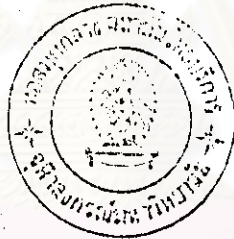


การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ด้านซัก  
ของเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย

นางสาว ทิพย์สุชน ชุนงาม



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชวิทยา

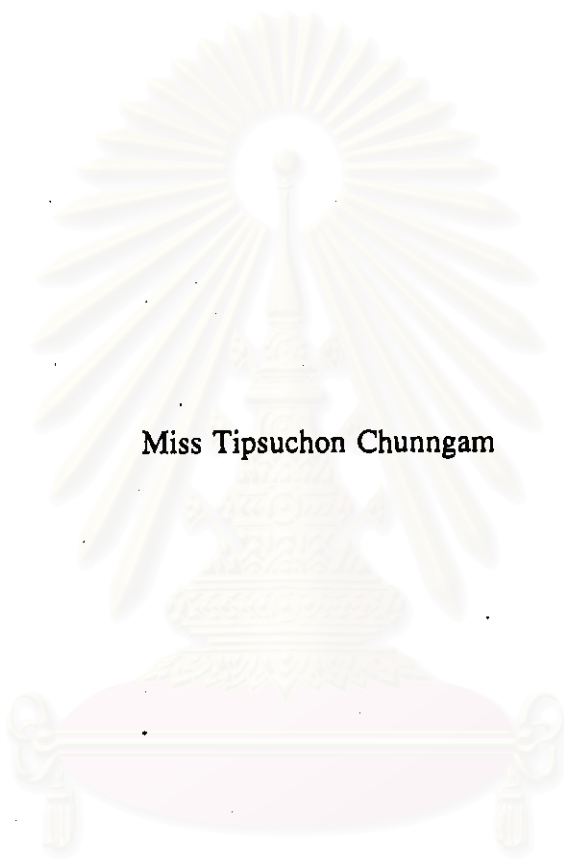
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-653-070-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRELIMINARY STUDIES OF ANTICONVULSION  
MECHANISMS OF N-(2-PROPYLPENTANOYL) UREA



Miss Tipsuchon Chunngam

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

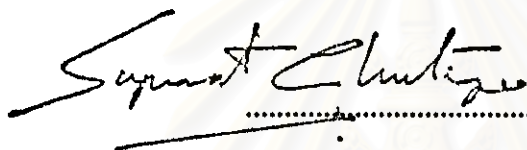
Academic year 1996

ISBN 974-635-070-6

Thesis Title Preliminary studies of anticonvulsion mechanisms of  
N-(2-propylpentanoyl) Urea  
By Miss. Tipsuchon Chunngam  
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.




..... Acting Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

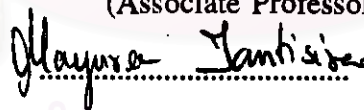
(Dean of Faculty of Medicine)

Thesis Committee



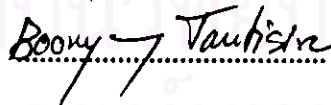
..... Chairman

(Associate Professor Pompen Pramyothin, Ph.D.)



..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)




..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)



..... Member

(Professor Ratre Sudsuang, Ph.D.)



..... Member

(Kanokwan Tilokskulchai, Ph.D.)

## พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ทิพย์สุชน ชุนงาม : การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ด้านชักของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย  
(PRELIMINARY STUDIES OF ANTICONVULSION MECHANISMS OF N-(2- PROPYLPENTANOYL)  
UREA) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. มยุรี ดันตสิระ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. บุญยงค์ ดันตสิระ, 99 หน้า,  
ISBN 974-653-070-6

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการด้านชัก, ระยะเวลาของการออกฤทธิ์ และพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย ซึ่งเป็นอนุพันธ์ใหม่ของกรควาลโปรอิก สารตัวนี้เคยมีรายงานในสัตว์ทดลองว่าสามารถออกฤทธิ์ด้านชักได้ดีทั้งในด้านความแรงและมีขอบเขตของการด้านชักกว้าง การวิจัยนี้จะประเมินฤทธิ์ด้านชักของสารในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้า และศึกษาพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางในการควบคุมการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลาย นอกจากนี้ยังจะทำการศึกษาในหลอดทดลองถึงการแตกตัวของสารนี้ทั้งในตับและในสมองตลอดจนศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่อาจเป็นไปได้ก่อนหลังสารสื่อประสาทชนิดกรควาลโปรอิกในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาวขณะตื่นโดยวิธีไมโครโคอะลไซซีส

ผลการศึกษาตลอดระยะเวลา 12 ชั่วโมงพบว่า เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย มีความแรงสูงกว่าและมีฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ต่อระบบประสาทส่วนกลางต่ำกว่ากรควาลโปรอิกและยังพบว่าเมื่อให้สารตัวนี้ทางปากสามารถด้านการชักได้เช่นกันแต่ขนาดของสารที่ด้านชักได้ในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง ( $ED_{50}$ ) จะสูงกว่าให้ทางช่องท้องถึง 6 เท่า จากการศึกษาการแตกตัวของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย ไม่มีการแตกตัวเป็นกรควาลโปรอิกทั้งที่ตับและสมอง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย จะออกฤทธิ์ด้วยตัวของมันเอง และ/หรือถูกเมตาโบไลต์เป็นสารอื่นก่อนจึงออกฤทธิ์และจากลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ  $ED_{50}$  ที่คล้ายคลึงกันระหว่าง เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย และกรควาลโปรอิก อาจเป็นไปได้ว่า เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย มีลักษณะทางเภสัชจลนศาสตร์คล้ายคลึงกับกรควาลโปรอิก

การศึกษาผลต่อระดับสารสื่อประสาทชนิดกรควาลโปรอิกในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาวขณะตื่นโดยวิธีไมโครโคอะลไซซีสพบว่า เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากกรควาลโปรอิก โดยเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย ไม่มีผลต่อระดับของแอสปาเตส, โกลซินและแกมมาอะมิโนิวไทลิก แต่จะมีผลระดับของกลูตาเมตเมื่อให้ในขนาดต่ำ ซึ่งจะต่างจากกรควาลโปรอิกที่มีผลเพิ่มระดับของแกมมาอะมิโนิวไทลิก และ โกลซิน อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรียต่อไป การศึกษาในขณะนี้บอกได้เพียงว่าเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการด้านชักสูง และในขนาดที่ให้ผลในการรักษามีฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ต่อระบบประสาทส่วนกลางค่อนข้างต่ำ และมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากกรควาลโปรอิก ดังนั้นในการที่จะพัฒนาเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล)ยูเรียให้เป็นยาต้านชักจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาโดยละเอียดเพิ่มเติมถึงเภสัชจลนศาสตร์, เภสัชพลศาสตร์, พิษวิทยา ตลอดจนกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดของสารนี้ต่อไป

ภาควิชา ..... ภาควิชาวิทยา  
สาขาวิชา .....  
ปีการศึกษา ..... ๒๕๓๔

ลายมือชื่อนิติกร ..... Tipuchon Chumngam  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... Boonye Yantisir  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## C775449 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD : ANTICONVULSANT / DURATION / MICRODIALYSIS / N-(2-PROPYLPENTANOYL) UREA /  
HOMOGENATE

TIPSUCHON CHUNNGAM : PRELIMINARY STUDIES OF ANTICONVULSION MECHANISMS  
OF N-(2-PROPYLPENTANOYL) UREA. THESIS-ADVISOR : ASSIST. PROF. MAYUREE  
TANTISIRA, Ph.D., THESIS-COADVISOER : ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D. 99 pp.  
ISBN 974-653-070-6

The present studies was aimed to investigate the anticonvulsant activity with regards to duration of action as well as neurotoxicity of a newly synthesized valproic analogue, N-(2-propylpentanoyl)urea (VPU), which has been previously reported to be a potent and broad spectrum anticonvulsant in animal models. Maximal electroshock (MES) and Rotorod test were used to assess the anticonvulsant and neurotoxicity of VPU in mice respectively. In addition, *in vitro* degradation using rat brain and liver homogenate and *in vivo* microdialysis experiment on conscious freely moving rats were performed to search for possible mode of action of VPU.

