

38

ฤทธิ์การต้านชักและผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง
ของ(เอ็น-ไฮดรอกซีเมทิล)-2-โพรพิลเพินทามายด์



นางสาว พรชูลี สุภัทรชัยพิศิษฏ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-474-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๕ 1644161

ANTICONVULSANT ACTIVITY AND EFFECTS OF
(N-HYDROXYMETHYL)-2-PROPYLPENTAMIDE
ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM



Miss Pornchulee Supatchaipisit

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-631-474-2

Thesis Title Anticonvulsant Activity and Effects of (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide on the Central Nervous System

By Miss. Pornchulee Supatchaipisit

Inter-department Pharmacology

Thesis Advisor Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D

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



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

Santi Thongsuwan Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thongsuwan, Ph.D)

Thesis Committee

Prasan Dhumma-upakorn Chairman
(Associate Professor Prasan Dhumma-upakorn, Ph.D.)

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

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

Ratree Sudsuang Member
(Professor Ratree Sudsuang, Ph.D.)

Surachai Unchern Member
(Assistant Professor Surachai Unchern, M.S)

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

พรชูลี สุภัทรชัยพิศิษฐ์: ฤทธิ์การต้านชักและผลต่อระบบประสาทส่วนกลางของ (เอ็น-ไฮดรอกซีเมทิล)-2-โพรพิลเพ็นทามายด์ (ANTICONVULSANT ACTIVITY AND EFFECTS OF (N-HYDROXYMETHYL)-2-PROPYLPENTAMIDE ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.มยุรี ดันตสิระ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.บุญยงค์ ดันตสิระ, 73 หน้า. ISBN 974-631-474-2

การศึกษาฤทธิ์และพิษในหนูถีบจักรของ(เอ็น-ไฮดรอกซีเมทิล)-2-โพรพิลเพ็นทามายด์(เอชเอ็มวี) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ใหม่ของกรควาลโปรอิค พบว่าเอชเอ็มวีที่ให้ทางช่องท้องหรือทางปากสามารถต้านการชักที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดด้วยกระแสไฟฟ้าและสารเพนทิลีนเตตราซอล แต่ไม่สามารถต้านการชักจากสารไบคูคลินและสารสตริควิน อนุพันธ์ใหม่นี้มีฤทธิ์ต้านชักดีกว่ากรควาลโปรอิค ทั้งในด้านความเร็วและความแรงของการออกฤทธิ์ โดยออกฤทธิ์ได้สูงสุดเมื่อเวลาประมาณ 15 นาที ในขณะที่กรควาลโปรอิคต้องใช้เวลาประมาณ 30 นาที ขนาดของสารที่ต้านชักได้ในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (ED_{50}) ของกรควาลโปรอิคและเอชเอ็มวีเมื่อให้โดยทางปาก จะมีค่าสูงกว่าค่า ED_{50} ของสารเดียวกัน ที่ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องประมาณ 2 เท่า ในหนูถีบจักรซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าพบว่าค่า ED_{50} ของเอชเอ็มวีและกรควาลโปรอิคที่ให้ทางช่องท้องคือ 77 และ 214 มก./กก. ในขณะที่ค่า ED_{50} ของการต้านชักจากสารเพนทิลีนเตตราซอลคือ 35 และ 108 มก./กก. ตามลำดับ แสดงว่าเอชเอ็มวีมีความแรงในการต้านชักสูงกว่ากรควาลโปรอิคประมาณ 3 เท่า เมื่อพิจารณาถึงขนาดของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งตาย (LD_{50}) พบว่าแม้เอชเอ็มวีและกรควาลโปรอิคจะมีค่าดังกล่าวใกล้เคียงกัน (722 และ 717 มก./กก. สำหรับเอชเอ็มวีและกรควาลโปรอิค ตามลำดับ) แต่เอชเอ็มวีจะมีค่าขอบเขตความปลอดภัย (LD_{50}/ED_{50}) สูงกว่ากรควาลโปรอิคประมาณ 3 เท่า

จากการศึกษาฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์ พบว่าเอชเอ็มวีในขนาด ED_{50} (35, 75 มก./กก.) ไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร เมื่อประเมินอาการพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางและการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลายโดยดูผลการเสริมฤทธิ์กับสารพิทูเรตและวิธีโรโดรอต พบว่าเอชเอ็มวีมีฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์ต่อระบบดังกล่าวใกล้เคียงกับกรควาลโปรอิค

การศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าเอชเอ็มวีเป็นสารออกฤทธิ์ต้านชักที่มีประสิทธิภาพสูง ออกฤทธิ์ได้เร็ว ดูดซึมได้ดีจากระบบทางเดินอาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยาหลักคือกรควาลโปรอิคแล้วพบว่าเอชเอ็มวีมีความแรงในการออกฤทธิ์และขอบเขตความปลอดภัยสูงกว่าประมาณ 3 เท่า และในขนาดที่ให้ผลทางการรักษามีฤทธิ์อื่นไม่พึงประสงค์ต่อระบบประสาทส่วนกลางค่อนข้างต่ำ น่าที่จะมีการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาต้านชักต่อไป

อนึ่งจากการที่เอชเอ็มวีในขนาด ED_{50} (75 มก./กก.) ไม่มีผลเพิ่มปริมาณกรดแกมมาอะมิโนบิวทิลริกในเปลือกสมองของหนูขาว แต่จะเพิ่มขึ้นต่อเมื่อได้รับเอชเอ็มวีขนาด 150 มก./กก. หรือกรควาลโปรอิค ขนาด 200, 400 มก./กก. แสดงว่ากลไกหลักในการออกฤทธิ์ต้านชักของเอชเอ็มวีน่าจะเป็นกลไกอื่นนอกเหนือจากการเพิ่มปริมาณกรดแกมมาอะมิโนบิวทิลริก



ภาควิชา เกษตรวิทยา
สาขาวิชา สหสาขาเกษตรวิทยา
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C645587 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WARDS : ANTICONVULSANT/ GABA/ VALPROATE/ MICRODIALYSIS/ (N-HYDROXYMETHYL) - 2-PROPYLPENTAMIDE

PORNCHULEE SUPATCHAIPISIT : ANTICONVULSANT ACTIVITY AND EFFECTS OF (N-HYDROXYMETHYL) -2-PROPYLPENTAMIDE ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM.

THESIS-ADVISOR : ASSIST. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D. THESIS

COADVISOR : ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D. 73 pp. ISBN 974-631-474-2

The purpose of the present studies was to investigate in mice, anticonvulsant activity, acute toxicity and the central nervous system depressant effects of a new valproic acid analogue, (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide (HMV). In addition, a possible action of HMV on cortical GABA was also investigated in anesthetized rats by microdialysis technique.

HMV and Valproic acid (VPA) were effective in both Maximal Electroshock (MES) and Pentylenetetrazol (PTZ) tests but rather ineffective in Bicuculline and Strychnine tests in mice. Like VPA, the median effective dose (ED_{50}) of HMV when given orally is about 2 times higher than the intraperitoneally administered. In MES, the ED_{50} of intraperitoneally administered HMV and VPA were 77 and 214 mg/kg B.W. respectively while they were 35 and 108 mg/kg B.W. in PTZ models. This concludes a greater potency than VPA of HMV. Furthermore HMV also acts more rapidly. Though the median lethal dose (LD_{50}) of HMV and VPA were almost equal, 722 and 717 mg/kg B.W. respectively, the relative safety margin (LD_{50}/ED_{50}) of HMV is about 3 times higher than its corresponding values of VPA. The median neurotoxic dose (TD_{50}) obtained from Rotorod test were 89 and 274 mg/kg B.W. for HMV 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.

The ED_{50} of HMV (35 and 75 mg/kg B.W.) had no significant effect on locomotor activity. However, the central depressant effect of HMV, only in the dose of 75 mg/kg B.W., was evident in the Barbiturate Potentiation test.

These results indicate that HMV is a highly effective anticonvulsant with rapid onset. In parallel with its higher potency, HMV seemed to be equally or less sedating than VPA.

Results from microdialysis study that VPA (200 and 400 mg/kg B.W.) and HMV (150 mg/kg B.W.) but not its ED_{50} (75 mg/kg B.W.) significantly increased the amount of cortical GABA, suggest that augmentation of brain GABA is not a principal mechanism underlying the anticonvulsant activity observed.

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา

สาขาวิชา.....เภสัชวิทยาเภสัชวิทยา

ปีการศึกษา.....2538

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

Acknowledgements



I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Assist. Prof. Dr. Mayuree Tantisira, and co advisor, Assoc. Prof. Dr. Boonyong Tantisira for their kind advice, guidance, frank keen interest and constant encouragement throughout the preparation of this thesis.

My thanks are also due to Head of Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences Chulalongkorn University for allowing me to carry out this work in their departments.

I further acknowledge Assoc. Prof. Dr. Phensri Thongnopnua for her kind assistance in solving many problems of HPLC, Assoc. Prof. Dr. Chamnan Patarapanich for synthesis and supplying the test substance (HMV), Mr Vichien Leelasangaluk for teaching microdialysis technique as well as kind helps in very many things and finally, Mr Thongchai Sooksawate for advices and manipulation of HPLC.

Similarly, I am indebted to all staff members of the Department of Pharmacology and Department of Physiology for their valuable helps as well as to all experimental animals for their sacrifice which bring me to succeed in my study.

Last, but not least, my greatest thanks are extended to my parents whose support, patience and encouragement made everything possible.

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
II Background Information	
Epilepsy.....	4
Amino Acid Neurotransmitters.....	10
Valproic acid.....	12
(N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide.....	19
III Materials and Method	
Animals.....	20
Equipments.....	20
Chemicals.....	21
Preparation and administration of the test substances	22
Experimental methods.....	23
Calculation and statistical analysis.....	30

IV	Results	
	Anticonvulsant activity.....	32
	Toxicity.....	33
	Effects on the rat cortical GABA.....	35
V	Discussion and Conclusion	53
	References	59
	Appendix	68
	Curriculum Vitae	73



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

Table	Page
1. Anticonvulsant activity of intraperitoneally or orally given..... HMV and VPA on different models of epilepsy in mice.	42
2. ED ₅₀ , TD ₅₀ , LD ₅₀ , PI (TD ₅₀ /ED ₅₀) and Relative safety margin..... (LD ₅₀ /ED ₅₀) of an intraperitoneal administration of HMV and VPA in MES and PTZ models.	44



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure	Page
1. The structure of 2-Propylpentanoic Acid (Valproic Acid ; VPA).....	12
2. The structure of (N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide (HMV).....	19
3. Log dose response curves of HMV (i.p.) against MES at 15, 30..... and 60 min pretreated times.	37
4. Log dose response curves of VPA (i.p.) against MES at 15, 30 and 60 min pretreated times.	38
5. Effect of various pretreated times of intraperitoneally given HMV and VPA on anticonvulsant activity against MES in mice.	39
6. Log dose response curves of acute toxicity (lethality) of HMV and VPA (i.p.) in mice.	40
7. Log dose response curves of neurotoxicity exhibited by HMV..... and VPA (i.p.) in mice.	41
8. Illustration of the LD ₅₀ , TD ₅₀ and ED ₅₀ elicited by an intraperitoneal administration of HMV and VPA in MES and PTZ models.	43
9. Effects of an intraperitoneal administration of VPA and HMV on..... horizontal counts (MEAN±SEM) of locomotor activity in mice at various times.	45
10. Effects of an intraperitoneal administration of VPA and HMV on..... total horizontal counts (MEAN±SEM) within 75 min after the injection of the test substances	46
11. Effects of an intraperitoneal administration of VPA and HMV on..... barbiturate sleeping time (MEAN ± SEM) in mice.	47

12. HPLC chromatogram of OPA-derivatized standard amino acids	48
13. HPLC chromatogram of OPA-derivatized amino acids from..... the rat cerebral cortex.	49
14. Changes in rat cortical GABA levels at various times after an..... intraperitoneal administration of NSS and PEG400.	50
15. Effects of an intraperitoneal administration of VPA and HMV..... on the rat cortical GABA level at various times.	51
16. Effects of VPA and HMV on the total amount of rat cortical..... GABA in the dialysates collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the test substances.	52



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Abbreviations

β	=	beta
δ	=	delta
γ	=	gamma
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μm	=	micrometre
μM	=	micromolar
ω	=	omega
%	=	percent
aCSF	=	artificial cerebrospinal fluid
a.m	=	ante meridium (before noon)
ATP	=	Adenosine triphosphate
B.W.	=	body weight
CNS	=	Central Nervous System
ED ₅₀	=	Median Effective Dose
EEG	=	Electroencephalogram
et. al.	=	et alii (and other)
etc.	=	et cetera (and so on)
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GABA-T	=	Gamma aminobutyric acid transaminase
GAD	=	Glutamic acid decarboxylase
GHB	=	Gamma hydroxybutyric acid

g	=	gram
HMV	=	(N-hydroxymethyl)-2-propylpentamide
5-HT	=	5-Hydroxytryptamine
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
i.e.	=	such as
l/h	=	litre per hour
ILAE	=	International League Against Epilepsy
i.p.	=	intraperitoneal
kg	=	kilogram
LD ₅₀	=	Median Lethal Dose
mA	=	milliampere
M	=	Molar
MES	=	Maximal Electroshock Seizure test
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NSS	=	Normal Saline Solution
OPA	=	ortho Phthaldialdehyde
PB	=	Pentobarbital
PEG 400	=	Polyethylene glycol 400
PI	=	Protective Index
pKa	=	dissociation constant
P.M.	=	post meridian (afternoon)
p.o.	=	per os

PTZ	=	Pentylentetrazole- induced seizure test
rev/min	=	revolution per minute
SEM	=	Standard error of the mean
SSADH	=	Succinic Semialdehyde Dehydrogenase
sec.	=	second
SRF	=	sustained repetitive firing
TD ₅₀	=	Median Toxic Dose
VPA	=	Valproic acid



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย