



TOFISOPAM'IN OPIOİDERJİK SİSTEM ARACILIKLI ANTİNOSESİPTİF ETKİNLİĞİ

OPIOİDERGIC SYSTEM-MEDIATED ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF TOFISOPAM

Nazlı TURAN YÜCEL¹ , Umut İrfan ÜÇEL^{2*} , Cevşen YAZICI³ ,
Ümide DEMİR ÖZKAY¹ , Özgür Devrim CAN¹ 

¹ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 26470, Eskişehir, Türkiye

² Bayburt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 69000, Bayburt, Türkiye

³Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, 26470, Eskişehir,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Tofisopam'ın antinosiseptif etkinlik potansiyelinin araştırılması ve bu etkiye opioiderjik sistemin olası katılımının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Tofisopam'ın (25 ve 50 mg/kg) antinosiseptif etkinlik potansiyeli sıcak plaka ve asetik asit ile indüklenen kıvranma testleri ile araştırılmış; farelerin motor koordinasyonları üzerindeki olası etkileri ise Rota-rod testi ile değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Tofisopam 50 mg/kg dozda, farelerin sıcak plaka testlerindeki reaksiyon sürelerini anlamlı ölçüde uzatmış; kıvranma testlerinde ise kıvranma davranışlarının sayılarını azaltmıştır. Bu bulgular Tofisopam'ın santral ve periferik mekanizmalar aracılıklı antinosiseptif aktiviteye sahip olduğuna işaret etmiştir. Tofisopam, uygulandığı dozlarda, farelerin motor aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Antinosiseptif etkiye opioid reseptörlerin olası katılımını araştırmak amacı ile yapılan nalokson ön-uygulamaları Tofisopam'ın antinosiseptif aktivitesini ortadan kaldırmıştır. Etkiye aracılık eden opioid reseptör alt-tiplerinin aydınlatılması amacıyla naloksonazin (μ -opioid reseptör blokörü), naltrindol (δ -opioid reseptör blokörü) ve nor-binaltorfimin (κ -opioid reseptör blokörü) ile mekanistik çalışmalar yapılmıştır. Her üç ajan da Tofisopam'ın antinosiseptif etkisini antagonize etmiştir. Elde edilen bu bulgular Tofisopam'ın 50 mg/kg dozdaki antinosiseptif etkinliğine μ -, δ - ve κ -opioid reseptörlerin aracılık ettiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Analjezi, asetik asit ile indüklenen kıvranma testi, opioiderjik reseptör, sıcak plaka testi, tofisopam

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Umut İrfan Üçel
e-posta / e-mail: umutucel@bayburt.edu.tr, Tel. / Phone: +904582111171/1836

ABSTRACT

Objective: *In this study, it was aimed to investigate antinociceptive activity potential of Tofisopam and to elucidate the possible involvement of opioid system in this effect.*

Material and Method: *The antinociceptive efficacy potential of Tofisopam (25 and 50 mg/kg) was evaluated by hot-plate and acetic acid-induced writhing tests; while possible effects of this drug on the motor coordinations of mice were evaluated with the Rota-rod tests.*

Result and Discussion: *Tofisopam at a dose of 50 mg/kg significantly prolonged the reaction times of mice in hot-plate tests and reduced the number of writhing behaviors in writhing tests. These findings indicated that Tofisopam has antinociceptive activity mediated by central and peripheral mechanisms. Tofisopam did not change the motor activities of mice at administrated doses. Pre-administration of naloxone to investigate the possible involvement of opioid receptors in the antinociceptive effect abolished the antinociceptive activity of Tofisopam. To elucidate the opioid receptor subtypes mediating the effect, mechanistic studies were carried out with naloxonazine (μ -opioid receptor blocker), naltrindole (δ -opioid receptor blocker), and nornalntorphimine (κ -opioid receptor blocker). All agents antagonized the antinociceptive effect of Tofisopam. Obtained findings revealed that Tofisopam at a dose of 50 mg/kg has antinociceptive activity mediated by μ -, δ - and κ -opioid receptors.*

Keywords: *Analgesia, acetic acid-induced writhing test, hot-plate test, opioidergic receptor, tofisopam*

GİRİŞ

Geleneksel 1,4-benzodiazepin'lerin kimyasal yapılarındaki nitrojen atomlarının yerlerinin değiştirilmesi ile elde edilen 2,3-benzodiazepin yapılı moleküllere homofitalazinler adı verilmektedir [1,2]. Bu grubun ilk ilacı olan ve 1976'da Grandaxin® ticari adı ile ruhsatlandırılan Tofisopam, Macaristan, Çek Cumhuriyeti, Japonya ve Rusya gibi ülkelerde anksiyolitik etkisi nedeniyle reçete edilmektedir [3,4]. 2,3-benzodiazepin yapısına sahip olan "girisopam" ve "nerisopam" da Tofisopam gibi anksiyolitik etkinliğe sahip olan moleküllerdir [1,2,5,6].

Tofisopam'ın psikofarmakolojik etkinlik profili klasik 1,4-benzodiazepinlerden farklıdır. Bu ilacın anksiyolitik etkisi selektiftir; mutad dozlarda antikonvülzan, sedatif-hipnotik ya da kas gevşetici etki göstermez [6,7,8]. Tofisopam'ın vejetatif modülatör ve antiparkinson etkileri de rapor edilmiştir [1, 7]. Ayrıca psikozun adjuvant tedavisinde; bilhassa negatif ve kognitif bulguların ortadan kaldırılmasında fayda sağlayabileceği öne sürülmüştür [8]. Araştırma grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada da Tofisopam'ın sıçanlarda skopolamin ile oluşturulan bilişsel bozukluklara karşı anti-amnezik etkinlik gösterdiği ve bozulan hipokampal sinaptogenezi, nörogenezi ve glial plastisiteyi anlamlı ölçüde iyileştirdiği bildirilmiştir [4].

Tofisopam'ın etki mekanizmasına ilişkin bazı çalışmalar dekstofisopam'ın (R-enantiomeri) geleneksel benzodiazepin bağlanma yöreleri üzerine kayda değer bir afinite göstermediğini ileri sürmüştür. Hatta bu molekülün santral sinir sisteminde kendisine özel bir bağlanma bölgesine sahip olabileceği ve "2,3-benzodiazepin reseptörü" olarak karakterize edilebilecek olan bu bölgenin geleneksel 1,4- ya da 1,5-benzodiazepin reseptörlerinden farklı olduğu rapor edilmiştir [9].

Yapılan çalışmalar 2,3-benzodiazepinlerin santral sinir sisteminde GABA_Aerjik, dopaminerjik ve opioid sistemleri etkilediğine işaret etmiştir [2,6,10-12]. Bu moleküllerin, klasik benzodiazepinlerin kendi

bağlanma bölgelerine olan afinitelerini güçlendirdikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte musimol'ün GABA reseptörlerine bağlanma potansiyelini de artırdıkları rapor edilmiştir [2,10]. Diğer yandan 2,3-benzodiazepinlerin dopamin reseptörleri üzerinde karışık tip agonist/antagonist-benzeri etkilere neden oldukları [12] ve opioid agonistlerinin etkinliklerini selektif olarak artırdıkları ileri sürülmüştür [2,6,11].

2,3-benzodiazepinlerin etki mekanizmalarına ilişkin diğer bulgular da bu moleküllerin sinyal iletiminde rol oynayan çeşitli proteinlerin fosforilasyon süreçlerini değiştirdiklerine ilişkindir [6]. Bu moleküllerin özellikle fosfodiesterazların (PDE) çeşitli izoenzimlerine yüksek afinite ile bağlandıkları ve onları inhibe ettikleri rapor edilmiştir [8,13]. Literatürde PDE inhibitörlerinin akut ve kronik ağrıda etkili bulunduğu dair çok sayıda çalışma mevcuttur [14-19]. Örneğin rolipram, teofilin ve sildenafil'in deney hayvanlarında asetik asitle indüklenmiş kıvrınma testi yanıtlarını iyileştirdikleri [20-22]; zaprinast, ibudilast ve rolipram'ın ise nöropatik ağrıda faydalı etkiler gösterdikleri rapor edilmiştir [17, 23].

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada Tofisopam'ın akut antinosiseptif etkinlik potansiyelinin araştırılması ve bu etkiye ağrı ve analjezi ile son derece yakından ilişkili olduğu bilinen opioidergik sistemin olası katılımının incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları

Deneylerde 30-35 g ağırlığında erişkin erkek Balb/c fareler kullanılmıştır. Deney hayvanları iyi havalandırılan, $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki odalarda tutulmuştur. 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsü (08:00-20:00) uygulanmıştır. Standart hayvan yemi ile beslenen hayvanlara testler boyunca yem veya su kısıtlaması uygulanmamıştır. Bu çalışmada kullanılan protokol ve prosedürler Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (10/3/2020 Karar No: 2020/13).

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tofisopam (Grandaxin[®], Egis PLC, Budapeşte, Macaristan) ticari olarak temin edilmiştir. Morfin sülfat, nalokson hidroklorür dehidrat, naloksonazin dihidroklorür ve nor-binaltorfimin dihidroklorür Sigma-Aldrich'ten (St Louis, MO, ABD); naltrindol hidroklorür Tocris Cookson'dan (Ballwin, MO, ABD) ve asetik asit de Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır.

Farelerin Motor Koordinasyonlarının Değerlendirildiği Testler

Rota-rod Testi

Farelerin motor koordinasyonlarını değerlendirmek üzere Rota-rod cihazı (Ugo-basile, 47600, Verase, İtalya) kullanılmıştır [24]. Rota-rod testi "alıştırma" ve "test" olmak üzere iki aşamalı bir testtir. Üç gün süren alıştırma aşamasında fareler 24 saat ara ile üç kez 16 rpm'lik sabit hızda dönen milin

üzerinde yürütülmüştür. Deneyle için üçüncü günün sonunda milde en az 180 s kalabilen hayvanlar seçilmiştir. Test aşamasında ise milin üzerine tekrar yerleştirilen hayvanların düşme süreleri kaydedilmiştir. Otomatik olarak kaydedilen bu süreler hayvanların motor performanslarının göstergesi olarak değerlendirilmiştir [25].

Antinosiseptif Etkinin Değerlendirildiği Testler

Antinosiseptif etkinliğin araştırılması için Tofisopam hayvanlara 25 ve 50 mg/kg dozlarda oral yolla uygulanmış ve nosiseptif testler uygulamalardan 60'ar dakika sonra yapılmıştır [8, 26].

Sıcak Plaka Testi

Sıcak plaka testi, $55 \pm 1.0^\circ\text{C}$ sıcaklığa ayarlanmış olan Sıcak Plaka Cihazı (Ugo-basile, 7280, Verase, İtalya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [27]. Bu testte, termal ağırlı uyaran uygulanan hayvanların ayaklarını yalamaya başlamaları ve/veya plaka üzerinden atlama süreleri kaydedilmiştir. Deneye başlamadan önce, hayvanlara duyarlılık testi uygulanmış ve testler için 15 s içerisinde yanıt veren hayvanlar seçilmiştir. Testler sırasında pençenin hasar görmemesi için uyarı maksimum 30 s süreyle uygulanmıştır [28].

Ölçülen reaksiyon süreleri aşağıda verilen formül yardımı ile mümkün olan maksimum etkinin yüzdesi (Maximum Possible Effect, MPE) değerlerine çevrilmiştir.

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{Uygulama sonrası süre} - \text{Uygulama öncesi süre}}{\text{Maksimum uygulama süresi} - \text{Uygulama öncesi süre}} \times 100$$

Asetik-asit ile İndüklenen Kıvrınma Testi

Kıvrınma testi için Koster ve Williamson'un geliştirmiş olduğu yöntem uygulanmıştır [29]. Farelerde abdominal ağrı, asetik asit çözeltisinin (%0.6) intraperitoneal yolla uygulanması ile oluşturulmuştur. Enjeksiyondan sonra 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra, farelerin kıvrınma davranışlarının yani, ayaklarını uzatıp gerilmelerinin ve karınlarını yere sürmelerinin sayısı 10 dakika boyunca kaydedilmiştir [30]. Her iki test için de morfin sülfat (10 mg/kg, *i.p.*) referans ilaç olarak kullanılmıştır [28, 30].

Mekanistik Çalışmalar

Mekanistik çalışmalar için Tofisopam'ın 50 mg/kg dozu seçilmiştir. Tofisopam'ın bu çalışmada ortaya koyulmuş olan akut antinosiseptif etkisine opioidlerjik sistemin katılımının araştırılması amacıyla non-selektif opioid reseptör antagonisti bir ajan olan nalokson (5.48 mg/kg, *i.p.*) kullanılmıştır [30]. Antinosiseptif etkiye aracılık eden opioid reseptör alt-tiplerinin aydınlatılması amacı ile de mekanistik çalışmalara, opioid reseptörlerin alt-tiplerine selektif ajanlar olan naloksonazin (μ -opioid reseptör blokörü; 7 mg/kg, *s.c.*), naltrindol (δ -opioid reseptör blokörü; 0.99 mg/kg, *i.p.*) ve nor-binaltorfimin (κ -opioid reseptör blokörü; 1.03 mg/kg, *i.p.*) kullanılarak devam edilmiştir [28,30]. Antagonizma

çalışmalarında kullanılan dört ajan da kontrol solüsyonu ve Tofisopam uygulamalarından 15'er dakika önce uygulanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Her bir deney grubu için 7 adet fareden alınan veriler Graphpad Prism ver. 8.4.3 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Rota-rod testlerinden ve nosiseptif deneylerden elde edilen veriler, Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar Tukey HSD Testleri ile yapılmıştır. Mekanistik çalışmalardan elde edilen veriler ise Çift-Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirilmiş ve çoklu karşılaştırma için Bonferroni Testleri uygulanmıştır.

$P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiş ve bulgular ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, 2,3-benzodiazepin türevi bir molekül olan Tofisopam'ın antinosiseptif etkinlik potansiyeli ve bu etkiye opioid reseptörlerin olası katılımı *in vivo* yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

Deney hayvanlarının motor performansını bozan ajanların antinosiseptif etki tarama testlerinde yanlış pozitif sonuçlara yol açabildiği bilgisinden hareketle [28,31], Tofisopam'ın antinosiseptif etkinliği araştırılmadan önce, bu ilacın farelerin motor koordinasyonları üzerindeki olası etkisi Rota-rod testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Rota-rod testlerinde, kontrol solüsyonunun, 25 ve 50 mg/kg dozlarda uygulanan Tofisopam'ın ve referans ilaç diazepam'ın farelerin "dönen milin üzerinden düşme süreleri" üzerine etkileri Tablo 1'de gösterilmiştir [$F(3, 24) = 8.31$; $p < 0.001$].

Tablo 1. Rota-rod testinde kontrol solüsyonu, Tofisopam ve diazepam uygulamalarının farelerin "düşme süreleri" üzerine etkileri

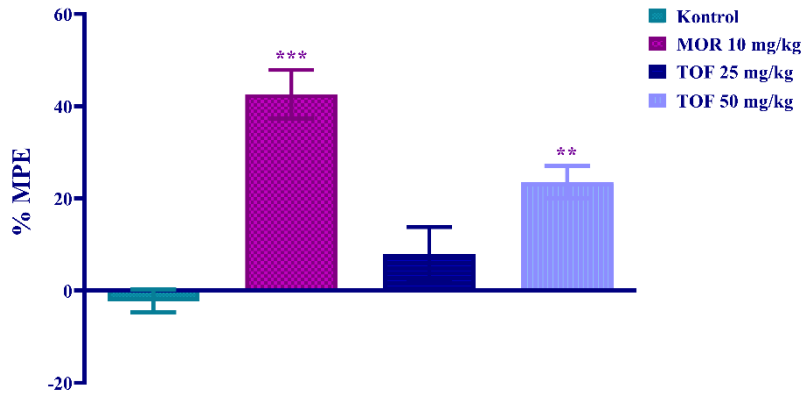
	Düşme Süresi (s)
Kontrol	600 \pm 0
Diazepam (2 mg/kg)	383.43 \pm 37.07***
TOF (25 mg/kg)	543.86 \pm 31.71
TOF (50 mg/kg)	495.86 \pm 41.18

*** $p < 0.001$: Kontrole göre anlamlı farklılık. Tek Yönlü Varyans Analizi, takiben Tukey HSD Çoklu Karşılaştırma Testi, $n=7$ (TOF: Tofisopam).

Tofisopam uygulandığı 25 ve 50 mg/kg dozlarda farelerin motor koordinasyonlarında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Tablo 1). Bu bulgular, antinosiseptif aktivite testlerinde elde edilen sonuçların hayvanların motor performanslarındaki herhangi bir değişiklikten etkilenmediğini göstermiş olması açısından önemlidir.

Tofisopam'ın antinosiseptif aktivitesi sıcak plaka ve asetik asit ile indüklenen kıvranma testleri ile değerlendirilmiştir.

Akut Tofisopam (25 ve 50 mg/kg) ve referans ilaç morfin uygulamalarının, sıcak plaka testinde hesaplanan % MPE değerleri üzerine etkileri Şekil 1'de sunulmuştur [F (3, 24) = 18.96; p < 0.001]. Çoklu karşılaştırma testleri, Tofisopam'ın 50 mg/kg dozu ile indüklenen % MPE değerlerinin, kontrol grubunun karşılık gelen değerlerine göre anlamlı ölçüde yüksek olduğunu göstermiştir (p < 0.01). İlaç 25 mg/kg'lık dozda etkisizdir. Referans ilaç olarak kullanılan morfin (10 mg/kg, *i.p.*), sıcak plaka testleri için hesaplanan % MPE değerlerinde beklenen artışı göstermiştir (p < 0.001).

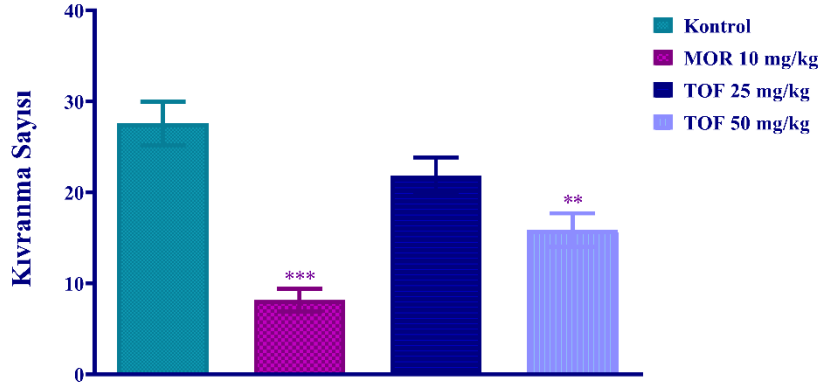


Şekil 1. Sıcak plaka testinde morfin (10 mg/kg) ve Tofisopam (25 ve 50 mg/kg) ile indüklenen % MPE değerleri. ** p < 0.01, *** p < 0.001: Kontrole göre anlamlı farklılık. Tek Yönlü Varyans Analizi, takiben Tukey HSD Çoklu Karşılaştırma Testi, n=7 (% MPE: Maksimum Etkinin Yüzdesi (Maximum Possible Effect); TOF: Tofisopam; MOR: Morfin)

Sıcak plaka testi antinosiseptif etkinin araştırılması için sıklıkla tercih edilen, geçerliliği ve güvenilirliği yüksek bir testtir [30,32,33]. Yöntemin esası, 55°C'ye ısıtılmış bir plaka üzerine yerleştirilen hayvanların, uygulanan ağrılı uyarana karşı gösterdikleri “pençe yalama” ya da “atlama” tepkilerinin sürelerinin saptanmasıdır [32]. Bu çalışmada, Tofisopam'ın 50 mg/kg dozda, farelerin termal nosiseptif uyarana karşı reaksiyon sürelerini anlamlı ölçüde uzatmış olması, bu molekülün antinosiseptif etkinliğini termal ağrılı uyarana taşıyan nöronal yollar üzerinde gösterdiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, sıcak plaka testinin özellikle supraspinal yollarda entegre edilen nosiseptif iletimi yansıttığı bilgisinden hareketle [32,34,35], Tofisopam'ın antinosiseptif etkisini supraspinal düzeyde gösterdiği ileri sürülebilir.

