

การประเมินฤทธิ์ต้านชักของกรด วาลโปรอิล ไฮดรอกซามิค



ร้อยตำรวจเอกหญิง นลินรัตน์ ทองเสฐียร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-970-7

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๕ 1925376x - 4 ๓.๘. 2546

EVALUATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY
OF VALPROYL HYDROXAMIC ACID

Police Captain Nalinrat Thongsathean

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacology

Inter-Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-334-970-7

Thesis Title Evaluation of Anticonvulsant Activity of Valproyl Hydroxamic Acid
By Police Captain Nalinrat Thongsathean
Inter-Department Pharmacology
Thesis Advisor Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of Graduate School
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Supeecha Wittayalerpanya
..... Chairman
(Associate Professor Supeecha Wittayalerpanya, M.S.)

Mayuree Tantisira
..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

Boonyong Tantisira
..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Boonyong Tantisira , Ph.D.)

Surachai Unchern
..... Member
(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph. D.)

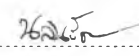
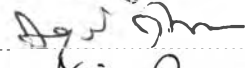
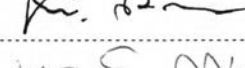
Kanokwan Tiloksakulchai
..... Member
(Assistant Professor Kanokwan Tiloksakulchai, Ph.D.)

นลินรัตน์ ทองเสฐียร : การประเมินฤทธิ์ต้านชักของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก (EVALUATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF VALPROYL HYDROXAMIC ACID) อ.ที่ปรึกษา ผศ.ดร. มยุรี ตันติสิระ อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ, ผศ.ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช, 82 หน้า, ISBN 974-334-970-7

กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก เป็นอนุพันธ์ใหม่ของวาลโปรไมด์ถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยคาดว่าจะมีฤทธิ์ด้านการชักดีกว่า และมีความเป็นพิษน้อยกว่ากรดวาลโปรอิล การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการชัก, การทำให้ตาย และพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ในหนูถีบจักรเปรียบเทียบกับกรดวาลโปรอิล นอกจากนี้ยังทำการศึกษาในหลอดทดลองถึงการแตกตัวของสารนี้ทั้งในตับและในสมองของหนูขาว การศึกษาฤทธิ์ด้านการชักที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าและสารเคมีในหนูถีบจักร พบว่าการให้กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกทางช่องท้อง สามารถต้านการชักที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า โดยสามารถออกฤทธิ์แรงและเร็วกว่ากรดวาลโปรอิล กล่าวคือ กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกออกฤทธิ์สูงสุดเมื่อเวลา 15 นาที ในขณะที่กรดวาลโปรอิลออกฤทธิ์สูงสุดเมื่อเวลา 30 นาที และยังพบว่า การให้กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกทางช่องท้องสามารถต้านการชักที่เหนี่ยวนำด้วยสารเพนทิลีนเตตระซอลและสารไบคูลลีนได้เช่นเดียวกับกรดวาลโปรอิล แต่สามารถออกฤทธิ์แรงกว่ากรดวาลโปรอิล เมื่อทดสอบต่อการชักที่เหนี่ยวนำด้วยสารไบคูลลีน ยิ่งไปกว่านั้น กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกสามารถต้านการชักจากสารสตรีนินได้ โดยกรดวาลโปรอิลไม่สามารถต้านการชักได้ ขนาดของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกที่ต้านการชักในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (ED_{50}) เมื่อเหนี่ยวนำการชักด้วยไฟฟ้า, สารเพนทิลีนเตตระซอลและสารไบคูลลีนเท่ากับ 114, 97 และ 153 มก/กก ตามลำดับ ส่วนของกรดวาลโปรอิลเท่ากับ 211, 99 และ 382 มก/กก ตามลำดับ ในการศึกษาฤทธิ์ต้านชักที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า พบว่า ค่า ED_{50} ของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก และกรดวาลโปรอิล เมื่อให้ทางปาก จะมีค่าสูงกว่า ED_{50} ของสารเดียวกันที่ให้ทางช่องท้องประมาณ 2 เท่า จากการศึกษาการแตกตัวพบว่า กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ไม่มีการแตกตัวเป็นกรดวาลโปรอิล ทั้งในตับและสมอง รวมทั้งการให้กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก โดยการฉีดเข้าสู่สมองโดยตรงสามารถต้านการชักที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า ($ED_{50} = 102$ ไมโครโมลลาร์) ดังนั้น เป็นไปได้ว่า กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก จะออกฤทธิ์ด้วยตัวของมันเอง อย่างไรก็ตาม พบว่า ฤทธิ์ต้านชักของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกจะลดลงอย่างรวดเร็ว จะเห็นได้จากค่า ED_{50} ที่ 15 นาที, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากให้สารนี้ เท่ากับ 114, 207, 466 และ 832 มก/กก ตามลำดับ ผลของไซโตโครมพี 450 ที่ทำให้ฤทธิ์ต้านชักของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นโดยการให้กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ร่วมกับเอสเคเอฟ 525เอ ซึ่งเป็นสารยับยั้งไซโตโครมพี450 พบว่า ค่า ED_{50} ที่ 15 นาที หลังจากให้กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ลดลงเหลือ 83 มก/กก อย่างไรก็ตาม ผลในส่วนนี้ไม่ได้อธิบายครอบคลุมถึงการที่ฤทธิ์ต้านชักของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ลดลงอย่างรวดเร็วในส่วนอื่น ซึ่งยังไม่ได้ศึกษาในรายละเอียด

การศึกษาพิษของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก พบว่า ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งตาย (LD_{50}) เท่ากับ 840 มก/กก ขนาดดังกล่าวนี้สูงกว่าค่า LD_{50} ของกรดวาลโปรอิลเล็กน้อย ขนาดของสารที่ทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (TD_{50}) ของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก และกรดวาลโปรอิล เท่ากับ 189 และ 260 มก/กก ตามลำดับ ดังนั้นค่า $PI (TD_{50}/ED_{50})$ ของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก และกรดวาลโปรอิล มีค่าประมาณ 1-2 นอกจากนี้กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ไม่มีผลกดการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรแต่มีผลทำให้เพิ่มเวลาในการนอนหลับของหนูถีบจักรที่ได้รับยาสลบเพนโตบาร์บิทัล เมื่อได้รับกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ขนาด 120 มก/กก ตลอดจนพบว่ากรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ไม่ทำให้เกิดการดิ้อยา

ผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่า กรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกมีฤทธิ์ต้านชักดีกว่า แต่ความเป็นพิษไม่น้อยกว่ากรดวาลโปรอิล อย่างไรก็ตามจำเป็นจะต้องมีการแก้ไขในสูตรโครงสร้างของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ต่อไป เพื่อปรับปรุงระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกให้นานขึ้น

ภาควิชา	สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

NALINRAT THONGSATHEAN : EVALUATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF VALPROYL HYDROXAMIC ACID. THESIS - ADVISOR : ASSIST. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D. THESIS - COADVISOR : ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D. ; ASSIST. PROF. CHAMNAN PATARAPANICH, Ph.D. 82 pp. ISBN 974-334-970-7

Valpropyl hydroxamic (VHA) is a novel derivative of valpromide, the primary amide of valproic acid, being synthesized in an attempt to obtain a new compound with higher potency and less toxicity than valproic acid (VPA). Anticonvulsant activity, lethality and neurotoxicity of VHA in comparison to VPA were investigated in mice. In addition, *in vitro* degradation using rat brain and liver homogenate was performed to search for possible mode of action of VHA.

The evaluation of anticonvulsant activity was performed in mice using the maximal electroshock seizure (MES) and chemically induced seizure tests. In MES test, VHA was found to be intraperitoneally effective showing the maximal protection around 15 min after pretreatment while the corresponding value for VPA was 30 min. Intraperitoneal administration of VHA demonstrated a higher protection than VPA in MES and bicuculline but was effective as VPA in PTZ tests. The median effective dose (ED_{50}) of VHA were 114, 97 and 153 mg / kg B.W. in MES, PTZ and bicuculline tests respectively, while corresponding values for VPA were 211, 99 and 382 mg / kg B.W. VHA weakly blocked the effect of strychnine exhibiting ED_{50} of 441 mg / kg B.W., while VPA was ineffective. Like VPA, VHA was also active orally demonstrating ED_{50} approximately 2 times higher than its ED_{50} by intraperitoneal route in MES test. The observation that VHA was not degraded to VPA by brain or liver homogenate as well as that VHA was able to protect the animal against MES test giving the ED_{50} of 102 μ M when being administered intracerebroventricularly indicate that VHA is an active anticonvulsant molecule. However, the anticonvulsant activity of VHA seemed to be short-lived as reflected by a rapid increase of ED_{50} values of 114 mg / kg B.W. at pretreated time of 15 min to 207, 466 and 832 mg/kg B.W. at 1, 3 and 6 hour(s), respectively. Inactivation by cytochrome P450 seemed to be part of rapid decline in anticonvulsant activity as the ED_{50} of VHA at pretreated time of 15 min was reduced to 83 mg / kg B.W. when VHA was given after an inhibitor of cytochrome P450, SKF-525A. However this finding did not exclude any other paths of inactivation of VHA which remain to be determined.

With regards to toxicity in terms of lethality, the LD_{50} of VHA (840 mg / kg B.W.) is slightly higher than that of VPA. The median neurotoxicity dose (TD_{50}) as measured by rotorod test were 189 and 260 mg / kg B.W. for VHA and VPA respectively. Therefore, both of them exhibited the protective index ($PI = TD_{50}/ED_{50}$) of about 1-2 in both MES and PTZ tests. Furthermore, ED_{50} of VHA had no significant depressant effect on locomotor activity though prolongation of barbiturate sleeping time was exhibited by VHA in the dose of 120 mg / kg B.W. Additionally, VHA seemed to have rather low potential to induce tolerance.

The present studies, VHA demonstrated better anticonvulsant activity with approximately the same profile of toxicity as VPA. Further modification of the structure of VHA is needed in order to improve its unfavorable short - lived anticonvulsant activity.

ภาควิชา	สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	Nalinrat Thongsathean
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	Mayuree Tantisira
ปีการศึกษา	2542	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	Chamnana Patrapanich Boonyong Tantisira

Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Assist. Prof. Dr. Mayuree Tantisira, and Assoc. Prof. Dr. Boonyong Tantisira for their valuable advices and guidances, kindness, and encouragement during the course of experimental work and presentation of the thesis and I would like to thank Assist. Prof. Dr. Chamnan Patarapanich, Department of Pharmaceutical Chemistry, for kindly supplying valproyl hydroxamic acid.

I would like to thank Dr. Nattaya Ngamrojanavanich, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, for kindly instruction of intracerebroventricular injection technique in mice.

My grateful appreciation extends to all staff members of the Departments of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for provision of facilities used in experimental works.

Finally, I would like to thank my family and my friends for their love and encouragement.

Contents

	Page
Abstract (Thai)	iv
Abstract (English)	v
Acknowledgements	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures	x
List of Abbreviations	xii
Chapter	
I Introduction	1
Epilepsy.....	1
Etiology.....	1
Epileptogenesis.....	3
Classification of seizures	5
Amino acid neurotransmitters	6
Antiepileptic drugs	12
Valproic acid	17
Valpropyl hydroxamic acid	24
II Materials and Methods	27
Experimental animals	27
Equipments	27
Chemicals	28
Experimental methods	28
Calculation and statistical analysis.....	37
III Results.....	39
Anticonvulsant activity	39
Toxicity test	42
<i>In vitro</i> degradation of VHA by liver and brain homogenate.....	43

IV Discussion and Conclusion.....	66
References	72
Curriculum Vitae.....	82

List of Tables

Table	Page
1. International classification of epileptic seizures	7
2. Antiepileptic drugs of choice	13
3. ED ₅₀ and relative safety margin (LD ₅₀ /ED ₅₀) of an intraperitoneal administration of VHA and VPA at different times after dosing	46
4. Anticonvulsant activity of intraperitoneally or orally given VHA and VPA in various animal models at optimal pretreated time of 15 and 30 min respectively	54
5. ED ₅₀ , LD ₅₀ , TD ₅₀ , PI and relative safety margin of intraperitoneal..... administrations of VHA and VPA in MES and PTZ seizure tests in mice	57
6. TD ₅₀ of an intraperitoneal administration of VHA and VPA at different times..... after dosing	58

