



Dipiron'un Analjezik Aktivitesi Üzerine H₂S'in Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması

The Effects of H₂S on the Analgesic Activity of Dipyrone in Rats

¹Kevser Erol, ¹Çiğdem Çengelli Ünel, ²Mahsum Ayaz, ²Enes Yeşiltuna, ²Ezgi Demir, ²Hamza Dalçınar, ²Bengihan Özcan

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye
²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 2. Sınıf Öğrencileri, Eskişehir, Türkiye

Özet: Dipiron antipiretik, analjezik ve antiinflamatuar etkileri olan pirazolön türevi bir ilaçtır. Postoperatif ağrı, kanser ağrısı, kolik ağrıları ve migren tedavisinde kullanılmaktadır. Analjezik etkisinin santral ve periferik yolla olduğu bilinmektedir. İstenmeyen ciddi yan etkileri olabilir. Hidrojen sülfür (H₂S) aktif-radikal bir gazdır. Somatik, nöropatik ve viseral ağrı üzerine etkisi olduğu, inflamasyonu azalttığı gözlenmiştir. Dipironun santral ve periferik antinosiseptif etkileri ve bu etkilerde H₂S'in katkısı değerlendirilmiştir. Otuz adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanılmıştır. İlaç uygulamasından 30 dakika önce tail clip ve hot plate test ölçümleri alınıp, kontrol grubuna serum fizyolojik, diğer gruplara Dipiron (50-100 mg/kg, i.p); NaHS (5mg/kg, i.p); NaHS (5mg/kg, i.p) + Dipiron (50mg/kg, i.p) verilmiştir. Uygulamadan bir saat sonra ölçümler tekrarlanmış, %0.6 asetik asid 60 mg/kg ip verildikten 5 dakika sonra kıvranma sayıları 10 dakika boyunca kaydedilmiştir. Latens, %MPE (olası maksimal etki) ve kıvranma sayısı kaydedilmiştir. İki ve tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Dipiron tail clip testinde anlamlı antinosiseptif etki göstermezken, 100 mg/kg dozda hot plate ve kıvranma testinde belirgin analjezik etki göstermiştir. NaHS, hot plate testinde latensi anlamlı uzatmış, tek başına kıvranma testinde belirgin aktivite göstermemiştir. 50 mg/kg dipiron ile kombine edildiğinde hot plate ve kıvranma testinde 100 mg/kg dipironun tek başına oluşturduğu etkiden daha fazla analjezik etki oluşturmuştur. Dipiron (50-100 mg/kg) santral yolla antinosiseptif etki göstermiş, 50 mg/kg dipiron periferik yolla etki göstermemiştir. NaHS santral antinosiseptif etki gösterip, periferik yolla göstermemiştir. NaHS (50 mg/kg) dipiron ile kombine edildiğinde antinosiseptif etkisi santral ve periferik yolla (100 mg/kg) dipironun etkisi kadar olmuştur. H₂S dipironun analjezik etkisini santral ve periferik yolla artırdığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antinosiseptif etki, dipiron, hidrojen sülfür

Abstract: Dipyrone is an analgesic, antipyretic and antiinflammatory drug that has been used for treating postoperative, colic, cancer pain, and migraine. It has some adverse effects such as of bone marrow suppression, sodium and water retention, and gastroenteropathy. Hydrogen sulfide (H₂S) is a active-radical gas. The precursors of H₂S were reported to overcome some drug side-effects. H₂S was also shown to have activity against several pain-related situations. Study aimed to evaluate the contribution of H₂S on central and peripheral antinociceptive activity of dipyrone. Male six weeks old Sprague Dawley rats were divided into five groups (n=6): Control (Saline, ip); dipyrone (50 or 100 mg/kg i.p); NaHS (5mg/kg ip); NaHS (5mg/kg) + dipyrone (50 mg/kg). Tail clip and hot plate tests were applied to the animals 30 minutes before and one hour after the drug injections. Five minutes after the injection of 60 mg/kg acetic acid (%0,6), stretching number was counted for ten minutes. The results were expressed as mean±SEM of latency, %MPE (maximal possible effect) and stretching number. One way and two way ANOVA tests were used for statistical analysis. P<0.05 was accepted as significant. Both doses of dipyrone did not have a significant activity on tail clip test, but 100 mg/kg dipyrone showed significant antinociceptive activity on hot plate and stretching tests. NaHS (5 mg/kg) was increased latency only on hot plate test. But the combination of NaHS with dipyrone has significant antinociceptive activity. It seems that H₂S increased the antinociceptive activity of dipyrone both central and peripherally.

