

ผลของเอ็น-2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยพิโลคาร์ปีน

นางสาว อรรระวี กงสมบัติ



ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาลัทธิสุตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาสารีรวิทยา (สหสาขาวิชา)


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6963-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF N-(2-PROPYLPENTANOYL)UREA ON PILOCARPINE-INDUCED SEIZURE IN RATS



Miss Onrawee Khongsombat

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology (Inter-Department)  
Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6963-6



อรรระวี คงสมบัติ : ผลของเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย  
 พิโลคาร์ปีน (EFFECT OF N-(2-PROPYLPENTANOYL)UREA ON PILOCARPINE-  
 INDUCED SEIZURE IN RATS) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. บุญยงค์ ดันตีสระ อ.ที่ปรึกษาร่วม :  
 PROF. HIROSHI WATANABE รศ.ดร. มยุรี ดันตีสระ, 106 หน้า ISBN 974-17-6963-6

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย (วีฟียู) ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยพิโลคาร์ปีน โดยศึกษาผลของวีฟียูในการป้องกันการชักที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยพิโลคาร์ปีน และศึกษาผลของวีฟียูต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับของสารสื่อประสาท (กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นและยับยั้งระบบประสาท) การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์ประสาท (CA1 และ CA3) และระดับไลปิดเปอร์ออกซิเดชันในส่วนของฮิปโปแคมปัส และการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมอง

ผลการวิจัยพบว่าวีฟียูมีประสิทธิภาพในการต้านชักสูงกว่าวีฟิเอ ขนาดวีฟียูและวีฟิเอที่สามารถป้องกันการชักที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยพิโลคาร์ปีนในหนูแรทจำนวนครึ่งหนึ่ง คือ 49 มก/กก และ 322 มก/กก นำหนักตัวตามลำดับ การศึกษาโดยวิธีไมโครไดอะลลิซิส ทั้งวีฟียู (50 และ 100 มก/กก) และ วีฟิเอ (300 และ 600 มก/กก) สามารถลดระดับกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นและยับยั้งระบบประสาทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะมีผลลดกลูตาเมตได้มากที่สุด ในฮิปโปแคมปัสของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยพิโลคาร์ปีน เป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านชักจากการเหนี่ยวนำด้วยพิโลคาร์ปีนของวีฟียูและวีฟิเอ น่าจะมีความสัมพันธ์กับการลดระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทที่สูงขึ้น นอกจากการป้องกันการชักแล้ววีฟียูและวีฟิเอสามารถป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาทและลดระดับมาลอลดีไฮด์ที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นของพิโลคาร์ปีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษาการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมอง วีฟียูอาจมีฤทธิ์เป็น uncoupler กระตุ้นการหายใจ state 4 แต่วีฟียูก็ออกฤทธิ์ลดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนจากพิโลคาร์ปีนในลูกโซ่การหายใจที่ complex I ทำให้การหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์ ATP ซึ่งผลเหล่านี้ต่างจาก วีฟิเอซึ่งไม่เปลี่ยนแปลงการหายใจ state 3, state 4 และการสังเคราะห์ ATP จากการที่วีฟียูสามารถลดระดับมาลอลดีไฮด์ที่สูงขึ้นและช่วยให้การทำงานของไมโทคอนเดรียดีขึ้นจากการกระตุ้นด้วยพิโลคาร์ปีน อาจอธิบายถึงความสามารถของวีฟียูในการป้องกันการทำลายของเซลล์ประสาทจากพิโลคาร์ปีน และวีฟิเออาจจะมีกลไกการออกฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ประสาทที่แตกต่างจากวีฟียู

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวีฟียูมีฤทธิ์ต้านชักจากการเหนี่ยวนำด้วยพิโลคาร์ปีน ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวน่าจะมีความสัมพันธ์กับการลดระดับของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นที่ถูกชักนำให้สูงขึ้นจากพิโลคาร์ปีน การลดลงของมาลอลดีไฮด์ที่สูงขึ้นและการช่วยเพิ่มความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียที่เสียไปจากการกระตุ้นด้วยพิโลคาร์ปีนของวีฟียู อาจอธิบายถึงความสามารถของวีฟียูในการป้องกันเซลล์ประสาท อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงกลไกอื่นๆ นอกเหนือจากที่รายงานไว้ในการศึกษาวิจัยนี้

ภาควิชา สรีรวิทยา

สาขาวิชา สหสาขา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## 4389673520 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: N-(2-PROPYLPENTANOYL)UREA / ANTICONVULSANT ACTIVITY / PILOCARPINE-INDUCED SEIZURE

ONRAWEE KHONGSOMBAT : EFFECT OF N-(2-PROPYLPENTANOYL)UREA ON PILOCARPINE-INDUCED SEIZURE IN RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. BOONYONG TANTISIRA, THESIS CO-ADVISOR : PROF. HIROSHI WATANABE, ASSOC.PROF.MAYUREE TANTISIRA, 106 pp. ISBN 974-17-6963-6

The present study was aimed to investigate the effects and underlying mechanisms of N-(2-propylpentanoyl) urea (VPU) in pilocarpine-induced seizure in rats. We studied an anticonvulsant activity of VPU against pilocarpine-induced seizure and also the effects of VPU on neurochemical changes (excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in the hippocampus), morphological changes in hippocampus (CA1 and CA3 regions), hippocampal lipid peroxidation levels and brain mitochondrial function.

VPU was found to be more effective than VPA while the median effective dose ( $ED_{50}$ ) of VPU was 49 mg/kg B.W., the corresponding value for VPA was 322 mg/kg B.W. In microdialysis studies, VPU (50 and 100 mg/kg B.W.) and VPA (300 and 600 mg/kg B.W.) demonstrated the same spectrum to significantly reduce both hippocampal excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters especially the greatest depression on glutamate in pilocarpine-induced seizure rats. It is likely that the anticonvulsant activity of VPU and VPA in pilocarpine-induced seizure rats is due, at least in part, to reduction of an abnormally high extracellular level of excitatory amino acid neurotransmitters. In addition to anticonvulsant activity, pretreatment of either VPU or VPA significantly reduced hippocampal neuronal damage and the enhancement of malonaldehyde (MDA) induced by pilocarpine. In brain mitochondrial function, VPU behaved as an uncoupler by stimulating state 4 respiration whereas it was successfully restored pilocarpine-induced inhibition of state 3 respiration when glutamate plus malate were used as the substrates, leading to slightly increase ATP synthesis. In contrast VPA produced no detectable effect on state 3, state 4 respiration and ATP synthesis. VPU reduced the enhancement of lipid peroxidation and restoring mitochondria dysfunction evoked by pilocarpine. This might propose the efficacy of VPU in the attenuation of the neuronal damage induced by pilocarpine. However VPA might be exerted different mechanisms of neuroprotection from VPU.

The results obtained suggest that the protection of VPU against pilocarpine-induced status epilepticus might be accounted by its ability to reduce the levels of excitatory amino acid which were significantly increased by pilocarpine. The reduction the enhancement of lipid peroxidation and restoring mitochondria dysfunction might be explain the neuroprotective activity of VPU in pilocarpine-induced seizure rats. We also suggest that some other mechanisms than those being demonstrated in the present study should also be further investigated.

Field of study Physiology

Academic year 2004

Student's signature..... *Onrawee Khongsombat*  
 Advisor's signature..... *Boonyong Tantisira*  
 Co-advisor's signature..... *H. Watanabe*  
 Co-advisor's signature..... *Mayuree Tantisira*

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and appreciation to Assoc. Prof. Boonyong Tantisira, my advisor, and Assoc. Prof. Mayuree Tantisira and Prof. Hiroshi Watanabe, my co-advisor, for their excellent instruction, guidance and constant encouragement during the long working process, which enable me to carry out this study. Their kindness will be long remembered.

My thanks are also due to Assist. Prof. Chamnam Patarapanich, Department of Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for kindly supplying N-(2-propylpentanoyl)Urea. I am deeply grateful to Assist. Prof. Witthaya Janthasoot, Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing me facilities and valuable guidance in the preparation of mitochondrial activity and Assist. Prof. Yukihiisa Murakami, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University for teaching and helpful advice in microdialysis and cresyl violet staining technique.

Similarly, I am indebted to all staff members of the Department of Pharmacology and Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and all staff members of the Department of Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan for their valuable helps as well as to all provision of facilities used in experimental works.

I also extend my thank to all my friends in Chulalongkorn University and Toyama Medical and Pharmaceutical University for having made these years so memorable. Finally, I am extremely grateful to my dear family for their love, great sacrifice and understanding throughout my life.

This work was financially supported by grants from the Ministry of University Affairs, Thailand, and the Graduate School, Chulalongkorn University.

# CONTENTS

	Page
Abstract (Thai) .....	iv
Abstract (English) .....	v
Acknowledgements .....	vi
Contents .....	vii
List of Tables .....	x
List of Figures .....	xi
List of Abbreviations .....	xiv
Chapter	
I Introduction .....	1
II Review Literatures .....	3
Epilepsy .....	3
2.1 Classification of epilepsy .....	4
2.2 Causes of epilepsy .....	8
2.3 Epileptogenesis .....	8
2.4 Seizure-induced neuronal injury .....	22
2.5 Treatment .....	26
2.6 Valproic acid (n-dipropylacetic acid) (VPA) .....	32
2.7 N-(2-propylpentanoyl)urea (VPU) .....	33

	Page
2.8 Pilocarpine-induced seizure model .....	36
III Materials and Methods .....	39
3.1 Animals .....	39
3.2 Chemicals used in various methodology .....	39
3.3 Study design .....	41
Part I Anticonvulsant activity and Neuroprotective effect of VPU .....	44
and VPA on pilocarpine-induced seizure	
Part II Effects of VPU and VPA on the level of hippocampal amino .....	46
acid neurotransmitters in freely moving rats	
Part III <i>Ex vivo</i> determination of Lipid peroxidation and Neuronal .....	48
mitochondrial activity	
3.4 Data analysis .....	54
IV Results.....	55
Part I Anticonvulsant activity and Neuroprotective effect of VPU .....	55
and VPA against pilocarpine-induced seizure	
Part II Effects of VPU and VPA on the level of hippocampal amino .....	64
acid neurotransmitters in freely moving rats	
Part III <i>Ex vivo</i> determination of Lipid peroxidation and Neuronal .....	71
mitochondrial activity	



	Page
V Discussion .....	77
VI Conclusion .....	85
References .....	86
Biography .....	106



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

Table	page
2.1 International classification of epileptic seizures .....	5
2.2 International classification of epilepsies and epilepsy syndromes .....	6
2.3 Drugs for treatment of epileptic seizures .....	29
2.4 Proposed mechanisms of antiepileptic drug action .....	30
4.1 Effects of VPA and VPU on the onset of motor limbic seizure induced .....	58
by pilocarpine	
4.2 Effects of VPA and VPU on the severity of seizure induced by pilocarpine ....	59
4.3 Respiration of brain mitochondria of rats (glutamate plus malate) .....	75
4.4 Respiration of brain mitochondria of rats (succinate) .....	76


  
 ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Mechanism of excitatory neurotransmission in the mammalian central nervous system .....	14
2.2 GABAergic synapse .....	17
2.3 Schematic representation of a glycinergic inhibitory synapse .....	20
2.4 Schematic illustration of NMDA receptors and binding sites .....	21
2.5 Schematic representation of major mitochondrial pathways involved in excitotoxic cell death .....	25
2.6 The structures of valproic acid, barbiturates, and proposed structure of N-(2-propylpentanoyl) urea .....	35
3.1 Representative trace of mitochondrial respiration .....	52
3.2 An Oxygraph tracing illustrating the measurement of RCR value .....	53
3.3 An Oxygraph tracing illustrating the measurement of P/O ratio .....	53
3.4 An Oxygraph tracing illustrating the measurement of oxygen consumption rates .....	53
4.1 Log dose-response curve of VPU on pilocarpine-induced seizure in rats at 30 minutes pretreated time .....	56
4.2 Log dose-response curve of VPA on pilocarpine-induced seizure in rats at 30 minutes pretreated time .....	57

Figure	Page
4.3 Representative photographs of hippocampal coronal sections of Cresyl violet-stained at low magnification in the upper panel (A, B, C, D), higher magnification of CA1 regions in the middle panel and CA3 regions in the lower panel	61
4.4 Effects of VPA and VPU on the number of CA1 pyramidal neurons of the hippocampus exposed to pilocarpine	62
4.5 Effects of VPA and VPU on the number of CA3 pyramidal neurons of the hippocampus exposed to pilocarpine	63
4.6 Effect of an intraperitoneal injection of pilocarpine and normal saline on the extracellular levels of glutamate	65
4.7 Effect of an intraperitoneal injection of pilocarpine and normal saline on the extracellular levels of aspartate	66
4.8 Effect of an intraperitoneal injection of pilocarpine and normal saline on the extracellular levels of glycine	67
4.9 Effect of an intraperitoneal injection of pilocarpine and normal saline on the extracellular levels of GABA	68
4.10 Effects of an intraperitoneal administration of VPU (50 and 100 mg/kg B W) on the total amount of the rat hippocampal amino acid levels in the dialysate collected for 210 min	69

