

ฤทธิ์ด้านการชักของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-707-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16718689

ANTICONVULSANT EFFECTS OF N-(2-PROPYLPENTANOYL) UREA



Mr. Thongchai Sooksawate

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Physiology

Graduate School


Chulalongkorn University

1995


ISBN 974-631-707-5


Thesis Title Anticonvulsant Effects of N-(2-Propylpentanoyl) Urea
By Mr. Thongchai Sooksawate
Department Physiology
Thesis Advisor Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.

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



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

Thesis Committee


..... Chairman
(Assistant Professor Sumlee Jaidee, M.S. in Physiology)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)


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


..... Member
(Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ธงชัย สุขเสวต : ฤทธิ์ต้านการชักของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย (ANTICONVULSANT EFFECTS OF N-(2-PROPYLPENTANOYL) UREA) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.บุญยงค์ ตันตสิระ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.มยุรี ตันตสิระ, 64 หน้า, ISBN 974-631-707-5.

การวิจัยนี้มุ่งหมายจะศึกษาฤทธิ์ต้านการชัก พิษต่อระบบประสาท และการตายอันเกิดจาก สาร เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ตัวใหม่ของกรควาลโปรอิก โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับกรควาลโปรอิก ในหนูถีบจักรและหนูขาว ร่วมกับการใช้วิธีไมโครไดอะลลิซิส ศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาว

กรควาลโปรอิกและเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ซึ่งให้โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง มีผลต้านการชักที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ สามารถต้านการชักที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยกระแสไฟฟ้า หรือ การฉีดสารเพนทิลีนเตตราซอลหรือสารไบคูลูลิน แต่ไม่สามารถต้านการชักที่เกิดจากการให้สารสตริกนิน เมื่อเปรียบเทียบกับ สารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย มีความแรงในการต้านการชักจากสารไบคูลูลินได้เท่ากับกรควาลโปรอิก แต่จะมีฤทธิ์แรงกว่าในการต้านการชักซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยกระแสไฟฟ้า หรือสารเพนทิลีนเตตราซอล ขนาดของสารที่มีฤทธิ์ต้านการชักได้ครั้งหนึ่งในสัตว์ทดลอง ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยกระแสไฟฟ้า หรือสารเพนทิลีนเตตราซอล หรือสารไบคูลูลิน ของสารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย คือ 66, 57 และ 331 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ขนาดที่ต้องใช้สำหรับกรควาลโปรอิก คือ 242, 95 และ 393 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครั้งหนึ่งของสารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ก็สูงกว่ากรควาลโปรอิกเช่นเดียวกัน คือ 1553 ต่อ 838 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ สารทั้งสองไม่มีผลที่เด่นชัดต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร แต่มีผลเพิ่มเวลาในการนอนหลับของหนูถีบจักรที่ได้รับยาเพนโทบาพิทาล จากข้อมูลที่ได้แสดงว่า สารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย น่าจะมีขอบเขตความปลอดภัยสูงกว่า แต่มีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการน้อยกว่ากรควาลโปรอิก

ในการศึกษาระดับกรดอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่โดยวิธีไมโครไดอะลลิซิส พบว่ากรควาลโปรอิก มีผลเฉพาะเจาะจงลดระดับของสารแอสปาเตตเท่านั้น ในขณะที่สารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย จะลดระดับทั้งกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้น (แอสปาเตตและกลูตาเมต) และยับยั้ง (ไกลซีนและกรดแกมมาอะมิโนบิวไทลิก) ระบบประสาท โดยมีผลลดกลูตาเมตได้มากที่สุด ในขณะที่มีผลลดไกลซีนได้น้อยที่สุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลให้สารนี้สามารถออกฤทธิ์ต้านการชักได้ อนึ่ง การเสริมฤทธิ์กันกับยาสลบที่ใช้คือ เพนโทบาพิทาล/อาจเป็นเหตุให้สารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ออกฤทธิ์กดระบบประสาทอย่างไม่เฉพาะเจาะจงได้ ทั้งนี้จะต้องทำการศึกษาต่อไป

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย เป็นสารหนึ่งที่น่าจะพัฒนาเป็นยาต้านชักที่มีขอบเขตในการต้านชักกว้างขวาง มีขอบเขตความปลอดภัยสูงและมีอาการข้างเคียงต่ำ จึงควรที่จะมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด ตลอดจนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาอื่น ๆ ของสารตัวนี้ต่อไปโดยละเอียด

ภาควิชา สรีรวิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิติ *Thyach Sukt*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Boonye Tanthira*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *Mayuree Tantisira*



C375336 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: N-(2-PROPYLPENTANOYL)UREA/VALPROATE/
ANTICONVULSANT/MICRODIALYSIS/GABA

THONGCHAI SOOKSAWATE : ANTICONVULSANT EFFECTS OF N-(2-
PROPYLPENTANOYL) UREA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. BOONYONG
TANTISIRA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. MAYUREE
TANTISIRA, Ph.D., 64 PP., ISBN 974-631-707-5.

Anticonvulsant activity, lethality and neurotoxicity of a new valproic acid analogue, n-(2-propylpentanoyl) urea (VPU), and valproic acid (VPA), as a reference drug, were investigated in mice and rats. Microdialysis technique was used to investigate the effect of VPU on rat cortical amino acid neurotransmitters.

Intraperitoneally administered VPA and VPU demonstrated the same spectrum of anticonvulsant activity, being active in maximal electroshock (MES) test, pentylenetetrazole (PTZ) test and bicuculline test but ineffective in strychnine test. In comparison to VPA, VPU was relatively equipotent in bicuculline test but exerted higher potency in MES and PTZ tests. The median effective dose (ED_{50}) of VPU in protection against a gamma aminobutylic acid ($GABA_A$) antagonist, bicuculline, was relatively high (>300 milligram/kilogram body weight (mg/kg B.W.)) Therefore the involvement of $GABA_A$ receptor seem to be trivial. The ED_{50} of VPU was 66 and 57 mg/kg B.W. in MES and PTZ tests respectively while they are 242 and 95 mg/kg B.W. for VPA. These results indicate that VPU exhibits a greater potency in protection against MES and PTZ test than VPA. Based on the relatively high LD_{50} , 1553 and 838 mg/kg B.W. for VPU and VPA respectively, and rather low side effects as predicted from its effects on locomotor activity and potentiation of barbiturate sleeping time, VPU appears to offer a greater safety margin as well as a lower unwanted effects than VPA.

In brain microdialysis studies, VPA significantly and selectively decreased cortical aspartate while VPU significantly decreased the levels of cortical excitatory (aspartate and glutamate) and inhibitory (glycine and GABA) amino acid neurotransmitters in dose dependent manner. The depression was greatest on glutamate and least on glycine. These may explain the anticonvulsant activity observed. A strong synergistic effect of VPU with the anesthetic used, pentobarbital, is questionable and may account to the non selective depressant effect of VPU.

The present studies demonstrated a promising prospect for VPU to become a candidate for a potent broad spectrum antiepileptic drug with higher margin of safety and lower side effects. However extensive studies are needed to elucidate its precise mechanism of action as well as pharmacological and toxicological profiles.

ภาควิชา สรีรวิทยา.....

ลายมือชื่อนิสิต *Thongchai Sook*.....

สาขาวิชา สรีรวิทยา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Boonyong Tantisira*.....

ปีการศึกษา 2537.....

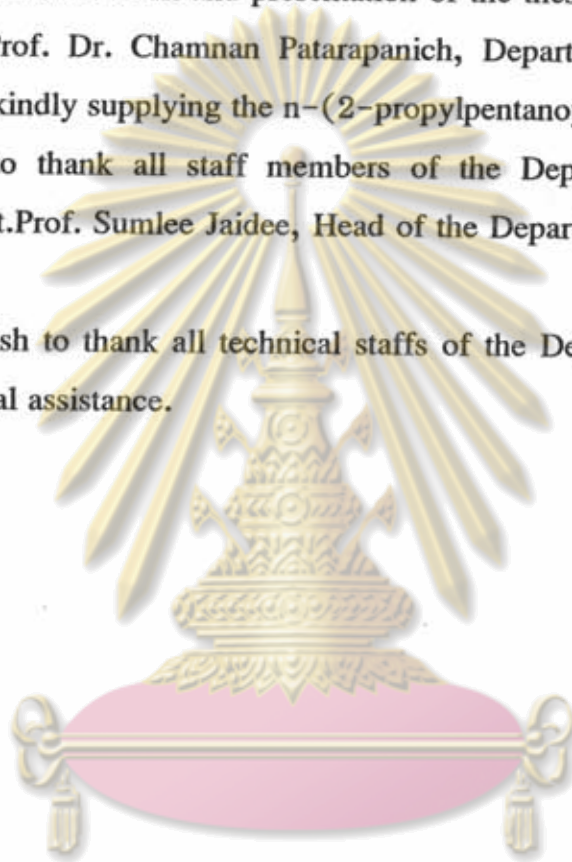
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *Mayuree Tantisira*.....

Acknowledgements

I wish to express my sincere gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Boonyong Tantisira, and my co-advisor, Assist. Prof. Dr. Mayuree Tantisira, for their valuable advise and guidance, 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 the n-(2-propylpentanoyl) urea.

I wish to thank all staff members of the Department of Physiology, especially Assist.Prof. Sumlee Jaidee, Head of the Department, for their valuable helps.

I also wish to thank all technical staffs of the Department of Physiology for their technical assistance.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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
Amino acid neurotransmitters in epilepsy	8
Amino acid neurotransmitters alteration within epileptic brain ..	13
Valproic acid	14
N-(2-Propylpentanoyl) urea	17
II Materials and Methods	22
Experimental animals	22
Chemicals	22
Drug administration	23
Experimental instruments	24
Experimental methods	25
III Results	32
Anticonvulsant activity	32
Toxicity	33
Effect on some cortical amino acid neurotransmitter levels	34
relating to convulsion in anesthetized rats	

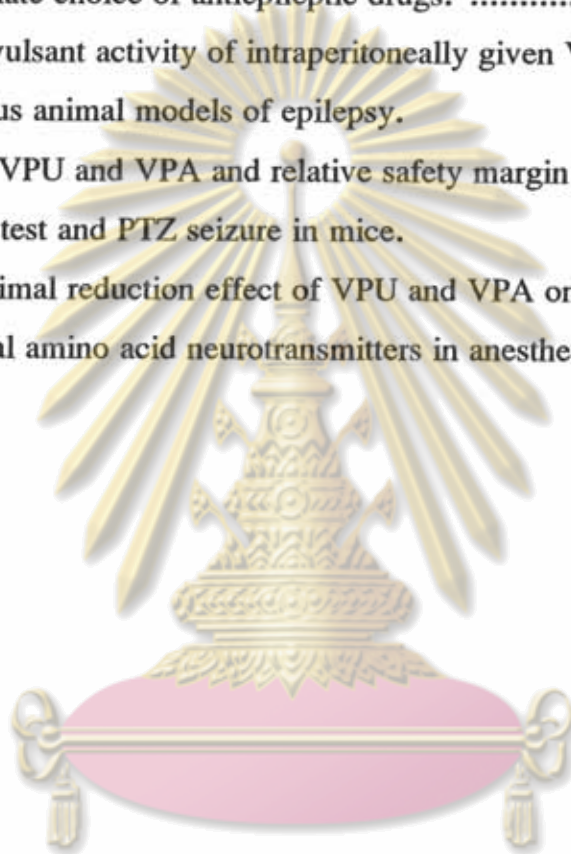
	page
IV Discussion.....	48
V Conclusion	53
References	54
Curriculum Vitae.....	64



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

Table	Page
1. Classification of Epileptic Seizures.	4
2. Appropriate choice of antiepileptic drugs.	7
3. Anticonvulsant activity of intraperitoneally given VPU and VPA on various animal models of epilepsy.	35
4. LD ₅₀ of VPU and VPA and relative safety margin (LD ₅₀ /ED ₅₀) on MES test and PTZ seizure in mice.	35
5. The maximal reduction effect of VPU and VPA on the levels of cortical amino acid neurotransmitters in anesthetized rats.	47



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



List of Figures

Figure	Page
1. Schematic diagram of relations between cortical discharges and 6 both intracellular and extracellular activity in an epileptic focus.	6
2. Model of GABA _A receptor complex. 11	11
3. The synthetic pathways of n-(2-propylpentanoyl) urea and 19 n-(2-propylpentanoyl) thiourea.	19
4. The structures of valproic acid, barbiturates and the proposed 20 structure of n-(2-propylpentanoyl) urea showing intramolecular hydrogen bonding.	20
5. Effect of various pretreated time on anticonvulsant activity 36 against MES of VPA in mice.	36
6. Effect of various pretreated time on anticonvulsant activity 36 against MES of VPU in mice.	36
7. Log dose-response curves of VPA and VPU on MES in mice 37 at 30 minutes pretreated time.	37
8. Log dose-response curves of VPA and VPU on MES in rats 37 at 30 minutes pretreated time.	37
9. Log dose-response curves of VPA and VPU on PTZ seizure in mice. . 38	38
10. Log dose-response curves of VPA and VPU on PTZ seizure in rats. .. 38	38
11. Log dose-response curves of VPA and VPU on bicuculline 39 convulsion in mice.	39
12. Log dose-response curves of VPA and VPU on acute toxicity 39 (lethality) in mice.	39
13. Effect of VPA and VPU on % change of locomotor activity in mice. .. 40	40

Figure	Page
14. Effect of VPA and VPU on total horizontal counts of locomotor activity in mice.	40
15. Effect of VPA and VPU on pentobarbital sleeping time in mice.	41
16. HPLC Chromatograms of o-phthaldialdehyde-derivatized amino acids from rat cerebral cortex, using l-homoserine as an internal standard.	42
17. Effect of VPA and VPU on cortical aspartate level in anesthetized rats.	43
18. Effect of VPA and VPU on cortical glutamate level in anesthetized rats.	44
19. Effect of VPA and VPU on cortical glycine level in anesthetized rats.	45
20. Effect of VPA and VPU on cortical GABA level in anesthetized rats.	46



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Abbreviations

%	=	Percent
α	=	alpha
β	=	beta
γ	=	gamma
μ l	=	microlitre
$^{\circ}$ C	=	degree celcius
ACPD	=	trans-1-aminocyclopentane-1-3-dicarboxylic acid
a.m.	=	ante meridiem
AMPA	=	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
Asp-T	=	aspartate aminotransferase
BDZ	=	benzodiazepine
B.W.	=	body weight
CNS	=	central nervous system
CSF	=	cerebrospinal fluid
ED ₅₀	=	median effective dose
EEG	=	electroencephalogram
et al.	=	et alii
g	=	gram
GABA	=	gamma-aminobutyric acid
GABA-T	=	gamma-aminobutyric acid transaminase
GAD	=	L-glutamate decarboxylase
GOT	=	glutamic-oxaloacetic transaminase
HPLC	=	high performance liquid chromatography
Hz.	=	Hertz
ILAE	=	International League Against Epilepsy
i.p.	=	intraperitonium
kg	=	kilogram

L-AP4	=	L-aminophosphonobutyric acid
LD ₅₀	=	median lethal dose
LTP	=	long-term potentiation
M	=	molar
mA.	=	milliampere
MES	=	maximal electroshock
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
nM	=	nanomolar
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NS	=	non-significant
OPA	=	o-phthaldialdehyde
PDS	=	paroxymal depolarizing shift
PEG	=	polyethyleneglycol
p.m.	=	post meridiem
PTZ	=	pentylenetetrazole
s.c.	=	subcutaneous
S.E.M.	=	standard error of the mean
SRF	=	sustained repeatitive firing
SGOT	=	glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	=	glutamic pyruvic transaminase
SHMT	=	serine hydroxymethyltransferase
SSADH	=	succinic semialdehyde dehydrogenase
VPA	=	valproic acid
VPU	=	N-(2-propylpentanoyl) urea
vs	=	versus