Keywords: Antinociceptive activity, dipyrone, hydrogen sulfide

Received 11.25.2019

Accepted 05.06.2020

Online published 10.07.2020

ORCID ID of the authors: K.E 0000-0002-8808-6616, Ç.ÇÜ 0000-0001-7680-0141, M.A0000-0002-7526-0216, E.Y 0000-0002-3769-9156, E.D 0000-0002-5929-8855, H.D 0000-0002-0554-3069, B.Ö 0000-0003-2623-0886

Erol K, Çengelli Ünel Ç, Ayaz M, Yeşiltuna E, Demir E, Dalçınar H, Özcan B, Dipiron'un Analjezik Aktivitesi Üzerine H₂S'in Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması, *Türk Tıp Öğrencileri Araştırma Dergisi*, 2020;2(2):90-96

Yazışma Adresi: **Çiğdem ÇENGELLİ ÜNEL** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye
mail: cigdemcengelli@gmail.com

1. Giriş ve Amaç

Dipiron (metamizol sodyum; kimyasal ismi, sodyum N-(2,3-dimetil-5-okso-1-fenil-3-pirazolin-4-yl)-N-metilaminometansulfonat, genellikle monohidrat) antipiretik, analjezik ve antiinflamatuvar etkileri olan bir pirazolon türevidir. Yaygın olarak postoperatif ağrı, kolik ağrıları, kanser ağrısı ve migren tedavisinde kullanılmaktadır (1). Dipironun analjezik etkisi altında yatan moleküler mekanizmalar hala araştırılmaktadır. Hem santral hem de periferik antinosiseptif etkileri olduğu bilinmektedir. Santral siklooksijenaz-3 enziminin inhibisyonu (2), kannabinoid system (3) ve opioiderjik sistemlerin (4) aktivasyonu dipironun analjezik etkisinde esas mekanizmayı oluşturur. Santral sinir sisteminde PGE₂ sentezinin bloke edilmesiyle ağrı mediyatörlerine karşı nosiseptör duyarlılığında azalma meydana gelir ve analjezik etki ortaya çıkar. Bunun yanı sıra dipironun aktif metabolitleri MAA (4-metil-amino-antipirin) ve AA (4-aminoantipirin) CB₁ reseptörlerine agonist etki gösterir. CB₁ reseptör aktivasyonu periakvaduktal gri maddedeki GABAerjik transmisyonu azaltır, glutamaterjik nöronların aktivasyonunu inhibe eder dolayısıyla antinosisepsiyon meydana gelir (4). Göreceli olarak güvenli olduğu düşünülse de istenmeyen yan etkileri oldukça ciddi olabilir. Duyarlı kişilerde agranülositoz ve aplastik anemi dahil kemik iliği depresyonu yapabilir (5). Ek olarak metamizol tedavisi alan kişilerde advers kardiyovasküler olay görülme sıklığı belirgin bir şekilde yüksek olduğu da görülmüştür (6).

H₂S (hidrojen sulfur) aktif-radikal özelliği taşıyan bir gazdır. Sentezinde sistation beta sentaz (CBS) ve sistation gama liyaz (CSE) enzimleri rol oynamaktadır. H₂S, SSS'de, kardiyovasküler sistemde, karaciğer ve böbrekte yüksek düzeyde bulunabilmektedir. Son zamanlarda H₂S saliverici bazı maddelerin ilaç olarak geliştirilmesi, bazı istenmeyen yan etkileri ortadan kaldırmak açısından oldukça önem taşımaktadır (7). Çeşitli çalışmalarda H₂S'in somatik, nöropatik ve viseral ağrı üzerine etkisi olduğu aynı zamanda inflamasyonu da azalttığı gözlenmiştir (8). Farelerle yapılan bir çalışmada in vivo H₂S gazı salan GIC-1001 kolorektal distansiyon ile indüklenen viseral

ağrı modelinde ağrıyı önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (9). Yine H₂S gazı salan naproksen türevi ATB-346 ile yapılan çalışmada artrit modeli uygulanmış ve naproksene oranla daha iyi antinosiseptif etki gösterdiği belirtilmiştir (10).

Bu çalışmada deneysel ağrı modellerinde dipiron ve beraberinde verilen hidrojen sülfürün dipironun analjezik etkilerine katkısı değerlendirilecektir.

2. Gereç ve Yöntem

Çalışmada, erkek, 6 haftalık Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar temin edildikten sonra, sıcaklık kontrolü sağlanan odada (22-23°C) 12 saat aydınlık/karanlık döngüde, yeme ve suya erişimleri serbest olacak şekilde barındırılmıştır. Hayvanlar bir hafta süre ile hayvan laboratuvarında adaptasyon için tutulmuştur. Etik Kurul onayı ESOGÜ HADYEK'ten alınmıştır. (10.12. 2018 tarih ve 699 sayı)

Çalışmamızda 5 grup olacaktır. Her grupta 6 sıçan olacaktır

Kontrol (serum fizyolojik)

Dipiron (50 mg/kg, i.p)

Dipiron (100 mg/kg, i.p)

NaHS (5 mg/kg, i.g ; H₂S donor)

NaHS (5 mg/kg, i.g) + Dipiron (50 mg/kg, i.p)

Asetik asit testi dışında diğer ağrı deneylerinde ilaçlar uygulanmadan yarım saat önce bazal ölçümler alınmıştır. NaHS ve dipiron injeksiyonları eş zamanlı yapılmış ve takiben 1 saat sonrasında ağrı deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Deneysel ağrı modelleri

Tail clip Testi (11)

Arter klipsi hayvanların kuyruk ucunun 2-2.5 cm yukarısından sıkıştırılacak şekilde yerleştirilir. Klipsi ısırma ya da klipseye doğru yönelmesine kadar geçen süre saniye olarak

kaydedilir. Doku hasarını engellemek amacıyla cut off değeri 20 sn olarak belirlenmiştir.

Sıcak plaka testi (hot plate) (12)

Sistem temel olarak 50-56 °C'ye ısıtılmış bir yüzeyden (bakır veya alüminyum) oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bölge sınırlarında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam veya pleksiglas silindirlere kullanılır. Yüzeye sıçanın bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar geçen süre tespit edilir. Hayvanın arka ayağını çekmesinin yanı sıra ayak çekme ve yalama, tekmeleme, sallama, dans etme veya sıçrama refleksleri de kabul edilir. Doku hasarını önlemek için cut-off süresi 30 sn. olarak belirlenmiştir (18). Bu çalışmada standardizasyon açısından 53 °C sıcaklık kullanılmıştır. İlaçlar injekte edilmeden yarım saat önce hayvanların sıcaklığa tepkisini ölçmek amacıyla bazal ölçüm alınmıştır. Daha sonrasında ilaçlar uygulanıp 60 dk sonra ön ve arka ayaklarını yalaması ve zıplama sayıları kaydedilmiştir. Sonuçlar latens ve %MPE (olası maksimal etki) olarak değerlendirilmiştir.

$$\%MPE=[T1-T0/T2-T0]*100$$

T0: Bazal ölçüm değeri

T1: İlaç sonrası ölçüm

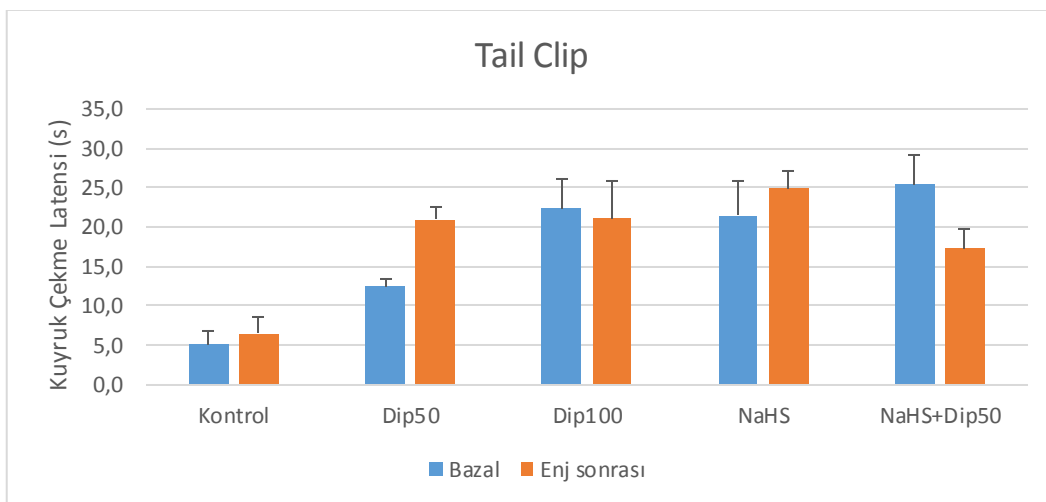
T2: Cut off

Asetik asit testi (13)

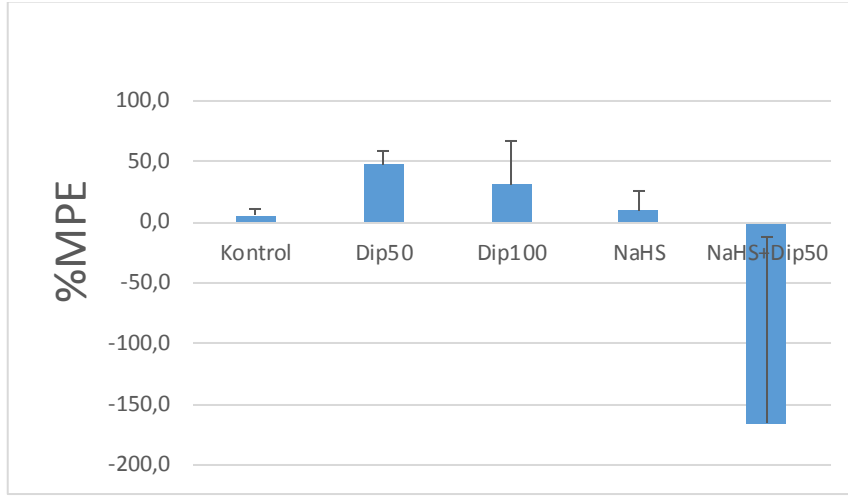
Genellikle hayvanlarda uygulanan akut viseral ağrı modelidir. Karın içine %0.6 asetik asit 60 mg/kg ip olarak hayvanlara uygulandıktan 5 dk sonrasında kıvrınma hareketleri (abdominal kasılmalar, gövde hareketleri, dorsoabdominal kasların kasılması) ve onu izleyen arka ayaklarda ekstansiyon 10 dk boyunca gözlemlenmiş ve kasılma sayıları sayılmıştır.

Sonuçlar ortalama± Standart Hata olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz için SPSS 21.0 ve Sigma STAT programları kullanılmıştır. *Tail Clip* ve sıcak plaka testi verilerinin değerlendirilmesinde iki yönlü ANOVA testi ve asetik asit kıvrınma testi verilerinin değerlendirilmesinde tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Bütün çoklu karşılaştırmalar Student Newman Keuls metoduyla değerlendirilmiştir. P<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

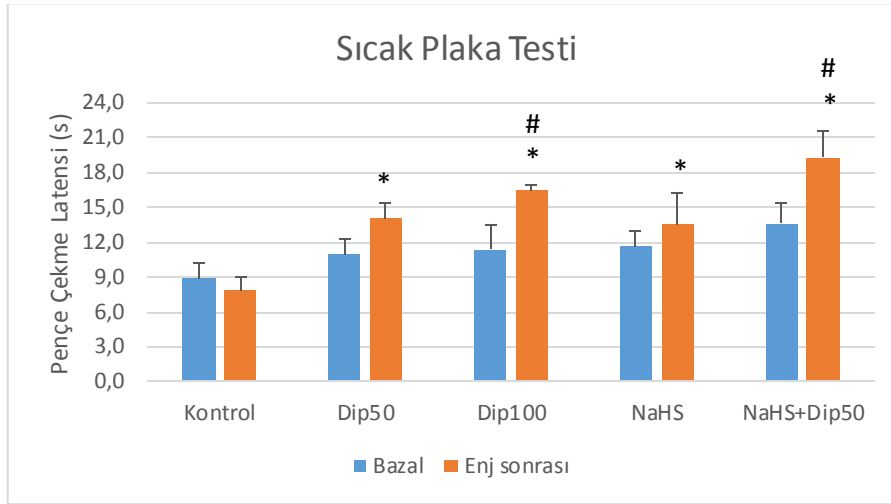
3. Bulgular



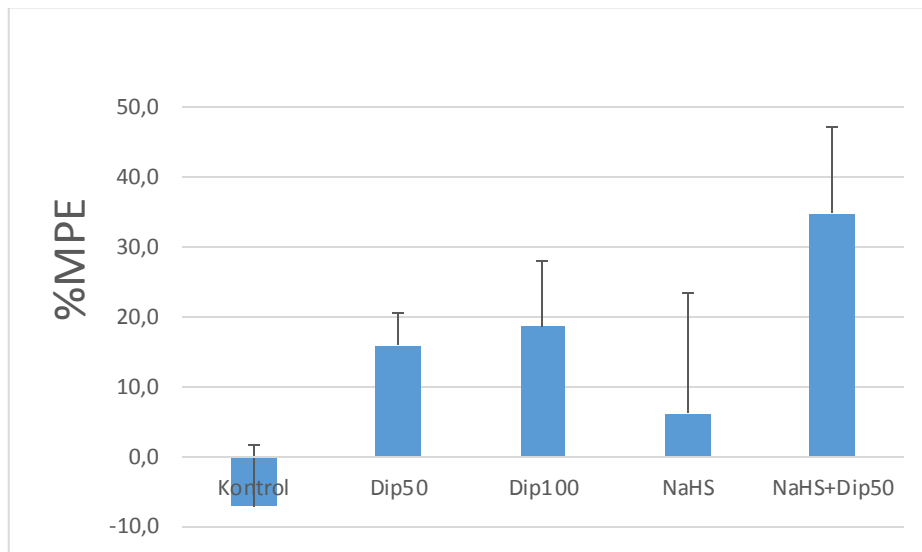
Şekil 1. Tail Clip testinde latens değerleri



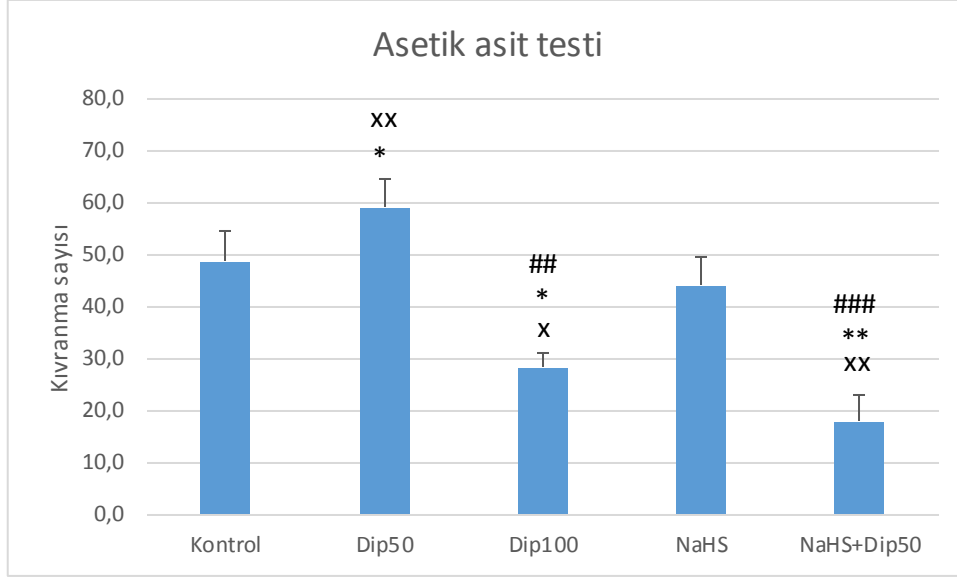
Şekil 2. Tail Clip %MPE değerleri



Şekil 3. Hot plate latens değerleri.*:p<0.05 kontrole göre, #:p<0.05: grubun bazal değerine göre



Şekil 4. Hot plate %MPE değerleri



Şekil 5. Kıvrınma testi sonuçları.

###: $p < 0,001$, ##: $p < 0,01$ Dip 50'ye göre; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ Kontrol değere göre; x: $p < 0,05$, xx: $p < 0,01$ NaHS'ye göre

Sonuç olarak Dipiron tail clip testinde anlamlı bir antinosiseptif etki göstermezken 100 mg/kg dozunda hot plate ve kıvrınma testinde belirgin analjezik etki göstermiştir. NaHS, hot plate testinde latensi anlamlı olarak uzatmış ancak tek başına kıvrınma testinde belirgin bir aktivite göstermemiştir. Oysa 50 mg/kg dipiron ile kombine edildiğinde hot plate ve kıvrınma testinde 100 mg/kg dipironun tek başına oluşturduğu etkiden daha fazla analjezik etki oluşturmuştur.

4. Tartışma

Bu çalışmada 100 mg/kg dipiron'un hem santral hem de periferik yolla antinosiseptif etki gösterdiği halde 50 mg/kg sadece santral yolla antinosiseptif etki gösterdiği belirlenmiştir. NaHS ise 50 mg/kg dozda uygulanan dipironun etkisini hem santral hem de periferik olarak belirgin olarak artırdığı saptanmıştır.

Dipironun santral antinosiseptif etkilerinde kannabinoid (3), opioid (4) ve COX -1 ve 3 enzimlerinin inhibisyonu (2) yanında santral serotonerjik ve noradrenerjik sistemlerin (14) de katkısının olduğu bilinmektedir. Periferik antinosiseptif etkilerinin yanında spazmolitik etkisinin de bulunması (15) onun ağrı kesici olarak yaygın bir şekilde kullanılmasına yol açmaktadır. Ancak nonsteroidal analjeziklerin

en önemli yan etkilerinden biri olarak sindirim sistemi rahatsızlıkları olmaktadır.

Bunun yanı sıra dipironun aktif metabolitleri MAA (4-metil-amino-antipirin) ve AA (4-aminoantipirin) CB1 reseptörlerine agonist etki göstermektedir. CB1 reseptör aktivasyonu periakvaduktal gri maddedeki GABAerjik transmisyonu azaltır, glutamaterjik nöronların aktivasyonunu inhibe eder dolayısıyla antinosisepsiyon meydana gelir (4).

Kimyasal yapısı suya benzeyen H₂S'in memelilerde pH'sının 7.4 olduğu bilinmektedir (16). NaHS'in de H₂S'in fizyolojik donörü olduğu bilinmektedir. H₂S donörlerinin antiinflamatuvar etkilerinin bulunduğu ve bu etkilerde intraselüler nitrit ve proinflamatuvar sitokinlerin (TNF-alfa ve COX-2) düzeylerinde azalma, antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-10, HO-1) düzeylerinde yükselmeye yol açmalarının katkısı olduğu öne sürülmüştür (17). Bunun yanında kükürtlü bir bileşik olan dimetiltrisülfid'in TRPA1 ve somatostatin (sst4) reseptörlerini aktive ederek duyuşal nöronlardan somatostatin salınmasına yol açmasıyla analjezik etki oluşturduğu göstermiştir (18). Bozulmuş yumurta kokusunda bir gaz olan H₂S'in nörotransmitter ve nöromodülatör rollerinin olduğu kabul edilmektedir (19).

Bu çalışmada da kullanılan düşük dozdaki dipiron periferik antinosseptif etki göstermediği halde H₂S ile birlikte kullanıldığında yaklaşık 100 mg/kg dozdaki dipiron dan daha güçlü santral ve periferik antinosseptif etki göstermiştir. Ancak santral etki spinal düzeyde saptanamadığı halde supraspinal düzeyde görülmüştür. Bunda dipironun santral nörotransmitterlerle etkileşmesi yanında H₂S'in sitokinler ve COX-2 üzerindeki etkileri ve TRPA1 ve sst4 reseptörleri ile etkileşiminin sinerjistik etkisini olduğu öne sürülebilir. Ancak mekanizmanın anlaşılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara gerek bulunmaktadır.

5. Sonuç

Dipiron 50 ve 100 mg/kg dozda santral yolla antinosseptif etki göstermiş, ancak 50 mg/kg dipiron periferik yolla bu etkiyi gösterememiştir. Oysa kullanılan dozlarda dipironun spinal düzeydeki antinosseptif etkisi belirgin olmamıştır. NaHS'de santral yolla antinosseptif etki gösterdiği halde periferik yolla gösterememiştir. Oysa NaHS 50 mg/kg dozda dipiron ile kombine edildiğinde antinosseptif etkisi hem santral hem de periferik yolla 100 mg/kg dozdaki dipironun etkisi kadar olmuştur. Sonuç olarak analjezik ilaçlarla H₂S donörlerinin kombine kullanılmasıyla analjezik dozunun azaltılabileceği bunun da yan etkileri azaltılabileceği ön görülebilir.

KAYNAKLAR

1. Derry S, Faura C, Edwards J, McQuay HJ, Moore RA. Single-dose dipyron for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;CD003227
2. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13926-31.
3. Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, Watzer B, Schlosburg J, Lichtman AH, Cascio MG, Bisogno T, Di Marzo V, Nu'sing R, Imming P, et al. Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorg Med Chem* 2012;20:101-7
4. Tortorici V, Vanegas H Opioid tolerance induced by metamizol (dipyron) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *Eur J Neurosci* 2000;12:4074-80
5. Hedenmalm K, Spigset O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole). *Eur J Clin Pharmacol* 2002;58:265-74.
6. Kötter, T., da Costa, B. R., Fässler, M., Blozik, E., Linde, K., Jüni, P., Reichenbach, S., Scherer, M et al. Metamizole-associated adverse events: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 2015;10:e0122918.
7. Chávez-Pina A.E. et. al. Inhibition of Endogenous Hydrogen Sulfide Synthesis by PAG Protects Against Ethanol-Induced Gastric Damage in The Rat. *Eur. Journal of Pharmacology* 2010;630:131-6
8. Distrutti E. Hydrogen sulphide and pain. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011;10:123-32.
9. Cenac N. et al., A novel orally administered trimebutine compound (GIC-1001) is antinociceptive and features peripheral opioid agonistic activity and Hydrogen Sulphide-releasing capacity in mice. *Eur J Pain* 2016;20:723-30
10. DIEF A.E., Hydrogen sulfide releasing naproxen offers better anti-inflammatory and chondroprotective effect relative to naproxen in a rat model of zymosan induced arthritis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2015;19:1537-46
11. Mehanna MM, Domiati S, Nakkash Chmaisse H, El Mallah A. Antinociceptive effect of tadalafil in various pain models: Involvement of opioid receptors and nitric oxide cyclic GMP pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;352:170-5.
12. Kuraishi, Y.; Harada, Y.; Aratani, S.; Satoh, M.; Takagi, H. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res*. 1983;273:245-52.
13. Koster, R., Anderson, M. and De Beer, E.J. Acetic Acid for Analgesic Screening. *Federation Proceedings*, 1959;18:412-7.
14. Gencer A, Gunduz O, Ulugol A. Involvement of Descending Serotonergic and Noradrenergic Systems and their Spinal Receptor Subtypes in the Antinociceptive Effect of Dipyron. *Drug Res (Stuttg)*. 2015;65:645-9.
15. Laird JM, Roza C, Olivar T. Antinociceptive activity of metamizol in rats with experimental ureteric calculosis: central and peripheral components. *Inflamm Res*. 1998;47:389-95.

16. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev.* 2012;92:791-896.
17. Li M, Li J, Zhang T, Zhao Q, Cheng J, Liu B, Wang Z, Zhao L, Wang C. Syntheses, et al toxicities and anti-inflammation of H(2)S-donors based onnon-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem.* 2017;138:51-65.
18. Pozsgai G, Payrits M, S ghy  , Sebesty n-B tai R, Steen E, Sz ke  , S ndor Z, Solym r M, Garami A, Orvos P, T losi L, Helyes Z, Pint r E. Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst(4) receptors. *Nitric Oxide.* 2017;65:10-21.
19. Shefa U, Yeo SG, Kim MS, Song IO, Jung J, Jeong NY, Huh Y. Role of Gasotransmitters in Oxidative Stresses, Neuroinflammation, and Neuronal Repair. *Biomed Res Int.* 2017:1689341.