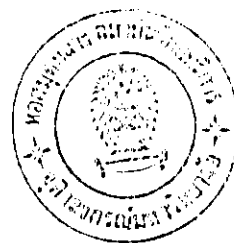
Superiority of VPU to VPA in terms of higher potency in protection against MES and lower neurological toxicity as assessed by rotorod test was evident throughout the observation of 12 hours after dosing. VPU was also orally active demonstrating the ED<sub>50</sub> approximately 6 times higher than its corresponding value by intraperitoneal route. VPU was not degraded to VPA either by brain or liver homogenate. Therefore, it is likely that VPU *per se* and/or any of its metabolites other than VPA accounts for the anticonvulsant observed. Based on the results that the alteration of ED<sub>50</sub> of VPU and VPA exhibited within the observation period of 12 hours were similar, it is speculative that VPU may resemble VPA in pharmacokinetic characters.

Microdialysis studies on awake rats revealed different profile of responses on cortical amino acid neurotransmitters exhibited by VPU and VPA. VPU was found to exert no significant effect on the level of cortical aspartate, glycine and GABA while a non dose-dependent reduction was observed on glutamate level. Therefore unlike VPA which appeared to exert at least part of its effect by an increment of cortical GABA and glycine, other mechanisms may underly anticonvulsant activity of VPU and they remain to be further elucidated. Thus, it may conclude herein that despite being an analogue of VPA, VPU differ from its parent compound with regards to potency, toxicity and mechanism of action. Extensive studies are needed to clarify pharmacokinetic, pharmacodynamic, toxicity and precise mechanism of action of this compound.

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา.....  
สาขาวิชา.....-.....  
ปีการศึกษา.....2539.....

ลายมือชื่อนิสิต.....Tipsuchon Chumngam.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Mayuree Tantisira.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....Boonyong Tantisira.....

## Acknowledgements



I would like to thank Assist. Prof. Dr. Mayuree Tantisira, and, Assoc. Prof. Dr. Boonyong Tantisira for their kindly 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 their helpful advice and allowing me to carry out this work in their departments.

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 studies.

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

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Contents

	page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	x
List of Abbreviations.....	xiii
Chapter	
I Introduction.....	1
Epilepsy.....	1
1. Epileptogenesis.....	2
2. Classification of epilepsy.....	5
3. Amino acid neurotransmitter.....	8
4. Drug for the treatment of epilepsy.....	17
Valproic acid.....	22
N-(2-propylpentanoyl)Urea.....	26
II Materials and Methods.....	28
Experimental animals.....	28
Equipments.....	29
Chemicals.....	30
Experimental methods.....	31
Calculation and statistical analysis.....	39

III Results.....	40
IV Discussion and Conclusion.....	68
References.....	75
Appendices.....	85
Curriculum Vitae.....	99



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## List of Tables

Table	Page
1. International Classification of Epileptic Seizures.....	7
2. ED <sub>50</sub> and relative safety margin (LD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub> ) of an intraperitoneal..... administration of VPU and VPA at different time after dosing.	46
3. ED <sub>50</sub> , TD <sub>50</sub> and PI(TD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub> ) of an intraperitoneal administration..... of VPU and VPA.	52



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## List of Figures

Figure	Page
1. Glutamate (NMDA) receptor complex.....	11
2. GABA <sub>A</sub> receptor complex.....	11
3. Metabolic pathway for the synthesis and degradation of GABA..... and glutamate.	14
4. Specificity of conventional antiepileptic drugs in the treatment of..... partial and generalized seizures.	21
5. Specificity of conventional antiepileptic drugs in the treatment of..... epileptic syndromes.	21
6. Specificity of new antiepileptic drug in the treatment of partial and..... generalized seizures.	21
7. Structural formula of valproic acid.....	22
8. Structural formula of N-(2-propylpentanoyl)Urea.....	26
9. Log dose response curves of VPU and VPA (i.p.) on MES at 30 min.... pretreated time.	45
10. Protection against MES exhibited by VPU and VPA at various..... pretreated times in mice.	47
11. Log dose response curves of VPU (p.o.) on MES at 30, 60 and 120.... min pretreated times.	48
12. Log dose response curves of VPA (p.o.) on MES at 30, 60 and 120..... min pretreated times.	49
13. Comparison of ED <sub>50</sub> at various pretreated time of orally given VPU.... and VPA against MES in mice.	50