List of Figures

Figure	Page
1. Schematic illustration of the GABA _A receptor complex.....	11
2. The chemical structure of valproic acid.....	17
3. Metabolic pathways of VPA	21
4. The chemical structure of valproyl hydroxamic acid.....	24
5. Log dose – response curves of VHA (i.p.) in MES test at pretreated times.....	43
of 15, 30 and 60 min	
6. Log dose – response curves of VPA (i.p.) in MES test at pretreated times	44
of 15, 30 and 60 min	
7. Comparison of ED ₅₀ at various pretreated times of intraperitoneally	45
given VHA and VPA in MES test in mice	
8. Protection against MES exhibited by VHA and VPA at various.....	47
pretreated times in mice	
9. Log dose – response curves of VHA and VPA (p.o.) in MES test	48
at their respective optimal pretreated time	
10. Log dose – response curves of VHA and VPA (i.c.v.) in MES test.....	49
at their respective optimal pretreated time	
11. Log dose – response curves on tolerance in MES test of group 1,	50
mice received PEG 400 (p.o.) for 5 days, and group 2, mice received VHA of 242 mg / kg B.W., p.o. for 5 days. On day 6, both of them received VHA (p.o.) in various doses at 15 min pretreated time.	
12. Log dose – response curves of VHA and VPA (i.p.) in combination.....	51
with SKF-525A in MES test at their respective optimal pretreated time	
13. Log dose – response curves of VHA and VPA in PTZ test.....	52
at their respective optimal pretreated time	
14. Log dose – response curves of VHA and VPA against bicuculline – induced ...	53
convulsion in mice	

15. Log dose – response curves of VHA and VPA on acute toxicity55 (lethality) in mice	55
16. Log dose – response curves of VHA and VPA in rotorod test in mice.....56	56
17. Neurotoxicity of VHA and VPA by rotorod test at various pretreated times59 in mice	59
18. Effects of intraperitoneal administration of VHA and VPA on number of counts 60 (Mean) of locomotor activity in mice.	60
19. Effects of intraperitoneal administration of VHA and VPA on the barbiturate61 sleeping time (Mean \pm S.E.M.) in mice.	61
20. HPLC chromatogram of ADAM – derivatized standard VPA.....62	62
21. VPA concentration in rat's liver homogenate at various incubation times63 after the administration of VHA at time 0.	63
22. VPA concentration in rat's brain homogenate at various incubation times.....64 after the administration of VHA at time 0.	64

List of Abbreviations

α	=	alpha
β	=	beta
γ	=	gamma
ω	=	omega
%	=	percent
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
2,4-diene VPA	=	2-n-propyl-2, 4-pentadienoate
2-ene VPA	=	2-propyl-2-pentanoic acid
3-keto VPA	=	2-propyl-3-keto-pentanoic acid
4-ene VPA	=	2-n-propyl-4-pentenoate
ADAM	=	9-Anthryldiazomethane
AEDs	=	antiepileptic drugs
a.m.	=	ante meridian (before noon)
AMPA	=	alpha-amino 3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxzole
B.W.	=	body weight
CNS	=	central nervous system
CSF	=	cerebrospinal fluid
CYP	=	cytochrome P450
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celsius
ED ₅₀	=	median effective dose
EEG	=	electroencephalogram
et al.	=	et alii (and other)
etc.	=	et cetera (and so on)
FBM	=	felbamate
g	=	gram
GABA	=	gamma aminobutyric acid
GABA-T	=	gamma aminobutyric acid transaminase

GAD	=	glutamic acid decarboxylase
GBP	=	gabapentin
GHB	=	gamma hydroxybutyric acid
HLPC	=	high performance liquid chromatography
hr.	=	hour
i.c.v.	=	intracerebroventricular
i.e.	=	such as
ILAE	=	international league against epilepsy
i.p.	=	intraperitoneal
KA	=	kainate
kg	=	kilogram
l	=	litre
LD ₅₀	=	median lethal dose
LTG	=	lamotrigine
mA	=	milliampere
M	=	molar
MES	=	maximal electroshock seizures
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
nm	=	nanometre
NMDA	=	N-methyl-D-aspartic acid
NSS	=	normal saline solution
PEG 400	=	polyethylene glycol 400
PGA	=	2-propyl glutaric acid
PI	=	protective index
p.m.	=	post meridian (afternoon)
p.o.	=	per oral
PTZ	=	pentylenetetrazole
rev/min	=	revolution per minute

sec	=	second
SEM	=	standard error of the mean
SSADH	=	succinic semialdehyde
tRNA	=	transfer ribonucleic acid
TD ₅₀	=	median toxic dose
TGB	=	tiagabine
TPM	=	topiramate
UDP	=	uridine diphosphate
VGB	=	vigabatrin
VHA	=	valproyl hydroxamic acid
VPA	=	valproic acid
VPD	=	valpromide