Asetik asit ile indüklenen kıvranma testi ise antinosiseptif etkinin taranması amacıyla sıklıkla kullanılan bir viseral ağrı modelidir [36]. Kontrol solüsyonu, akut Tofisopam (25 ve 50 mg/kg) ve referans ilaç morfin uygulamalarının, asetik asit ile indüklenen kıvranma testinde farelerin kıvranma davranışlarının sayıları üzerine etkileri Şekil 2'de sunulmuştur [F (3, 24) = 18.94; p < 0.001]. Çoklu

karşılaştırma testleri, Tofisopam'ın 25 mg/kg'lık dozda etkili olmadığını, ancak 50 mg/kg'lık dozun farelerin kıvranma sayılarını, kontrol grubunun kıvranma sayılarına göre anlamlı biçimde azalttığını ortaya koymuştur ($p < 0.01$). Referans ilaç olarak kullanılan morfin (10 mg/kg, *i.p.*) beklendiği üzere, farelerin kıvranma davranışlarının sayılarını anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p < 0.001$).



Şekil 2. Morfin (10 mg/kg) ve Tofisopam (25 ve 50 mg/kg) uygulamalarının asetik asit ile indüklenen kıvranma sayıları üzerine etkileri. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrolle göre anlamlı farklılık. Tek Yönlü Varyans Analizi, takiben Tukey HSD Çoklu Karşılaştırma Testi, $n=7$ (TOF: Tofisopam; MOR: Morfin)

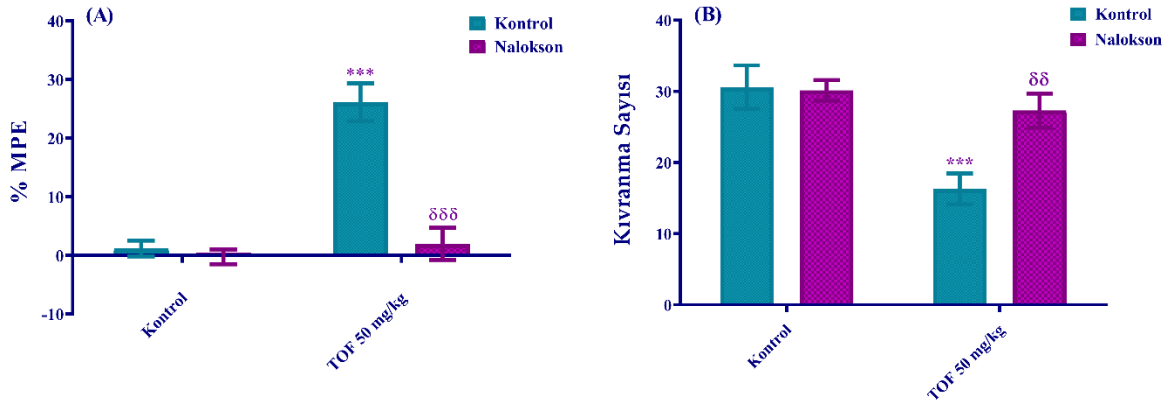
Farelere kimyasal nitelikli nosisepsiyona neden olan asetik asitin intraperitoneal yolla uygulanmasının, bu hayvanlarda abdominal kasların kasılması, arka bacakların ekstensiyonu ve vücudun geriye doğru uzatılması şeklinde gözlenebilen bir “kıvranma” yanıtına sebep olduğu bilinmektedir [37]. Kıvranma davranışı, asetik asit enjeksiyonuna bağlı olarak asetilkolin, histamin, P maddesi, prostaglandinler ve kininler gibi endojen maddelerin salınmasındaki artış sonucu tetiklenmektedir. Söz konusu endojen maddeler vasküler geçirgenliği artırmakta, ağrı eşiğini azaltmakta ve nonsteroidal anti-inflamatuvar ve/veya opioid ilaçlara duyarlı nosiseptif nöronları uyarmaktadır [38-40]. Bu çalışmada, 50 mg/kg dozda akut Tofisopam uygulamasının farelerde asetik asit ile indüklenen kıvranma davranışlarının sayısını azaltmış olması, bu ilacın periferel düzeydeki antinosiseptif etkinliğini sözü edilen mekanizmaların en azından bazılarını etkileyerek göstermiş olabileceğini düşündürmektedir. Tofisopam antinosiseptif etkisini inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesini azaltarak; bu endojen maddelerin reseptörlerini antagonize ederek; ağrı eşiği değerlerini değiştirerek veya ağrı stimulusunun nöronal iletimini engelleyerek gerçekleştirmiş olabilir [30].

Bu çalışma kapsamında, Tofisopam'ın antinosiseptif aktivitesinin belirlenmesinden sonra, bu etkiye analjezi ile yakından ilişkili olduğu bilinen opioidlerjik sistemin olası katılımının araştırılması planlanmıştır. Bu kapsamda non-selektif opioidlerjik reseptör blokörü bir ajan olan nalokson ile mekanistik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3A, Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka testindeki antinosiseptif etkisinin nalokson ön-

uygulaması varlığındaki değişimini göstermektedir. İstatistiksel analizler % MPE değerleri üzerinde hem tedavi faktörünün [$F(1, 24) = 34.46; p < 0.001$] hem de antagonist faktörünün [$F(1, 24) = 30.57; p < 0.001$] etkili olduğunu ve tedavi faktörü ile antagonist faktörü arasında anlamlı bir etkileşim [$F(1, 24) = 24.21; p < 0.001$] bulunduğunu ortaya koymuştur. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri % MPE değerlerinde Tofisopam ile indüklenen artışın ($p < 0.001$) nalokson ön-uygulaması ile geri döndüğünü ($p < 0.001$) göstermiştir.

Tofisopam'ın (50 mg/kg) asetik asit ile indüklenen kıvranma testindeki antinosiseptif etkisinin nalokson ön-uygulaması varlığındaki değişimi Şekil 3B'de sunulmuştur. İstatistiksel analizler kıvranma sayıları üzerinde tedavi faktörünün de [$F(1, 24) = 13.42; p < 0.01$] antagonist faktörünün de [$F(1, 24) = 5.11; p < 0.05$] etkili olduğuna işaret etmiştir. Bununla birlikte, bu faktörler arasında anlamlı bir etkileşim söz konusudur [$F(1, 24) = 5.97; p < 0.05$]. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri, kıvranma sayılarında Tofisopam ile indüklenen azalmanın ($p < 0.001$) nalokson ön-uygulaması ile kontrol seviyesine geri döndüğünü ($p < 0.01$) göstermiştir.



Şekil 3. Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka (A) ve asetik asit ile indüklenen kıvranma (B) testlerindeki antinosiseptif etkisinin nalokson ön-uygulaması varlığındaki değişimi. *** $p < 0.001$: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan kontrol grubuna göre anlamlı farklılık; δδ $p < 0.01$; δδδ $p < 0.001$: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan 50 mg/kg Tofisopam grubuna göre anlamlı farklılık. Çift Yönlü Varyans Analizi, takiben Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi, $n=7$ (% MPE: Maksimum Etkinin Yüzdesi (Maximum Possible Effect); TOF: Tofisopam).

Nalokson ön-uygulamaları her iki testte de Tofisopam'ın (50 mg/kg) antinosiseptif etkinliğini ortadan kaldırmıştır. Bu bulgular opioid mekanizmaların, bu ilacın hem santral hem de periferik düzeydeki antinosiseptif etkinliğine aracılık ettiğine işaret etmiştir. Nitelik literatürde 2,3-benzodiazepinlerin farmakodinamik etkilerinin opioid sistem ile ilişkili olduğuna işaret eden araştırmalar bulunmaktadır. Bu moleküllerin opioid agonistlerinin etkilerini selektif biçimde güçlendirdikleri çeşitli *in vitro* ve *in vivo* yöntemler ile gösterilmiştir [2,6,11]. Diğer yandan, Tofisopam

ve ilişkili moleküllerin opioidlerin antinosiseptif etkinliklerini artırabildikleri de rapor edilmiştir [6]. 2,3-benzodiazepinlerin farmakolojik etkilerinin morfin toleransı olan hayvanlarda görülmemesi de, bu moleküllerin etki mekanizmalarının opioidlerjik sistem ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir [11].

Bu çalışmada Tofisopam'ın opioidlerjik sistem aracılıklı antinosiseptif etkinliği ortaya koyulduktan sonra, etkiye aracılık eden opioid reseptör alt-tiplerinin de aydınlatılması planlanmıştır. Bu amaçla sırasıyla μ -, δ - ve κ -opioid reseptöre selektif blokörler olan naloksonazin, naltrindol ve norbinaltorfimin ile mekanistik çalışmalar yapılmıştır.

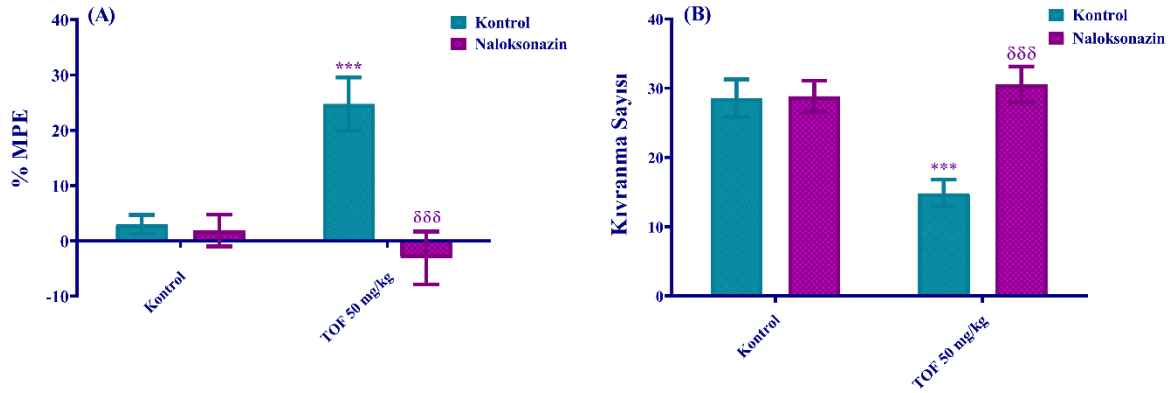
Şekil 4A, Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka testindeki antinosiseptif etkisinin naloksonazin ön-uygulaması varlığındaki değişimini göstermektedir. İstatistiksel analizler % MPE değerleri üzerinde hem tedavi faktörünün [F (1, 24) = 4.94; p < 0.05] hem de antagonist faktörünün [F (1, 24) = 14.66; p < 0.001] etkili olduğunu ve tedavi faktörü ile antagonist faktörü arasında anlamlı bir etkileşim [F (1, 24) = 12.49; p < 0.01] bulunduğunu ortaya koymuştur. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri % MPE değerlerinde Tofisopam ile indüklenen artışın (p < 0.001) naloksonazin ön-uygulaması ile geri döndüğünü (p < 0.001) göstermiştir.

Tofisopam'ın (50 mg/kg) asetik asit ile indüklenen kıvranma testindeki antinosiseptif etkisinin naloksonazin ön-uygulaması varlığındaki değişimi Şekil 4B'de sunulmuştur. İstatistiksel analizler kıvranma sayıları üzerinde tedavi faktörünün de [F (1, 24) = 6.32; p < 0.05] antagonist faktörünün de [F (1, 24) = 11.23; p < 0.01] etkili olduğuna işaret etmiştir. Bununla birlikte, bu faktörler arasında anlamlı bir etkileşim söz konusudur [F (1, 24) = 10.45; p < 0.01]. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri, kıvranma sayılarında Tofisopam ile indüklenen azalmanın (p < 0.001) nalokson ön-uygulaması ile kontrol seviyesine geri döndüğünü (p < 0.001) göstermiştir.

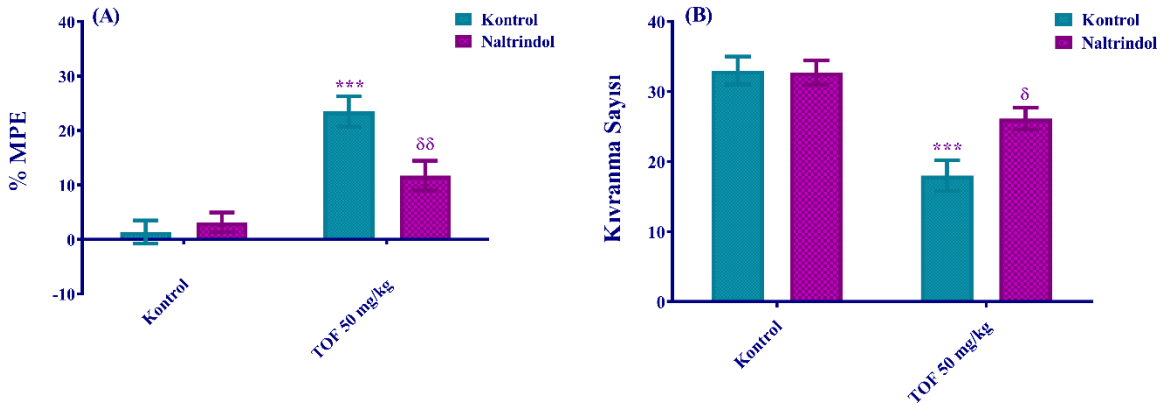
Şekil 5A, Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka testindeki antinosiseptif etkisinin naltrindol ön-uygulaması varlığındaki değişimini göstermektedir. İstatistiksel analizler % MPE değerleri üzerinde hem tedavi faktörünün [F (1, 24) = 40.99; p < 0.001] hem de antagonist faktörünün [F (1, 24) = 4.33; p < 0.05] etkili olduğunu ve tedavi faktörü ile antagonist faktörü arasında anlamlı bir etkileşim [F (1, 24) = 8.04; p < 0.01] bulunduğunu ortaya koymuştur. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri % MPE değerlerinde Tofisopam ile indüklenen artışın (p < 0.001) naltrindol ön-uygulaması ile geri döndüğünü (p < 0.01) göstermiştir.

Tofisopam'ın (50 mg/kg) asetik asit ile indüklenen kıvranma testindeki antinosiseptif etkisinin naltrindol ön-uygulaması varlığındaki değişimi Şekil 5B'de sunulmuştur. İstatistiksel analizler kıvranma sayıları üzerinde tedavi faktörünün de [F (1, 24) = 32.56; p < 0.001] antagonist faktörünün de [F (1, 24) = 4.32; p < 0.05] etkili olduğuna işaret etmiştir. Bununla birlikte, bu faktörler arasında anlamlı bir etkileşim söz konusudur [F (1, 24) = 4.97; p < 0.05]. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri, kıvranma sayılarında Tofisopam ile indüklenen azalmanın (p < 0.001) naltrindol ön-uygulaması

ile geri döndüğünü ($p < 0.05$) göstermiştir.



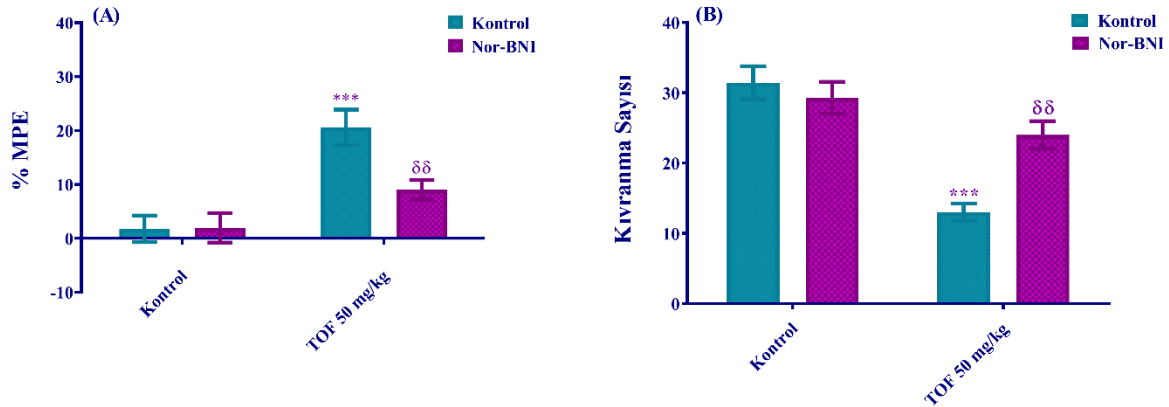
Şekil 4. Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka (A) ve asetik asit ile indüklenen kıvrınma (B) testlerindeki antinosiseptif etkisinin naloksonazim ön-uygulaması varlığındaki değişimi. *** $p < 0.001$: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan kontrol grubuna göre anlamlı farklılık; δδδ $p < 0.001$: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan 50 mg/kg Tofisopam grubuna göre anlamlı farklılık. Çift Yönlü Varyans Analizi, takiben Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi, $n=7$ (% MPE: Maksimum Etkinin Yüzdesi (Maximum Possible Effect); TOF: Tofisopam)



Şekil 5. Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka (A) ve asetik asit ile indüklenen kıvrınma (B) testlerindeki antinosiseptif etkisinin naltrindol ön-uygulaması varlığındaki değişimi. *** $p < 0.001$: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan kontrol grubuna göre anlamlı farklılık; δ $p < 0.05$, δδ $p < 0.01$: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan 50 mg/kg Tofisopam grubuna göre anlamlı farklılık. Çift Yönlü Varyans Analizi, Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi, $n=7$ (% MPE: Maksimum Etkinin Yüzdesi (Maximum Possible Effect); TOF: Tofisopam)

Şekil 6A, Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka testindeki antinosiseptif etkisinin nor-binaltorfimin ön-uygulaması varlığındaki değişimini göstermektedir. İstatistiksel analizler % MPE değerleri üzerinde hem tedavi faktörünün [F (1, 24) = 24.26; p < 0.001] hem de antagonist faktörünün [F (1, 24) = 4.71; p < 0.05] etkili olduğunu ve tedavi faktörü ile antagonist faktörü arasında anlamlı bir etkileşim [F (1, 24) = 5.03; p < 0.05] bulunduğunu ortaya koymuştur. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri % MPE değerlerinde Tofisopam ile indüklenen artışın (p < 0.001) nor-binaltorfimin ön-uygulaması ile geri döndüğünü (p < 0.01) göstermiştir.

Tofisopam'ın (50 mg/kg) asetik asit ile indüklenen kıvrınma testindeki antinosiseptif etkisinin nor-binaltorfimin ön-uygulaması varlığındaki değişimi Şekil 6B'de sunulmuştur. İstatistiksel analizler kıvrınma sayıları üzerinde tedavi faktörünün de [F (1, 24) = 35.19; p < 0.001] antagonist faktörünün de [F (1, 24) = 4.91; p < 0.05] etkili olduğuna işaret etmiştir. Bununla birlikte, bu faktörler arasında anlamlı bir etkileşim söz konusudur [F (1, 24) = 10.81; p < 0.01]. Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni Testleri, kıvrınma sayılarında Tofisopam ile indüklenen azalmanın (p < 0.001) nor-binaltorfimin ön-uygulaması ile geri döndüğünü (p < 0.01) göstermiştir.



Şekil 6. Tofisopam'ın (50 mg/kg) sıcak plaka (A) ve asetik asit ile indüklenen kıvrınma (B) testlerindeki antinosiseptif etkisinin nor-binaltorfimin ön-uygulaması varlığındaki değişimi. *** p < 0.001: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan kontrol grubuna göre anlamlı farklılık; $\delta\delta$ p < 0.01: Serum fizyolojik ön-uygulaması yapılan 50 mg/kg Tofisopam grubuna göre anlamlı farklılık. Çift Yönlü Varyans Analizi, takiben Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi, n=7 (TOF: Tofisopam; Nor-BNI: Nor-binaltorfimin)

Naloksonazin, naltrindol ve nor-binaltorfimin ön-uygulamaları hem sıcak plaka hem de asetik asit ile indüklenen kıvrınma testlerinde Tofisopam'ın (50 mg/kg) antinosiseptif etkinliğini ortadan kaldırmıştır. Bu bulgular μ -, δ - ve κ -opioid reseptör alt-tiplerinin üçünün de bu ilacın santral ve periferik düzeylerdeki antinosiseptif etkilerine katkıda bulunduğuna işaret etmiştir. Antinosiseptif etkinin her üç

ajanın ön-uygulaması ile geri dönmüş olması Tofisopam'ın antinosiseptif etkisinin, non-spesifik bir reseptör aktivasyonundan ziyade endojen opioidlerin salınımındaki bir artışla ya da opioid reseptörlerinin allosterik modülasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu molekülün opioid post-reseptör mekanizmalar üzerine non-selektif bir etkinlik göstermiş olması da mümkün olabilir. Tüm bu varsayımların daha kapsamlı mekanistik çalışmalarla araştırılması gerekmektedir. Diğer yandan, Tofisopam tarafından indüklenen antinosiseptif etkiye nosiseptin/orfanin reseptörlerinin olası katılımının araştırılması da Tofisopam'ın antinosiseptif etki mekanizmasının daha ileri düzeyde aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Ağrı ve analjezi süreçlerinde, pek çok regülatör yolağın ve endojen mekanizmanın rol oynadığı [41,42] düşünüldüğünde, Tofisopam'ın etki mekanizmasının kesin olarak aydınlatılabilmesi için, bu molekülün antinosiseptif etkisine örneğin GABAerjik, nitrerjik, kannabinoiderjik, kolinerjik ya da adenozerjik sistemlerin olası katılımlarının da araştırılmasının gerektiği açıktır.

Bu araştırmanın en önemli bulgusu, Tofisopam'ın ağrı ile ilişkili hastalıkların tedavisi için terapötik bir potansiyele sahip olabileceğinin ilk kez ortaya koyulmuş olmasıdır. Bu çalışmanın prelinik bulgularının klinik araştırmalar ile doğrulanması durumunda, Tofisopam “analjezik” ya da “adjuvan” bir ajan olarak değerlendirilebilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 1808S277).

YAZAR KATKILARI

Kavram: Ö.D.C., Ü.D.Ö.; Tasarım: Ö.D.C., N.T.Y.; Denetim: Ö.D.C., U.İ.Ü.; Kaynaklar: Ö.D.C.; Malzemeler: C.Y.; Veri Toplama ve/veya İşleme: N.T.Y., U.İ.Ü., C.Y.; Analiz ve/veya yorumlama: Ö.D.C., Ü.D.Ö.; Literatür taraması: N.T.Y., U.İ.Ü., C.Y.; Makalenin yazılması: Ö.D.C., Ü.D.Ö.; Kritik inceleme: Ö.D.C., Ü.D.Ö., U.İ.Ü., N.T.Y., C.Y.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışmanın deneysel protokolü Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (10/3/2020 Karar No: 2020/13).

KAYNAKLAR

1. Szénási, G., Hársing Jr, L.G. (2004). Pharmacology and prospective therapeutic usefulness of negative allosteric modulators of AMPA receptors. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 1(1), 69-76. [\[CrossRef\]](#)
2. Hamed, A., Skórzewska, A., Lehner, M., Płaźnik, A. (2007). Tofizopam. W poszukiwaniu mechanizmów działania 2,3-benzodiazepin. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii*, 2, 109-117.
3. Rx Media Pharma® (2022). İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Erişim tarihi: 20.02.2022.
4. Üçel, U.İ., Can, Ö.D., Özkay, Ü.D., Ulupinar, E. (2020). Antiamnesic effects of tofisopam against scopolamine-induced cognitive impairments in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 190, 172858. [\[CrossRef\]](#)
5. Horváth, E.J., Salamon, C., Bakonyi, A., Fekete, M.I., Palkovits, M. (1999). [(3)H]girisopam, a novel selective benzodiazepine for the 2, 3-benzodiazepine binding site. *Brain Research Protocols*, 4(2), 230-235. [\[CrossRef\]](#)
6. Horváth, E.J., Horváth, K., Hámori, T., Fekete, M.I., Sólyom, S., Palkovits, M. (2000). Anxiolytic 2,3-benzodiazepines, their specific binding to the basal ganglia. *Progress in Neurobiology*, 60(4), 309-342. [\[CrossRef\]](#)
7. Szegó, J., Somogyi, M., Papp, E. (1993). Szemelvények a Grandaxin klinikai-farmakológiai és klinikai vizsgálataiból [Excerpts from the clinical-pharmacologic and clinical studies of Grandaxin]. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 63(2), 91-98. [\[CrossRef\]](#)
8. Rundfeldt, C., Socala, K., Wlaź, P. (2010). The atypical anxiolytic drug, tofisopam, selectively blocks phosphodiesterase isoenzymes and is active in the mouse model of negative symptoms of psychosis. *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 117(11), 1319-1325. [\[CrossRef\]](#)
9. Leventer, S.M., Raudibaugh, K., Frissora, C.L., Kassem, N., Keogh, J.C., Phillips, J., Mangel, A.W. (2008). Clinical trial: dextofisopam in the treatment of patients with diarrhoea-predominant or alternating irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), 197-206. [\[CrossRef\]](#)
10. Petócz, L. (1993). Pharmacologic effects of tofisopam (Grandaxin). *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 63(2), 79-82.
11. Fekete, M.I., Horváth, K., Kedves, R., Máté, I., Székely, J.I., Szentkúti, E. (1997). Selective interaction of homophthalazine derivatives with morphine. *European Journal of Pharmacology*, 331(2-3), 175-183. [\[CrossRef\]](#)

12. Pellow, S., File, S.E. (1986). Is tofisopam an atypical anxiolytic? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 10, 221-227. [\[CrossRef\]](#)
13. Bernard, P., Dufresne-Favetta, C., Favetta, P., Do, Q.T., Himbert, F., Zubrzycki, S., Scior, T., Lugnier, C. (2008). Application of drug repositioning strategy to tofisopam. *Current Medicinal Chemistry*, 15(30), 3196-3203. [\[CrossRef\]](#)
14. Levy, R.A., Goldstein, B.D. (1981). Analgesia following microinjection of phosphodiesterase inhibitors at brainstem sites. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 15(3), 501-504. [\[CrossRef\]](#)
15. Araiza-Saldaña, C.I., Reyes-García, G., Bermúdez-Ocaña, D.Y., Pérez-Severiano, F., Granados-Soto, V. (2005). Effect of diabetes on the mechanisms of intrathecal antinociception of sildenafil in rats. *European Journal of Pharmacology*, 527(1-3), 60-70. [\[CrossRef\]](#)
16. Salehi, F., Hosseini-Zare, M.S., Aghajani, H., Seyed, S.Y., Hosseini-Zare, M.S., Sharifzadeh, M. (2017). Effect of bucladesine, pentoxifylline, and H-89 as cyclic adenosine monophosphate analog, phosphodiesterase and protein kinase A inhibitor on acute pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 31(4), 411-419. [\[CrossRef\]](#)
17. Fujita, M., Tamano, R., Yoneda, S., Omachi, S., Yogo, E., Rokushima, M., Shinohara, S., Sakaguchi, G., Hasegawa, M., Asaki, T. (2018). Ibudilast produces anti-allodynic effects at the persistent phase of peripheral or central neuropathic pain in rats: Different inhibitory mechanism on spinal microglia from minocycline and propentofylline. *European Journal of Pharmacology*, 833, 263-274. [\[CrossRef\]](#)
18. Mehanna, M.M., Domiati, S., Nakkash Chmaisse, H., El Mallah, A. (2018). Antinociceptive effect of tadalafil in various pain models: Involvement of opioid receptors and nitric oxide cyclic GMP pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 352, 170-175. [\[CrossRef\]](#)
19. Rojewska, E., Piotrowska, A., Jurga, A., Makuch, W., Mika, J. (2018). Zaprinast diminished pain and enhanced opioid analgesia in a rat neuropathic pain model. *European Journal of Pharmacology*, 839, 21-32. [\[CrossRef\]](#)
20. Kumar, A., Jain, N.K., Kulkarni, S.K. (2000). Analgesic and anti-inflammatory effects of phosphodiesterase inhibitors. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38(1), 26-30. [\[CrossRef\]](#)
21. Jain, N.K., Patil, C.S., Singh, A., Kulkarni, S.K. (2001). Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Research*, 909(1-2), 170-178. [\[CrossRef\]](#)
22. Jain, N.K., Patil, C.S., Singh, A., Kulkarni, S.K. (2003). Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, enhances the antinociceptive effect of morphine. *Pharmacology*, 67(3), 150-156. [\[CrossRef\]](#)
23. Kim, H.K., Kwon, J.Y., Yoo, C., Abdi, S. (2015). The analgesic effect of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, on chemotherapy-induced neuropathic pain in rats. *Anesthesia & Analgesia*, 121(3), 822-828. [\[CrossRef\]](#)
24. Dunham, N.W., Miya, T.S. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, 46(3), 208-209. [\[CrossRef\]](#)

25. Adzu, B., Amos, S., Dzarma, S., Wambebe, C., Gamaniel, K. (2000). Effect of *Zizypos spinachristi* wild aqueous extract on the central nervous system in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 13-16. [\[CrossRef\]](#)
26. Ozawa, M., Nakada, Y., Sugimachi, K., Yabuuchi, F., Akai, T., Mizuta, E., Kuno, S., Yamaguchi, M. (1994). Pharmacological characterization of the novel anxiolytic beta-carboline abecarnil in rodents and primates. *Japanese Journal of Pharmacology*, 64(3), 179-188. [\[CrossRef\]](#)
27. Woolfe, G., Mcdonald, A.D. (1944). The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 80(3), 300-307. [\[CrossRef\]](#)
28. Kasap, M., Can, Ö.D. (2016). Opioid system mediated anti-nociceptive effect of agomelatine in mice. *Life Sciences*, 163, 55-63. [\[CrossRef\]](#)
29. Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, 18, 412-418.
30. Demir Özkay, U., Can, O.D. (2013). Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 109, 23-30. [\[CrossRef\]](#)
31. Cartmell, S.M., Gelgor, L., Mitchell, D. (1991). A revised rotarod procedure for measuring the effect of antinociceptive drugs on motor function in the rat. *Journal of Pharmacological Methods*, 26(2), 149-159. [\[CrossRef\]](#)
32. Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 597-652. [\[CrossRef\]](#)
33. López-Canul, M., Comai, S., Domínguez-López, S., Granados-Soto, V., Gobbi, G. (2015). Antinociceptive properties of selective MT2 melatonin receptor partial agonists. *European Journal of Pharmacology*, 764, 424-432. [\[CrossRef\]](#)
34. Wong, C.H., Day, P., Yarmush, J., Wu, W., Zbuzek, U.K. (1994). Nifedipine induced analgesic after epidural injections in rats. *Anesthesia & Analgesia*, 79(2), 303-306. [\[CrossRef\]](#)
35. Gabra, B.H., Sirois, P. (2003). 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*, 24(8), 1131-1139. [\[CrossRef\]](#)
36. De Souza, M.M., Pereira, M.A., Ardenghi, J.V., Mora, T.C., Bresciani, L.F., Yunes, R.A., Delle Monache, F., Cechinel-Filho, V. (2009). Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93(1), 40-46. [\[CrossRef\]](#)
37. Park, S.H., Sim, Y.B., Kang, Y.J., Kim, S.S., Kim, C.H., Kim, S.J., Seo, J.Y., Lim, S.M., Suh, H.W. (2012). Hop extract produces antinociception by acting on opioid system in mice. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 16(3), 187-192. [\[CrossRef\]](#)
38. Coelho, L.P., Reis, P.A., de Castro, F.L., Gayer, C.R., da Silva Lopes, C., da Costa e Silva, M.C., de Carvalho Sabino, K.C., Todeschini, A.R., Coelho, M.G. (2005). Antinociceptive properties of

- ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1-2), 109-116. [\[CrossRef\]](#)
39. Pinheiro, M.M., Bessa, S.O., Fingolo, C.E., Kuster, R.M., Matheus, M.E., Menezes, F.S., Fernandes, P.D. (2010). Antinociceptive activity of fractions from *Couroupita guianensis* Aubl. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 407-413. [\[CrossRef\]](#)
40. Pinheiro, M.M., Boylan, F., Fernandes, P.D. (2012). Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: evidence for the involvement of apigenin. *Life Sciences*, 91(9-10), 293-300. [\[CrossRef\]](#)
41. Millan, M.J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355-474. [\[CrossRef\]](#)
42. Argoff, C. (2011). Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. *Current Medical Research and Opinion*, 27(10), 2019-2031. [\[CrossRef\]](#)