (M, 10 mg/kg) ve test bileşikleri (C3, C6-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının ve nalokson (N) ön-tedavisinin hayvanların pençe yalama süreleri üzerine etkisi.

Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; Morfin grubuna göre anlamlı farklılık <sup>xxx</sup>p<0.001; C3 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>ε</sup>p<0.05, <sup>εε</sup>p<0.001; C6 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>&</sup>p<0.05, <sup>&&&</sup>p<0.001; C7 grubuna göre anlamlı farklılık <<<p<0.001; C8 grubuna göre anlamlı farklılık +++p<0.001; C9 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>εε</sup>p<0.01, <sup>εεε</sup>p<0.001; C10 grubuna göre anlamlı farklılık #p<0.05, ###p<0.001; C11 grubuna göre anlamlı farklılık <sup>^^^</sup>p<0.001, n=7.

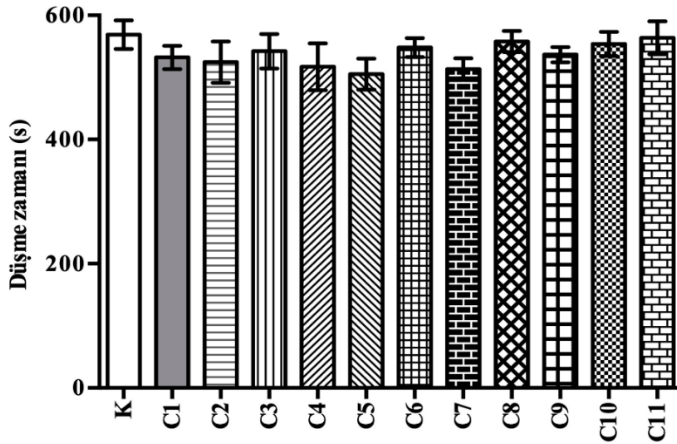
**Tablo 2. Morfin (10 mg/kg) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulanan grupların formalin testinin erken ve geç fazındaki % inhibisyon değerleri, n=7.**

Tedavi	Erken Faz % İnhibisyon	Geç Faz % İnhibisyon
Morfin	96.53	98.51
C1	4.23	14.08
C2	5.06	4.36
C3	35.43	32.17
C4	7.44	2.61
C5	10.79	11.48
C6	32.32	28.37
C7	73.54	75.59
C8	76.01	78.56
C9	36.07	47.74
C10	43.28	42.34
C11	84.46	82.51

### Dönen mil (Rota-Rod) testi

20 mg/kg dozda uygulanan test bileşiklerinin (C1-C11) Rota-Rod testinde farelerin motor koordinasyonları üzerine etkileri Şekil 13'de verilmiştir.

Test bileşikleri uygulanan dozda hayvanların dönen milden düşme sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 13).



**Şekil 13. Dönen mil testinde çiçek yağı (K, kontrol) ve test bileşikleri (C1-C11, 20 mg/kg) uygulamalarının hayvanların dönen milden düşme zamanları üzerine etkisi, n=7.**

### TARTIŞMA

Bu çalışmada, C1-C11 kodlu test bileşiklerinin olası antinosiseptif etkinliğini araştırmak için kuyruk sıkıştırma, sıcak plaka, asetik asid kıvranma ve formalin testleri uygulanmıştır. Kuyruk sıkıştırma testlerinde, C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri uygulamaları mekanik ağırlı uyarana karşı farelerin

reaksiyon sürelerini artırmış yani antinosiseptif etkiye neden olmuştur. Sıcak plaka testlerinde, C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri uygulamalarının farelerin reaksiyon sürelerinin uzamasına neden olması söz konusu türevlerin termal ağırlı uyarana karşı antinosiseptif etki gösterdiğini ortaya koymuştur. C3, C6-C11 kodlu test bileşikleri uygulamaları kimyasal ağırlı uyaraların uygulandığı asetik asid kıvranma testinde ve formalin testinde, sırasıyla farelerin

kıvrınma sayılarını ve pençe yalama sürelerini azaltarak antinosiseptif etkinlik göstermiştir. Sentezlenen türevlerin antinosiseptif etkinliklerinin değerlendirildiği tüm testler, serideki C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin termal, mekanik ve kimyasal ağırlı uyaranları taşıyan nosiseptif yollar üzerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Referans ilaç olarak kullanılan morfin kuyruk sıkıştırma, sıcak plaka, asetik asid kıvrınma ve formalin testlerinde beklenen analjezik etkiyi göstermiştir.