Figure	Page
4.11 Effects of intraperitoneal administration of VPA (300 and 600 mg/kg B W ) ... on the total amount of the rat hippocampal amino acid levels in the dialysate collected for 210 min	70
4.12 The effects of VPU (50 and 100 mg/kg B W ) and VPA ..... (300, 600 mg/kg B W ) on the MDA levels in hippocampus of adult rat after pilocarpine-induced seizure	72



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF ABBREVIATIONS

$\alpha$	=	Alpha
$\beta$	=	Beta
$\gamma$	=	Gamma
$\mu$	=	Micro
$\mu$	=	Microlitre
$\mu\text{m}$	=	Micrometre
$\mu\text{M}$	=	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree celsius
aCSF	=	Artificial cerebrospinal fluid
ADP	=	Adenosine diphosphate
AEDs	=	Antiepileptic drugs
AMPA	=	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
A.P.	=	Anterior posterior
ATP	=	Adenosine triphosphate
BW	=	Body weight
BZDs	=	Benzodiazepines
$\text{Ca}^{++}$	=	Calcium ion
$\text{CaCl}_2$	=	Calcium chloride
$\text{Cl}^-$	=	Chloride ion
Cm	=	Centimeter
CMC	=	Carboxymethyl cellulose sodium salt
CNS	=	Central nervous system
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EAAAs	=	Excitatory amino acids
EAATs	=	Excitatory amino acid transporters

ECD	=	Electrochemical detector
ED <sub>50</sub>	=	Median effective dose
EEG	=	Electroencephalogram
e.g.	=	Exempli gratia (for example)
et.al.	=	et alii (and other)
g	=	gram
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GABA-T	=	Gamma aminobutyric acid transaminase
GAD	=	Glutamic acid decarboxylase
GEFS <sup>+</sup>	=	Generalised epilepsies with febrile seizures
GLATS	=	Glutamate transporter
GLY-R	=	Strychnine-sensitive glycine receptor
GLYT	=	Glycine transporter
HCO <sup>3-</sup>	=	Hydrogen carbonate ion
HEPES	=	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HPLC	=	High performance liquid chromatography
h	=	Hour
i.p.	=	Intraperitoneal
i.v.	=	Intravenous
ILAE	=	International League Against Epilepsy
K <sup>+</sup>	=	Potassium ion
KA	=	Kainic acid
KCl	=	Potassium chloride
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	=	Potassium phosphate
kg	=	Kilogram
M	=	Molar

MDA	=	Malondialdehyde
MES	=	Maximal electroshock seizure
mg	=	Milligram
Mg <sup>++</sup>	=	Magnesium ion
MgSO <sub>4</sub>	=	Magnesium sulfate
min	=	minute
MK801	=	5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohept-5,10-imine maleate
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
mM	=	Millimolar
MPT	=	mitochondrial permeability transition
MRC	=	Mitochondrial respiratory chain
NAD <sup>+</sup>	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Na <sup>+</sup>	=	Sodium ion
NaCl	=	Sodium chloride
NaHCO <sub>3</sub>	=	Sodium bicarbonate
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NO	=	Nitric oxide
NSS	=	Normal saline solution
OPA	=	O-Phthaldialdehyde
PCP	=	phencyclidine
PHT	=	Phenytoin
PTZ	=	Pentylentetrazole
RCR	=	Respiratory control ratio
ROS	=	Reactive oxygen species
RNA	=	Ribonucleic acid
s.c.	=	Subcutaneous



S.E.	=	Status epilepticus
S.E.M.	=	Standard error of the mean
Sec	=	Second
SRS	=	Spontaneous recurrent seizure
SSA	=	Succinic semialdehyde
SSV	=	Small synaptic vesicles
TBARs	=	2-Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	=	Tricarboxylic acid
TCP	=	1-(1-thienyl-cyclohexyl)piperidine
TLE	=	Temporal lobe epilepsy
VIAAT	=	Vesicular inhibitory amino acid transporter
VPA	=	N-dipropylacetic acid
VPU	=	N-(2-propylpentanoyl)urea
VNS	=	Vagus nerve stimulation
w/v	=	weight per volume



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย