



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Dipiron farelerde anksiyolitik-benzeri etkiler oluşturuyor mu?

Does dipyrrone produce anxiolytic-like effects in mice?

Ruhan Deniz Topuz¹, Özgür Gündüz¹, Dikmen Dökmeçi¹, Çetin Hakan Karadağ¹, Ahmet Ulugöl¹

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, Turkey

Cukurova Medical Journal 2019;44(3):866-874.

Abstract

Purpose: Paracetamol has been shown to exert anxiolytic-like effects mediated by endocannabinoids via cannabinoid CB1 receptors. Dipyrrone is an analgesic with similar effects to paracetamol rather than non-steroidal anti-inflammatory drugs. Involvement of central structures to its effects are long under debate, whereas recent findings suggesting contribution of cannabinoid CB1 receptors to its antinociceptive effect support this argument. Taken together, the purpose of this study was to investigate whether dipyrrone possesses anxiolytic-like behavior; contribution of cannabinoid CB1 and CB2 receptors and TRPV1 receptors will be determined in case of observing any effect of dipyrrone in anxiety tests.

Material and Methods: Balb-c mice effects of dipyrrone (150, 300, 600 mg/kg, i.p.) were assessed in three-chamber social interaction, open-field, elevated plus-maze and rota rod tests. The cannabinoid CB1 antagonist AM251 (1 mg/kg i.p.), the CB2 antagonist SR 144528 (1 mg/kg i.p.) and the TRPV1 antagonist capsazepine (3 mg/kg i.p.) were going to be administered before dipyrrone injections if any effect of dipyrrone occurs.

Results: Dipyrrone had no effect at any dose in behavioral tests (three-chamber social interaction, open-field, elevated plus-maze and rota rod tests). Therefore, dipyrrone is not tested together with the cannabinoid CB1 and CB2 antagonists and the TRPV1 receptor antagonist.

Conclusion: Unlike paracetamol, dipyrrone did not possess anxiolytic-like effects in mice. Discrepancies in experimental models and methodologies may be the reason of our results.

Keywords: Dipyrrone, anxiety, cannabinoid.

Öz

Amaç: Yakın zamanda parasetamol'ün anksiyolitik-benzeri etkileri olduğu ve bu etkilerine kannabinoid CB1 reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir. Etkilerinde santral sinir sisteminin rolü olduğu uzun zamandır düşünülen ve etkileri açısından non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlardan çok parasetamol ile benzerlik gösteren bir analjezik olan dipiron'un da antinosisseptif etkisinde kannabinoid sistemin rolü olduğu belirtilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak dipiron'un anksiyolitik etki gösterebileceği düşünüldü; varsa bu etkisinde kannabinoid ve TRPV1 reseptörlerinin katkısının araştırılması planlandı.

Gereç ve Yöntem: Balb-c farelerde dipiron (150, 300, 600 mg/kg, i.p.) verildikten sonra üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testleri uygulanması, etki görülürse kannabinoid CB1 antagonisti AM251 (1 mg/kg i.p.), CB2 antagonisti SR 144528 (1 mg/kg i.p.) ve TRPV1 antagonisti kapsazepin (3 mg/kg i.p.) ile birlikte verilmesi düşünüldü.

Bulgular: Dipiron herhangi bir dozunda davranış testlerinin (üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi) hiçbirisinde etki göstermedi. Bu nedenle, dipiron ile birlikte kannabinoid CB1, CB2 ve TRPV1 reseptör antagonistlerinin birlikte uygulanacağı aşamaya geçilmedi.

Sonuç: Parasetamol'den farklı olarak, dipiron farelerde anksiyolitik-benzeri etkilere yol açmamaktadır. Deneysel modeller ve ölçüm yöntemlerindeki farklılıklar bu bulgularımızın nedeni olabilir.

Anahtar kelimeler: Dipiron, anksiyete, kannabinoid.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Ruhan Deniz Topuz, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, Turkey E-mail: ruhantopuz@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 27.11.2018 Kabul tarihi/Accepted: 13.01.2019 Çevrimiçi yayın/Published online: 07.09.2019

GİRİŞ

Kannabinoidler, kannabinoid reseptörleri (CB1 ve CB2) aracılığıyla etki gösteren esrar-benzeri maddeler olup, bitkisel kannabinoidler, sentetik kannabinoidler ve vücudumuzda bulunan endokannabinoidler olarak sınıflandırılabilirler¹. Bu maddelerin ağrı kesici etkileri yüzyıllardır bilinmektedir. Ancak keyif verici etkilerine bağlı olarak kötüye kullanıma olasılıklarının bulunması ve ayrıca tolerans, bağımlılık ve bazı psikotrop etkiler gibi ciddi santral istenmeyen etkilerinin bulunması bu ilaçların tedavide yeterince kullanılmamalarına yol açmıştır. Son 20 yıl içinde kannabinoidlerin farmakolojisine ilişkin çok önemli gelişmeler olmuş, bu ilaçların tedavide kullanılmalarının önü açılmıştır. Nöropatik ağrı, multipl skleroz, kanser kemoterapisine eşlik eden bulantı ve kusma vb. endikasyonlar başta olmak üzere bazı klinik durumlarda kullanılmak için önce ABD ve Kanada'da, son yıllarda da Avrupa'da birçok ülkede onay almışlardır^{2,3,4}. Kannabinoidlerin bir diğer etkisi ise oluşturdukları emosyonel yanıtların farklılığıdır; bir taraftan anksiyete giderici ve rahatlatıcı etkiler oluştururken tam aksine panik atak oluşumuna kadar zıt etkilere yol açabilirler. Anksiyete üzerine bu etki farklılıklarının çeşitli nedenleri olmakla birlikte, genelde düşük dozlarda anksiyolitik, yüksek dozlarda ise anksiyojenik etki gösterdikleri kabul edilmekte ve endokannabinoid sistem yeni anksiyolitik ilaçlar için bir hedef olarak gösterilmektedir^{5,6}.

Parasetamol (asetaminofen) ve dipiron (metamizol) diğer non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlardan (NSAİİ) farklı olarak neredeyse hiç anti-inflamatuvar etkinlik göstermeyen, ancak analjezik ve antipiretik olarak günümüzde tüm dünyada sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Çok eski ilaçlar olmalarına karşın halen etki mekanizmaları kesin olarak açıklığa kavuşmamıştır; uzun yıllardır analjezik etkilerinin santral komponentinin olduğu bildirilmesinin yanı sıra^{7,8,9,10,11} son senelerde her iki ilacın da bazı etkilerine endojen kannabinoid sistemin aracılık ettiği bildirilmektedir. Öncelikle, parasetamol'un analjezik etkilerine CB1 reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiş^{12,13} daha sonra parasetamol'un araşidonil amid metaboliti olan AM-404'un, endokannabinoidleri degrade eden yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) enzimini ve endokannabinoidlerin geri-alımını inhibe ederek endokannabinoid düzeylerini artırdığı belirlenmiştir¹⁴. Yakın zamanda, dipironun da araşidonil amid metabolitleri olduğu belirlenmiş ve bu metabolitlerin kannabinoid reseptörlerine yüksek afinitesi gösterilmiştir¹⁵

dipironun analjezik etkilerinde CB1 reseptörlerinin rolü olduğunu hem destekleyen hem de tersi bulgular elde edilen araştırmalar bulunmaktadır^{16,17,18}. Siklooksijenaz (COX) enziminin inhibisyonu sonucu araşidonik asit yolağının prostaglandin sentezinden endokannabinoid sentezine kayması ile endokannabinoidlerin düzeyi artabilir; ayrıca, COX enzimi FAAH ve benzeri enzimler kadar olmasa da endokannabinoidlerin yıkımında da rol oynamaktadır^{16,19}. Bu nedenle genel olarak tüm NSAİİ'ler COX inhibisyonu sonucu endokannabinoid düzeylerini artırma potansiyeline sahiptirler. Ayrıca, parasetamol ve dipiron'dan farklı olarak diğer bazı NSAİ ilaçların antinöroseptif etkilerinde de kannabinoid sistemin rolü olduğu belirtilmektedir^{16,19}.

Yukarıda belirtilen ilaçlardan parasetamol'un kannabinoid sistem üzerine etkilerinden yola çıkılarak anksiyete üzerine de etkileri olabileceği düşünülmüş, yapılan araştırmalarda düşük dozlarında anksiyolitik etki gösterdiği ve sosyal davranışı artırdığı bildirilmiş ve bu etkilerine kannabinoid CB1 reseptörlerinin aracılık ettiği belirlenmiştir^{20,21}. Buna karşılık, benzer etkiler gösteren bir diğer analjezik olan dipironun anksiyete üzerine etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu verilerden yola çıktığımız araştırmamızda, öncelikle farelerde dipironun farklı dozlarında anksiyete üzerine etkisinin olup olmadığını farklı anksiyete testleri kullanarak araştırmayı amaçladık. Bu testlerin herhangi birinde etkisinin görülmesi durumunda kannabinoid reseptör antagonistleri kullanarak bu etkiye kannabinoid reseptörlerinin aracılık edip etmediğini göstermek ise ikincil hedefimizdi, çalışmanın ilk aşamasının sonunda dipironun anksiyete üzerine herhangi bir etkisinin bulunmaması durumunda çalışmanın ikinci aşamasına geçilmemesi planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Birimi'nden temin edilen 20-30 g ağırlığında 32 adet erkek Balb/c fare kullanıldı. Denekler, su ve yemlerine rahatça erişebilecek şekilde barındırıldılar; ortam ısı 22± 1° olacak şekilde sabit tutuldu. Bu deneyde kullanılan davranış deneyleri dünyada yaygın olarak kullanılmakta olup, hayvanlar için herhangi rahatsızlık teşkil etmemektedir. Çalışmamızda standart dışı bir uygulama ya da muamele yoktur ve İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Bu araştırmanın tüm protokolü

Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar No: 2017.12.03).

Davranış deneyleri

Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik testi

Test, odacıklar arasında gezinmeye izin veren 3 bölmeli dikdörtgen bir kutu içerisinde yapıldı. Sağ ve sol taraftaki bölmelerin içinde birer tane telden kafes kondu. Deneyin evrelerine göre bu kafesler ya boş kullanıldılar ya da bu kafeslerin içine denklemlerle aynı özelliklere sahip (cinsiyet, yaş, ağırlık vb.) fareler kondu. İki günlük deneyin birinci gününde fare, deney düzeni içinde ortama alışması amacıyla 30 dakika serbest bırakıldı. Deneyin ikinci günü ilk 5 dakika fare deney alanını hatırlaması ve alışması için serbest bırakıldı. Deneyin ikinci bölümü olan 10 dakikalık kısmında daha önceden bilmediği kendisiyle aynı özelliklere sahip bir fare sol bölme içinde bulunan tel kafese konuldu. Bu süre içinde deneyin daha önceden hiç görmediği fareye olan yaklaşımı, onunla kurduğu sosyallik analiz edildi. Deneyin, dolu kafesin (yabancı fare) yanında geçirdiği toplam süre, dolu kafese olan uzaklığı ve yabancı fareyi koklaması değerlendirildi. Deneyin 3. kısmına geçmeden önce sol odada yer alan kafes, denek görmeden sağdaki boş kafes ile değiştirildi. Sol tarafta konulan boş kafese yabancı bir fare kondu. Son durumda sol bölmedeki tel kafesin içinde tanımadığı (yabancı) bir fare ve sağ bölmedeki kafesin içinde de deneyin 2. bölümünde de kullanılan (tanıdık) fare vardı. Deneyin bu bölümünde sağ ve sol bölmelerde geçirilen süre ve kafesler içindeki fareleri koklama sayıları hesaplandı²².

Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi genellikle kemirgenlerde otizm benzer davranışların değerlendirilmesi amacıyla kullanılır ve sosyal etkileşim ve sosyal yeniliği test eder. Başka bir davranış testi olan sosyal interaksyon testi ilaçların anksiyolitik etkilerinin değerlendirilmesi için kullanılabilir ve deneklerin motor aktiviteleri artmadan diğer deney hayvanı ile interaksyona girişinin artması anksiyolitik etki olarak değerlendirilir²³. Biz de bu çalışmada üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin sosyal interaksyon testi gibi kullanılabilirliğini düşündük ve diğer anksiyete testleri ile benzer sonuçlar gösterip göstermeyeceğini görmek istedik.

Açık Alan testi

Deney hayvanlarının genel aktivite düzeylerini, lokomotor aktivite ve araştırıcı davranışlarını

belirlemek için kullanılan basit bir sensorimotor testtir²⁴. Fareler 60x60 cm boyutlarında bir kutu içine 10 dakika boyunca serbestçe hareket edebilecek şekilde bırakıldı. Bu deneyde toplam gezilen mesafe, merkez alanda geçirilen süre ve araştırma davranışı olarak yorumlanan arka iki ayakları üzerinde ayağa kalkma davranışları (rearing, şahlanma) hesaplandı.

Yükseltilmiş Artı Labirent testi

Yükseltilmiş artı labirent testi, yerden 40 cm yükseklikte, hazırlanmış bir deney düzenidir²⁵. 110 cm uzunluğunda, 2 açık ve 2 kapalı kol ile bunların birleştiği merkez alandan oluşmaktadır. Hayvanlar yükseltilmiş artı labirentin merkezine bırakıldı ve 5 dakika boyunca açık kollarda geçirdiği süre hesaplandı.

Tüm davranış deneyleri sessiz bir oda içinde ve aynı ışık şiddetinde yapıldı. Deneyler süresince alınan video kayıtlarının analizi Ethovision XT 11,5 (Noldus, Holland) ve Mice Behaviour modülü kullanılarak yapıldı.

Deney düzeni ve ilaçlar

Grup 1 kontrol grubu olarak % 0.9 salin intraperitoneal (i.p.) uygulandı, Grup 2-4'e ise farklı dozlarda dipiron (150, 300, 600 mg/kg, i.p.) verildi. Enjeksiyonlardan 30 dk sonra her gruptaki hayvanlara sırasıyla üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testleri uygulandı. İlk dört grup tamamlandıktan sonra davranış deneylerinin istatistiksel analizleri tamamlandı ve dipiron'un herhangi bir dozda anksiyolitik etkisinin olup olmadığına bakıldı. Eğer anksiyolitik etki görülürse deneyin diğer gruplarına devam edilecek ve anksiyolitik etkide kannabinoid sistemin ve TRPV1 reseptörlerinin etkisi araştırılacaktır; bu gruplarda antagonistler dipiron'dan 10 dk önce verilecekti.

Dipiron'un anksiyete üzerine etkisi görüldüğü takdirde, Grup 5-7'de kannabinoid CB1 reseptör antagonisti AM251 (1 mg/kg i.p.) ile farklı dozlarda dipiron (150, 300, 600 mg/kg, i.p.) verilecek, Grup 8-10 'de ise CB2 reseptör antagonisti SR 144528 (1 mg/kg i.p.) ile farklı dozlarda dipiron (150, 300, 600 mg/kg, i.p.) uygulanacaktır. Grup 11-13 'de TRPV1 reseptör antagonisti kapsazepin (3 mg/kg i.p.) ile farklı dozlarda dipiron (150, 300, 600 mg/kg, i.p.) verilecek; son olarak Grup 14-16 'da kannabinoid CB1 reseptör antagonisti AM251 (1 mg/kg i.p.), CB2 reseptör antagonisti SR 144528 (1 mg/kg i.p.) ile TRPV1 reseptör antagonisti kapsazepin (3 mg/kg

i.p.) tek başlarına uygulanacaktı. Ancak çalışmamızda dipiron'un anksiyolitik etkisi ortaya çıkmadığı için, yukarıda bahsedilen gruplara devam edilmedi.

Dipiron Cayman'dan, kannabinoid CB1 reseptör antagonisti AM251, kannabinoid CB2 reseptör antagonisti SR 144528 ve TPRV1 reseptör antagonisti kapsazepin ise Sigma'dan temin edildiler. İlaçlar vücut ağırlığına 0.05 ml/10 g hacminde uygulandılar.

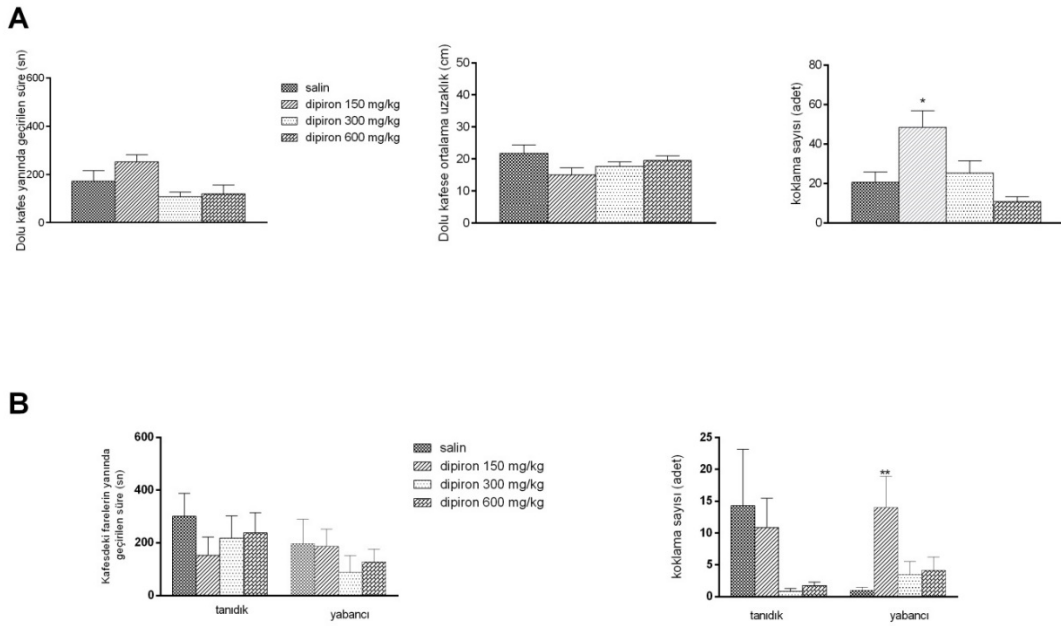
İstatistiksel analiz

Gruplar arası farklılıklar normal dağılım gösteren verilerde tek yönlü varyans analizi ANOVA ve takiben Bonferroni testi ile; normal dağılım göstermeyenler de ise Kruskal Wallis Varyans analizi ve sonrasında Dunn testi ile yapıldı. $P < 0.05$ değeri

anlamli olarak kabul edildi ve tüm veriler ortalama SEM olarak belirtildi.

BULGULAR

Üç Odalı Sosyallik ve Sosyal Yenilik Testi: Bu davranışın deneyinin ilk 10 dakikalık kısmında deney hayvanının dolu kafese olan uzaklığı, dolu kafesin bulunduğu bölmede geçirdiği süre ve kafes içindeki hayvanı koklama sayıları değerlendirildi. İçinde fare bulunan kafese uzaklık ve dolu kafesin olduğu bölmede geçirilen süre açısından gruplar arasında istatistiksel anlamli bir fark yoktu. Dolu kafesin bulunduğu bölmede geçirdiği süre içerisinde kafesteki hayvanı koklama sayılarına bakıldığında 150 mg/kg dipiron alan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamli fark vardı (Şekil 1A).



Şekil 1. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi sonuçları.

n=8, grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.*: $p=0,0023$, kafes içindeki fareyi koklama sayısı, kontrol grubuna göre, Kruskal Wallis Varyans analizi post hoc Dunn testi.

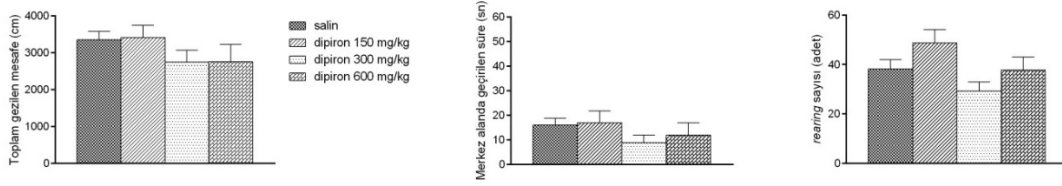
** : $p=0,0180$, kafes içindeki yabancı fareyi koklama sayısı, kontrol grubuna göre tek yönlü varyans analizi ANOVA, post hoc Bonferroni

Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinin ikinci 10 dakikalık bölümünde tanıdık ve yeni hayvanların yanında geçirilen süre açısından gruplar arasında bir fark yoktu. Kafes içindeki hayvanları koklama sayıları

açısından değerlendirildiğinde 150 mg/kg dipiron alan grubunun yabancı hayvanı koklama sayısı kontrol grubuna göre anlamli olarak yükseldi (Şekil 1B).

Açık alan testi: Deney hayvanlarının lokomotor aktivitelerinin, araştırma davranışlarının ve anksiyetelerinin değerlendirildiği bu testte toplam gezilen mesafe, merkez alanda geçirilen süre ve *rearing* sayıları hesaplandı. Deney hayvanlarının lokomotor

aktivitelerinin bir göstergesi olan toplam gezilen mesafe açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Dipiron artan dozlarda merkez alanda geçirilen süre ve *rearing* sayılarında da kontrol grubuna göre bir fark oluşturmadı (Şekil 2).



Şekil 2. Açık alan testi

(n=8, grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir. kontrol grubuna göre Kruskal Wallis Varyans analizi post hoc Dunn testi.)

Yükseltilmiş artı labirent testi: Deney hayvanının düzenek içindeki hareketi 5 dk boyunca izlenir. Bu testte toplam gezilen mesafe ve açık kollarda geçirilen süre değerlendirildi. Toplam gezilen mesafe açısından 150 mg/kg dipiron alan grupta kontrol grubuna göre belirgin artış vardı ancak bu fark istatistiksel

anlamlılığa ulaşmadı. Anksiyetesi olan hayvanlar daha çok kapalı kollarda zaman geçirirler. Çalışmamızda açık kollarda geçirilen süre açısından dipiron alan gruplarla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yoktu (Şekil 3).



Şekil 3. Yükseltilmiş artı labirent testi

(n=8, grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir. Kontrol grubuna göre tek yönlü varyans analizi ANOVA, post hoc Bonferroni).

TARTIŞMA

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda anksiyeteyi değerlendirmek için, açık alan testi, yükseltilmiş artı/zero labirent testi, sosyal interaksyon testi, aydınlık karanlık testi, delik tahtası testi (hole board), merdiven testi, dört plaka testi, korku potansiyelli irkilme gibi birçok test kullanılabilir²³. Biz çalışmamızda çok daha uzun

süredir çok daha fazla çalışmada kullanılan açık alan testini ve yükseltilmiş artı labirent testlerini ve sosyal interaksyon testiyle kısmi benzerliği nedeniyle üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testini tercih ettik.

Bu çalışmada fareler üzerinde farklı dozlarda akut uygulanan dipiron'un anksiyolitik etkisinin olup olmadığı incelendi. Açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testlerinin sonuçlarında gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktu. Üç odalı sosyallik

ve sosyal yenilik testinde ise hem sosyallik hem de sosyal yenilik aşamalarında bölmelerde geçirilen süreler açısından anlamlı bir fark yoktu. Kafes içindeki hayvanları koklama sayıları açısından değerlendirildiğinde 150 mg/kg dipiron alan grubunun her iki deney aşamasında da yeni hayvanı koklama sayısı fazlaydı. Bu bulgu deneklerin anksiyetelerinin azaldığı yönünde yorumlanabilir ancak deneklerin toplam motor aktivitelerin deneyin iki aşamasında da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da belirgin artış göstermiş olması nedeniyle koklama sayısındaki artış tek başına anksiyolitik etki olarak yorumlanmadı. Üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testi daha çok otizm benzeri davranışları değerlendirmede kullanılır. Açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent gibi anksiyolitik etkinin test edilmesi için daha yaygın olarak kullanılan testlerde istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi. Bu nedenlerle sadece üç odalı sosyallik ve sosyal yenilik testinde elde edilen tek bir verinin anksiyolitik etkinin varlığının gösterilmesi için yeterli olmadığı düşüncesindeyiz. Kafes içindeki yeni hayvanların koklanmasını araştırmacı davranış olarak yorumlanmasının daha doğru olacağı düşüncesindeyiz.

Siklooksijenaz enzimi araşidonik asitten prostaglandinlerin oluşumunu katalize eden enzimdir. COX enziminin günümüzde COX-1 ve COX-2 olarak bilinen iki ayrı izoformu bulunmaktadır. NSAİİ'ler anti-inflamatuvar, analjezik, antipiretik ve antitrombotik etkilerinden sıklıkla faydalanılan bir grup heterojen bileşiklerdir. NSAİİ'lerin COX-1 ve COX-2'yi farklı derecelerde inhibe etmelerine karşın, gerek terapötik gerekse istenmeyen etkilerinin mekanizması olarak öncelikle COX ve prostaglandin sentezinin inhibisyonu sorumlu tutulmaktadır²⁶. Bu temel mekanizmaya ek olarak, nitrik oksit (NO), endokannabinoidler, monoaminerjik ve kolinerjik sistemlerin de NSAİİ'lerin etki mekanizmasında rol oynadıklarına ilişkin pek çok araştırma yapılmıştır²⁷.

Dipiron, COX enzimleri üzerine olan etkisi çok fazla olmadığı için klasik NSAİİ'den ayrılır, bu açıdan kısmen parasetamol ile benzerlik gösterir. Dipiron'un etkilerinin ortaya çıkmasında periferik ve santral sinir sisteminin rolü halen tartışmalıdır. Periferde, klasik COX inhibisyonunun yanı sıra, L-arjinin/NO/cGMP/ K_{ATP} sinyal yolağının önemli rolü bilinmektedir^{28,29}. Ayrıca, kannabinoid reseptörlerin periferik nosisepsiyona olası katılımını gösteren araştırmalar olmakla birlikte tam tersi sonuçlar da bildirilmiştir^{30,31}. Dipiron'un santral sinir

sistemindeki etkinliği ise uzun yıllardır araştırma konusu olmasına karşın, günümüzde periakvaduktal gri cevher, rostral ventromediyal medulla, omurilik gibi santral yapıların etkilerine aracılık ettiği, endojen opioidlerin salıverilmesine yol açtığı ve inisi inhibitör yolları aktive ettiği bilinmektedir³². Bir diğer COX enzimi olduğu düşünülen COX-3³³ inhibisyonu, L-arjinin/NO/cGMP/ K_{ATP} yolağı ve/veya glutamaterjik sistem, bir diğer opioid reseptörü olan nosiseptin/orfanin FQ reseptörleri olası santral mekanizmalar arasındadır^{34,35,36}. Endokannabinoid sistemin dipiron'un santral etkilerindeki rolü ise en az bu mekanizmalar kadar önemli gözükmektedir. Öncelikle, COX inhibisyonu artan miktarlardaki araşidonik asidin prostaglandin yerine endokannabinoid sentezinde kullanılmasına olanak verir. Tüm NSAİİ'lerin hem FAAH hem de COX inhibisyonu yapmaları endokannabinoid yıkımını azaltarak düzeylerini arttıracak diğer iki faktördür. Ayrıca, NO sentezini inhibe etmeleri de endokannabinoid taşıyıcılarını inaktive ederek yıkımlarına engel olacaktır^{19,27}.

Araştırmamızda, dipiron farelerde anksiyete testleri üzerine herhangi bir etki göstermemiştir. Ancak, yukarıda detaylı olarak anlatılan dipiron ve diğer NSAİİ'lere ait etki mekanizmaları büyük çoğunlukla bu ilaçların antinoseptif etkileri ile ilişkilidir; anksiyete durumlarında farklı mekanizmaların da rol oynayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bir endojen kannabinoid olan anandamid'in CB1 reseptörleri aracılığıyla anksiyolitik etkiler ortaya çıkartması³⁷, yüksek dozlarında ise TRPV1 reseptörlerini aktive ederek anksijojenik etkilere yol açması³⁸; bunlara ek olarak gerek parasetamol'un gerekse parasetamol metaboliti olan AM404'un de hem anandamid düzeylerini arttırması hem de CB1 reseptörleri aracılığıyla anksiyolitik-benzeri etkiler göstermesi^{20,39}, dipiron'un da benzer şekilde anksiyete üzerine etkileri olabileceği düşüncesi oluşturmuştur. Dipiron'un kannabimimetik aktivitenin göstergesi olarak "tetrad modeli" olarak bilinen antinosepsiyon, hipolokomosyon, katalepsi ve hipotermi belirtilerini deneysel olarak ortaya çıkartması¹⁶, dipironun endokannabinoid sistem aracılığıyla anksiyolitik etkinlik gösterebileceği düşüncesini daha da güçlendirmişti. Tüm bu beklentilere karşılık dipiron'un anksiyolitik etki göstermemesi, kannabinoidlerin deneysel anksiyete üzerine etkinliklerinin birçok faktöre bağlı olarak değişebileceği ile açıklanabilir. Bu faktörlerden en önemlilerinden biri uygulanan doz'dur; kannabinoidler genellikle düşük dozlarında

anksiyolitik etkili iken yüksek dozlarında anksiyojenik etkilidirler⁶. Aydınlatmanın şiddeti gibi deneyin çevresel faktörleri de CB1 reseptör aktivasyonu veya blokajını etkileyebilmektedir⁴⁰. Ayrıca anksiyete ölçümündeki farklı protokoller farklı sonuçlar doğurabilmekte, geçmişte strese veya ilaç tedavisine maruz kalma gibi etkenler de kannabinoidlere farklı yanıtlar verilmesine neden olabilmektedir^{41,42}. Örneğin kronik stres modelinde dipironun fareler üzerinde antidepresan etkili olduğu gösterilmiştir. Buradaki farklılık dipironun kronik kullanımının ya da önceden maruz kalınan stresin endokannabinoid düzeylerinde sebep olduğu değişikliğe bağlanabilir¹¹. Bunların dışında, endokannabinoid düzeylerinin sabit değil dinamik olması da elde ettiğimiz sonuçlarda etkili olabilir; in vivo çalışmalarda endokannabinoid düzeylerinin doz, uygulama zamanı ve anestezi gibi pek çok dış faktörden etkilendiği bilinmektedir⁴³. Örneğin, bir diğer endokannabinoid olan 2-araşidonil gliserol (2-AG) düzeylerinde değişiklik olabilmesi için en az 5 saat geçmesi gerektiği bildirilmiştir⁴⁴; bizim çalışmamızda dipiron uygulandıktan 30 dk sonra anksiyete testlerinin yapılmış olması 2-AG'nin henüz ortaya çıkmamış olabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmamızda dipiron, etki mekanizması kısmen benzerlik gösteren parasetamol'den farklı olarak, farelerde anksiyete testlerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Dipiron'un antinositif etkilerine kannabinoid CB1 reseptörlerinin aracılık ettiğine ilişkin de birbirinden farklı bulgular elde edilmiş, bu durum ağır modellerindeki, ilaç uygulama yollarındaki ve deneysel ölçüm yöntemlerindeki farklılıklara bağlanmıştır^{16,17,18}. Benzer şekilde, bizim bulgularımız da dipiron'un anksiyete üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını göstermez; nosisepsiyon çalışmalarındaki nedenler, kannabinoidlerin deneysel anksiyete üzerine etkinliklerinin değişebilmesi, endokannabinoid düzeylerindeki kolay değişkenlik vb. etkenler sonuçlarımızın nedenlerinden olabilir. Üzerinde fazla araştırma yapılmamış bu konu üzerine yapılacak araştırmalarla dipiron'un anksiyete üzerindeki etkisi yeniden değerlendirilebilir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasanımı: AU, RDT; Veri toplama: RDT, ÖG; Veri analizi ve yorumlama: RDT, AU, ÇHK; Yazı taslağı: AU, ÇHK, RDT; İçerğin eleştirilme: RDT, AU, ÇHK, DD, ÖG; Son onay ve sorumluluk: RDT, ÖG, DD, ÇHK, AU; Teknik ve malzeme desteği: DD, ÖG; Süpervizyon: AU, RDT, ÇHK; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Teşekkür: Araştırmamızda davranış deneylerinin gerçekleşmesinde büyük emeği olan Öğr.Gör. Kübra DUVAN AYDEMİR'e teşekkür ederiz.

Author Contributions: Concept/Design : AU, RDT; Data acquisition: RDT, ÖG; Data analysis and interpretation: RDT, AU, ÇHK; Drafting

manuscript: AU, ÇHK, RDT; Critical revision of manuscript: RDT, AU, ÇHK, DD, ÖG; Final approval and accountability: RDT, ÖG, DD, ÇHK, AU; Technical or material support: DD, ÖG; Supervision: AU, RDT, ÇHK; 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: We would like to thank Kübra Duvan Aydemir for her great efforts in conducting the behavioral experiments in our research.

KAYNAKLAR

1. Ulugol A. The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balkan Med J.* 2014;31:115-20.
2. Schrot RJ, Hubbard JR. Cannabinoids: Medical implications. *Ann Med.* 2016;48:128-41.
3. Wright S, Guy G. Licensed cannabis-based medicines: Benefits and risks. In: *Handbook of Cannabis* (Eds Pertwee R): New York: Oxford University Press. 2014; 373-92.
4. Ulugol A. Kannabinoidlerin klinikte kullanılışı ve terapötik hedefler. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel Sayısı.* 2018;6:42-50.
5. Patel S, Hill MN, Cheer JF, Wotjak CT, Holmes A. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci Biobehav R.* 2017;76:56-66.
6. Marco EM, Perez-Alvarez L, Borcel E, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, et al. Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. *Behav Pharmacol.* 2004;15:21-7.
7. Akman H, Aksu F, Gultekin I, Ozbek H, Oral U, Doran F et al. A possible central antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Pharmacology.* 1996;53:71-8.
8. Carlsson KH, Jurna I. The Role of Descending Inhibition in the Antinociceptive Effects of the Pyrazolone Derivatives, Metamizol (Dipyrone) and Aminophenazone (Pyramidon). *N-S Arch Pharmacol.* 1987;335:154-9.
9. Gencer A, Gunduz O, Ulugol A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic systems and their spinal receptor subtypes in the antinociceptive effect of dipyrone. *Drug Res.* 2015;65:645-9.
10. Yılmaz I, Ulugol A. The Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on the Development of Analgesic Tolerance to Dipyrone in Mice. *Int J Neurosci.* 2009;119:755-64.
11. Kiroglu OE, Demirkol K, Berktaş F, Yegani AA, Kirpik A, Maytalman E et al. Dipyrone ameliorates behavioural changes induced by unpredictable chronic mild stress: gender differences. *Clin Invest Med.* 2016;39:14-20.
12. Dani M, Guindon J, Lambert C, Beaulieu P. The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol.* 2007;573:214-5.
13. Ottani A, Ferraris E, Giuliani D, Mioni C, Bertolini A,

- Sternieri E et al. Effect of sumatriptan in different models of pain in rats. *Eur J Pharmacol.* 2004;497:181-6.
14. Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E et al. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain.* 2008;139:190-200.
 15. Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, Watzer B, Schlosburg J, Lichtman AH, et al. Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorgan Med Chem.* 2012;20:101-7.
 16. Crunfli F, Vilela FC, Giusti-Paiva A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. *Clin Exp Pharmacol P.* 2015;42:246-55.
 17. Elmas P, Ulugol A. Involvement of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive effect of dipyrone. *J Neural Transm.* 2013;120:1533-8.
 18. Schlosburg JE, Radanova L, Di Marzo V, Imming P, Lichtman AH. Evaluation of the endogenous cannabinoid system in mediating the behavioral effects of dipyrone (metamizol) in mice. *Behav Pharmacol.* 2012;23:722-6.
 19. Paunescu H, Coman OA, Coman I, Ghita I, Georgescu SR, Draghia F et al. Cannabinoid system and cyclooxygenases inhibitors. *J Med Life.* 2011;4:11-20.
 20. Umathe SN, Manna SSS, Utturwar KS, Jain NS. Endocannabinoids mediate anxiolytic-like effect of acetaminophen via CB1 receptors. *Prog Neuro-Psychopharmacol.* 2009;33:1191-9.
 21. Gould GG, Seillier A, Weiss G, Giuffrida A, Burke TF, Hensler JG et al. Acetaminophen differentially enhances social behavior and cortical cannabinoid levels in inbred mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol.* 2012;38:260-9.
 22. Crawley JN. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10:248-58.
 23. Harro J. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behav Brain Res.* 2018;352:81-93.
 24. Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci.* 1969;159:852-9.
 25. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985;14:149-67.
 26. Vane J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Faseb J.* 1987;1:89-96.
 27. Hamza M, Dionne RA. Mechanisms of non-opioid analgesics beyond cyclooxygenase enzyme inhibition. *Curr Mol Pharmacol.* 2009;2:1-14.
 28. Alves DP, Duarte IDG. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *Eur J Pharmacol.* 2002;444:47-52.
 29. Campos C, de Gregorio R, Garcia-Nieto R, Gago F, Ortiz P, Alemany S. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *Eur J Pharmacol.* 1999;378:339-47.
 30. Dos Santos GG, Dias EV, Teixeira JM, Athie MC, Bonet IJ, Tambeli CH et al. The analgesic effect of dipyrone in peripheral tissue involves two different mechanisms: Neuronal K channel opening and CB receptor activation. *Eur J Pharmacol.* 2014;741C:124-31.
 31. Silva LCR, Romero TRI, Guzzo LS, Duarte IDG. Participation of cannabinoid receptors in peripheral nociception induced by some NSAIDs. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45:1240-3.
 32. Vanegas H, Vazquez E, Tortorici V. NSAIDs, Opioids, Cannabinoids and the Control of Pain by the Central Nervous System. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3:1335-47.
 33. Jozwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm.* 2014;71:11-23.
 34. Beirith A, Santos ARS, Rodrigues ALS, Creczynski-Pasa TB, Calixto JB. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 1998;345:233-45.
 35. Ertin IH, Gunduz O, Ulugol A. Contribution of nociceptin/orphanin FQ receptors to the antinociceptive and hypothermic effects of dipyrone. *Acta Neuropsychiatr.* 2015;27:48-52.
 36. Siebel JS, Beirith A, Calixto JB. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Brain Research.* 2004;1003:61-7.
 37. Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology.* 2007;52:958-65.
 38. Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Viganò D, Marras E et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2008;18:1292-301.
 39. Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA, Scattoni ML, Frau R, Trezza V et al. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31:2652-9.
 40. Haller J, Varga B, Ledent C, Barna I, Freund TF. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci.* 2004;19:1906-12.
 41. Rodgers RJ, Evans PM, Murphy A. Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naive and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol.* 2005;16:405-13.
 42. Viveros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;81:331-42.
 43. Fowler CJ. NSAIDs: eNdocannabinoid stimulating

- anti-inflammatory drugs? Trends Pharmacol Sci. 2012;33:468-73.
44. de Lago E, Petrosino S, Valenti M, Morera E, Ortega-Gutierrez S, Fernandez-Ruiz J et al. Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. Biochem Pharmacol. 2005;70:446-52.