Kuyruk sıkıştırma ve sıcak plaka testleri santral antinosiseptif etkinliği araştırmak üzere uygulanan testlerdir. Kuyruk sıkıştırma testi özellikle spinal, sıcak plaka testi ise özellikle supraspinal nosisepsiyon ile ilişkili testlerdir<sup>32,42</sup>. Bu çalışmada, test edilen bileşiklerden C3, C6-C11 kodlu türevler hem kuyruk sıkıştırma hem de sıcak plaka testinde farelerin reaksiyon sürelerini uzatarak antinosiseptif etkinlik göstermiştir. Bu bulgular, söz konusu türevlerin santral antinosiseptif etkinlik gösterdiğini ve türevlerin antinosiseptif etkilerinde hem spinal hem de supraspinal mekanizmaların rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Asetik asid kıvrınma testi yeni bileşiklerin antinosiseptif etkinliklerinin değerlendirilmesi amacı ile kullanılan bir visseral ağrı modelidir<sup>43</sup>. Kimyasal ağırlı uyaran olan asetik asidin i.p. enjeksiyonu, hayvanların arka bacaklarının ve vücutlarının uzamasına ve karın kaslarının kasılmasına neden olur<sup>44</sup>. Fare kıvrınma testi sempatik sistem (biyojenik aminlerin salınımı), siklooksijenazlar ve metabolitleri ve opioid mekanizmalar gibi farklı nosiseptif mekanizmaları içerir. Asetik asid indirekt bir şekilde NSAİ ilaçlara ve/veya opioidlere duyarlı nosiseptif nöronları stimüle eden çeşitli endojen mediyatörlerin salınımına neden olur<sup>45-47</sup>. Bu çalışmada test edilen bileşiklerden C3, C6-C11 kodlu türevler farelerin kıvrınma sayılarını azaltmış ve hayvanları kıvrınma davranışını inhibe etmiştir. Söz konusu türevlerin uygulanması ile farelerin kıvrınma sayılarının azalması, periferik dokularda inflamatuvar mediyatörlerin salınımının azalması ya da reseptörlerinin direk blokajı ile ilişkili olabilir. Ayrıca bu antinosiseptif etki ağrı eşliğinin artması ya da ağrı uyaranının sinir lifine iletiminin engellenmesi ile de ilişkili olabilir.

Formalin testinin klinik ağrıya daha çok benzeyen bir model olduğu düşünülmektedir. Hayvanların pençelerinde formalin enjeksiyonuna bağlı olarak oluşan ağrının iki fazlı nosisepsiyona neden olduğu bilinmektedir. Formalin enjeksiyonundan hemen

sonra başlayan erken (nörojenik) faz yoğun nörojenik ağrı ile karakterizedir ve bu fazda nosiseptif uyaran periferik stimülasyondan sonra (nosiseptörlerin direkt stimülasyonu) özellikle C-lifleri tarafından taşınır. Bu nörojenik faz santral aracılıklı ağrıyı yansıtmaktadır. Formalin testinin ikinci fazı geç (inflamatuvar) fazdır. Medulla spinalis'in dorsal boynuzundaki yapısal ve işlevsel değişiklikler ile ilişkili olan geç fazda serotonin, histamin, bradikinin ve prostaglandinler gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınımı söz konusudur. Formalin testinin geç fazının, periferik mekanizmalar nedeniyle primer aferent nöronlarda devam eden aktivitenin yanı sıra santral nöronların periferik inflamasyon nedeni ile duyarlılaşmalarından kaynaklandığı kabul edilmektedir<sup>45,47,48</sup>. Formalin testi analjezik ilaçların ya da ajanların etki gücünü değerlendirmek ve analjezik etkinin mekanizmasını aydınlatmak için uygun bir testtir<sup>48,49</sup>. Narkotikler gibi santral analjezik ilaçlar formalin testinin her iki fazını da inhibe ederken steroidler ve NSAİ ilaçlar gibi periferik etkili ilaçlar testin geç fazını inhibe etmektedirler<sup>45,49</sup>.

Bu çalışmada test edilen bileşiklerden C3, C6-C11 kodlu türevler formalin testinin her iki fazında da farelerin pençe yalama sürelerini istatistiksel olarak anlamlı biçimde azaltmış ve hayvanların pençe yalama davranışını inhibe etmiştir. Söz konusu test maddelerinin uygulanması ile farelerin pençe yalama sürelerinin formalin testinin birinci fazında azalmış olması santral antinosiseptif etkinliğin değerlendirildiği kuyruk sıkıştırma ve sıcak plaka testlerinin sonuçlarını desteklemektedir. Diğer yandan, farelerin pençe yalama sürelerinin formalin testinin ikinci fazında azalmış olması ise periferik antinosiseptif etkinin değerlendirildiği asetik asid kıvrınma testinin sonuçlarını doğrulamaktadır.

Kuyruk sıkıştırma, sıcak plaka, asetik asid ve formalin testlerinin sonuçları, C3, C6-C11 kodlu test bileşiklerinin antinosiseptif etkilerinin hem santral hem de periferik mekanizmalar ile ilişkili olduğunu işaret etmektedir.

Rota-Rod testinden elde edilen bulgular, test edilen bileşiklerin farelerin motor koordinasyonları üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Farelerin motor koordinasyonlarının bozulmamış olması söz konusu antinosiseptif etkinin hayvanlarda oluşan herhangi bir motor koordinasyon bozukluğu ile ilişkili olmadığını ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada test edilen bileşiklerin hem santral hem de periferik düzeyde antinosiseptif etkiler göstermiş

olmaları, söz konusu antinosiseptif etkinin hem santral hem de periferik düzeyde etkili olduğu bilinen opioidlere benzer olabileceğini düşündürmüştür<sup>50,51</sup>. Diğer yandan, BW373U86<sup>16</sup>, DPI-3290<sup>17</sup> ve SNC-80<sup>18</sup> gibi çeşitli piperazin türevlerinin opioid sistem aracılıklı antinosiseptif etkinliklerini bildiren çalışmalar da göz önünde bulundurularak, bu çalışmada ortaya konulan antinosiseptif etkinliğe opioid mekanizmaların olası katılımının incelenmesi planlanmıştır. Bu amaçla non-selektif opioid reseptör antagonisti nalokson (5 mg/kg) ile antagonizma çalışmaları yapılmıştır. Deneyler sonucunda C3, C6-C11 kodlu test bileşikler uygulaması ile kuyruk sıkıştırma, sıcak plaka, asetik asid kıvrınma ve formalin testlerinde ortaya çıkan antinosiseptif etki nalokson ön-tedavisi ile antagonize edilmiştir. Bu bulgu, söz konusu türevlerin antinosiseptif etkilerinde opioid mekanizmaların rol oynadığını işaret etmektedir. Bu etkiler, türevlerin opioid reseptör agonisti aktiviteleri ve/veya endojen opioid salınımının stimülasyonu ile ilişkili olabilir.

Bu çalışma kapsamında antinosiseptif etkinlikleri araştırılan C1-C11 kodlu bileşiklerin farmakolojik aktiviteleri ile kimyasal yapıları arasındaki ilişkiler de incelenmiştir.

Lipofilité ilaçların etki yörelerine ulaşmasında ve biyolojik membranlardan geçerek farmakolojik etkilerinin ortaya çıkmasında önemli bir özelliktir<sup>52,53</sup>. Yüksek lipofilitéye sahip ilaçların kan beyin bariyerini daha kolay geçerek santral sinir sistemi (SSS)'nde etkinlik gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedenle, ilaçların lipofilik karakterlerinin bir göstergesi olan partiyon katsayısı (logP) test bileşikleri için ChemBioDraw 12.0 bilgisayar programı kullanılarak hesaplanmış ve etkili türevler ile olası bir korelasyon araştırılmıştır. Etkinliği test edilen bileşiklerin partiyon katsayıları **Tablo 3**'de belirtilmiştir.

**Tablo 3. Etkinliği test edilen bileşiklerin partiyon katsayıları**

Bileşik	logP	Bileşik	logP
C1	1.41	C7	3.97
C2	1.75	C8	4.04
C3	0.89	C9	3.64
C4	1.41	C10	3.52
C5	2.96	C11	4.86
C6	3.49		

**Tablo 3**'de görüldüğü gibi piperazin halkasının dördüncü konumunda fenil, 4-süstitü fenil veya benzhidril yapısal parçacıklarını taşıyan C6-C11 kodlu

bileşiklerin logP değerleri seri içerisindeki diğer türevlere göre daha yüksek düzeydedir. Bu bileşiklerin SSS'de daha yüksek konsantrasyonlarda bulunabilme ve SSS'de farmakolojik aktiviteden sorumlu endojen maddeler ile hidrofobik etkileşimlere girebilme olasılıkları diğer türevlere göre daha yüksektir. C6-C11 kodlu bileşiklerin antinosiseptif etkinlikleri bu olasılık ile ilişkilendirilebilir.

Lipofilik karakterin yüksek oluşu seri içerisindeki C6-C11 bileşiklerinin yapı etki ilişkilerini araştırmaya yardımcı olmakla birlikte tek başına yetersiz kalmaktadır. Çünkü seri içerisindeki C3 bileşiği, logP değeri en küçük bileşik olmasına rağmen antinosiseptif etkinliği ortaya konulan türevler arasındadır. C1-C5 kodlu bileşiklerin yapıları incelendiğinde, C3 kodlu bileşiğin hidrojen bağı yapma yeteneğine sahip tek türev olduğu görülmektedir. Bu bulgu, ilgili bileşiğin diğer bileşiklere göre hedef yöresinde daha fazla kimyasal etkileşimde bulunabileceğinin bir göstergesidir ve farmakolojik aktivitedeki artışın nedeni olarak gösterilebilir.

Sonuç olarak, yapı etki ilişkileri değerlendirmeleri, piperazin halkasının dördüncü konumundaki süstitüsyonun aktivite üzerindeki önemini ortaya koymaktadır. Bu konumda yer alan süstitüentlerin aromatik gruplar veya hidrojen bağı yapabilecek gruplar olması durumunda, antinosiseptif aktivite gösterme olasılığı bulunan bileşiklerin elde edilebileceği düşünülmektedir.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: ÜDÖ; Veri toplama: BDA; Veri analizi ve yorumlama: ÜDÖ; Yazı taslağı: ÜDÖ; İçeriğin eleştirel incelenmesi: ÜDÖ; Son onay ve sorumluluk: BDA, ÜDÖ; Teknik ve malzeme desteği: ÜDÖ; Süpervizyon: ÜDÖ; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Teşekkür:** Bu çalışmanın yazarları, test edilen 11 adet piperazin alkanol türevlerinin teminindeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Yusuf Özkay ve Doç. Dr. Leyla Yurttaş'a teşekkürlerini sunar.

**Author Contributions:** Concept/Design: ÜDÖ; Data acquisition: BDA; Data analysis and interpretation: ÜDÖ; Drafting manuscript: ÜDÖ; Critical revision of manuscript: ÜDÖ; Final approval and accountability: BDA, ÜDÖ; Technical or material support: ÜDÖ; Supervision: ÜDÖ; Securing funding (if available): n/a.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support

**Acknowledgement:** The authors of the present study appreciated Dr. Yusuf Özkay and Assoc. Dr. Leyla Yurttaş for their support in providing 11 piperazine alkanol derivatives tested.

## KAYNAKLAR

1. Nguelefack TB, Dutra RC, Paszcuk AF, Andrade EL, Tapondjou LA, Calixto JB. Antinociceptive activities

- of the methanol extract of the bulbs of *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa* in mice is dependent of NO-cGMP-ATP-sensitive-K(+) channel activation. *J Ethnopharmacol.* 2010;128:567-74.
- Buschmann H, Christoph T, Friderichs E, Maul C, Sundermann B (editors). *Analgesics: From chemistry and pharmacology to clinical application.* 1st ed., Germany: Weinheim: Wiley-VCH. 2002;1-264.
  - Jagerovic N, Cano C, Elguero J, Goya P, Callado LF, Meana JJ et al. Long-acting fentanyl analogues: synthesis and pharmacology of N-(1-phenylpyrazolyl)-N-(1-phenylalkyl-4-piperidyl)propanamides. *Bioorg Med Chem.* 2002;10:817-27.
  - Xiong Y, Zhao X, Sun Q, Li R, Li C, Ye J. Antinociceptive mechanism of the spirocyclopiperazinium compound LXM-10 in mice and rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;95:192-7.
  - Moore ND. In search of an ideal analgesic for common acute pain. *Acute Pain.* 2009;11:129-37.
  - Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56:387-437.
  - Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N et al. Opioid complications and side effects. *Pain Physician.* 2008;11:105-20.
  - Shaquizzaman M, Verma G, Marella A, Akhter M, Akhtar W, Khan MF et al. Piperazine scaffold: A remarkable tool in generation of diverse pharmacological agents. *Eur J Med Chem.* 2015;102:487-529.
  - Nozaki M, Niwa M, Imai E, Hori M, Fujimura H. (1,2-Diphenylethyl) piperazines as potent opiate-like analgesics; the unusual relationships between stereoselectivity and affinity to opioid receptor. *Life Sci.* 1983;33:431-4.
  - Nikolova M, Fajad K, Natova L. Synthesis and pharmacological screening of a group of piperazine derivatives. *Analgesic activity. Farmaco.* 1993;48:459-72.
  - Abdel-Salam OM, El-Batran S. Pharmacological investigation of trimetazidine in models of inflammation, pain and gastric injury in rodents. *Pharmacology.* 2005;75:122-32.
  - Biancalani C, Giovannoni MP, Pieretti S, Cesari N, Graziano A, Vergelli C et al. Further studies on arylpiperazinyl alkyl pyridazinones: discovery of an exceptionally potent, orally active, antinociceptive agent in thermally induced pain. *J Med Chem.* 2009;52:7397-409.
  - Kam YL, Rhee HK, Rhim H, Back SK, Na HS, Choo HY. Synthesis and T-type calcium channel blocking activity of novel diphenylpiperazine compounds, and evaluation of *in vivo* analgesic activity. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:5938-44.
  - Chen Y, Wang G, Xu X, Liu BF, Li J, Zhang G. Design, synthesis and biological activity evaluation of arylpiperazine derivatives for the treatment of neuropathic pain. *Molecules.* 2011;16:5785-806.
  - Chae E, Yi H, Choi Y, Cho H, Lee K, Moon H. Synthesis and pharmacological evaluation of carbamic acid 1-phenyl-3-(4-phenyl-piperazine-1-yl)-propyl ester derivatives as new analgesic agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22:2434-9.
  - Wild KD, McCormick J, Bilsky EJ, Vanderah T, McNutt RW, Chang KJ et al. Antinociceptive actions of BW373U86 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;267:858-65.
  - Gengo PJ, Pettit HO, O'Neill SJ, Wei K, McNutt R, Bishop MJ, Chang KJ. DPI-3290 [(+)-3-(alpha-R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-hydroxybenzyl)-N-(3-fluorophenyl)-N-methylbenzamide]. I. A mixed opioid agonist with potent antinociceptive activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307:1221-6.
  - Barn DR, Caulfield WL, Cottney J, McGurk K, Morphy JR, Rankovic Z et al. Parallel synthesis and biological activity of a new class of high affinity and selective delta-opioid ligand. *Bioorg Med Chem.* 2001;9:2609-24.
  - Falconner B, Pinhas H. Piperazine alkanols. *US Patent Appl. No: 782051 (1978).*
  - Li J, Wang G, Zhang G, Yang X, Xie P, Zhang L, Xu X, Wang Y. Substituted phenylpiperazinyl aralkylalcohol derivatives, Pharmaceutical compositions containing such derivatives and uses thereof. 2011;U.S Patent Appl. No:US20110294822A1.
  - Demir Özkay Ü, Yurttaş L, Özkay Y, Üçel UI, Can ÖD, Öztürk Y. Synthesis of new 1-phenyl-2-(4-substituted-piperazin-1-yl)-propanol derivatives and evaluation of their antidepressant-like effects. *Arch Pharm Res.* 2013;36:802-11.
  - Lynch ME. Antidepressants as analgesics: a review of randomized controlled trials. *J Psychiatry Neurosci.* 2001;26:30-6.
  - Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;96:399-409.
  - Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain.* 2009;5:20.
  - Park HJ, Moon DE. Pharmacologic management of chronic pain. *Korean J Pain.* 2010;23:99-108.
  - Can OD, Altıntop MD, Özkay UD, Üçel UI, Doğruer B, Kaplancikli ZA. Synthesis of thiazole derivatives bearing hydrazone moieties and evaluation of their pharmacological effects on anxiety, depression, and nociception parameters in mice. *Arch Pharm Res.* 2012;35:659-69.
  - Kaplancikli ZA, Turan-Zitouni G, Ozdemir A, Can OD, Chevallet P. Synthesis and antinociceptive activities of some pyrazoline derivatives. *Eur J Med Chem.* 2009;44:2606-10.

28. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1941;72:74-9.
29. Adeyemi OO, Okpo SO, Okpaka O. The analgesic effect of the methanolic extract of *Acanthus montanus*. *J Ethnopharmacol.* 2004;90:45-8.
30. Özkay UD, Can OD, Kaplancıklı ZA. Antinociceptive activities of some triazole and pyrazoline moieties-bearing compounds. *Med Chem Res.* 2012;21:1056-61.
31. Woolfe G, McDonald AD. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther.* 1944;80:300-7.
32. Gabra BH, Sirois P. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. *Peptides.* 2003;24:1131-9.
33. de Fátima Arrigoni-Blank M, Dmitrieva EG, Franzotti EM, Antonioli AR, Andrade MR, Marchioro M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). *J Ethnopharmacol.* 2004;91:215-8.
34. Ridditid W, Sae-Wong C, Reanmongkol W, Wongnawa M. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 2008;118:225-30.
35. Pavin NF, Donato F, Cibin FW, Jesse CR, Schneider PH, de Salles HD et al. Antinociceptive and anti-hypernociceptive effects of Se-phenyl thiazolidine-4-carboselenoate in mice. *Eur J Pharmacol.* 2011;668:169-76.
36. Koster R, Anderson M, De Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc.* 1959;18:412-5.
37. Demir Özkay U, Can OD. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;109:23-30.
38. Hunskaar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods.* 1985;14:69-76.
39. Ruangsang P, Tewtrakul S, Reanmongkol W. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory activities of *Curcuma mangga* Val and *Zizip* rhizomes. *J Nat Med.* 2010;64:36-41.
40. Rogers DC, Jones DN, Nelson PR, Jones CM, Quilter CA, Robinson TL et al. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res.* 1999;105:207-17.
41. Pollak D, Weitzdoerfer R, Yang YW, Prast H, Hoeger H, Lubec G. Cerebellar protein expression in three different mouse strains and their relevance for motor performance. *Neurochem Int.* 2005;46:19-29.
42. Wong CH, Dey P, Yarmush J, Wu WH, Zbuzek VK. Nifedipine-induced analgesia after epidural injection in rats. *Anesth Analg.* 1994;79:303-6.
43. De Souza MM, Pereira MA, Ardenghi JV, Mora TC, Bresciani LF, Yunes RA et al. Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;93:40-6.
44. Park SH, Sim YB, Kang YJ, Kim SS, Kim CH, Kim SJ et al. Hop extract produces antinociception by acting on opioid system in mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012;16:187-92.
45. Coelho LP, Reis PA, de Castro FL, Gayer CR, da Silva Lopes C, da Costa e Silva MC et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J Ethnopharmacol.* 2005;98:109-16.
46. Pinheiro MM, Bessa SO, Fingolo CE, Kuster RM, Matheus ME, Menezes FS et al. Antinociceptive activity of fractions from *Couroupita guianensis* Aubl. leaves. *J Ethnopharmacol.* 2010;127:407-13.
47. Pinheiro MM, Boylan F, Fernandes PD. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: evidence for the involvement of apigenin. *Life Sci.* 2012;91:293-300.
48. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 1992;51:5-17.
49. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 1987;30:103-14.
50. Kanjhan R. Opioids and pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22:397-403.
51. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53:597-652.
52. Testa B, Crivori P, Reist M, Carrupt PA. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. *Perspect Drug Discov Des.* 2000;19:179-211.
53. Patil M, Hunoor R, Gudasi K. Transition metal complexes of a new hexadentate macrocyclic N2O4-donor Schiff base: inhibitory activity against bacteria and fungi. *Eur J Med Chem.* 2010;45:2981-86.