14. Log dose response curves of neurotoxicity exhibited by VPU and..... VPA (i.p.) in mice.	51
15. Neurotoxicity of VPU and VPA by rotorod test at various pretreated..... times in mice.	53
16. HPLC chromatogram of ADAM-derivatized standard VPA.....	54
17. VPA concentration in rat' s liver homogenate at various incubation..... times after the administration of VPU at time 0.	55
18. VPA concentration in rat' s brain homogenate at various incubation..... times after the administration of VPU at time 0.	56
19. HPLC chromatogram of OPA-derivatized amino acids from the rat..... cerebral cortex.	57
20. Change in the rat cortical aspartate levels at various times after..... an intraperitoneal administration of NSS and PEG400.	58
21. Change in the rat cortical glutamate levels at various times after..... an intraperitoneal administration of NSS and PEG400.	59
22. Change in the rat cortical glycine levels at various times after..... an intraperitoneal administration of NSS and PEG400.	60
23. Change in the rat cortical GABA levels at various times after an..... intraperitoneal administration of NSS and PEG400.	61
24. Effect of an intraperitoneal administration of VPA and VPU on..... the rat cortical aspartate levels at various times.	62
25. Effect of an intraperitoneal administration of VPA and VPU on..... the rat cortical glutamate levels at various times.	62
26. Effect of an intraperitoneal administration of VPA and VPU on..... the rat cortical glycine levels at various times.	63
27. Effect of an intraperitoneal administration of VPA and VPU on..... the rat cortical GABA levels at various times.	63

28. Effect of VPA and VPU on the total amount of the rat cortical..... 64  
aspartate in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal  
administration of the test substances.
29. Effect of VPA and VPU on the total amount of the rat cortical..... 65  
glutamate in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal  
administration of the test substances.
30. Effect of VPA and VPU on the total amount of the rat cortical..... 66  
glycine in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal  
administration of the test substances.
31. Effect of VPA and VPU on the total amount of the rat cortical..... 67  
GABA in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal  
administration of the test substances.

## List of Abbreviations

$\alpha$	=	alpha
$\beta$	=	beta
$\delta$	=	delta
$\gamma$	=	gamma
$\mu$	=	micro
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microlitre
$\mu\text{m}$	=	micrometre
$\mu\text{M}$	=	micromolar
nM	=	nanomolar
%	=	percent
$\text{Ca}^{++}$	=	calcium ion
$\text{Mg}^{++}$	=	magnesium ion
$\text{K}^{+}$	=	potassium ion
$\text{Na}^{+}$	=	Sodium ion
ADAM	=	9-Anthryldiazomethane
ACPD	=	Trans-1-aminocyclopentane-1-3-dicarboxylic acid
aCSF	=	artificial cerebrospinal fluid
a.m.	=	ante meridian (before noon)
AMPA	=	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-oxazole-4-propionic acid
AP4	=	L-2 amino-4-phosphonobutyrate
Asp-T	=	Aspartate aminotransferase

B.W.	=	body weight
CNS	=	Central Nervous System
cm	=	Centimetre
°C	=	degree Celsius
ED <sub>50</sub>	=	Median Effective Dose
EEG	=	Electroencephalogram
et. al	=	et alii (and other)
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GABA-T	=	Gamma aminobutyric acid transaminase
GAD	=	Glutamic acid decarboxylase
GOT	=	Glutamic oxaloacetic transferase
g	=	gram
Hz	=	Hertz
HPLC	=	High performance Liquid Chromatography
hr	=	hour
ILAE	=	International League Against Epilepsy
i.p.	=	intraperitoneal
IP	=	inositol phosphate
kg	=	kilogram
L	=	Litre
mA	=	milliampere
M	=	Molar
MES	=	Maximal Electroshock Seizure test
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre

mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
nm	=	nanometre
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NSS	=	Normal Saline Solution
OPA	=	ortho Phthaldialdehyde
PEG400	=	Polyethylene glycol 400
PI	=	Protective Index
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
sec	=	Second
SHMT	=	serine hydroxymethyl transferase
TD <sub>50</sub>	=	Median toxic Dose
VPA	=	Valproic acid
VPU	=	N-(-2-propylpentanoyl)Urea

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย