



## ARAŞTIRMA/RESEARCH

### 1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1h-pirazol türevi bazı bileşiklerin benzodiazepin reseptörleri aracılığıyla anksiyolitik-benzeri etkileri

Benzodiazepine receptors mediated anxiolytic-like effects of some 1,3,5-triaryl-4,5-dihydro-1h-pyrazole derivatives

Özgür Devrim Can<sup>1</sup>, Nazlı Turan<sup>1</sup>, Feyza Alyu<sup>1</sup>

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

*Cukurova Medical Journal 2016;41(2):304-315.*

#### Abstract

**Purpose:** Pyrazole is a heterocycle structure characterized by a five-membered ring of three carbon and two adjacent nitrogen atoms. Numerous compounds including pyrazole nucleus have been reported to possess wide diverse of pharmacological activities related to central nervous system. Based on this knowledge, in the present study, we planned to examine probable anxiolytic-like effects of eighteen 1,5-diaryl-3-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivative test compounds (2a-s) which previously synthesized by our research group.

**Material and Methods:** Anxiolytic activity potential of the test compounds (100 mg/kg, i.p) was evaluated in mice using hole-board and plus-maze tests. An antagonism study was conducted with flumazenil (3 mg / kg, ip), a GABA-benzodiazepine receptor blocker, in order to investigate mechanism of the anxiolytic-like activities.

**Results:** In the hole-board tests, compounds 2g, 2h, 2k and 2s significantly increased total number of the head-dipping behavior and number of the explored holes. In the plus-maze tests, the same compounds increased the time spent in the open arms and the number of entries into the open arms. These findings indicated that these four compounds have anxiolytic-like effects. Reference drug diazepam (1 mg/kg, i.p) also showed its anxiolytic activity in both of the tests, as expected.

**Conclusion:** Benzodiazepine receptors mediated the anxiolytic-like effects of 2g, 2h, 2k and 2s coded 1,3,5-triaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivative compounds.

**Key words:** Anxiolytic, 4,5-dihydro-1H-pyrazole, flumazenil, hole-board test, elevated plus-maze tests

#### Öz

**Amaç:** Pirazol, üç karbon atomundan ve yan yana iki azot atomundan oluşan beş üyeli heterosiklik bir halka sistemidir. Literatürde pirazol çekirdeği taşıyan kimyasal bileşiklerin santral sinir sistemi üzerinde önemli bir etkinlik potansiyeli olduğuna ilişkin çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür. Bu bilgiden hareketle, bu çalışmada, araştırma grubumuz tarafından sentezlenmiş olan onsekiz adet 1,5-diaril-3- [4- (metilsülfonil) fenil] -4,5-dihidro-1H-pirazol türevi bileşiğin (2a-s) olası anksiyolitik-benzeri aktiviteleri yönünden araştırılması planlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Test bileşiklerinin (100 mg/kg, ip) anksiyolitik aktivite potansiyelleri, farelerde, delikli tahta ve yükseltilmiş artı-labirent testleri ile değerlendirilmiştir. Anksiyolitik-benzeri etkinliğe aracılık eden mekanizmaları araştırmak üzere GABA-A benzodiazepin reseptör blokörü flumazenil (3 mg/kg, i.p) ile antagonizma çalışması yapılmıştır.

**Bulgular:** Serideki 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu bileşikler, farelerin delikli tahta testlerinde ölçülen toplam baş daldırma ve keşfedilen delik sayılarını anlamlı olarak artırmıştır. Aynı bileşikler, yükseltilmiş artı-labirent testi uygulanan farelerin hem açık kola giriş sayılarını hem de açık kolda kalma sürelerini anlamlı biçimde artırmıştır. Bu bulgular, söz konusu dört bileşiğin anksiyolitik-benzeri etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Diğer yandan, referans ilaç olarak kullanılan diazepam (1 mg / kg, ip) da hem delikli tahta hem de yükseltilmiş artı-labirent testlerinde beklenen anksiyolitik aktiviteyi göstermiştir. **Sonuç:** 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu 1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevlerinin anksiyolitik-benzeri etkilerine benzodiazepin reseptörleri aracılık etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** anksiyolitik, 4,5-dihidro-1H-pirazol, delikli tahta testi, flumazenil, yükseltilmiş artı labirent testi

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Özgür Devrim Can, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Turkey E-mail adres: ozgurdt@anadolu.edu.tr  
Geliş tarihi/Received: 20.11.2015 Kabul tarihi/Accepted: 29.12.2015

## GİRİŞ

Pirazol üç karbon atomundan ve yan yana iki azot atomundan oluşan beş-üyel heterosiklik bir halka sistemidir. Literatürde bu heterosiklik yapıyı taşıyan kimyasal bileşiklerin çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterdiğine ilişkin çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür.

4,5-dihidro-1H-pirazol türevlerinin terapötik etki potansiyellerini değerlendirmek üzere yapılan literatür taramalarında, bu bileşiklerin özellikle kemoterapötik<sup>1-4</sup>, antinosiseptif<sup>5-10</sup>, anti-inflamatuar<sup>5,9,11-13</sup> ve antipiretik<sup>9,14</sup> etkinlik yönünden kayda değer bir aktivite profilleri olduğu dikkati çekmektedir. 4,5-dihidro-1H-pirazol türevi bileşiklerin anti-inflamatuar, antinosiseptif ve antipiretik etkinliklerini ortaya koyan önceki çalışmalar, bu halka sistemini taşıyan kimyasal bileşiklerin non-steroidal anti-inflamatuar (NSAI) ilaçlara benzer bir farmakolojik etki potansiyeline sahip olabileceğine işaret etmiştir. Nitekim klinikte kullanılan metamizol ve nifenazon gibi bazı NSAI ilaçların kimyasal yapılarında pirazol halkasını taşıdığı bilinmektedir<sup>15,16</sup>.

4,5-dihidro-1H-pirazol türevleri ile ilgili olarak dikkat çeken diğer bir aktivite alanı ise santral sinir sistemidir. Bu yapıya sahip bileşiklerin santral sinir sistemine geçerek önemli farmakolojik aktiviteler gösterdikleri çok kez rapor edilmiştir. Bunlardan en dikkat çekici olanlar söz konusu bileşiklerin antidepresan<sup>17-24</sup>, antikonvülzan<sup>22,25-27</sup>, nöroprotektif<sup>28-30</sup> ve anksiyolitik<sup>18,20</sup> etkilerinin bildirildiği çalışmalardır. Bazı 4,5-dihidro-1H-pirazol türevlerinin antinosiseptif etkilerini de santral mekanizmalar ile ilişkilendiren çalışmalara rastlamak mümkündür<sup>6,8,10,31</sup>. Söz konusu türevlerin antinosiseptif etkilerine periakvaduktal gri'de on/off hücre ateşlemesinde azalma<sup>32</sup>, opioid mekanizmaların stimülasyonu<sup>6-8,32</sup>, spinal serotonerjik reseptörlerin ve  $\alpha 2$  adrenoseptörlerin aktivasyonu<sup>31</sup> gibi çeşitli santral mekanizmaların aracılık ettiği gösterilmiştir.

4,5-dihidro-1H-pirazol türevi bileşiklerin santral sinir sistemi ile de ilişkili olabilen yaygın farmakolojik etki potansiyellerinden hareketle araştırma grubumuz tarafından 18 adet 1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevi bileşik sentezlenmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin olası antidepresan aktiviteleri<sup>24</sup> ve

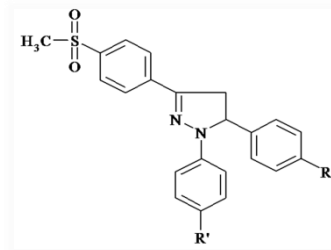
antinosiseptif etki potansiyelleri<sup>33</sup> araştırılmıştır. Antidepresan-benzeri aktivite, modifiye zorlu yüzdürme ve kuyruktan asma testleri kullanılarak değerlendirilmiş ve serideki bileşiklerden 2a, 2h, 2j, 2k, 2l, 2m ve 2n kodlu olanların anlamlı ölçüde antidepresan-benzeri etkiye sahip olduğu görülmüştür<sup>24</sup>. Test bileşiklerinin olası antinosiseptif etkinlikleri ise sıcak plaka, kuyruk sıkıştırma ve asetik asid ile indüklenen kıvrınma testi ile değerlendirilmiş ve aynı seriden 2c, 2e, 2g, 2h, 2j, 2l, 2m kodlu bileşiklerin anlamlı düzeyde akut antinosiseptif etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir<sup>33</sup>.

Bu çalışmada ise söz konusu test bileşiklerinin anksiyolitik-benzeri etkinlik açısından taranması planlanmıştır. Ayrıca, GABAA/benzodiazepin reseptör antagonisti flumazenil ile antagonizma çalışmaları yapılarak, söz konusu farmakolojik etkiye aracılık eden mekanizmalara ilişkin bir yaklaşım da sağlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bileşiklerin sentezi

1,5-diaril-3-[4-(metilsulfonyl)fenil]-4,5-dihidro-1H-pirazol türevleri (2a-s), 3-(4-süstitüte fenil)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-2-propen-1-on'ların sıcak asetik asitte fenilhidrazin hidroklorid türevleri ile muamele edilmesi sonucunda sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları IR, 1H-NMR, 13C-NMR ve kütle spektrometrisi verileri ve elemental analiz ile aydınlatılmıştır.



Şekil 1. Test maddelerinin genel kimyasal yapısı

Test edilen bileşiklerin sentez protokolü ve ilgili spektral verileri çalışma grubumuz tarafından önceden rapor edilmiştir 24. Test bileşiklerinin genel kimyasal yapısı Şekil 1'de ve her bir test bileşiğinin süstitü edildiği gruplar ise Tablo 1'de sunulmuştur.

**Tablo 1. 4,5-dihidro-1H-pirazol türevi test maddelerinin süstitüe edildiği gruplar**

Bileşik	Moleküler Formül	R	R'
2a	C22H18ClFN2O2S	F	Cl
2b	C22H18F2N2O2S	F	F
2c	C22H18BrFN2O2S	F	Br
2d	C23H21FN2O3S	F	OMe
2e	C23H21FN2O2S	F	Me
2f	C23H21ClN2O3S	Cl	OMe
2g	C22H18ClFN2O2S	Cl	F
2h	C23H21ClN2O2S	Cl	Me
2i	C22H18BrClN2O2S	Cl	Br
2j	C22H18Cl2N2O2S	Cl	Cl
2k	C23H21BrN2O3S	Br	OMe
2l	C22H18BrFN2O2S	Br	F
2m	C23H21BrN2O2S	Br	Me
2n	C22H18Br2N2O2S	Br	Br
2o	C22H18BrClN2O2S	Br	Cl
2p	C22H19BrN2O2S	Br	H
2r	C22H19ClN2O2S	Cl	H
2s	C22H19FN2O2S	F	H

### Deney hayvanları

Deneyler için, 30-35 g ağırlığında, erişkin Balb/c erkek fareler kullanılmıştır. Deney hayvanları 24±10C sıcaklıktaki, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsüne sahip odalarda barındırılmıştır. Deney süresince sıcaklık, ses ve aydınlatma koşulları sabit tutulmuştur.

Deney hayvanları, ortama alışmaları ve uyum sağlamaları amacıyla deneye başlanmadan en az 48 saat önce laboratuvara getirilmiştir. Bu çalışmanın deneysel protokolü Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar tarihi: 4.3.2015; karar no: 2015-11).

### Test maddelerinin uygulanması

Test bileşikleri (100 mg/kg) çiçek yağı içerisinde çözülmüş ve intraperitoneal (i.p) yolla uygulanmıştır<sup>24</sup>. Kontrol grubunda bulunan hayvanlara da aynı hacimde (0,1 mL) çözücü (çiçek yağı) enjekte edilmiştir. Test bileşiklerinin dozları, laboratuvarımızda 4,5-dihidro-1H-pirazol türevi çeşitli bileşikler ile daha önce yapılmış olan çalışmalar doğrultusunda seçilmiştir.

Referans anksiyolitik ilaç olarak kullanılan diazepam ise serum fizyolojik içinde çözülmüş ve 1 mg/kg dozda i.p yolla uygulanmıştır. Anksiyeteyi değerlendirmekte kullanılan testler, uygulanmalardan 30 dakika sonra başlatılmıştır.

### Davranış deneyleri

#### Delikli tahta deneyleri

Farelerin keşif davranışları, delikli tahta cihazı (Ugo Basile, no. 6650, Varese, İtalya) ile değerlendirilmiştir<sup>34-37</sup>. Delikli tahta cihazı, 16 adet 3 cm çaplı eşdeğer delik içeren 40×40 cm<sup>2</sup>'lik gri pleksiglas bir panelden oluşmuştur. Cihaz yerden 15 cm yüksekte konumlandırılmıştır. Uygulamalardan 30'ar dakika sonra, hayvanlar tek tek, sırtı gözlemciye dönük biçimde cihazın merkezine konulmuş ve cihazın üzerindeki delikleri keşfetmek üzere serbest bırakılmıştır. Farelerin cihaza konulmasından itibaren, tahta üzerindeki 16 delikten kaç tanesini keşfettiği (keşfedilen delik sayısı) ve bu deliklere kafasını kaç kez daldırdığı (toplam baş daldırma) 5 dakikalık süre boyunca kaydedilmiştir.

#### Yükseltilmiş artı şekilli labirent deneyleri

Farelerin anksiyete şiddetleri, yükseltilmiş artı şekilli labirent deneyleri (Ugo Basile, no. 40143, Varese, İtalya) ile değerlendirilmiştir<sup>38</sup>. Bu çalışmada kullanılan yükseltilmiş artı şekilli düzenek iki açık (35 cm x 5 cm), iki kapalı koldan (35 cm x 5 cm x 15 cm) ve bunların birleştiği merkez bölgeden oluşan, yerden 60 cm yukarıda konumlanmış olan artı şeklinde bir labirenttir. Beş dakikalık ölçüm süresi boyunca, farelerin açık ve kapalı kollara giriş sayıları ve bu kollarda geçirdiği süreler kaydedilmiştir. Hayvanların açık kola giriş sayısının, her iki kola

toplam giriş sayısına oranının yüzdesi (%AKGS) ve açık kolda geçirdikleri sürenin, her iki kolda kaldıkları toplam süreye oranının yüzdesi (%AKKS), anksiyete şiddetlerinin belirlenmesi için ölçüt olarak kabul edilmiştir<sup>39</sup>.

### Antagonizma çalışmaları

Test edilen bileşiklerden anksiyolitik-benzeri aktivite gösterenler tespit edildikten sonra, söz konusu etkinin mekanizmasına ilişkin bir yaklaşım sağlamak amacıyla benzodiazepin reseptör blokörü flumazenil (Flu) kullanılarak antagonizma çalışması yapılmıştır. Bu amaçla serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanan Flu, bileşiklerin enjeksiyonlarından 15'er dakika önce 3 mg/kg dozda i.p olarak uygulanmıştır. Daha sonra yukarıda tarif edilen deney protokolü aynen tekrar edilmiştir<sup>40</sup>.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmeler için Graphpad Prism ver. 4.03 paket programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testleri uygulanarak değerlendirilmiştir. Grafiklerin çizimleri için, Graphpad Prism ver. 4.03 programından

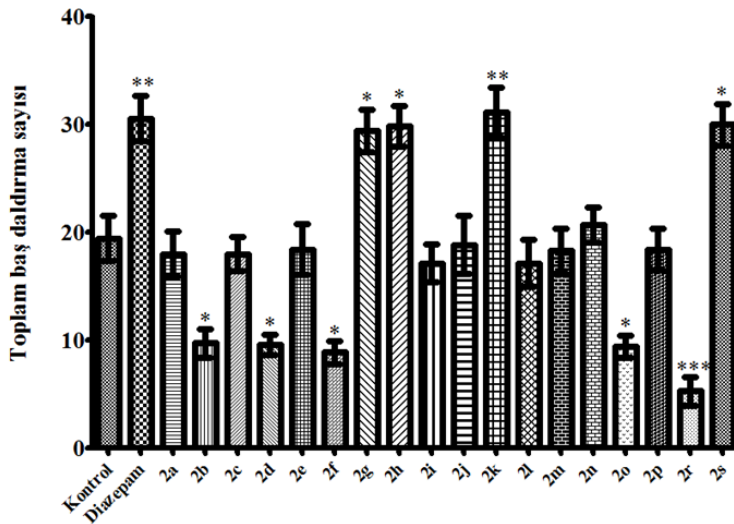
yararlanılmıştır. Sonuçlar, ortalama±ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir.  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### Delikli tahta deneyleri

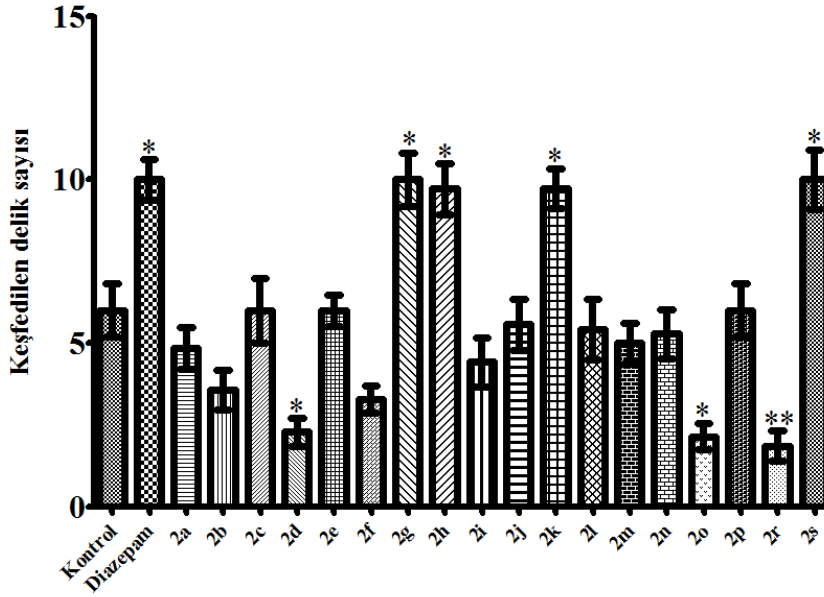
1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevi test bileşiklerinin (100 mg/kg) ve referans ilaç diazepam'ın (1 mg/kg) farelerin delikli tahta testine ölçülen toplam baş daldırma sayıları üzerine etkileri Şekil 2'de [ $F(19.140) = 18.07, P < 0.001$ ], keşfedilen delik sayısı üzerine etkileri ise Şekil 3'de [ $F(19.120) = 14.94, P < 0.001$ ] gösterilmiştir.

Çoklu karşılaştırma için uygulanan Tukey HSD testi sonuçları, diazepam'ın ( $p < 0.01$ ) ve 2g ( $p < 0.05$ ), 2h ( $p < 0.05$ ), 2k ( $p < 0.01$ ) ve 2s ( $p < 0.05$ ) kodlu test bileşiklerinin delikli tahta cihazında ölçülen toplam baş daldırma sayılarını kontrol grubunun toplam baş daldırma sayısına göre anlamlı ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Benzer biçimde, gerek diazepam ( $p < 0.05$ ) ve gerekse 2g ( $p < 0.05$ ), 2h ( $p < 0.05$ ), 2k ( $p < 0.05$ ) ve 2s ( $p < 0.05$ ) kodlu test bileşiklerinin uygulanması farelerin keşfettikleri delik sayısında anlamlı bir artışa neden olmuştur.



Şekil 2. Diazepamın (1 mg/kg) ve 1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevi test maddelerinin (100 mg/kg), farelerin delikli tahta testine ölçülen toplam baş daldırma sayıları üzerine etkileri.

Kontrolle göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Tek yönlü varyans analizi, takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır,  $n=7$ .



Şekil 3. Diazepamın (1 mg/kg) ve 1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevi test maddelerinin (100 mg/kg), farelerin delikli tahta testine “keşfettikleri delik sayısı” üzerine etkileri.

Kontrolle göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır,  $n=7$ .

### Yükseltilmiş artı şekilli labirent deneyleri

1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevi test bileşiklerinin (100 mg/kg) ve referans ilaç diazepam'ın (1 mg/kg) farelerin yükseltilmiş labirent testine ölçülen %AKGS parametreleri üzerine etkileri Şekil 4'de [ $F(19,140) = 11.12, P < 0.001$ ] ve %AKKS parametreleri üzerine etkileri ise Şekil 5'de [ $F(19,140) = 14.16, P < 0.001$ ] gösterilmiştir.

Çoklu karşılaştırma için uygulanan Tukey HSD testi sonuçları, diazepam'ın ( $p < 0.01$ ) ve 2g ( $p < 0.05$ ), 2h ( $p < 0.05$ ), 2k ( $p < 0.05$ ) ve 2s ( $p < 0.05$ ) kodlu test bileşiklerinin farelerin yükseltilmiş labirent testine ölçülen %AKGS parametrelerini kontrol grubunun %AKGS parametrelerine göre anlamlı ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Benzer biçimde, gerek diazepam ( $p < 0.05$ ) ve gerekse 2g ( $p < 0.05$ ), 2h ( $p < 0.01$ ), 2k ( $p < 0.05$ ) ve 2s ( $p < 0.05$ ) kodlu test bileşiklerinin uygulanması farelerin %AKKS parametrelerinde de anlamlı bir artışa neden olmuştur.

Gerek delikli tahta gerekse yükseltilmiş labirent testlerine etkili bulunan 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu

bileşikler, farelerin kapalı kola giriş sıklığında kontrol değerlerine göre anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 6).

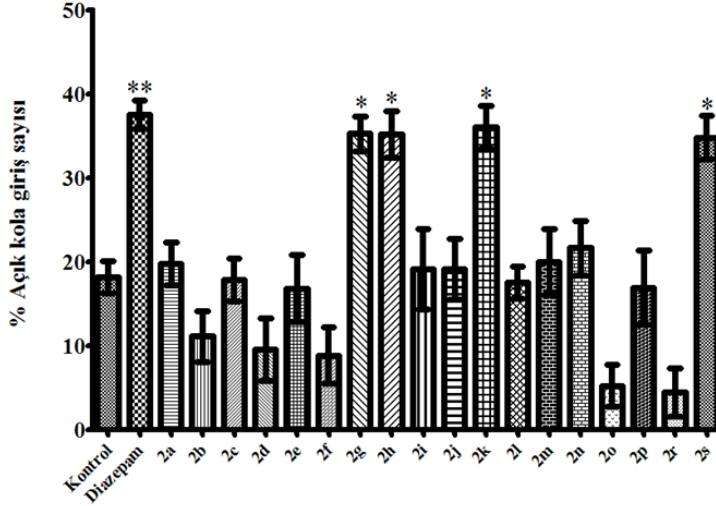
### Antagonizma çalışmalarının sonuçları

Flumazenil (3 mg/kg) ön-uygulamasının delikli tahta testinde ölçülen “toplam baş daldırma sayısı” parametresi üzerine etkisi Şekil 7'de [ $F(10,66) = 9.14, P < 0.001$ ]; “keşfedilen delik sayısı” üzerine etkisi ise Şekil 8'de gösterilmiştir [ $F(10,66) = 14.78, P < 0.001$ ].

Flumazenil ön-uygulaması gerek diazepam'ın, gerekse, 2g, 2h, 2k, ve 2s kodlu bileşiklerin, toplam baş daldırma sayısını artırıcı etkilerini ortadan kaldırmıştır (diazepam için  $p < 0.05$ ; 2g için  $p < 0.05$ ; 2h için  $p < 0.01$ ; 2k için  $p < 0.01$ ; 2s için  $p < 0.01$ ) (Şekil 7). Flumazenil ile yapılan antagonizma çalışması sonucunda, toplam baş daldırma sayılarına benzer şekilde, farelerin keşfettikleri delik sayılarında da 2g, 2h, 2k, 2s kodlu bileşikler ve diazepam ile indüklenen artış ortadan kalkmıştır (2g için  $p < 0.001$ ; 2h için  $p < 0.001$ ; 2k için  $p < 0.001$ ; 2s için  $p < 0.001$ ; diazepam için  $p < 0.001$ ) (Şekil 8).

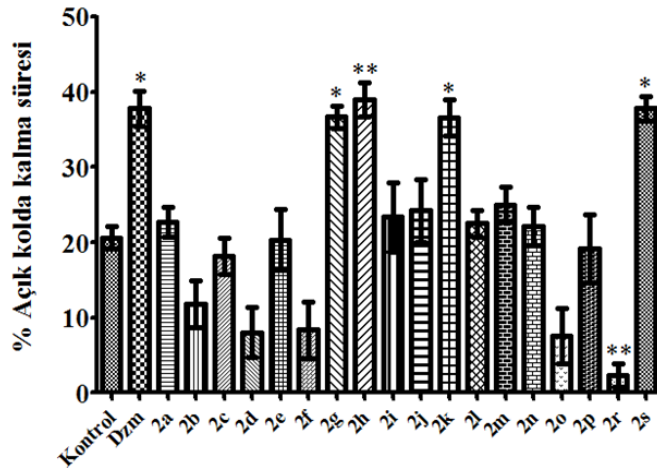
Flumazenil (3 mg/kg) ön-uygulamasının yükseltmiş labirent testinde ölçülen %AKGS parametresi üzerine etkileri Şekil 9'de [ $F(10,66) = 14.83, P <$

0.001]; %AKKS üzerine etkileri ise Şekil 10'da gösterilmiştir [ $F(10,66) = 11.26, P < 0.001$ ].



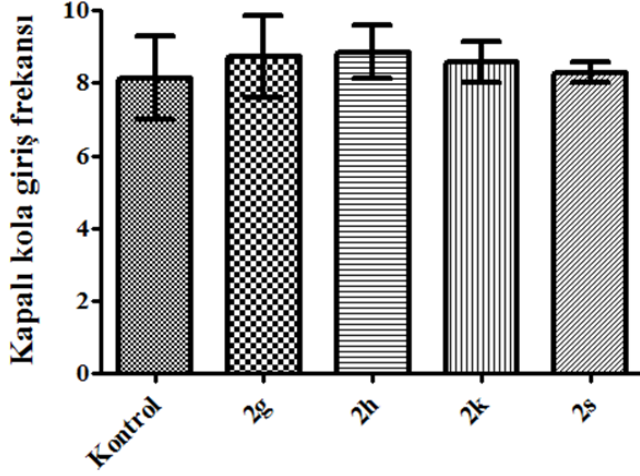
Şekil 4. Diazepam'ın (1 mg/kg) ve 1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevi test maddelerinin (100 mg/kg), yükseltmiş labirent testi uygulanan farelerdeki "açık kola giriş sayısının yüzdesi" üzerine etkileri.

Kontrolle Göre Anlamlı Farklılık \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır,  $n=7$



Şekil 5. Diazepam'ın (1 mg/kg) ve 1,3,5-triaril-4,5-dihidro-1H-pirazol türevi test maddelerinin (100 mg/kg), yükseltmiş labirent testi uygulanan farelerdeki "açık kolda kalma süresinin yüzdesi" üzerine etkileri.

Kontrolle göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır,  $n=7$

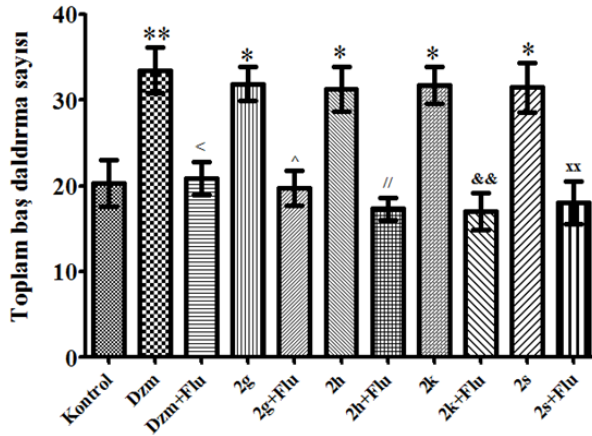


Şekil 6. 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu bileşiklerin (100 mg/kg), yükseltilmiş labirent testi uygulanan farelerdeki “kapalı kola giriş frekansı” üzerine etkileri.

Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır, n=7.

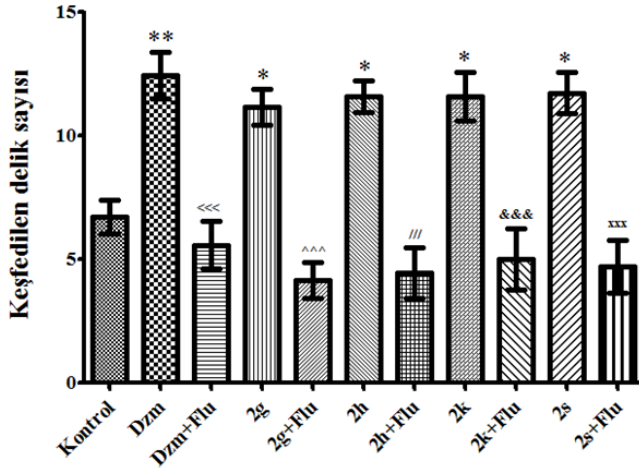
Flumazenil ön-uygulaması, gerek diazepam'ın, gerekse 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu test bileşiklerinin, farelerin %AKGS parametresini artırıcı etkilerini ortadan kaldırmıştır (diazepam için  $p<0.001$ ; 2g için  $p<0.001$ ; 2h için  $p<0.01$ ; 2k için  $p<0.01$ ; 2s için  $p<0.001$ ) (Şekil 9). Flumazenil ile yapılan antagonizma çalışması, toplam baş daldırma

sayılarına benzer şekilde, farelerin %AKKS parametreleri de 2g, 2h, 2k, 2s kodlu bileşikler ve diazepam ile indüklenen artışı da ortadan kaldırmıştır (2g için  $p<0.05$ ; 2h için  $p<0.01$ ; 2k için  $p<0.05$ ; 2s için  $p<0.001$ ; diazepam için  $p<0.001$ ) (Şekil 10).



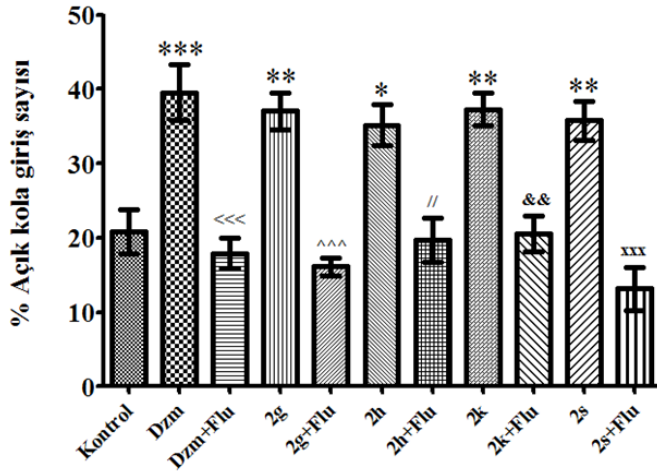
Şekil 7. Flumazenil (3 mg/kg) ön uygulamasının delikli tahta testinde ölçülen “toplam baş daldırma sayısı” parametresi üzerine etkisi.

Kontrolle göre anlamlı farklılık \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ ; Dzm grubuna göre anlamlı farklılık < $p<0,05$ ; 2g grubuna göre anlamlı farklılık ^ $p<0,05$ ; 2h grubuna göre anlamlı farklılık // $p<0,01$ ; 2k grubuna göre anlamlı farklılık && $p<0,01$ ; 2s grubuna göre anlamlı farklılık x $p<0,01$ . Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır, n=7.



Şekil 8. Flumazenil (3 mg/kg) ön uygulamasının delikli tahta testinde ölçülen “toplam baş daldırma sayısı” parametresi üzerine etkisi.

Kontrole göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; Dzm grubuna göre anlamlı farklılık <<< $p < 0,001$ ; 2g grubuna göre anlamlı farklılık ^^ $p < 0,001$ ; 2h grubuna göre anlamlı farklılık /// $p < 0,001$ ; 2k grubuna göre anlamlı farklılık &&& $p < 0,001$ ; 2s grubuna göre anlamlı farklılık xxx $p < 0,001$ . Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır,  $n=7$ .



Şekil 9. Flumazenil (3 mg/kg) ön uygulamasının yükseltilmiş labirent testinde ölçülen “açık kola giriş sayısının yüzdesi” parametresi üzerine etkisi.

Kontrole göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; Dzm grubuna göre anlamlı farklılık <<< $p < 0,001$ ; 2g grubuna göre anlamlı farklılık ^^ $p < 0,001$ ; 2h grubuna göre anlamlı farklılık /// $p < 0,01$ ; 2k grubuna göre anlamlı farklılık && $p < 0,01$ ; 2s grubuna göre anlamlı farklılık xxx $p < 0,001$ . Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır,  $n=7$ .

## TARTIŞMA

Bu çalışmada 4,5-dihidro-1H-pirazol türevi bazı bileşiklerin potansiyel anksiyolitik-benzeri etkileri delikli tahta ve yükseltilmiş artı-labirent testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Kemirgenlerin

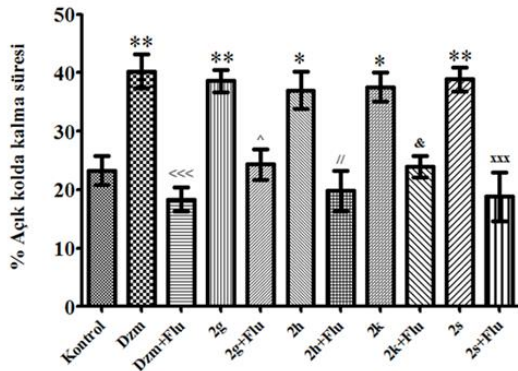
emosyonel durumunu değerlendirmeye ilişkin sık kullanılan bir yöntem<sup>34</sup> olan delikli tahta testinde, deney hayvanının test süresi boyunca düzenek üzerinde bulunan 16 adet deliğe “toplam kaç kez baş daldırdığı” ve bu süre boyunca eşdeğer özellikteki bu



deliklerden “kaç tanesini keşfedebildiği” gibi bazı parametreler değerlendirilmektedir<sup>34-36</sup>.

Bu çalışmada test edilen türevler içerisinde 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu bileşiklerin, delikli tahta testinde ölçülen toplam baş daldırma (Şekil 2) ve keşfedilen delik (Şekil 3) sayılarını, kontrol gruplarına göre anlamlı biçimde artırdığı gözlenmiştir. Bu bulgular akut olarak uygulanan bu dört 4,5-dihidro-1H-pirazol türevinin, hayvanların keşif davranışlarını artırdığına, diğer bir ifadeyle anksiyolitik-benzeri etki gösterdiğine işaret etmektedir.

Bu çalışmada, deney hayvanlarının anksiyete davranışlarının değerlendirilmesi için kullanılan diğer bir yöntem ise yükseltilmiş artı-labirent testidir. Bu test, kemirgenlerin yerden yüksek pozisyonda konumlanmış artı şekilli düzeneğin dar, açık ve yüksek olan kolundan kaçınmaları ve doğal eğilimleri gereği karanlık ve kapalı kolu tercih etmelerine esasına dayanmaktadır. Anksiyolitik ilaçların/bileşiklerin, anksiyoselektif özellikli bu testte %AKGS ve %AKKS parametrelerini anlamlı olarak artırdığı; anksiyojenik bileşiklerin ise söz konusu parametreleri azalttığı bilinmektedir<sup>41</sup>.



Şekil 10. Flumazenil (3 mg/kg) ön uygulamasının yükseltilmiş labirent testinde ölçülen “açık kolda kalma süresinin yüzdesi” parametresi üzerine etkisi.

Kontrolle göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; Dzm grubuna göre anlamlı farklılık <<< $p < 0,001$ ; 2g grubuna göre anlamlı farklılık ^ $p < 0,05$ ; 2h grubuna göre anlamlı farklılık // $p < 0,01$ ; 2k grubuna göre anlamlı farklılık & $p < 0,05$ ; 2s grubuna göre anlamlı farklılık xxx $p < 0,001$ . Tek yönlü varyans analizini takiben çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi uygulanmıştır,  $n=7$ .

Bu çalışmada yükseltilmiş artı-labirent testinde elde edilen veriler, test edilen 4,5-dihidro-1H-pirazol türevleri arasında 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu bileşiklerin hem % AKGS (Şekil 4) ve hem de % AKKS (Şekil 5) değerlerini kontrol değerlerine göre anlamlı biçimde artırdığını ortaya koymuştur. Söz konusu dört bileşiğin anksiyolitik-benzeri etkinlik gösterdiğine işaret eden bu bulgular delikli tahta testinden elde edilen sonuçları da destekler özelliindedir. Referans ilaç olarak kullanılan diazepam (1 mg/kg) da hem yükseltilmiş artı-labirent hem de delikli tahta testlerinde beklenen anksiyolitik etkisini göstermiştir (Şekil 2-5).

Diğer yandan, anksiyolitik-benzeri etkinlik gösteren bu dört bileşiğin, farelerin kapalı kola giriş sıklığında kontrol değerlerine göre anlamlı bir değişikliğe neden olmamış olması (Şekil 6), gözlenen anksiyolitik-benzeri etkiye nörosedatif etki ya da motor aktivite bozukluğu gibi non-spesifik

faktörlerin karışmadığına ilişkin bir işaret olarak kabul edilebilir<sup>37</sup>. Nitekim anksiyolitik-benzeri etki gösteren bu dört bileşiğin, farelerin lokomotor aktivite<sup>24</sup> ya da motor koordinasyon<sup>33</sup> değerlerini, kontrol gruplarına göre anlamlı biçimde değiştirmedeği tarafımızdan daha önce de rapor edilmiştir.

Anksiyete davranışlarının düzenlenmesinde GABA-A benzodiazepin reseptörü Cl- kanalı kompleksinin önemli rol oynadığı bilinmektedir<sup>42</sup>. Nitekim, klinikte kullanılan anksiyolitik ilaçların büyük bölümü, bu kompleks üzerine agonistik etki gösteren maddelerdir<sup>16</sup>. Bu bilgiden hareketle, bu çalışmada 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu bileşiklerin anksiyolitik-benzeri etkilerine benzodiazepin reseptörlerinin olası katılımını araştırmak üzere, Flu ile antagonizma çalışmaları yapılmıştır. Flu (3 mg/kg) ön-uygulamaları, hem delikli tahta (Şekil 7 ve 8) hem de yükseltilmiş labirent (Şekil 9 ve 10) testlerinde, 2g,

2h, 2k ve 2s kodlu bileşikler ile indüklenen anksiyolitik-benzeri etkiyi tamamen ortadan kaldırmıştır. Bu bulgular, söz konusu bileşiklerin anksiyolitik-benzeri etkilerine santral benzodiazepin reseptörlerinin aracılık ettiğini ortaya koymuştur.

Bu çalışma, 4,5-dihidro-1H-pyrazol türevlerinin farmakolojik etkilerine GABA(A)/benzodiazepin reseptör kompleksinin katılabileceğine işaret eden ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Diğer yandan 2g, 2h, 2k ve 2s kodlu bileşiklerin etki mekanizmalarının tam olarak aydınlatılabilmesi için, bu bileşikler ile indüklenen anksiyolitik-benzeri etkiye aracılık etmesi olasılığı olan diğer mekanizmalara (serotonerjik, noradrenerjik, glutamaterjik, adenozerjik vs) ilişkin ek çalışmalara gereksinim duyulduğu açıktır.

Bu çalışmada anksiyolitik-benzeri etkinlikleri ortaya konulan türevlerden, 2k'nın antidepresan-benzeri; 2g'nin antinosiseptif ve 2h'nın da hem antinosiseptif hem de antidepresan-benzeri etkinliğe sahip olduğuna ilişkin önceki bilgiler<sup>24,33</sup> göz önünde bulundurulduğunda, adı geçen bileşiklerin etki mekanizmalarının çok yönlü olduğu sonucuna varılabilir. Bu durum, ilaç geliştirme sürecinde polifarmasiden kaçınmaya yardımcı olabilecek ajanların keşfi açısından değerlidir.

2g, 2h, 2k ve 2s kodlu bileşiklerin, uygulamayı takip eden 48 saat içerisinde herhangi bir ölüme neden olmaması ve ataksi, paralizi, konvülsiyon ya da diyare gibi istenmeyen yan etkileri indüklememiş olması bileşiklerin güvenliliğine dair ön-ışaretler olarak kabul edilebilir. Diğer yandan, kayda değer ölçüde anksiyolitik-benzeri etkinlik gösteren bileşiklerin kronik toksisite açısından araştırılmasının yararlı olacağı açıktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yazarları, test edilen 18 adet 4,5-dihidro-1H-pirazol türevinin teminindeki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Ahmet Öztürk'e, Prof. Dr. Zafer Asım Kaplancıklı'ya, Prof. Dr. Turan-Zitouni'ye ve Doç. Dr. Mehlika Dilek Altıntop'a teşekkürlerini sunar.

## KAYNAKLAR

1. Goodell JR, Puig-Basagoiti F, Forshey BM, Shi PY, Ferguson DM. Identification of compounds with anti-West Nile virus activity. *J Med Chem.* 2006;49:2127-37.
2. Liu JJ, Sun J, Fang YB, Yang YA, Jiao RH, Zhu HL. Synthesis, and antibacterial activity of novel 4,5-

3. Oliveira S, Pizzuti L, Quina F, Flores A, Lund R, Lencina C et al. Anti-candida, anti-enzyme activity and cytotoxicity of 3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamides. *Molecules.* 2014;19:5806-20.
4. Zhao MY, Yin Y, Yu XW, Sangani CB, Wang SF, Lu AM et al. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR study of novel 4,5-dihydro-1H-pyrazole thiazole derivatives as BRAF(V<sup>600</sup>E) inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2015;23:46-54.
5. Amir M, Kumar H, Khan SA. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazoline derivatives as new anti-inflammatory and analgesic agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18:918-22.
6. Milano J, Oliveira SM, Rossato MF, Sauzem PD, Machado P, Beck P et al. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur J Pharmacol.* 2008;581:86-96.
7. Milano J, Rossato MF, Oliveira SM, Drewes C, Machado P, Beck P et al. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sci.* 2008;83:739-46.
8. Kaplancıklı ZA, Turan-Zitouni G, Ozdemir A, Can O, Chevallet P. Synthesis and antinociceptive activities of some pyrazoline derivatives. *Eur J Med Chem.* 2009;44:2606-10.
9. Khode S, Maddi V, Aragade P, Palkar M, Ronad PK, Mamledesai S et al. Synthesis and pharmacological evaluation of a novel series of 5-(substituted)aryl-3-(3-coumarinyl)-1-phenyl-2-pyrazolines as novel anti-inflammatory and analgesic agents. *Eur J Med Chem.* 2009;44:1682-8.
10. Demir Özkay U, Can OD, Kaplancıklı ZA. Antinociceptive activities of some triazole and pyrazoline moieties-bearing compounds. *Med Chem Res.* 2012;21:1056-61.
11. Bandgar BP, Adsul LK, Chavan HV, Jalde SS, Shringare SN, Shaikh R et al. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of 3-(substituted)-aryl-5-(9-methyl-3-carbazole)-1H-2-pyrazolines as potent anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22:5839-44.
12. Bano S, Javed K, Ahmad S, Rathish IG, Singh S, Alam MS. Synthesis and biological evaluation of some new 2-pyrazolines bearing benzene sulfonamide moiety as potential anti-inflammatory and anti-cancer agents. *Eur J Med Chem.* 2011;46:5763-8.
13. Rathish IG, Javed K, Ahmad S, Bano S, Alam MS, Pillai KK et al. Synthesis and antiinflammatory activity of some new 1,3,5-trisubstituted pyrazolines bearing benzene sulfonamide. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19:255-8.

14. Pasin JS, Ferreira AP, Saraiva AL, Ratzlaff V, Andrighetto R, Machado P et al. Antipyretic and antioxidant activities of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43:1193-202.
15. Buschmann H, Christoph T, Friderichs E, Maul C, Sundermann, B. *Analgesics: From Chemistry and Pharmacology to Clinical Application*, Weinheim: Published by Wiley-VCH, 2002.
16. Rx Media Pharma®. *İnterAktif İlaç Bilgi Kaynağı*, 2015.
17. Can OD, Ozkay UD, Kaplancıklı ZA., Ozturk Y. Effects of some 1,3,5-trisubstitued-2-pyrazoline derivatives on depression and anxiety parameters of mice. *Arch Pharm Res.* 2009;32:1293-9.
18. Gökhan-Kelekçi N, Koyunoğlu S, Yabanoğlu S, Yelekçi K, Ozgen O, Uçar G et al. New pyrazoline bearing 4(3H)-quinazolinone inhibitors of monoamine oxidase: synthesis, biological evaluation, and structural determinants of MAO-A and MAO-B selectivity. *Bioorg Med Chem.* 2009;17:675-89.
19. Kaplancıklı ZA, Ozdemir A, Turan-Zitouni G, Altıntop MD, Can OD. New pyrazoline derivatives and their antidepressant activity. *Eur J Med Chem.* 2010;45:4383-7.
20. Koç GŞ, Tan OU, Uçar G, Yıldırım E, Erol K, Palaska E., Synthesis and monoamine oxidase inhibitory activities of some 3-(4-fluorophenyl)-5-aryl-n-substituted-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole-1-carbothioamide derivatives. *Drug Res (Stuttg).* 2014;64:591-8.
21. Mathew B, Suresh J, Anbazhagan S, Dev S. Molecular docking studies of some novel antidepressant 5-substituted phenyl-3-(thiophen-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxamides against monoamine oxidase isoforms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2015 (in press).
22. Özdemir Z, Kandilci HB, Gümüşel B, Çalış U, Bilgin AA. Synthesis and studies on antidepressant and anticonvulsant activities of some 3-(2-furyl)-pyrazoline derivatives. *Eur J Med Chem.* 2007;42:373-9.
23. Palaska E, Aytemir M, Uzbay IT, Erol D. Synthesis and antidepressant activities of some 3,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Eur J Med Chem.* 2001;36:539-43.
24. Özdemir A, Altıntop MD, Kaplancıklı ZA, Can ÖD, Demir Özkay Ü, Turan-Zitouni G. Synthesis and evaluation of new 1,5-diaryl-3-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives as potential antidepressant agents. *Molecules.* 2015;20:2668-84.
25. Aboul-Enein MN, El-Azzouny AA, Attia MI, Maklad YA, Amin KM, Abdel-Rehim M et al. Design and synthesis of novel stiripentol analogues as potential anticonvulsants. *Eur J Med Chem.* 2012;47:360-9.
26. Güniz Küçükgül S, Rollas S, Erdeniz H, Kiraz M, Cevdet Ekinci A, Vidin A. Synthesis, characterization and pharmacological properties of some 4-arylhydrazono-2-pyrazoline-5-one derivatives obtained from heterocyclic amines. *Eur J Med Chem.* 2000;35:761-71.
27. Singh SP, Chaudhari A, Barthwal JP, Parmar SS. Anticonvulsant activity and selective inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent oxidations by 1,3,5-trisubstituted pyrazolines. *J Pharm Sci.* 1974;63:1948-50.
28. Nakagawa T., Ozawa T., Shige K., Yamamoto R., Minami M., Satoh M. Inhibition of morphine tolerance and dependence by MS-153, a glutamate transporter activator. *Eur J Pharmacol.* 2001;419:39-45.
29. Shimada F, Shiga Y, Morikawa M, Kawazura H, Morikawa O, Matsuoka T et al. The neuroprotective agent MS-153 stimulates glutamate uptake. *Eur J Pharmacol.* 1999;336:263-70.
30. Yamashita H, Okumura K, Lizuka H, Ohto N. Process for producing 1-acyl-2-pyrazolines for treatment of cerebral edema. *Eur Pat Appl EP* 322,691. C.A. 112 1990; 98520.
31. Godoy MC, Figuera MR, Souza FR, Flores AE, Rubin MA, Oliveira MR et al. Alpha 2-adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur J Pharmacol.* 2004;496:93-7.
32. Tortorici V, Vanegas H. Putative role of medullary off- and on-cells in the antinociception produced by dipyrone (metamizol) administered systemically or microinjected into PAG. *Pain.* 1994;57:197-205.
33. Can ÖD, Alyu F, Turan N, Özdemir A. Antinociceptive activities of some 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives: involvement of central and peripheral pathways. *Lett Drug Des Discov* 2016 (in press).
34. File SE, Pellow S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *British J Pharmacol* 1985;86:729-35.
35. Can OD, Ozkay UD, Oztürk N, Oztürk Y. Effects of hawthorn seed and pulp extracts on the central nervous system. *Pharm Biol.* 2010;48:924-31.
36. Can OD, Demir Özkay, Ü. Effects of Hypericum montbretti extract on the central nervous system and involvement of GABA (A)/benzodiazepine receptors in its pharmacological activity. *Phytother Res.* 2012;26:1695-700.
37. Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol.* 1998;350:21-9.
38. Can OD, Demir Özkay U, Kıyan HT, Demirci B. Psychopharmacological profile of Chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil in mice. *Phytomedicine.* 2012;19:306-10.
39. Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, Lin YC, Liao J. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse

- models of anxiety. *J Ethnopharmacol.* 2000;72:435-41.
40. Rejón-Orantes J del C, González-Esquinca AR, de la Mora MP, Roldan Roldan G, Cortes D. Annomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta Med.* 2011;77:322-7.
41. Sampath C, Holbik M, Krenn L, Butterweck V. Anxiolytic effects of fractions obtained from *Passiflora incarnata* L. in the elevated plus-maze in mice. *Phytother Res.* 2011;25:789-95.
42. Salzman C, Miyawaki EK, le Bars P, Kerrihard TN. Neurobiologic basis of anxiety and its treatment. *Harv Rev Psychiatry.* 1993;1:197-206.