

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านชักของ (เอ็น-ไฮดรอกซีเมทิล)-2-โพรพิลเพนทามาย์

โดย

รศ.ดร.บุญยงค์ ตันตีสิริระ

รศ.ดร.มยุรี ตันตีสิริระ

ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช

อ.เพ็ญพิมล ผลทรัพย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้องต่าง ๆ ดังนี้

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัย

คณะกรรมการการติดตามและประเมินผลโครงการวิจัยที่ให้ข้อเสนอแนะและแก้ไขโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย สุขเสวต และอาจารย์ ดร.สุมิตรา โกมลเจริญศิริ สำหรับความร่วมมือในการทดลองด้วยเทคนิค Patch clamp

ภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา และภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความอนุเคราะห์การใช้สถานที่ วัสดุและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัย : ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ด้านชักของ (เอ็น-ไฮดรอกซีเมทิล)-2-โพรพิลเพนทา
มาย์

ผู้วิจัย : รศ.ดร.บุญยงค์ ตันตีสิริระ

รศ.ดร.มยุรี ตันตีสิริระ

ผศ.ดร.ชานาญ ภัทรพานิช

อ.เพ็ญพิมล ผลทรัพย์

ทำวิจัยเสร็จเมื่อ : กันยายน 2550

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะและกลไกการออกฤทธิ์ด้านชักของสาร (เอ็น-ไฮดรอกซีเมทิล)-2-โพรพิลเพนทามาย์ด์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ใหม่ของกรดวาลโปรอิก(วีพีเอ)ที่มีฤทธิ์ด้านชักเมื่อเปรียบเทียบกับ วีพีเอ พบว่า สาร เอชพีพี ออกฤทธิ์ด้านชักได้เร็วกว่าและแรงกว่าวีพีเอแต่มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ที่สั้นกว่า ในขณะที่ความเป็นพิษต่อการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลายของสารทั้งสองแม้จะอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันในระยะแรก แต่ความเป็นพิษจากวีพีเอจะอยู่ได้นานกว่าความเป็นพิษจากสารเอชพีพีซึ่งค่อย ๆ ลดลงพร้อม ๆ กับฤทธิ์ด้านชัก เช่นเดียวกันกับวีพีเอ เมแทบอลิซึมของสารเอชพีพีน่าจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไซโตโครมพี 450

เมื่อศึกษาต่อไปถึงผลของสารเอชพีพี ต่อระดับของสารสื่อประสาทที่เป็นกรดอะมิโน อันได้แก่ กลูตาเมต แอสพาร์เตต กลัยซีนและกาบา ในเปลือกสมองของหนูแรทในขณะตื่น โดยวิธีไมโครไดอะลิสซิส พบว่าสารเอชพีพี ในขนาด 80 และ 160 มก/กก น้ำหนักตัว มีฤทธิ์ทำให้ระดับของกลูตาเมตในเปลือกสมองของหนูแรทในขณะตื่นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่จะพบการลดของกลูตาเมตเฉพาะแต่ในกลุ่มของหนูแรทที่ได้รับ วีพีเอในขนาดสูง (440 มก/กก น้ำหนักตัว) เท่านั้น

เมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารดังกล่าวที่มีต่อตัวรับชนิด กาบา เอ กลัยซีน และเอ็นเอ็มดีเอ ในเซลล์ประสาทที่แยกได้ทันทีจากฮิปโปแคมปัสของหนูแรท โดยการวัดกระแสทั้งหมดที่ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาท พบว่าสารเอชพีพีไม่มีผลโดยตรงในการที่จะทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเข้าเซลล์ประสาทปริามิดที่แยกได้ทันทีจากฮิปโปแคมปัสของหนูแรท และไม่มีเปลี่ยนแปลงการตอบสนองที่ผ่านตัวรับชนิดกาบา เอ กลัยซีน และเอ็นเอ็มดีเอ

จากผลการศึกษาดังกล่าวมาข้ามต้นนี้ อาจกล่าวได้ว่าสารเอชพีพีเป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ด้านชักที่แรงกว่าแต่มีข้อดีกว่าวีพีเอคือ มีระยะเวลาออกฤทธิ์ที่สั้นกว่า และน่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ด้านชักโดยการลดระดับกลูตาเมตซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นในสมอง ควรจะมีการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีเพื่อให้ได้สารที่มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ด้านชักนานกว่านี้

Project title : Study on the mechanisms of anticonvulsant activity of (N-Hydroxymethyl)-2-propylpentamide.

Name of the Investigators : Assoc.Dr.Boonyong Tantisira
Assoc.Dr.Mayuree Tantisira
Assist.Dr.chamnan Patarapanich
Ms.Penphimon Ponsup

Year : September 2005

Abstract

The purpose of the present investigation was to study profiles and mechanisms of anticonvulsant activity of N-Hydroxymethyl-2-propylpentamid (HPP), a newly synthesized valproic analogue. In comparison to VPA, HPP possessed a stronger but of shorter duration than those exhibited by VPA. Neurotoxicity on motor co-ordination of HPP gradually decreased whereas those of VPA was rather persistent. Cytochrome P 450 seemed to be involved in the metabolic pathway of both HPP and VPA.

Further study on the level of brain amino acid neurotransmitters namely, glutamate, aspartate, glycine and GABA of freely moving rats was investigated by microdialysis technique. Significant decreases in the level of cortical glutamate, an excitatory amino acid neurotransmitter, was noted in both of HPP-treated groups whereas a reduction of glutamate was observed in rats only those receiving high dose (440 mg.kg B.W.) of VPA.

Furthermore, the effects of HPP on GABA_A, glycine and NMDA receptors in acutely dissociated rat hippocampal neurons, using the whole-cell application of the patch clamp techniques, was also investigated. HPP did not directly elicited inward currents in acutely dissociated rat hippocampal neurons. Additionally, GABA_A, glycine and NMDA currents were unaltered by HPP.

The present studies identified HPP as a more potent anticonvulsant than its parents compound. Reduction of brain glutamate which is an excitatory neurotransmitter seemed to underlie its anticonvulsant activity. Further structural modification should be carried out to improve the duration of action of HPP.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อภาษาไทย.....	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iv.
สารบัญ.....	v
รายการตารางประกอบ.....	vi
รายการภาพประกอบ.....	vii
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	7
วัสดุและวิธีการวิจัย.....	8
ผลการวิจัย.....	17
การอภิปรายและสรุปผล.....	54
เอกสารอ้างอิง.....	57

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของโรคลมชัก.....	2
ตารางที่ 2 การเลือกใช้ยาต้านชักชนิดต่าง ๆ ตามอาการแสดงที่เกิดขึ้นของโรคลมชัก.....	3
ตารางที่ 3 ED ₅₀ ของฤทธิ์ต้านการชักในหนูถีบจักรที่ได้รับ HPP และ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้อง ก่อนการทดสอบฤทธิ์ โดยวิธี MES ในระยะเวลา 15 นาที, 30 นาที, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ.....	20
ตารางที่ 4 รั้อยละของหนูถีบจักรที่ได้รับ HPP และ VPA ขนาด 1 และ 2 เท่า ของค่า ED ₅₀ ที่ optimal pretreated time ทางช่องท้องที่ไม่สามารถทรงตัวบนแกนกลางของเครื่อง rotorod ที่หมุนอยู่ได้.....	21
ตารางที่ 5 ED ₅₀ ของฤทธิ์ต้านชักจาก MES ในหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ SKF-525A ขนาด 50 มก/กก น้ำหนักตัว ทางปากร่วมกับสารทดสอบ HPP หรือ VPA ขนาดเท่ากับ ED ₅₀ ที่ optimal pretreated time เปรียบเทียบกับ ED ₅₀ ในหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ HPP หรือ VPA แต่เพียงอย่างเดียวที่ optimal pretreated time.....	21

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Valproic acid (VPA).....	4
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Valpromide.....	5
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ (N-Hydroxymethyl)-2-propylpentamide (HPP).....	6
รูปที่ 4 กราฟแท่งแสดงค่า ED ₅₀ ของ HPP และ VPA ในหนูถีบจักรที่ได้รับสารทดสอบทางช่องท้อง เป็นเวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดการชักด้วยกระแสไฟฟ้า.....	22
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 15 นาที.....	23
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 30 นาที.....	24
รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง.....	25
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง.....	26
รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 15 นาที.....	27
รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 30 นาที.....	28
รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง.....	29
รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	30
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง...	31
รูปที่ 14 ผลของ SKF-525A ขนาด 50 มก/กก น้ำหนักตัว เมื่อให้ทางปากก่อนให้ HPP 60 นาทีต่อ ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP กับการต้านชัก ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วย กระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 15 นาที.....	32

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 15 ผลของ SKF-525A ขนาด 50 มก/กก น้ำหนักตัว เมื่อให้ทางปากก่อนให้ VPA 60 นาที ต่อความสัมพัทธ์ระหว่างขนาดของ VPA (แนวนอน) กับการต้านชัก (แนวตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 30 นาที.....	33
รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงระดับของสารสื่อประสาท GABA ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	34
รูปที่ 17 กราฟแท่งแสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ GABA ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG 400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	35
รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาท Glycine ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG 400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	36
รูปที่ 19 กราฟแท่งแสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ Glycine ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG 400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	37
รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาท Glutamate ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG 400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	38
รูปที่ 21 กราฟแท่งแสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ Glutamate ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG 400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	39
รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาท Aspartate ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG 400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	40
รูปที่ 23 กราฟแท่งแสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ Aspartate ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG 400, VPA และ HPP เข้าทางช่องท้อง.....	41
รูปที่ 24 Inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก GABA ที่ความเข้มข้น 0.3-1,000 ไมโครโมล โดยที่ จะตรึงค่า potential ของเซลล์ประสาทไว้ที่ -20 มิลลิโวลต์.....	42
รูปที่ 25 GABA log concentration-response relationship ของเซลล์ประสาทที่ถูกแยกทันทีจากบริเวณฮิปโปแคมปัส.....	43
รูปที่ 26 แสดงผลการยับยั้งของ Bicucullin ที่ขนาด 5, 10, 15 และ 20 μM ต่อกกระแสไฟฟ้าของ เซลล์ประสาทที่เกิดจาก GABA (3 μM).....	44
รูปที่ 27 แสดงผลการยับยั้งของ Picrotoxin ที่ขนาด 10, 50, 100 และ 200 μM ต่อกกระแสไฟฟ้าของ เซลล์ประสาทที่เกิดจาก GABA (3 μM).....	44

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลในการยับยั้งกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก GABA โดย Bicuculline และ Picrotoxin.....	45
รูปที่ 29 แสดงผลของ Diazepam ต่อกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทเมื่อไม่มี GABA (A) และมี GABA ที่ขนาดความเข้มข้น 3 μM (B).....	46
รูปที่ 30 แสดงผลของ HPP ต่อกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทเมื่อให้ร่วมกับ GABA ที่ขนาดความเข้มข้น 3 μM (A) เมื่อเปรียบเทียบกับ DZP (B).....	47
รูปที่ 31 แสดงการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก Glycine ที่ขนาดความเข้มข้น 1-3,000 μM โดยที่จะวัดค่า potential ของเซลล์ประสาทไว้ที่ -20 มิลลิโวลต์.....	48
รูปที่ 32 Glycine log concentration-response relationship ของเซลล์ประสาทที่ถูกแยกทันทีจากบริเวณฮิปโปแคมปัส.....	48
รูปที่ 33 แสดงผลการยับยั้งของ Strychnine sulfate (STR) ที่ขนาด 1, 5, 10, 15 และ 20 μM ต่อกระแสไฟฟ้าของ เซลล์ประสาทที่เกิดจาก Glycine (3 μM).....	49
รูปที่ 34 แสดงผลของ HPP ที่ขนาดความเข้มข้น 1-300 μM ต่อกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทเมื่อให้ร่วมกับ Glycine (30 μM).....	49
รูปที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลในการยับยั้งกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก Glycine โดย Strychnine sulfate (STR) และ DZP	50
รูปที่ 36 แสดงการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA ที่ขนาดความเข้มข้น 1-800 μM โดยที่จะวัดค่า potential ของเซลล์ประสาทไว้ที่ -20 มิลลิโวลต์.....	50
รูปที่ 37 NMDA log concentration-response relationship ของเซลล์ประสาทที่ถูกแยกทันทีจากบริเวณฮิปโปแคมปัส.....	51
รูปที่ 38 แสดงผลการยับยั้งของ DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5) ที่ขนาด 50, 100, 150 และ 200 μM ต่อกระแสไฟฟ้าของ เซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA (100 μM)...52	52
รูปที่ 39 แสดงผลของ HPP ที่ขนาดความเข้มข้น 1-300 μM ต่อกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA (100 μM).....	52
รูปที่ 40 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลของกระแสไฟฟ้าของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA โดย AP-5 และ HPP.....	53

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคลมชัก (Epilepsy) เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติทางสมองที่พบมากที่สุดโรคหนึ่ง ปัจจุบันยังไม่ทราบพยาธิสรีรวิทยาของโรคลมชักอย่างแน่ชัด แต่เชื่อกันว่ากลไกการเกิดโรคมักมีหลายกลไก ซึ่งอาจเกิดร่วมกันได้ (Biton, 2007; Hakimian และคณะ, 2007; Avanzini และ Franceschetti, 2003) โดยเฉลี่ยแล้วเราพบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคลมชัก 1 คน ต่อประชากร 200 คน (Dichter, 1994; Hausen, 1998; Ure และ Parassolo, 2000) ในจำนวนประชากรที่ประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคลมชักนี้ พบว่ามีผู้ป่วยถึง 20% ที่เราไม่สามารถควบคุมการชักได้อย่างสมบูรณ์ด้วยยาต้านชักที่มีในปัจจุบัน (Penry และ Dean 1993; Porter, 1993; Rogawski, 2006)

โรคลมชักแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามสาเหตุของการเกิด พยาธิสภาพ อายุผู้ป่วย อาการที่แสดงออกขณะชัก และลักษณะของคลื่นไฟฟ้าในสมอง (Brodie และ Dichter, 1996; McLachlan และคณะ, 2000; Trescher และ Lesser, 2000) การจำแนกชนิดของโรคลมชักนี้ได้เริ่มทำกันมาตั้งแต่ศตวรรษที่ 19 และได้มีการเปลี่ยนแปลงแก้ไขมาจนปัจจุบัน ตารางที่ 1. แสดงการจำแนกชนิดของโรคลมชักโดยอาศัยแนวทางของ General Assemble of the International League Against Epilepsy (ILAE) ในปี 1981 การจำแนกชนิดของโรคลมชักนี้ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางในด้านคลินิก โดยใช้เป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรคลมชักและการเลือกให้ยาต้านชักที่เหมาะสม นอกจากการจำแนกชนิดของโรคลมชักที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1. แล้ว ยังได้มีความพยายามที่จะปรับปรุงการจัดหมวดหมู่ของโรคลมชักต่อมาจนถึงปัจจุบัน (Dreifuss, 1997; Fukuzako และ Izumi, 1991; McNamara, 1996; Kwan และ Brodie 2007)

แม้เราจะยังไม่ทราบกลไกที่ก่อให้เกิดโรคลมชักที่แน่นอน แต่ปัจจุบันเชื่อว่าโรคลมชักมีความเกี่ยวข้องกับการเสียสมดุลของสารสื่อประสาทในสมอง ทำให้มีปริมาณสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งลดลง หรือไปเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นหรืออาจเป็นทั้ง 2 อย่าง นอกจากนั้นยังเชื่อว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการผ่านเข้าออกผนังเซลล์ของเกลือแร่ต่าง ๆ (Holmes, 1997; McNamara, 1996; Meldrum, 1995) ปัจจัยทางพันธุกรรมก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่ง (Trescher และ Lesser, 2000; Avanzini และ Franceschetti, 2003) นอกจากนี้โรคลมชักยังสามารถเกิดในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพที่มีผลต่อสมองซึ่งได้แก่ ความพิการแต่กำเนิด, การติดเชื้อ, เนื้องอก, โรคหลอดเลือดแดง และการบาดเจ็บ (Avoli, 1997; Gilroy, 2000; Porter, 1993)

I. Partial (focal, local) seizures

A. Simple partial seizures

1. With motor symptoms
2. With somatosensory or special sensory symptoms
3. With autonomic symptoms or signs
4. With psychic symptoms

B. Complex partial seizures

1. Simple partial onset followed by impairment of consciousness
 - a. With simple partial features (as in A. 1-4) followed by impaired consciousness
 - b. With automatisms
2. With impairment of consciousness at onset
 - a. With impairment of consciousness only
 - b. With automatisms

C. Partial seizures evolving to secondarily generalized seizures

II. Generalized seizures (convulsive and non-convulsive)

A. Absence seizures

1. Typical absence
2. Atypical absence

B. Myoclonic seizures

C. Clonic seizures

D. Tonic seizures

E. Tonic-Clonic seizures

F. Atonic seizures

III. Unclassified epileptic seizures

Modified form Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1981).

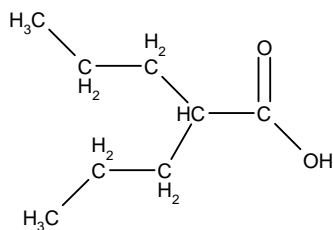
ตารางที่ 1. การจำแนกชนิดของโรคลมชัก ตามแนวทางของ General Assembly of the International League Against Epilepsy (ILAE) 1981 (Shorvon, 2000)

จากสาเหตุและลักษณะอาการของโรคลมชัก นอกจากจะทำให้ผู้ป่วยได้รับความทุกข์ทรมาน ทั้งทางร่างกายและจิตใจแล้ว ยังมีผลต่อระบบประสาท, สถิติปัญญา, การรับรู้, ผนกวนด้านการศึกษา, การทำงาน ตลอดจนรบกวนการดำเนินชีวิตหรือการประกอบกิจวัตรประจำวันอีกด้วย การรักษาโรคลมชักจะต้องพิจารณาตามชนิดและสาเหตุของโรคลมชัก ในการเลือกใช้ยาต้านชักจะต้องคำนึงถึง ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของยาที่ใช้รักษา (Pedley, 2000; McNamara, 1996; Bailer และคณะ, 2004) ปัจจุบันมีการสังเคราะห์ยาใหม่ ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมาใช้มากมายหลายตัว เช่น Vigabatrin, Gabapentin, Lamotrigine และ Felbamate ทำให้เราสามารถเลือกใช้ยาที่มีความจำเพาะต่อชนิดและอาการของโรคได้ถึง 80 % ตารางที่ 2 แสดงการเลือกใช้ยาต้านชักชนิดต่าง ๆ ตามอาการแสดงที่เกิดขึ้นของโรคลมชัก (Dreifuss, 1997; McNamara, 2001; Rokawski, 2006) อย่างไรก็ตามก็ยังมีผู้ป่วยอีกเป็นจำนวนมากที่เราไม่สามารถควบคุมอาการของโรคลมชักได้ (Porter และ Meldrum, 1998; Trescher และ Lesser, 2000) และยาต้านชักต่าง ๆ เหล่านี้ยังทำให้เกิดพิษ และผลข้างเคียงต่าง ๆ อีกด้วย จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีผู้พยายามเสาะแสวงหายาต้านชักตัวใหม่ทั้งชนิดที่เป็นสารใหม่ และชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของยาต้านชักตัวเก่าที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (Hadad และ Bailer, 1997 ; Bailer และคณะ, 1994 ; Bailer, 1999 ; Bailer และคณะ, 2001 ; Isoherranen และคณะ, 2001 ; Spiegelstein และคณะ, 1999; Tasso และคณะ, 2004; Bailer และคณะ, 2002)

Focal-Onset Seizures*	Generalized Seizures			
	Generalized Tonic - Clonic	Absence	Myoclonic	Atonic
FIRST - LINE				
Carbamazepine	Valproic acid	Ethosuximide	Valproic acid	Valproic acid
Phenytoin	Carbamazepine	Valproic acid		
Valproic acid	Phenytoin			
ALTERNATIVES				
Lamotrigine	Phenobarbital	Acetazolamide	Clonazepam	Clonazepam
Gabapentin	Primidone	Clonazepam	Acetazolamide	
Phenobarbital		Phenobarbital		
Primidone				

* Simple-partial, complex-partial, and secondarily generalized tonic-clonic seizures.

ตารางที่ 2. การเลือกใช้ยาต้านชักชนิดต่าง ๆ ตามอาการแสดงที่เกิดขึ้นของโรคลมชัก



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Valproic acid

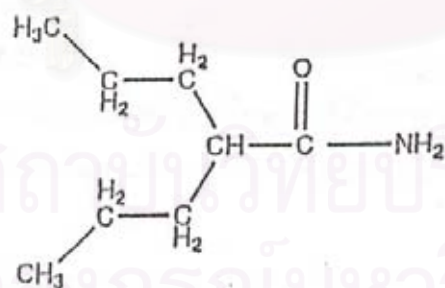
Valproic acid (2-propenpentanoic acid, n-dipropylacetic acid, VPA รูปที่ 1) เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ. 1882 และถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ต้านชักโดย Meunier และคณะในปี ค.ศ. 1963 (Bruni, 1996 ; Rowen, 1998) ต่อมาได้มีการนำ VPA มาใช้เป็นยาต้านชักในปี ค.ศ. 1976 ปัจจุบันได้มีการนำ VPA มาใช้รักษาโรคลมชักกันอย่างแพร่หลาย โดยจัดเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านชักในระดับปานกลาง VPA มีสูตรโครงสร้างไม่ซับซ้อน สามารถออกฤทธิ์ได้กว้าง กล่าวคือใช้ได้ผลดีกับทั้ง generalized seizure (absence, tonic-clonic, myoclonic) และ partial seizure (Davis และคณะ, 1994; Fuluzako และ Izumi, 1991; Johannessen, 2000; Loscher, 1998; Rowan, 1998)) ซึ่งปกติจะถูกควบคุมได้ดีโดยยาต่างกลุ่มกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เราสามารถนำ VPA มาใช้รักษาความผิดปกติทางจิตประสาทอื่นๆได้อีกด้วย ถึงแม้จะมีการใช้ VPA เป็นยาต้านชักกันอย่างกว้างขวาง แต่ในปัจจุบันเรายังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของ VPA อย่างชัดเจน พบว่า VPA อาจมีกลไกการออกฤทธิ์หลายกลไกได้แก่

1. VPA อาจไปเพิ่มระดับ Gamma aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่ยับยั้งการทำงานของระบบประสาท โดยอาจไปเร่งการทำงานของเอนไซม์ Glutamic acid decarboxylase (GAD) ซึ่งจำเป็นต่อการสร้าง GABA (Davis และคณะ, 1994) อาจไปยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลาย GABA เช่น GABA-transaminase (GABA-T), Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) (Cooper, Bloom และ Roth, 1996; Davis และคณะ, 1994; Loscher, 1993) และ VPA อาจสนับสนุนฤทธิ์การยับยั้งของ GABA โดยไปเพิ่มการตอบสนองของสมองต่อ GABA (Davis และคณะ, 1994)
2. ผลของ VPA ต่อ amino acid neurotransmitters ตัวอื่น นอกจาก GABA เช่น มีรายงานว่า VPA สามารถเพิ่ม ปริมาณ glutamate ในเปลือกสมองใหญ่ของหนูถีบจักรได้ (Dixon และ Hokin, 1997) และยังมีผลต่อ glutamate โดยไปลดการตอบสนองต่อตัวรับ NMDA อีกด้วย (Gean, 1994) ในส่วนของ aspartate นั้นก็พบว่า มีการลดปริมาณการหลั่งของสาร aspartate ในสมองหนูขาวและหนูถีบจักร (Chapman และคณะ, 1982; Crowder

และ Bradford, 1987) และพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ glycine ในเนื้อเยื่อสมอง อีกด้วย (Similae และคณะ, 1979)

3. VPA มีผลต่อเยื่อหุ้มผนังเซลล์ โดยทำให้ลด excitability ของเซลล์ประสาทลง อาจไปลด sustained repetitive neuronal firing โดยผ่าน voltage-dependent Na^+ channels (Loscher, 1993; Brodie และ Dichter, 1996) หรือมีผลต่อ sodium และ potassium conductance (Loscher, 1993; Davis และคณะ, 1994)

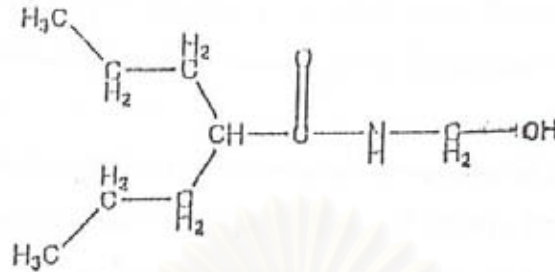
ถึงแม้จะมีการใช้ VPA ทางคลินิกอย่างกว้างขวางแต่ VPA ก็จัดเป็นยาต้านชักที่ออกฤทธิ์ระดับปานกลาง เนื่องจากผ่าน blood-brain barrier ได้ไม่ดีเท่ายาต้านชักตัวอื่นๆ และยังพบว่า VPA ทำให้เกิดอาการข้างเคียงตั้งแต่ระดับเล็กน้อยจนถึงรุนแรงมาก ที่สำคัญได้แก่ความเป็นพิษต่อตับทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (Davis และคณะ, 1994; de Jong และคณะ, 2007) มีผลต่อทารกในครรภ์ หรือตัวอ่อนในสัตว์ทดลองโดยทำให้เกิดความผิดปกติตั้งแต่กำเนิด (Davis และคณะ, 1994; de Jong และคณะ, 2007; Eikel และคณะ, 2006; Okada และคณะ, 2004) มีพิษต่อไต, กล้ามเนื้อโครงร่าง, ทำให้เกิดอาการซึมเศร้า เดี๋ยวใจเซ และมีผลต่อทางเดินอาหาร (Davis และคณะ, 1994; Brodie และ Dichter, 1996; Stringer, 1998; Ben Salem และคณะ, 2007) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีผู้พยายามพัฒนาสูตรโครงสร้างของ VPA เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงขึ้น แต่มีความเป็นพิษและผลข้างเคียงลดน้อยลง (Bailer และคณะ, 1994; Hadad และ Bailer, 1997; Spilestein และคณะ, 1999; Bailer, 1999; Isoherranen และคณะ 2001; Tasso และคณะ, 2004)



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Valpromide

อนุพันธ์ valproic acid ที่สำคัญกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ อนุพันธ์ กลุ่ม primary amides สารตัวต้นในกลุ่มนี้ ได้แก่ valpromide (รูปที่ 2) สารดังกล่าวได้มีการพัฒนาจนนำไปใช้เป็นยาต้านชักในบางประเทศ อย่างไรก็ตามก็ถึงแม้จะมีรายงานว่า valpromide มีฤทธิ์ต้านชักดีกว่าและมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนน้อยกว่า VPA แต่ valpromide ก็จะถูกสลายตัวในร่างกายเป็น VPA (Bailer, 1991; Tasso และ

คณะ, 2004) นอกจากนี้ valpromide แล้วยังได้มีความพยายามพัฒนาอนุพันธ์ของ valpromide ขึ้นมาอีกหลายตัว และพบว่ามีอนุพันธ์บางตัวมีฤทธิ์ต้านชักเช่นกัน (Bailer และคณะ, 1994; Bailer และคณะ, 2001; Tasso และคณะ, 2004; Kwan และ Brodie, 2007)



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ (N-Hydroxymethyl)-2-propylpentamide

สำหรับอนุพันธ์ valproic acid ในกลุ่ม amide นี้ คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการสังเคราะห์สาร (N-Hydroxymethyl)-2-propylpentamide (HPP) ขึ้น (รูปที่3) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการชัก ฤทธิ์ข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ ความเป็นพิษเฉียบพลัน ตลอดจนผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ที่เปลือกสมองใหญ่หนูขาว โดยวิธี microdialysis พบว่า HPP ออกฤทธิ์ต้านชักได้ดีกว่า VPA ซึ่งเป็นสารต้นแบบไม่ว่าจะเป็นการทดสอบในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าหรือสาร Pentylene tetrazole (PTZ) ก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านชักได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ HPP ยังมีขอบเขตของความปลอดภัยสัมพัทธ์สูงกว่า VPA ในขณะที่มีฤทธิ์ข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์อยู่ในระดับเดียวกับ VPA สำหรับผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาท amino acid นั้น ไม่สามารถจะสรุปได้อย่างชัดเจนเนื่องจากการดำเนินการทดลองดังกล่าวทำในหนูขาวที่สลบ ยาสลบที่ใช้อาจมีผลต่อการหลั่งสารสื่อประสาทในสมองได้

เมื่อสรุปจากการศึกษาเบื้องต้นแล้ว อาจกล่าวได้ว่า HPP เป็นอนุพันธ์ที่มีศักยภาพพอที่จะดำเนินการวิจัยในระดับลึก เพื่อพัฒนามาใช้เป็นยาต้านชักต่อไป โดยคณะผู้วิจัยจะดำเนินการศึกษาระยะเวลาการออกฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง คุณสมบัติการต้านยา ผลของ enzyme inhibition ต่อฤทธิ์ต้านชัก ผลต่อปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ที่เปลือกสมองใหญ่หนูขาวที่เคลื่อนไหวได้โดยอิสระ ตลอดจนผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการส่งกระแสประสาทของเซลล์ประสาทเดี่ยวในสมอง โดยเปรียบเทียบผลดังกล่าวกับ VPA ซึ่งเป็นสารตัวต้นแบบ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษา

1. ฤทธิ์และระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของ HPP
2. ความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของ HPP
3. ผลของ enzyme inhibitor ต่อฤทธิ์ต้านชักของ HPP
4. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนที่เปลือกสมองใหญ่หนูขาวที่เคลื่อนไหวได้โดยอิสระ
5. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าในเซลล์ปิรามิดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูขาว โดยวิธี Patch clamp



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุและวิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

การทดลอง microdialysis จะใช้หนูขาว (Wistar albino rats) เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 250-350 กรัม และ การทดลอง patch clamp ใช้หนูขาวอายุ 14 – 21 วัน นอกจากนั้นจะใช้หนูถีบจักร (Swiss albino mice) เพศผู้ น้ำหนักตัวระหว่าง 18-25 กรัม สัตว์ทดลองทั้งหมดจะถูกนำมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม มาเลี้ยง ณ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และสำหรับหนูถีบจักรนั้น แต่ละรุ่นที่ได้มาจะดำเนินการทดลองให้เสร็จสิ้นภายใน 1 สัปดาห์หลังจากเริ่มทำการทดลอง (ยกเว้นการศึกษาผลต่อการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหว) เพื่อลดความผิดพลาดของผลการด้านซั๊กที่อาจเกิดจากอายุของสัตว์ทดลองที่เพิ่มมากขึ้น (Loscher และ Nolting, 1991) การทดลองทั้งหมดดำเนินการระหว่างเวลา 8.00-18.00 น. และสัตว์ทดลองทุกตัวจะนำมาใช้ทดลองเพียงครั้งเดียว

สารเคมี

1. HPP ดำเนินการสังเคราะห์โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช และคณะ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. Adenosine-5'-triphosphate (ATP; Sigma, U.S.A.)
3. DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5; Sigma, U.S.A.)
4. γ -amino-n-butylic acid (GABA; Sigma, U.S.A.)
5. Aspartic acid (Sigma, U.S.A.)
6. (-)+Bicuculline methochloride (BMC; Sigma, U.S.A.)
7. Calcium chloride-2-hydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Riedel de Haen, Germany)
8. Cesium chloride (CsCl; Sigma, U.S.A.)
9. Chloral hydrate (Witayasom; Thailand)
10. D-glucose monohydrate (Riedel de Haen, Germany)
11. Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, U.S.A.)
12. Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl Ether)-N,N,N',N',-Tetraacetic Acid (EGTA; Sigma, U.S.A.)
13. Glutamic acid (Sigma, U.S.A.)
14. Glycine (Sigma, U.S.A.)
15. Homoserine (Sigma, U.S.A.)

16. Magnesium chloride-6-hydrate ($MgCl_2$; Riedel-de Haën, Germany)
17. Magnesium sulfate-6-hydrate ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$; Riedel de Haen, Germany)
18. 2-Mercaptoethanol (Merck, Germany)
19. Methanol, HPLC grade (Merck, Germany)
20. N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanosulfonic acid)(HEPES; Sigma, U.S.A.)
21. N-methyl-D-aspartate (NMDA; Sigma, U.S.A.)
22. O-phthaldialdehyde (Sigma, U.S.A.)
23. Polyethyleneglycol 400 (PEG400; Witayason, Thailand)
24. Potassium chloride (KCl; Riedel de Haen, Germany)
25. Protease type X (Thermolysin; Sigma, U.S.A.)
26. Protease type XIV (pronase; Sigma, U.S.A.)
27. Sodium chloride (NaCl; Riedel de Haen, Germany)
28. Strychnine sulfate (STR; Mactarlan Smith, U.K.)
29. Sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; Riedel de Haen, Germany)
30. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$; Riedel de Haen, Germany)
31. di-sodium hydrogen phosphate-2-hydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; Riedel de Haen, Germany)
32. Sodium hydroxide (NaOH; Riedel de Haen, Germany)
33. Tris-base (Sigma, U.S.A.)
34. Valproic acid (VPA; Sigma, U.S.A.)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องกระตุ้นสมองด้วยกระแสไฟฟ้า พร้อมขั้วไฟฟ้าสำหรับกระตุ้นที่กระจกตา (electrorshock apparatus with corneal electrodes)
2. เครื่องวัดการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลาย (rotorod apparatus)
3. Animal activity cage (UGO basile7430, Comerico, Italy)
4. Stereotaxic Instruments (NARISHIGE, Japan)
5. Automatic mixer (Vortex, U.S.A.)
6. Automatic micropipette (Pipet-Lite™, U.S.A.)

7. Automatic controlled temperature (Model-7305, Polyscience, U.S.A.)
8. pH meter (Suntex, Japan)
9. ชุดเครื่องมือสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้าในตัวรับ GABA_A และ NMDA ในเซลล์ประสาท โดยวิธี patch clamp ประกอบด้วย
 - Electronic stimulator (Model SEN 3201, Nihon Kohden, Japan)
 - Faraday cage
 - Inverted research microscope (Model IMT-2, Olympus, Japan)
 - Joystick manipulator (Model NM-151, Narishige, Japan)
 - Macintosh[®] Computer (Model LC 630, Apple computer, Inc., U.S.A.) with software programs; Chart[™] V3.4 for data recording system (MacLab[™], AD Instruments, Australia)
 - 0.22 μm membrane filter (Millipore, U.K.)
 - Oscilloscope (Model 420, Gould, U.K.)
 - Patch clamp amplifier (Model Axopatch 200 B. Axon Instruments, U.S.A.)
 - Thin wall borosilicate glass capillaries without filament (GC 1501-10, Clark Electromedical Instruments, U.K.)
 - Three dimensional hydraulic micromanipulator (Model MO-203, narishige, Japan)
 - Vacuum pump (Model A-3S, Tokyo Rikakikai, Japan)
 - Vibroslice (Model 752 M, campden Instruments,U.K.)
 - Vertical microelectrode puller (Model PP-83, Narishige, Japan)
10. ชุดเครื่องมือสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งสารสื่อประสาท amino acid ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาว โดยวิธี microdialysis ประกอบด้วย
 - Automatic infusion pump (CMA/100, Carnegie, Sweden)
 - System for freely moving animal (CMA/120, Carmegie, Sweden)
 - C1 Reverse-phase, 250x4.6 mm, particle size 5 μm , Spherisorb ODS2. (Attech^R, U.S.A.)
 - Guard column with packing material, particle sizes 5 μm , Spherisorb ODS2. (Phenominex^R, U.S.A.)
 - Column oven (Model 2155, LKB, Sweden)

- Fluorescence detector (Water 470, U.S.A.)
- Pump with gradient system (LC-10AD; Shimadzu, Japan)
- Analog to Digital Instruments (Maclab^{TM/4}, AD Instruments, Australia)
- Macintosh computer (Model LC 630, Apple computer, Inc., U.S.A.) with software programs (Maclab^{TM/4}, AD Instruments, Australia); ChartTM V3.2.8 for data recording system and PeakTM V1.3 for data processing system
- Laser printer (Laser writer select 360, Apple computer, Inc., U.S.A.)
- Microdialysis probe; Horizontal type, molecular weight cut off 50,000 (Homofilter PNF-140, Asahi Medical Co., Tokyo Japan)

วิธีดำเนินการทดลอง

การสังเคราะห์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของ HPP ให้ได้ปริมาณเพียงพอที่จะใช้ดำเนินการวิจัยตลอดโครงการ ดำเนินการโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช และ คณะ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้วิธีสังเคราะห์และวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ (ดูจาก IR spectrum, ¹H-NMR Spectrum และ ¹³C-NMR spectrum) ดังที่ได้รายงานไว้โดย ล้อมลิ้ม ในปี พศ. 2541 (Lomlim, 1998)

การเตรียมยาและการให้ยาในสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยใช้ Polyethylene glycol 400 (PEG 400) เป็นตัวทำละลายสารทดสอบ (VPA และ HPP) และใช้ 0.9% normal saline solution (NSS) เป็นตัวทำละลาย Chloral hydrate, PTZ และ pentobarbital sodium สารต่าง ๆ เหล่านี้จะให้โดยการฉีดเข้าในช่องท้องสัตว์ทดลองยกเว้น PTZ ซึ่งจะให้โดยการฉีดใต้ผิวหนัง ปริมาณสารต่าง ๆ ที่สัตว์ทดลองได้รับจะอยู่ที่ 0.1ml/25 g B.W. ในหนูถีบจักร และ 0.4-0.8 ml ในหนูขาว ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการฉีดสาร PEG 400 ในปริมาณต่าง ๆ เหล่านี้ทางช่องท้องจะไม่มีผลต่อระบบประสาทของสัตว์ทดลองที่ใช้แต่อย่างใด

การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็นหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

1. การศึกษาฤทธิ์และระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของ HPP โดยจะทดสอบฤทธิ์และระยะเวลาในการออกฤทธิ์ต้านชักในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักโดยการกระตุ้นสมองด้วยกระแสไฟฟ้า (maximal electroshock seizure, MES)

การศึกษาดังกล่าวใช้เครื่อง electroshock apparatus กระตุ้นสมองหนูถีบจักรผ่านทางกระจกตา ด้วย corneal electrodes ขนาดของการกระตุ้นที่ใช้ คือใช้ไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 50 รอบต่อวินาที ความแรง 55 มิลลิแอมแปร์ ด้วยระยะเวลาของการกระตุ้น 0.2 วินาที ผู้วิจัยจะฉีดสารทดสอบขนาดต่าง ๆ เข้าทางช่องท้องหนูถีบจักรก่อนการกระตุ้นเป็นเวลา 15 นาที, 30 นาที, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง เพื่อหาระยะเวลาที่สารทดสอบสามารถออกฤทธิ์ด้านชักได้ดีที่สุด (optimal pretreated time) และระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของสารทดสอบ (duration of action) นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดและฤทธิ์ด้านการชักของสารทดสอบ จากนั้นคำนวณหาค่า median effective dose (ED_{50}) ของสารทดสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น ค่า ED_{50} หมายถึงขนาดของสารทดสอบที่สามารถป้องกันการชักในหนูถีบจักรได้จำนวนครึ่งหนึ่ง โดยลักษณะการชักจะเป็นแบบเหยียดเกร็งของขาหลัง (generalized seizures with tonic hindlimb extension)

ในแต่ละ pretreated time (15 นาที, 30 นาที, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง) จะทำการทดลองโดยแบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

1.1 กลุ่มที่ได้รับ PEG 400 และ NSS ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นกลุ่มควบคุม ในแต่ละกลุ่มจะแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มเล็ก หนูแต่ละกลุ่มเล็กจะนำไปทดสอบฤทธิ์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น แต่ละกลุ่มเล็กนี้จะประกอบด้วยหนูถีบจักรไม่น้อยกว่า 8 ตัว

1.2 กลุ่มที่ได้รับ VPA หนูกลุ่มนี้จะแบ่งเป็น 5 กลุ่มเล็ก แต่ละกลุ่มเล็กผู้วิจัยจะทดสอบฤทธิ์ด้านการชักโดยฉีดสารทดสอบก่อนการกระตุ้นเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น แต่ละกลุ่มเล็กจะแบ่งเป็นกลุ่มย่อยอย่างน้อย 5 กลุ่มย่อยตามขนาดของ VPA ที่ใช้ แต่ละกลุ่มย่อยประกอบด้วยหนูถีบจักรอย่างน้อย 8 ตัว

1.3 กลุ่มที่ได้รับ HPP หนูกลุ่มนี้จะแบ่งเป็นกลุ่มย่อย โดยใช้จำนวนหนูถีบจักรในแต่ละกลุ่มย่อย เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 1.2 ข้างต้น

2. การศึกษาความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของ HPP ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ศึกษาผลของสารทดสอบต่อการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลายหนูถีบจักร ซึ่งถูกควบคุมโดยระบบประสาทส่วนกลางโดยนับจำนวนหนูถีบจักรที่ไม่สามารถทรงตัวอยู่บนแถบกลางของเครื่อง rotorod ได้ วิธีการทดสอบดังกล่าวคิดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Dunham และ Miya 1957.

แบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

2.1 กลุ่มควบคุม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับ NSS และกลุ่มที่ได้ PEG400 กลุ่มละ 8 ตัว ผู้วิจัยใช้ค่า pretreated time 30 นาที

2.2 กลุ่มที่ได้รับ VPA หนูกลุ่มนี้จะแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มย่อยประกอบด้วยหนู 8 ตัว หนูแต่ละกลุ่มย่อยจะได้รับ VPA ทางช่องท้องขนาดต่าง ๆ กัน โดยใช้ optimal pretreated time ของ VPA ที่ได้จากการทดลองตามข้อ 1

2.3 กลุ่มที่ได้รับ HPP หนูกลุ่มนี้จะแบ่งเป็น 5 กลุ่มย่อย และแต่ละกลุ่มย่อยประกอบด้วยหนู 8 ตัวเช่นกัน หนูแต่ละกลุ่มย่อยจะได้รับ HPP ขนาดต่าง ๆ กันทางช่องท้อง โดยใช้ค่า optimal pretreated time ของ HPP ที่ได้จากการทดลองตามข้อ 1

การศึกษาระยะเวลาในการเกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของ VPA และ HPP ทำการทดสอบโดยใช้เครื่อง rotorod เช่นกัน โดยศึกษาผลต่อการทำงานประสานกันของ กล้ามเนื้อลายภายหลังการให้สารทดสอบ 15 นาที, 30 นาที, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทางช่องท้องโดยใช้หนูถีบจักรที่ได้รับ NSS และ PEG 400 ทางช่องท้องเป็นกลุ่มควบคุม และเลือกให้สารทดสอบขนาดเท่ากับ 1 เท่า และ 2 เท่าของค่า ED_{50} ที่ optimal pretreated time มาทำการทดลอง แต่ละกลุ่มย่อยใช้หนูอย่างต่ำ 10 ตัว

3. ศึกษาผลของ SKF-525A ต่อฤทธิ์ต้านชักของ VPA และ HPP

SKF-525A เป็น P450 enzyme inhibitor ซึ่งอาจจะมีผลทำให้สารทดสอบถูกเปลี่ยนแปลงโดย Cytochrome P450 น้อยลง การศึกษานี้ทำโดยการให้สาร SKF-525A ทางปากหนูถีบจักรในขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัว (Hurh และคณะ, 2000; Shank และคณะ, 2000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนให้สารทดสอบ จากนั้น นำหนูถีบจักรไปทดสอบฤทธิ์ต้านการชักโดยวิธี MES นำผลที่ได้มาหาค่า ED_{50} เปรียบเทียบค่า ED_{50} ระหว่างหนูกลุ่มที่ได้จากการทดสอบในหัวข้อนี้กับ ED_{50} ในหนูกลุ่มที่ได้จากการทดสอบดังกล่าวข้างต้น การทดสอบฤทธิ์ต้านการชักของสารทดสอบดังกล่าวใช้ค่า optimal pretreated time โดยหนูถีบจักรที่ใช้ในการทดลองนี้จะแบ่งเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มละอย่างน้อย 10 ตัว โดยหนูถีบจักรกลุ่มควบคุมจะได้รับ PEG 400 โดยใช้ pretreated time 30 นาที หนูถีบจักรที่เหลืออีก 8 กลุ่ม จะได้รับสารทดสอบ VPA และ HPP ขนาดต่าง ๆ อย่างละ 4 ขนาด

4. การศึกษาผลของ HPP ต่อการหลังสารสื่อประสาท amino acid ในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาวที่เคลื่อนไหวโดยอิสระใช้วิธี microdialysis (Benveniste และ Huttemeir, 1990) โดยเปรียบเทียบกับผลของ VPA วัดปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ทั้งชนิดกระตุ้น และยับยั้ง โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) system

แบ่งหนูขาวออกเป็น 6 กลุ่มกลุ่มละ 5 ตัว แต่ละกลุ่มจะได้รับ Normal saline, PEG 400 ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม, VPA และ HPP ในขนาดที่ใกล้เคียงกับ ED_{50} และ สองเท่าของ ED_{50} ที่ได้จากการทดลองขึ้นต้น

การเตรียมสัตว์ทดลอง ทำให้สัตว์ทดลองหมดความรู้สึกโดยฉีด chloral hydrate 350 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง นำหนูที่สลบไปตรึงศีรษะในเครื่อง stereotaxic apparatus เปิดหนังศีรษะ จนถึงกะโหลก หาดำแหน่ง bregma บนผิวกะโหลกศีรษะ ซึ่งจะให้เป็นตัวบอกตำแหน่งต่าง ๆ ของสมอง เจาะกะโหลกบริเวณขมับหนูขวาให้เป็นรูทั้ง 2 ด้าน ให้ตรงกันที่ตำแหน่ง coordinate 2 มม. rostral ต่อจุด bregma และด้วยความลึก 1-1.5 มม. จากผิวสมอง ตำแหน่งนี้จะฝัง microdialysis probe ในแนวอน ซึ่ง probe นี้จะพาดผ่านเปลือกสมองใหญ่หนูขวา

การสอด microdialysis probe และการเก็บตัวอย่าง microdialysis probe ที่ใช้เป็นชนิด acrylic polymer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 มม. มีรูที่ผนังขนาดที่ยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 50,000 ผ่านได้ ก่อนนำมาใช้จะต้องเคลือบปิดรูผนัง microdialysis probe ด้วยกาว epoxy ทั้งหมด ยกเว้นบริเวณที่จะฝังอยู่ในเปลือกสมองใหญ่หนูขวาซึ่งมีความยาว 5 มม. เท่านั้น หลังจากการฝัง microdialysis probe ในเปลือกสมองใหญ่หนูขวา นำหนูไปพักฟื้นอย่างน้อย 1 วัน ในกรงซึ่งสัตว์ทดลองสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระ เมื่อเริ่มการทดลอง ผ่านสารละลาย artificial cerebrospinal fluid (aCSF) โดยใช้ microperfusion pump เข้าทางด้านหนึ่งของ microdialysis probe ด้วยอัตราการไหล 2 μ l/min ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างทุก 20 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นฉีดสารที่ต้องการทดสอบเข้าทางช่องท้องแล้วเก็บตัวอย่างต่ออีก 3 ชั่วโมง นำ dialysate ที่เก็บได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ชนิดต่าง ๆ ในสมองก่อนและหลังการให้สารทดสอบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การเก็บตัวอย่าง หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนในการเตรียมสัตว์ทดลองแล้ว ผู้วิจัยจะทิ้งสัตว์ทดลองเป็นเวลา 1 วัน โดยไม่มีการเก็บตัวอย่าง เพื่อให้สภาวะต่าง ๆ ของสัตว์ทดลองเข้าสู่สมดุล จากนั้นจึงเริ่มเก็บตัวอย่างทุก 20 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วฉีดสารทดสอบชนิดต่าง ๆ เข้าทางช่องท้อง เก็บตัวอย่างต่อไปอีกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ชนิดต่าง ๆ ที่สมองหลังออกมาก่อนและหลังการให้สารทดสอบ

ภายหลังการเก็บตัวอย่างแล้วผู้วิจัยจะตรวจสอบตำแหน่งของ microdialysis probe ว่าถูกต้องหรือไม่โดยการเปิดกะโหลกศีรษะแล้วตรวจสอบตำแหน่งของ microdialysis probe ว่าฝังอยู่ในเปลือกสมองใหญ่หรือไม่ด้วยตาเปล่า ตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์จะต้องเป็นตัวอย่างที่มีการวาง microdialysis probe ถูกตำแหน่งเท่านั้น

การศึกษาปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ในเปลือกสมองใหญ่หนูขวาโดยใช้ HPLC system นั้น สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาท amino acid จากตัวอย่างที่เก็บจากสมองใช้วิธี precolumn fluorescence derivatization with O-phthalaldehyde (OPA) (Lindroth และ Mopper, 1979) โดย mobile phases ใช้ gradient run ของสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.05 M

phosphate buffer pH 7.3 และ methanol (Chunngam, 1996) สารละลายเหล่านี้จะถูกระบาย degassed ด้วย Helium gradient run ของสารละลายที่ผ่านเข้าสู่ HPLC column ทำโดยการเพิ่มอัตราส่วนของ methanol ใน phosphate buffer ตั้งแต่ 20% ไปจนถึง 60% โดยเพิ่มในอัตรา 2% ต่อนาที จากนั้นก็จะลดอัตราส่วนของ methanol กลับลงมาจนเหลือ 20% ภายใน 5 นาที ผู้วิจัยใช้อัตราการไหลของ mobile phase ผ่าน HPLC column เท่ากับ 0.8-1 มิลลิลิตร/นาที

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสื่อประสาท amino acid จากเปลือกสมองใหญ่หนูขาว ผู้วิจัยวิเคราะห์หาอัตราส่วนของการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งสารสื่อประสาทก่อนและหลังการให้สารทดสอบโดยเปรียบเทียบกับ homoserine ที่ทราบปริมาณแน่นอน ซึ่งใช้เป็น internal standard สารละลายที่จะฉีดเข้าใน HPLC column ประกอบด้วยตัวอย่างที่เก็บได้จากสมองกับ homoserine ซึ่งทราบความเข้มข้นและสารละลาย OPA โดยมีอัตราส่วนของปริมาตรเป็น 1:1:5 โดยผสมกันเป็นเวลา 2 นาที ก่อนฉีดเข้าสู่ HPLC column ปริมาณสารสื่อประสาทวัดโดยเครื่อง fluorescence detector ซึ่งปรับให้มี emission wave length 418 nm. และ excitation wave length 330 nm. ผลที่ fluorescence detector วัดได้จะถูกเปลี่ยนเป็น digital data โดยใช้เครื่อง Maclab และบันทึกลงใน chart program V3.2.8 ของเครื่อง Macintosh computer ปริมาณสารสื่อประสาทจะหาได้โดยการวัดพื้นที่ใต้ curve ของ peak ของ amino acid ชนิดต่าง ๆ โดยใช้ peak program V1.3

ผู้วิจัยเลือกวิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ที่สำคัญ 4 ตัวคือ aspartic acid กับ glutamic acid ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น และ glycine กับ GABA ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง

5. การศึกษาฤทธิ์ของ HPP ต่อตัวรับชนิด $GABA_A$, glycine และ NMDA ในเซลล์ปริามิดที่บริเวณสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

การศึกษาเริ่มจากใช้หนูแรทอายุ 21-27 วัน ทำdecapitation อย่างรวดเร็วและแยกสมองออกจากกระโหลกและเยื่อหุ้มสมอง นำไปแช่ใน (physiologic saline solution) PSS ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปตัดเป็นแผ่นบางให้มีความหนา $400 \mu m$ แล้วนำไป incubated ที่อุณหภูมิ $25^{\circ}C$ พร้อมกับให้ O_2 เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปย่อยโปรตีนโดยใช้ protease และ thymolysis ที่อุณหภูมิ $31^{\circ}C$ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกเซลล์ปริามิดออกมาทำการศึกษาโดยวิธี trituration เส้นผ่าศูนย์กลางของปลายแท่งแก้วให้มีขนาดใหญ่ไปหาเล็ก เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการศึกษาแล้วนำไปวางไว้บน chamber ก่อนทำการทดลอง 30-40 นาที

ศึกษาผลของสาร HPP ต่อตัวรับชนิด $GABA_A$, glycine และ NMDA โดยใช้วิธี whole-cell patch clamp technique (Hamill และคณะ 1981) ที่บริเวณ soma ของตัวประสาทปริามิดวัดกระแสการไหลของประจุไฟฟ้าที่ตรงค่า potential ไว้ที่ $-20 mV$

Patch pipette จะใช้ borosilicate glass capillaries ชนิดที่ไม่มี filament อยู่ด้านในโดย pipette ที่ใช้จะมีความต้านทานอยู่ที่ 3-5 M Ω และมีขนาด 1.5 mm O.D. และ 1.17 mm I.D. บรรจุไว้ด้วย intrapipette solution ที่มีส่วนประกอบของ CsCl, MgCl₂, Mg₂ATP, EGTA, CaCl₂ และ HEPES pH เท่ากับ 7.2 แล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 μ m บันทึกค่าการไหลของกระแสไฟฟ้าจากผนัง cell โดยผ่าน Macintosh computer โปรแกรม Chart™ 3.4

การแสดงผลและสถิติ

- ค่าต่าง ๆ ที่เป็นตัวเลขจะแสดงค่าเป็น mean \pm standard error of the mean (S.E.M.)
- ในการหาค่า ED₅₀, TD₅₀, HD₅₀ และ LD₅₀ กราฟแต่ละเส้นจะใช้ผลการทดลองจากสัตว์ทดลอง 3-5 กลุ่ม กลุ่มละอย่างน้อย 8 ตัว มาคำนวณโดยวิธี ของ Litchfield และ Wilcoxon (1949)
- สำหรับการศึกษาค่าผลของสารทดสอบต่อปริมาณสารสื่อประสาท amino acid โดยวิธี microdialysis นั้น ผู้วิจัยใช้หนูขาวกลุ่มละอย่างน้อย 5 ตัว ทั้งนี้ เนื่องจากการทดลองโดยวิธี microdialysis นี้ ใช้เวลาในการทดลองแต่ละครั้งนาน วารสารทางประสาทวิทยาศาสตร์ส่วนมากยอมรับการทดลองโดยใช้สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มเพียง 5 ตัวได้ (Kongsombut et al., 2008)
- ในการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระหว่างกลุ่มสัตว์ทดลองหลาย ๆ กลุ่มจะใช้ analysis of variance (one way ANOVA) ร่วมกับ Duncan's multiple range test (P<0.05)
- สำหรับการวิเคราะห์ค่าการตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารต่อกระแสไหลของกระแสไฟฟ้าที่ตัวรับสารสื่อประสาทจะใช้ โปรแกรม Graphpad PRISM™ Version 3.0 โดยใช้สมการ

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / (1 + (EC_{50}/[x])^H)$$

โดยที่ ค่า I = กระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A, glycine และ NMDA

I_{min}, I_{max} = ค่าต่ำสุดและสูงสุดของกระแสไหลที่ตอบสนองต่อตัว GABA_A, glycine และ NMDA

EC₅₀ = กระแสไหลที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของ GABA, glycine และ NMDA ที่ 50 %จากกระแสไฟฟ้าสูงสุด

[x] = ค่าความเข้มข้นของ GABA, glycine และ NMDA

H = Hill coefficient

ผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์และระยะเวลาของการออกฤทธิ์ของ HPP

ผลการออกฤทธิ์ด้านชักของ HPP โดยเปรียบเทียบกับ VPA ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักโดยการกระตุ้นสมองด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านทางกระจกตา (Maximal electroshock seizure, MES) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากการให้สารทดสอบขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้อง พบว่า ค่า ED₅₀ ของ HPP จะต่ำสุดเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ 15 นาที หลังการให้สารทดสอบนี้ (optimal pretreated time) ในขณะที่ ED₅₀ ของ VPA จะต่ำสุดเมื่อทดสอบฤทธิ์ 30 นาทีหลังการให้ VPA เมื่อเปรียบเทียบ ED₅₀ ของ HPP และ VPA ที่ optimal pretreated time ของสารทดสอบทั้งสอง พบว่า ED₅₀ ของ HPP จะต่ำกว่าประมาณ 3 เท่า ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการซึมผ่าน blood brain barrier และความแรงในการออกฤทธิ์ด้านชักของ HPP ที่สูงกว่า VPA อย่างไรก็ดี เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารทดสอบที่ระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นพบว่า HPP มีระยะเวลาของการออกฤทธิ์ค่อนข้างสั้นกล่าวคือ ผู้วิจัยพบว่า ED₅₀ ของ HPP จะสูงขึ้นประมาณ 2 เท่าในระยะเวลา 2 ชั่วโมง หลังการให้ HPP เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง ค่า ED₅₀ ของ HPP จะสูงเกิน 300 มก/กก น้ำหนักตัว ในขณะที่ ED₅₀ ของ VPA จะคงที่ในระยะเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นก็จะค่อย ๆ เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 4 สำหรับกราฟแสดงการหาค่า ED₅₀ ของ HPP ที่ระยะเวลา 15, 30 นาที 1, 2 ชั่วโมง และ VPA ที่ระยะเวลา 15, 30 นาที 1, 2 และ 4 ชั่วโมง แสดงไว้ใน รูปที่ 5-13 และตารางที่ 3 ตามลำดับ สำหรับ หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ NSS และ PEG 400 ที่ผู้วิจัยใช้เป็นกลุ่มควบคุม ไม่สามารถต้านการชักโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าได้ ไม่ว่าจะใช้ pretreated time เท่าใดก็ตาม

การศึกษาความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของ HPP ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ผลการทดสอบความเป็นพิษของ HPP เมื่อเปรียบเทียบกับ VPA ต่อการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลายหนูถีบจักร ซึ่งถูกควบคุมโดยระบบประสาทส่วนกลาง โดยดูจากจำนวนร้อยละของหนูถีบจักรที่ไม่สามารถทรงตัวอยู่บนแกนกลางของเครื่อง rotorod ที่หมุนอยู่ได้ หนูถีบจักรแต่ละกลุ่มจะได้รับ HPP และ VPA ขนาด 1 และ 2 เท่าของ ED₅₀ ของตัวมันที่ optimal pretreated time ทางช่องท้อง ผู้วิจัยทดสอบความเป็นพิษที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า สารทดสอบทั้งสองมีพิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยความเป็นพิษนี้จะแปรตามขนาดของสารทดสอบที่ใช้ เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษระหว่าง HPP กับ VPA พบว่า ความเป็นพิษในหนูถีบจักรที่ได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 15 และ 30 นาที จะใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเมื่อผู้วิจัยทดสอบในหนูถีบจักรที่ได้รับสารทดสอบในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นพบว่า HPP ทั้ง 2 ขนาดจะมีความเป็นพิษน้อยลง จนในที่สุดความเป็นพิษจะหมดไปในระยะเวลา 2 ชั่วโมง หนูถีบจักรทุกตัวสามารถทรงตัวบนแกนกลางของเครื่อง rotorod ได้ ในขณะที่ความเป็นพิษของ

VPA จะสูงขึ้นจนในที่สุดหนูถีบจักรทุกตัวจะไม่สามารถทรงตัวบนแกนกลางของเครื่อง rotorod ได้ สำหรับหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ NSS และ PEG 400 ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นกลุ่มควบคุมทุกตัวสามารถทรงตัวอยู่บนแกนกลางของเครื่อง rotorod ได้ ไม่ว่าจะทดสอบโดยใช้ pretreated time เท่าไหร่ก็ตาม ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4

ผลของ SKF-525 A ต่อฤทธิ์ต้านชักของ HPP และ VPA

หนูถีบจักรที่ได้รับ SKF-525A ซึ่งเป็น cytochrome P450 enzyme inhibitor ขนาด 50 มก/ก น้ำหนักตัว ทางปาก 1 ชั่วโมง ก่อนให้สารทดสอบขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้อง หลังการให้สารทดสอบในระยะเวลาเท่ากับ optimal pretreated time ของสารนั้น ผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ต้านชัก พบว่า ED₅₀ ของ HPP และ VPA ในหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ SKF-525A ก่อนหน้านั้นมีค่าต่ำกว่าในหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบเพียงอย่างเดียว คือ ED₅₀ ของการต้านชักโดย MES ในหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ SKF-525A + HPP : หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ HPP เพียงอย่างเดียว = 35 : 81 มก/ก น้ำหนักตัว ส่วนค่า ED₅₀ ในหนูกลุ่มที่ได้รับ SKF-525A + VPA : หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ VPA เพียงอย่างเดียว = 61 : 221 มก/ก น้ำหนักตัว ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5 รูปที่ 14 และ 15

ผลของ VPA และ HPP ต่อการหลั่งของสารสื่อประสาทในสมองใหญ่ของหนูแรทที่เคลื่อนไหวได้โดยอิสระ

ผู้วิจัยศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณการหลั่งสารสื่อประสาท amino acid จาก เปลือกสมองใหญ่หนูขาวที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ ทางช่องท้อง โดยจะศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ทั้งชนิดกระตุ้น คือ aspartate และ glutamate และ ชนิดยับยั้ง คือ glycine และ GABA ในการศึกษาผลของสารทดสอบ HPP ต่อการหลั่งสารสื่อประสาท amino acid ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวโดยวิธี microdialysis โดยเปรียบเทียบกับ VPA และใช้หนูที่ได้รับ NSS และ PEG400 ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารทดสอบ เป็นกลุ่มควบคุม พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ NSS แล้ว การให้ PEG400 ทางช่องท้องหนูขาวจะไม่มีผลต่อระดับปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ทั้งชนิดกระตุ้น และชนิดยับยั้ง (รูป 16-23)

เมื่อเปรียบเทียบผลของสารทดสอบกับผลของ PEG 400 จะพบว่า VPA ทั้งในขนาด 220 และ 440 มก./ก. น้ำหนักตัว ไม่มีผลต่อระดับของ inhibitory neurotransmitter ทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 16-19) ส่วนผลต่อ excitatory neurotransmitter นั้น พบว่า VPA ทั้ง 2 ขนาดจะไม่มีผลต่อระดับของ aspartate แต่อย่างใด แต่ VPA ขนาด 440 มก./ก. น้ำหนักตัว จะออกฤทธิ์ลดระดับของ glutamate ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ VPA ขนาดที่ต่ำกว่า (220 มก./ก. น้ำหนักตัว) จะไม่แสดงผลเช่นนี้ (รูปที่ 20-23)

สารทดสอบ HPP ในขนาด 80 และ 160 มก/กก สามารถลดระดับการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทชนิด glutamate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 20 และ 21) โดยมีลักษณะแปรผันตามขนาดของสารทดสอบที่ให้ ในขณะที่ HPP ทั้ง 2 ขนาดไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสื่อประสาทอีก 3 ชนิด (รูปที่ 16-19 และ 22-23)

ผลของ HPP ต่อตัวรับสารสื่อประสาทชนิด GABA_A

เมื่อให้ความเข้มข้นของ GABA ในขนาด 0.3-1,000 μM จะเกิด inward current ในลักษณะแปรผันกับขนาดของสารที่ให้ ซึ่งค่า inward current สูงสุดจะหยุดอยู่ที่ความเข้มข้น 300 μM (รูปที่ 24) ผลของ EC₅₀ และ Hill coefficient of the log concentration – response relationship เท่ากับ 8.06+0.14 μM และ 1.63+0.04 μM ตามลำดับ (รูปที่ 25)

เมื่อให้ GABA พร้อมกับสาร Bicuculline methochloride (BMC) 20 μM ซึ่งเป็น competitive antagonist ของตัวรับชนิด GABA_A จะหยุดการตอบสนองต่อ GABA ได้อย่างสมบูรณ์ที่ 20 μM (รูปที่ 26) เช่นเดียวกับสาร Picrotoxin (PTX) ซึ่งเป็น non-competitive antagonist ของตัวรับชนิด GABA_A ที่ 200 μM (รูปที่ 27) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลในการยับยั้ง inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก GABA โดย Bicuculline และ Picrotoxin แสดงไว้ในรูปที่ 28 ในส่วนของ Diazepam (DZP) (รูปที่ 29) สาร DZP เองไม่สามารถทำให้เกิด inward current ต่อตัวรับชนิด GABA_A ได้ถึงแม้ว่าจะให้ปริมาณที่สูงถึง 1,000 μM ก็ตาม แต่เมื่อให้พร้อมกับ GABA 3 μM ก็สามารถเสริมฤทธิ์กันได้

สาร HPP ขนาด 0.1-300 μM เมื่อให้ร่วมกับ GABA 3 μM ไม่มีผลต่อการเพิ่ม inward current ที่บริเวณตัวรับชนิด GABA_A (รูปที่ 30)

ผลของ HPP ต่อตัวรับสารสื่อประสาทชนิด Glycine

เมื่อให้ Glycine ขนาด 1-3,000 μM จะเกิด inward current ในลักษณะแปรผันกับความเข้มข้น (รูปที่ 31) ค่า EC₅₀ และ Hill coefficient of the log concentration – response relationship เท่ากับ 30.24 + 0.25 μM 1.6 + 0.15 μM ตามลำดับ (รูปที่ 32) เมื่อให้ Strychnine sulfate (STR) ขนาด 1-20 μM ซึ่งเป็น competitive antagonist ของ Glycine ร่วมกับ Glycine 30 μM จะมีผลยับยั้ง inward current อย่างสมบูรณ์ที่ขนาด 20 μM (รูปที่ 33) แต่เมื่อให้ HPP ขนาด 0.1-300 μM ร่วมกับ Glycine 30 μM จะเห็นว่าสาร HPP ไม่มีผลต่อการตอบสนองของตัวรับ Glycine (รูปที่ 34) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลในการยับยั้ง inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก Glycine โดย STR และ HPP แสดงไว้ในรูป 35

ผลของ HPP ต่อตัวรับสารสื่อประสาทชนิด NMDA

เมื่อให้ความเข้มข้นของ NMDA ในขนาด 1-800 μM จะเกิด inward current ในลักษณะแปรผันกับขนาดของสารที่ให้ โดยมีค่า inward current สูงสุดอยู่ที่ NMDA ความเข้มข้น 500 μM (รูปที่ 36) ผลของ EC_{50} และ Hill coefficient of the log concentration –response relationship เท่ากับ $76.6 + 0.24 \mu\text{M}$ และ $0.91 + 0.05 \mu\text{M}$ ตามลำดับ (รูปที่ 37) เมื่อให้ NMDA พร้อมกับสาร DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5) 50 μM ซึ่งเป็น selective antagonist ของตัวรับชนิด NMDA จะหยุดการตอบสนองของ inward current ได้อย่างสมบูรณ์ที่ AP-5 ขนาด 200 μM (รูปที่ 38)

สาร HPP ขนาด 0.1-300 μM เมื่อให้ร่วมกับ NMDA 100 μM ไม่มีผลต่อการเพิ่ม inward current ที่บริเวณตัวรับชนิด NMDA (รูปที่ 39) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลต่อ inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA โดย AP-5 และ HPP แสดงไว้ในรูปที่ 40

Pretreated time	ED_{50} (มก./กก.น้ำหนักตัว)	
	HPP	VPA
15 นาที	81	247
30 นาที	97	221
1 ชั่วโมง	104	222
2 ชั่วโมง	159	223
4 ชั่วโมง	> 300	312

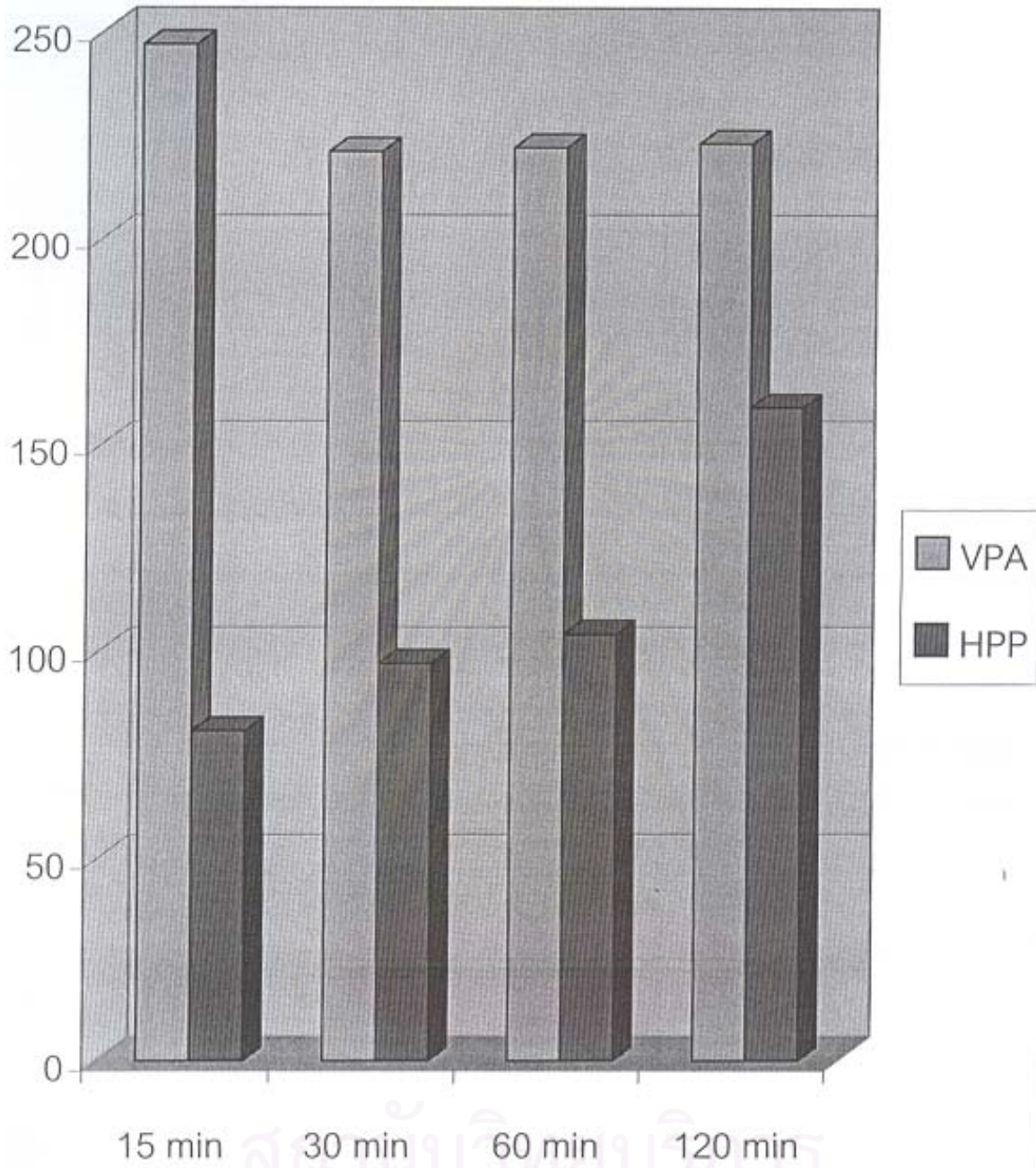
ตารางที่ 3 ED_{50} ของฤทธิ์ต้านการชักในหนูถีบจักรที่ได้รับ HPP และ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้อง ก่อนการทดสอบฤทธิ์โดยวิธี MES ในระยะเวลา 15 นาที, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ NSS และ PEG 400 ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมทุกตัวไม่สามารถต้านการชักได้

Pretreated times	% of falling mice			
	HPP		VPA	
	ED ₅₀	2 ED ₅₀	ED ₅₀	2 ED ₅₀
15 นาที	37.5	87.5	44.5	77.8
30 นาที	62.5	87.5	55.6	88.9
1 ชั่วโมง	12.5	75.0	66.7	88.9
2 ชั่วโมง	0	0	77.8	100.0
4 ชั่วโมง	0	0	100	100.0
8 ชั่วโมง	0	0	100	100.0

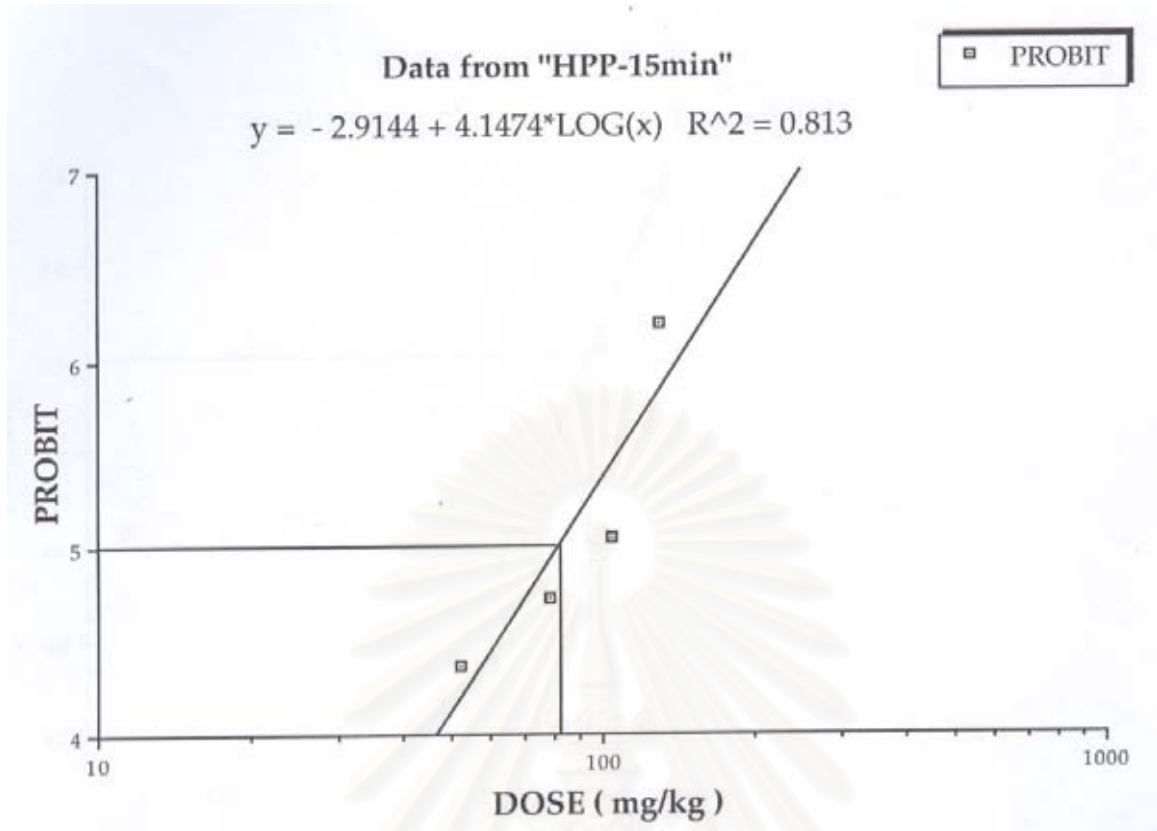
ตารางที่ 4 ร้อยละของหนูถีบจักรที่ได้รับ HPP และ VPA ขนาด 1 และ 2 เท่าของค่า ED₅₀ ที่ optimal pretreated time ทางช่องท้องที่ไม่สามารถทรงตัวบนแกนกลางของเครื่อง rotorod ที่หมุนอยู่ได้ หนูถีบจักรที่ได้รับ NSS และ PEG 400 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมทุกตัว สามารถทรงตัวบนแกนกลางของเครื่อง rotorod ที่กำลังเคลื่อนที่ได้ ไม่ว่าจะทดสอบโดยใช้ pretreated time เท่าไรก็ตาม

สารที่ให้	ED ₅₀ (มก./กก.น้ำหนักตัว)
SKF 525A + HPP	35
HPP	81
SKF 525A + VPA	61
VPA	221

ตารางที่ 5 ED₅₀ ของฤทธิ์ต้านชักจาก MES ในหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ SKF-525A ขนาด 50 มก/ก น้ำหนักตัว ทางปากร่วมกับสารทดสอบ HPP หรือ VPA ขนาดเท่ากับ ED₅₀ ที่ optimal pretreated time เปรียบเทียบกับ ED₅₀ ในหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ HPP หรือ VPA แต่เพียงอย่างเดียวที่ optimal pretreated time

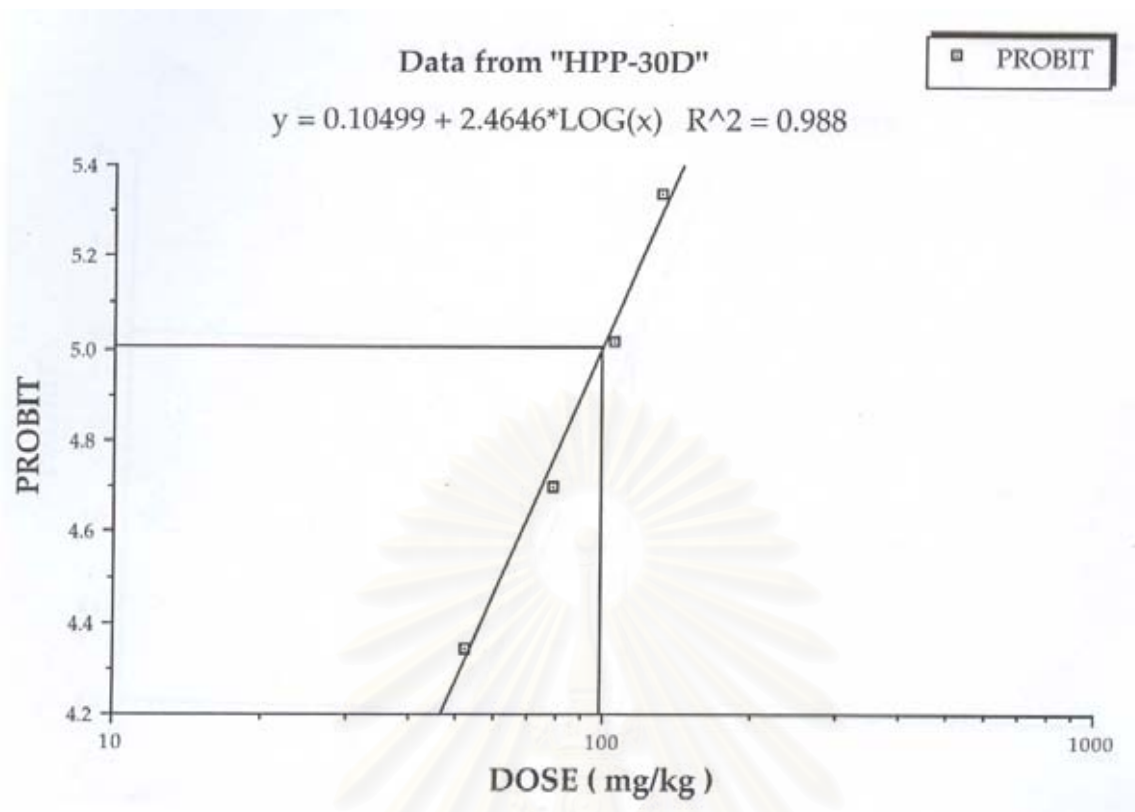


รูปที่ 4 กราฟแท่งแสดงค่า ED₅₀ ของ HPP และ VPA ในหนูถีบจักรที่ได้รับสารทดสอบทางช่องท้องเป็นเวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดการชักด้วยกระแสไฟฟ้า



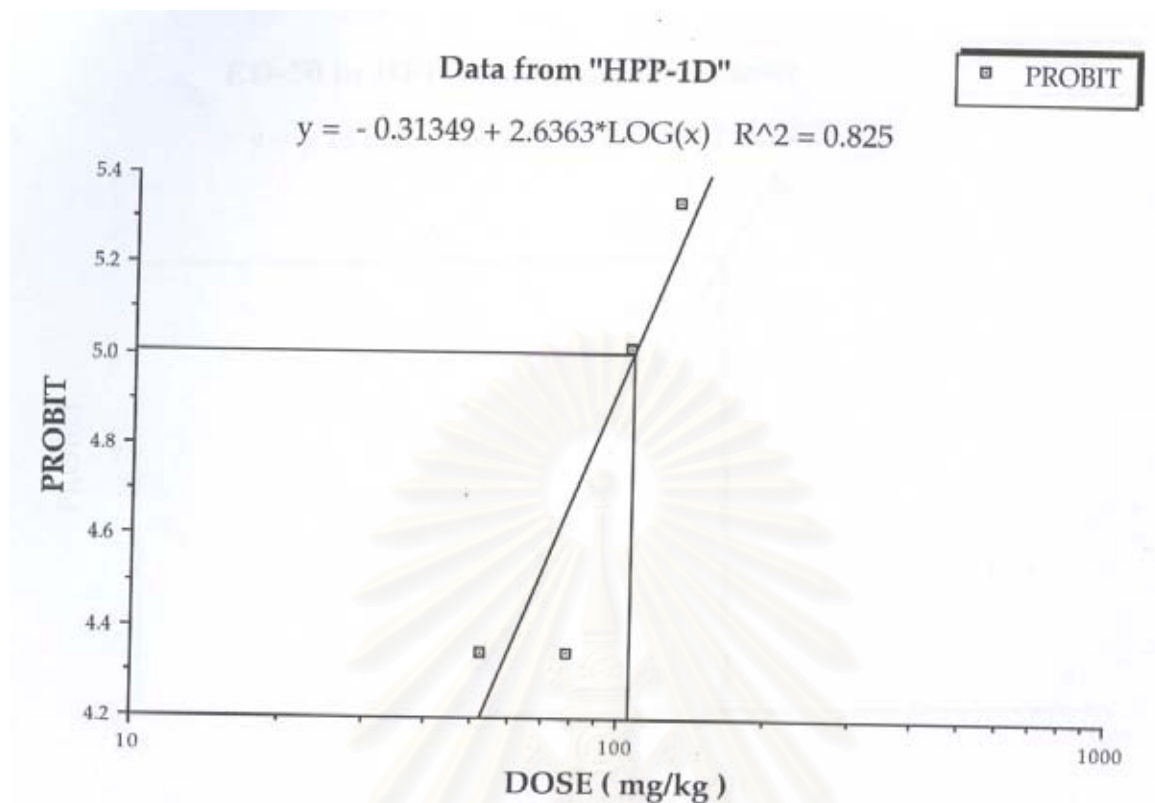
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP (แวนอน) กับการต้านชัก (แวนตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



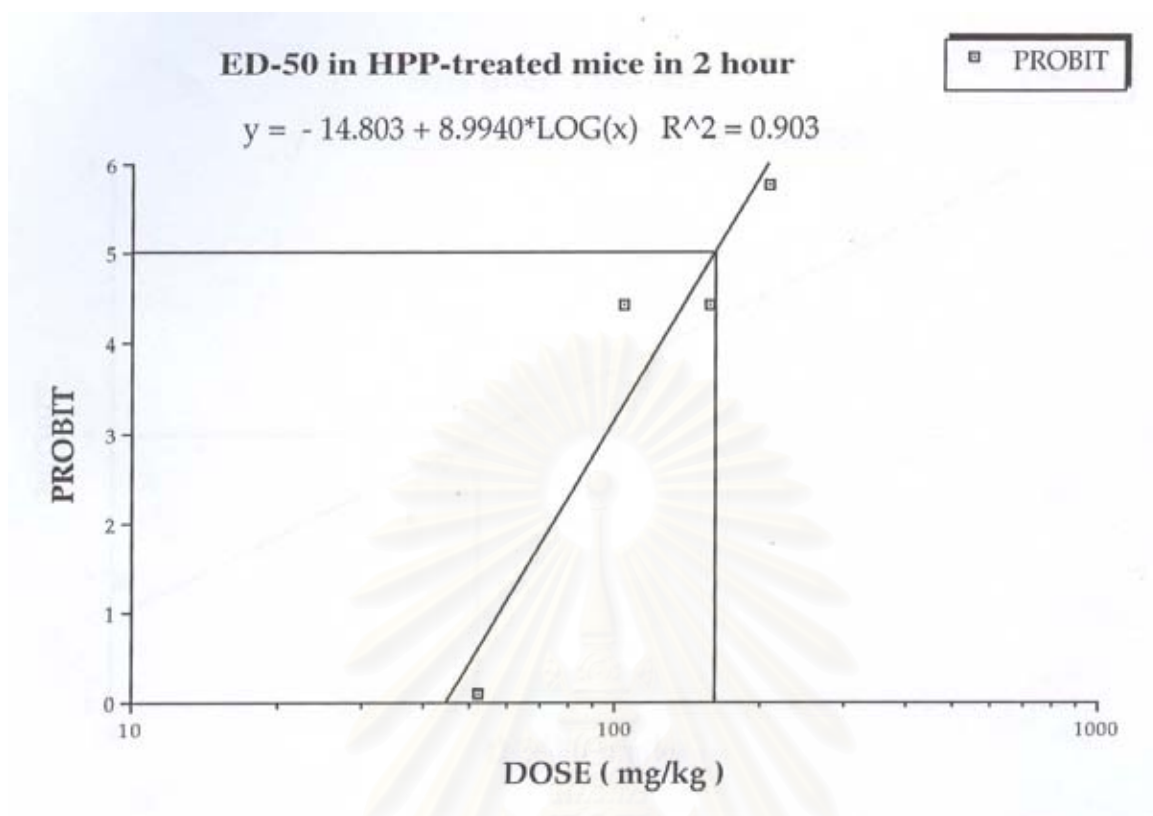
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP (แวนอน) กับการต้านชัก (แวนตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



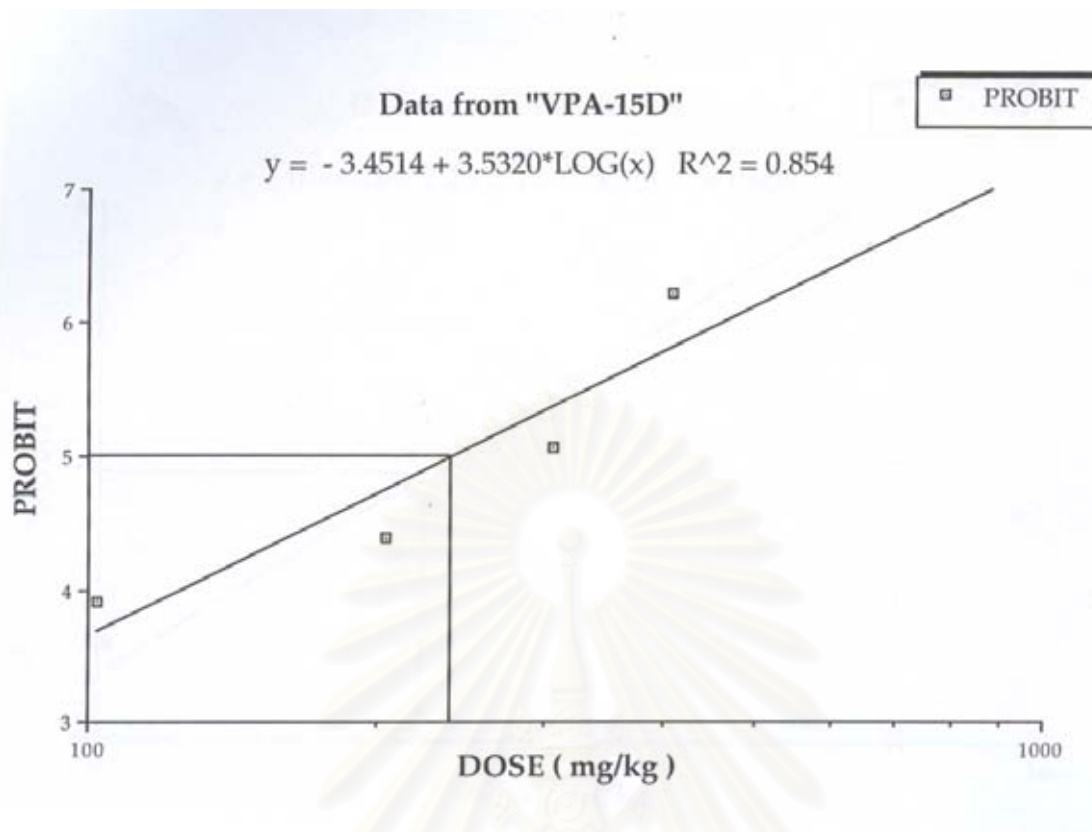
รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP (แวนนอน)กับการต้านชัก(แวนตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



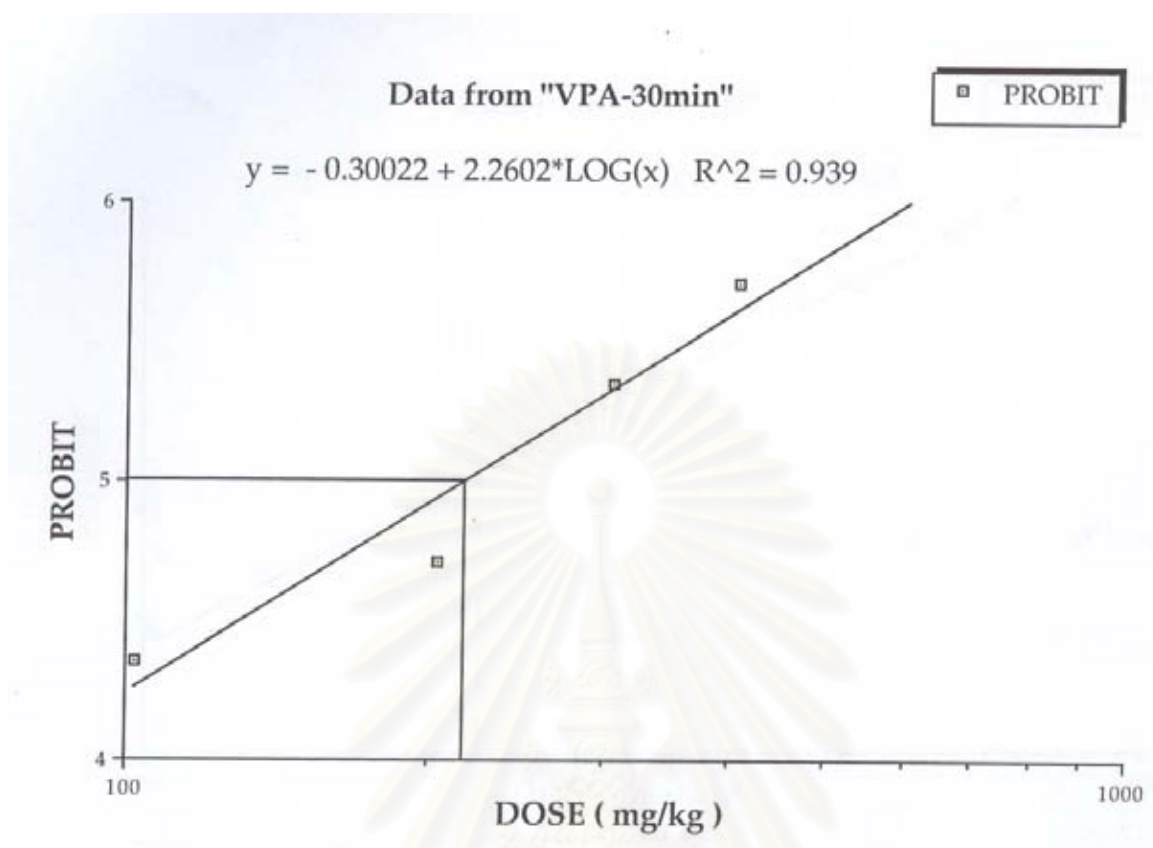
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP (แวนอน) กับการต้านชัก (แวนตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



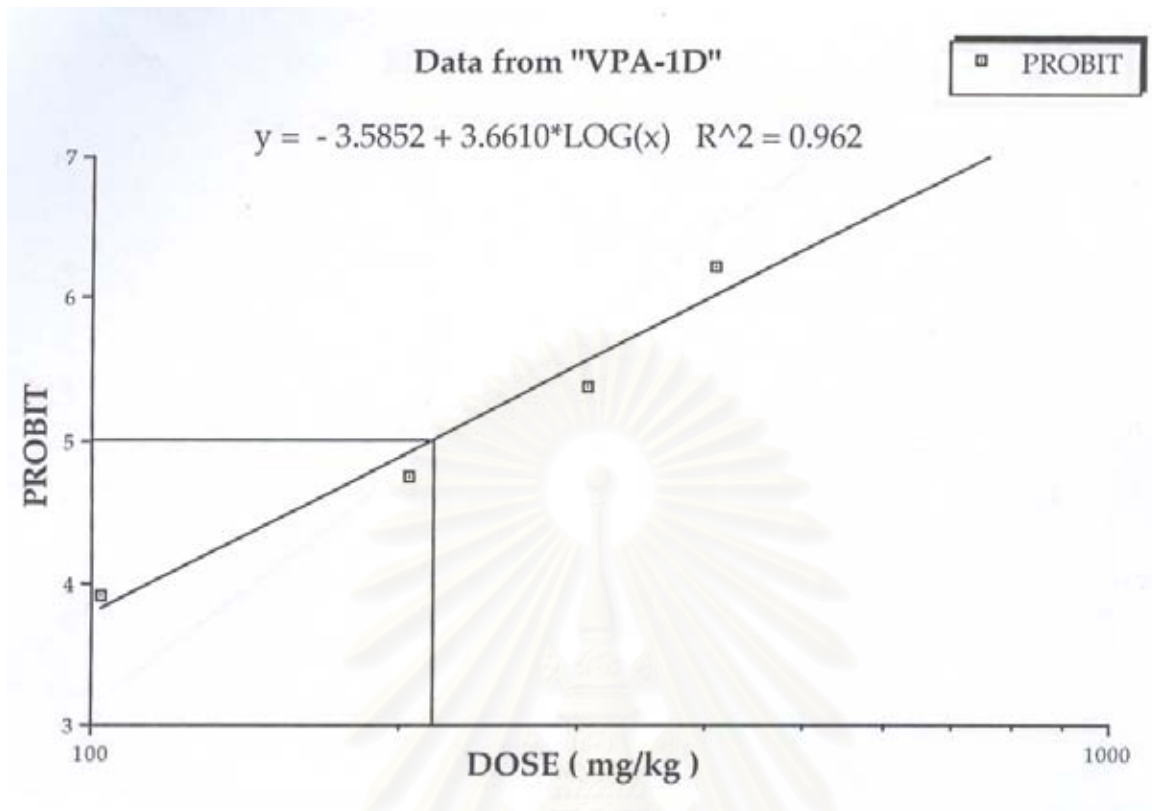
รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA (แวนอนน) กับการต้านชัก (แนวตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



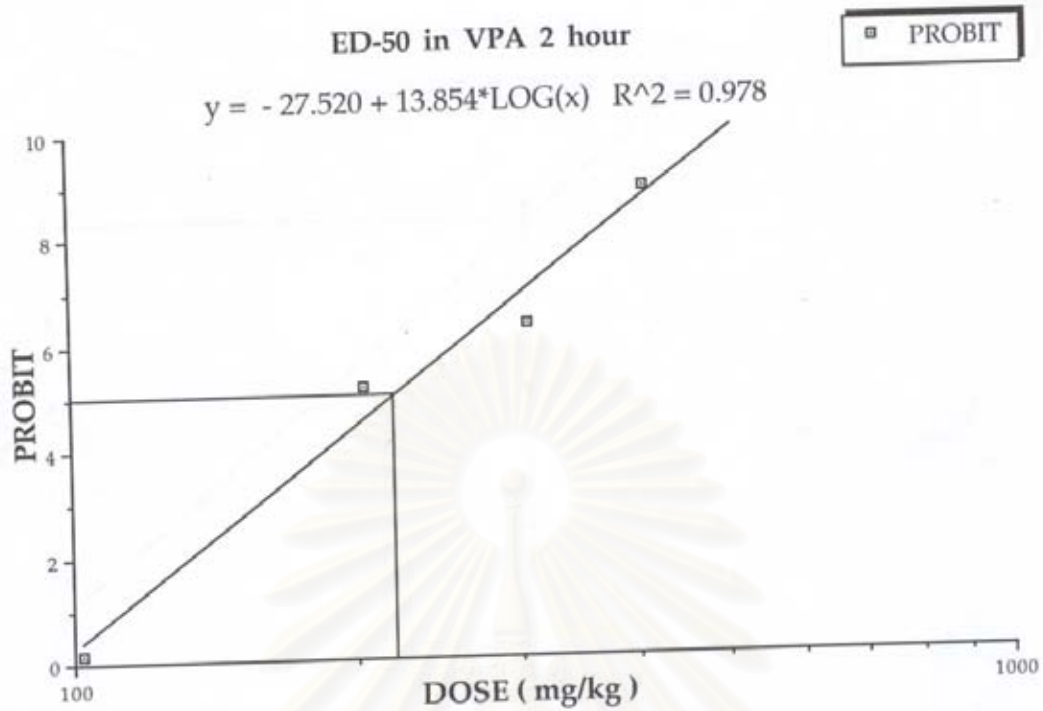
รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA (แวนอนน) กับการต้านชัก (แนวตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



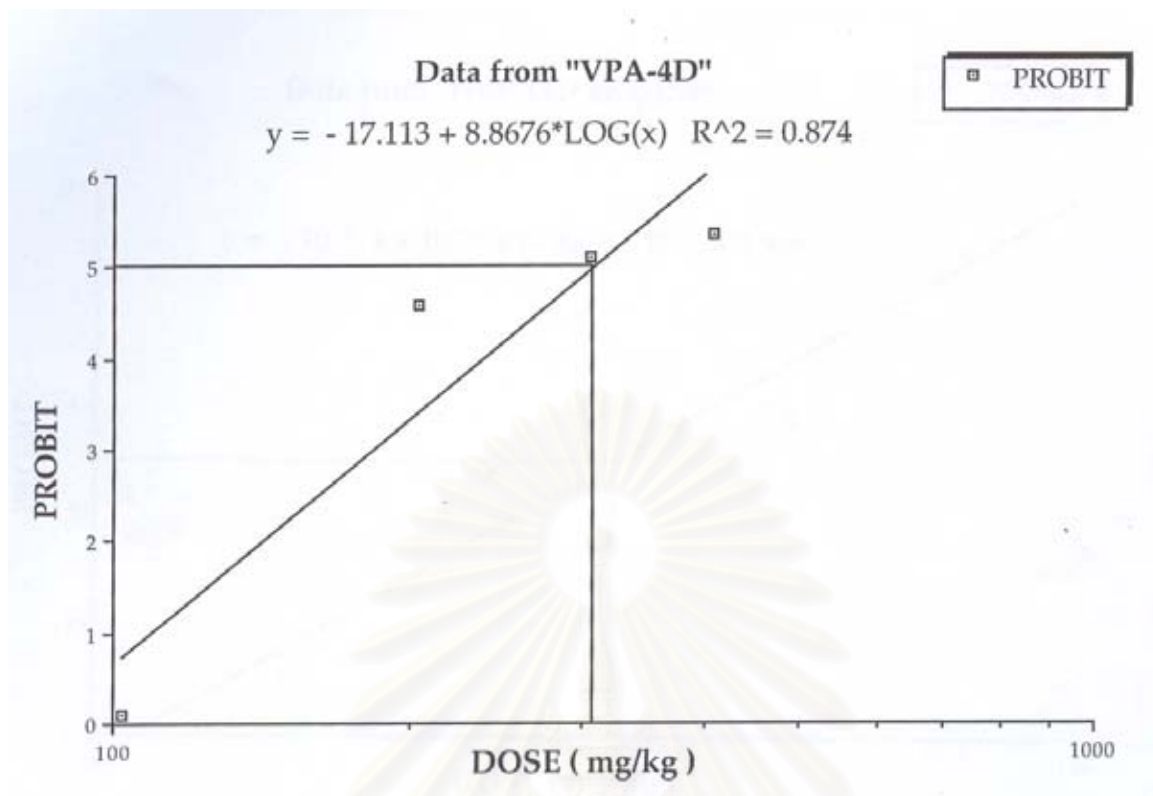
รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA (แนวนอน) กับการต้านชัก (แนวตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



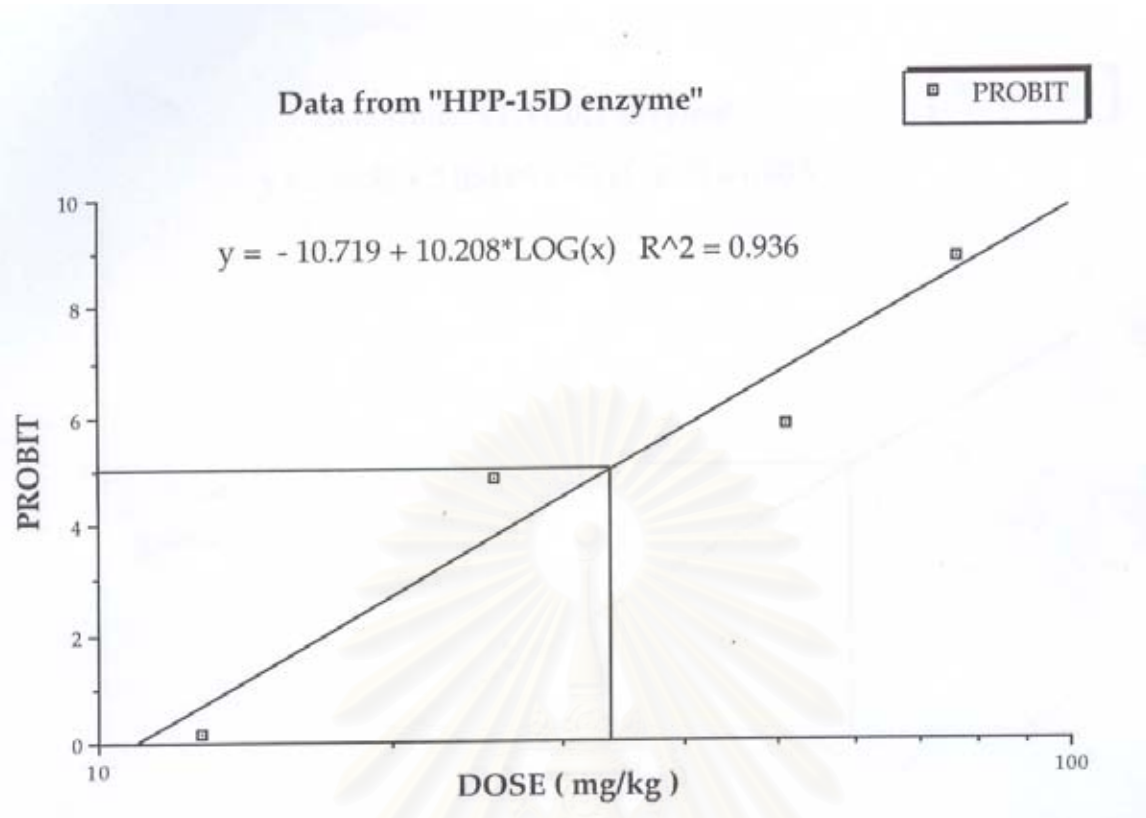
รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA (แวนอนน) กับการต้านชัก (แนวตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



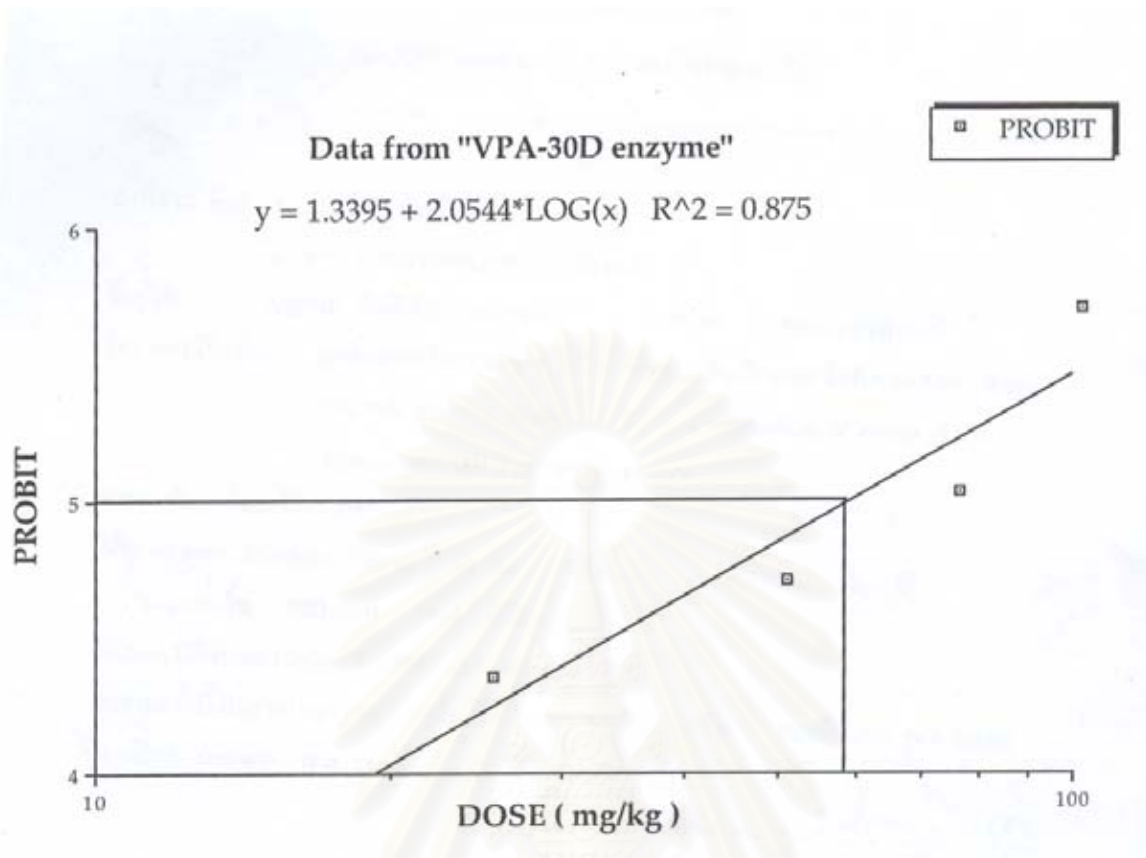
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA (แวนอนน) กับการต้านชัก (แนวตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



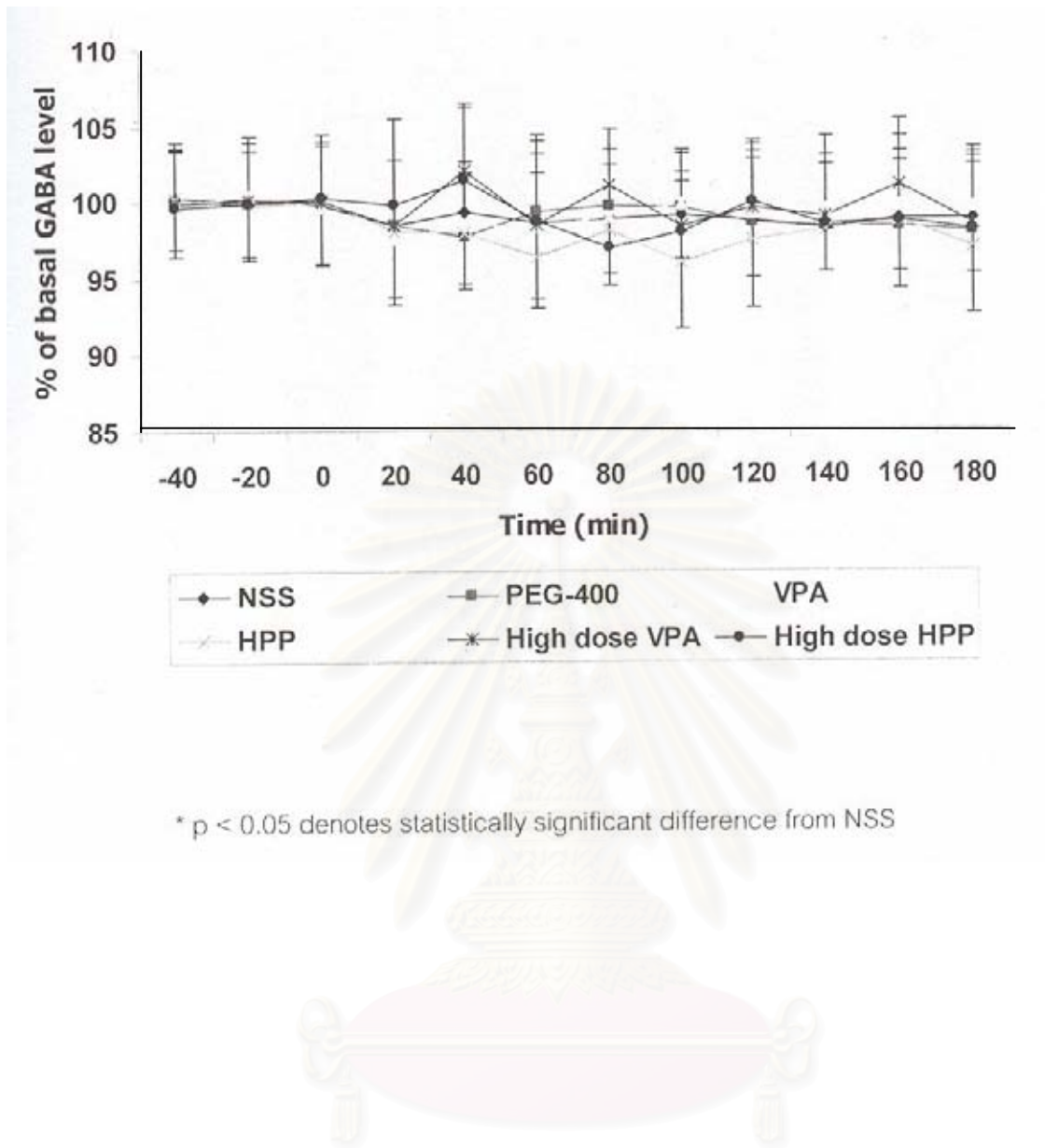
รูปที่ 14 ผลของ SKF-525A ขนาด 50 มก/กก น้ำหนักตัว เมื่อให้ทางปากก่อนให้ HPP 60 นาที ต่อความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ HPP (แวนอน) กับการต้านชัก (แวนตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ HPP ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



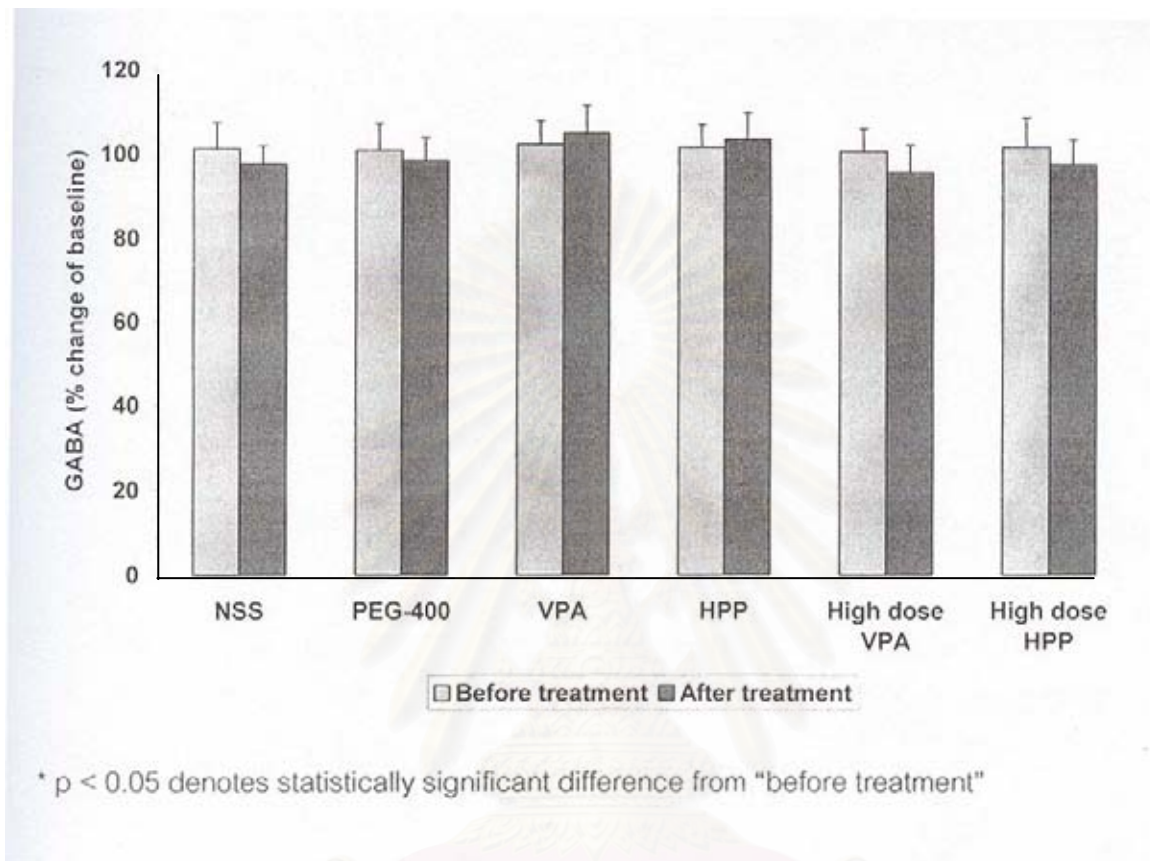
รูปที่ 15 ผลของ SKF-525A ขนาด 50 มก/กก น้ำหนักตัว เมื่อให้ทางปากก่อนให้ VPA 60 นาที ต่อความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของ VPA (แวนอน) กับการต้านชัก (แวนตั้ง) ในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักด้วยกระแสไฟฟ้าภายหลังการให้ VPA ขนาดต่าง ๆ ทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

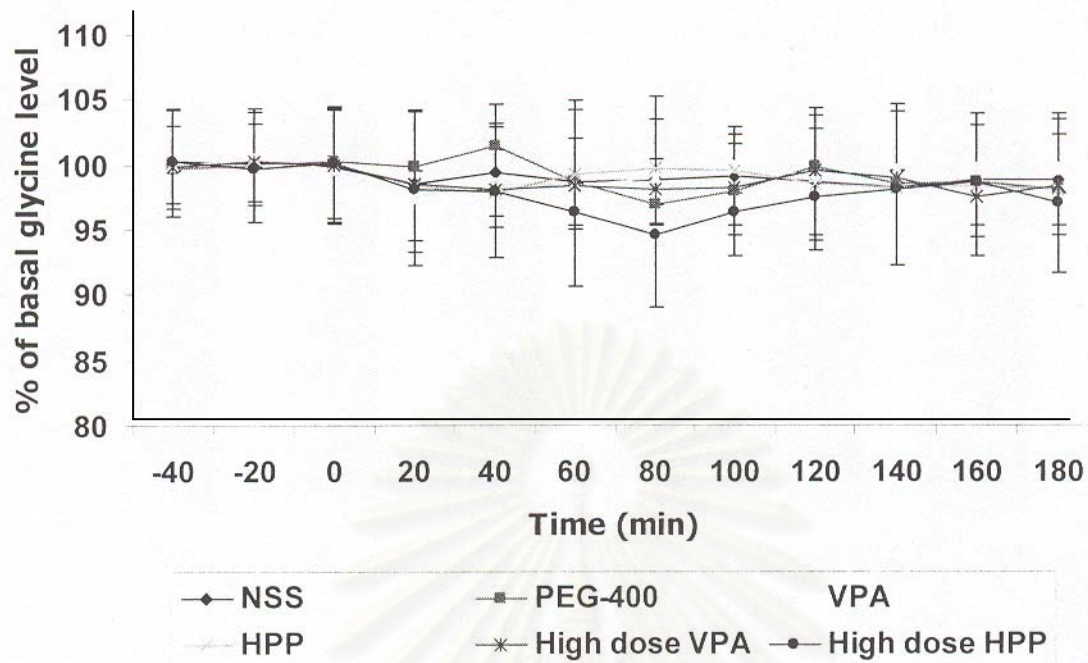


รูปที่ 16 ระดับของสารสื่อประสาท GABA ในเวลาต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง หนูขาว กลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กน้ำหนักตัว) และ HPP (80 และ 160 มก/กน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง โดยที่จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ตัว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



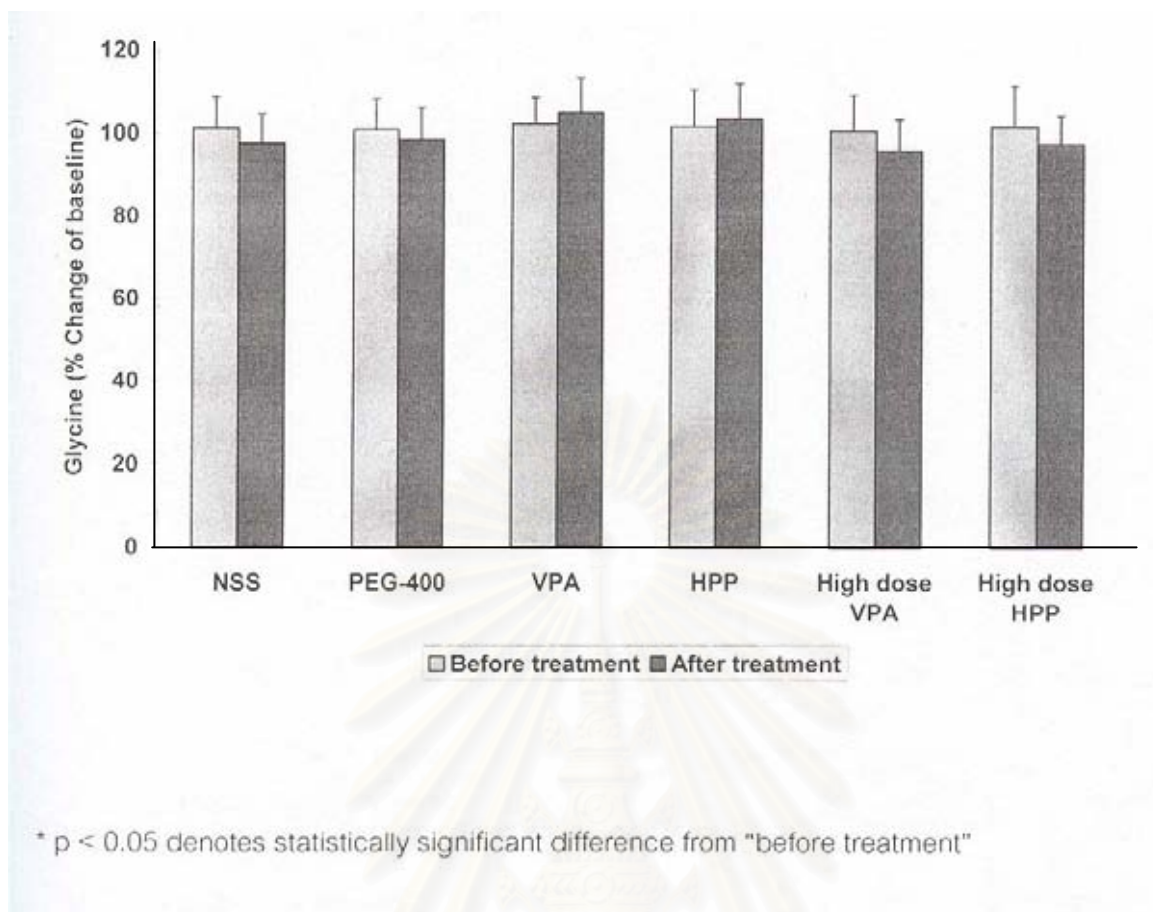
รูปที่ 17 กราฟแท่ง (mean \pm S.E.M.) แสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ GABA ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กน้ำหนักตัว) และ HPP (80 และ 160 มก/กน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง หลังการให้สารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (n=5 ในแต่ละกลุ่ม)



* $p < 0.05$ denotes statistically significant difference from NSS

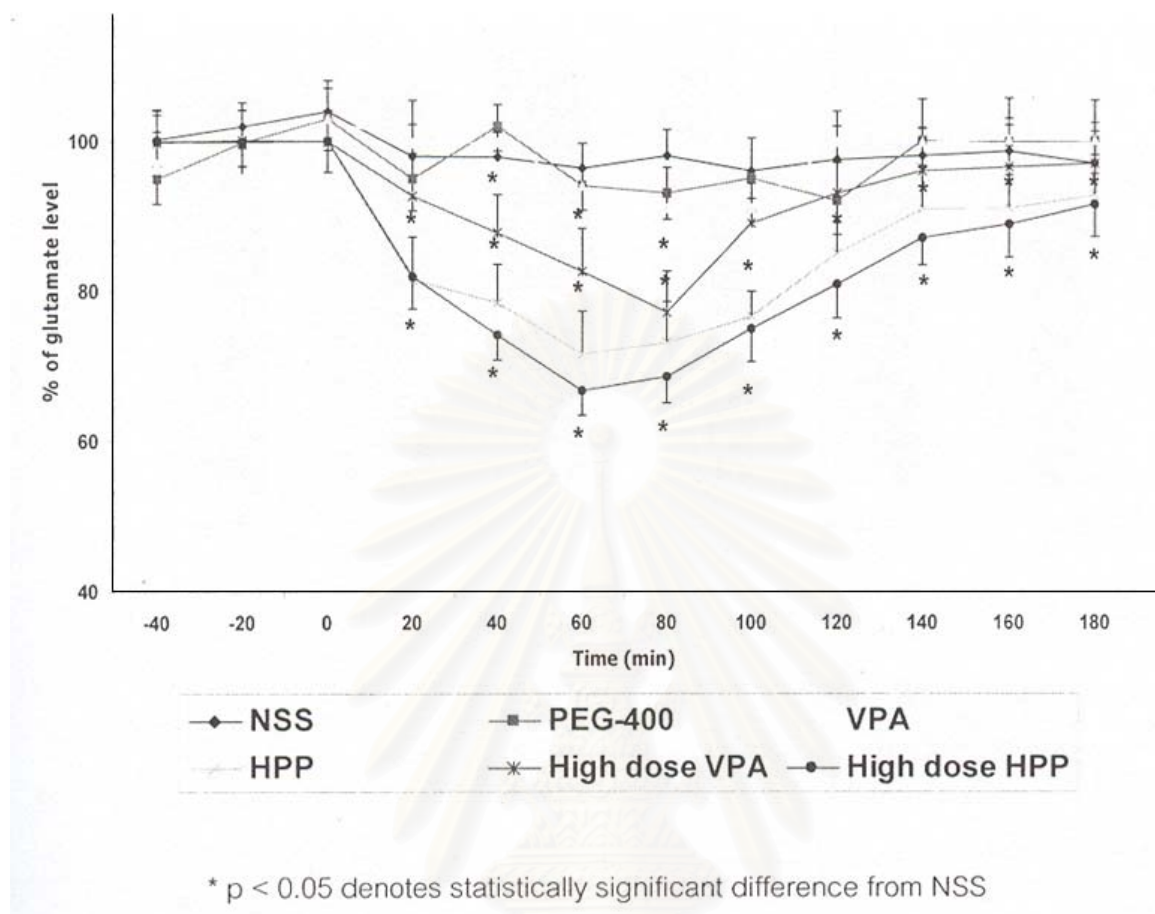
รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาท Glycine ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กน้ำหนักตัว) และ HPP (80 และ 160 มก/กน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง โดยที่จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ตัว

สถาบันนวัตยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



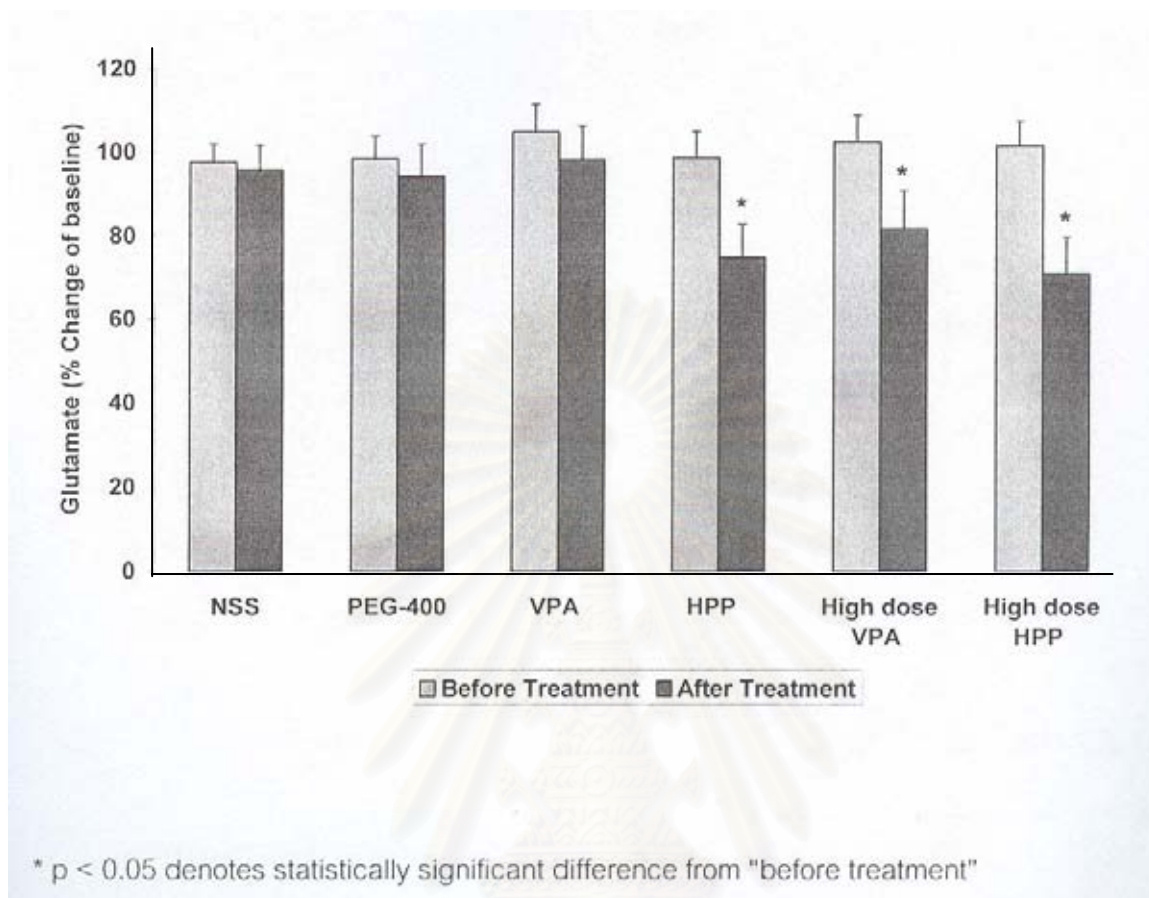
รูปที่ 19 กราฟแท่ง (mean \pm S.E.M.) แสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ Glycine ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กน้ำหนักตัว) และ HPP (80 และ 160 มก/กน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง หลังการให้สารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (n=5 ในแต่ละกลุ่ม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



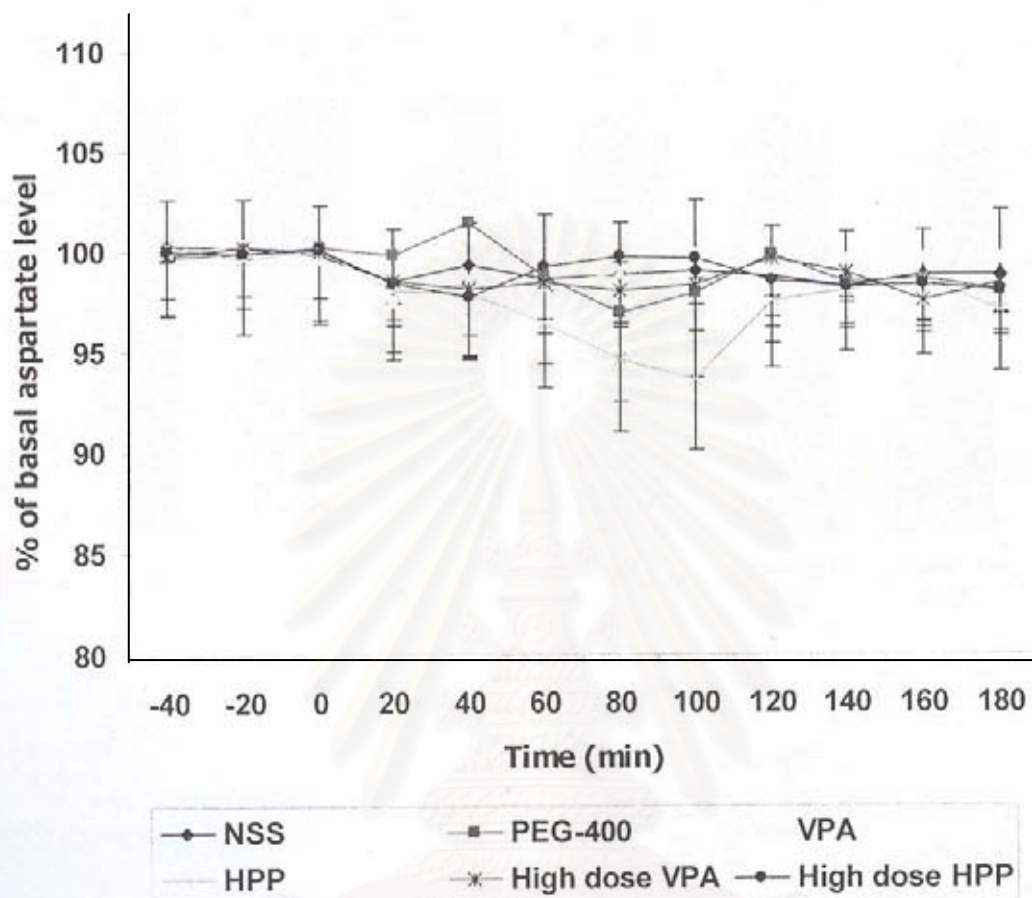
รูปที่ 20 ระดับของสารสื่อประสาท glutamate ในเวลาต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กน้ำหนักตัว) และ HPP (80 แล 160 มก/กน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง โดยที่จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ตัว

สถานวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



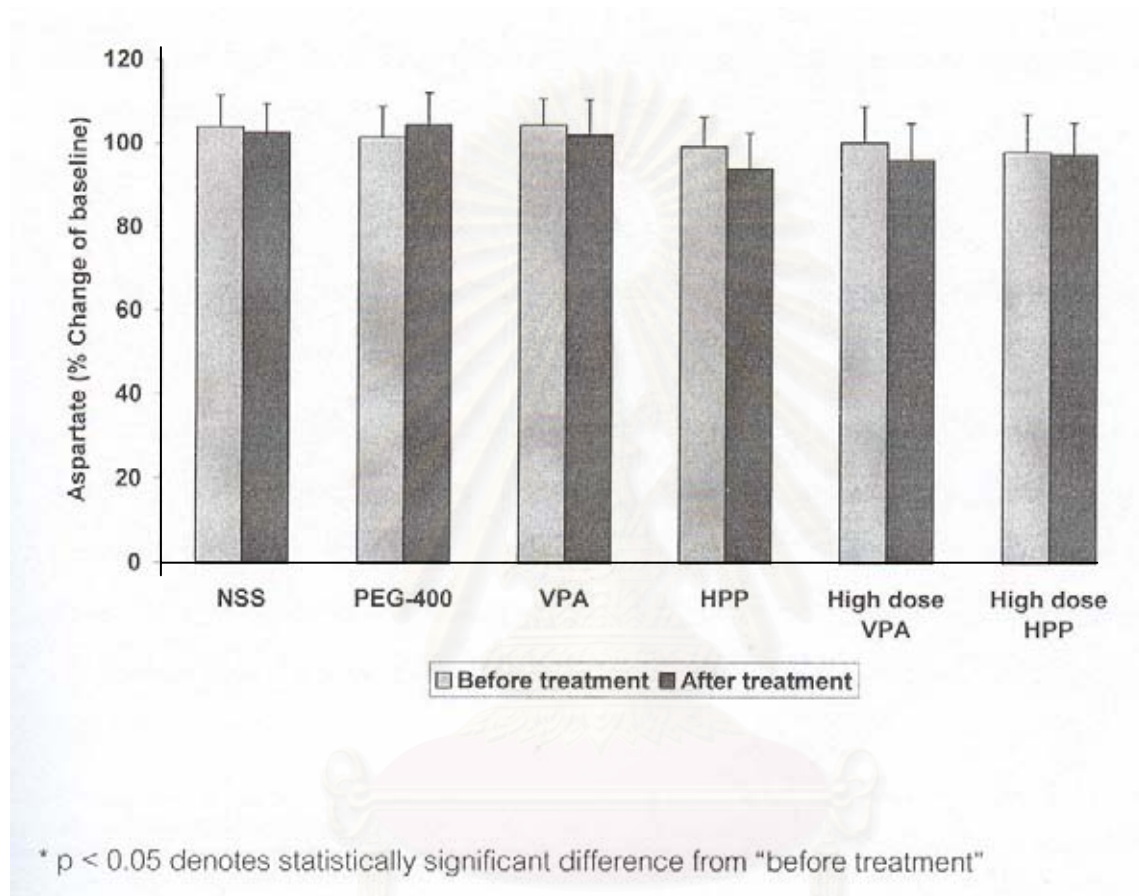
รูปที่ 21 กราฟแท่ง (mean \pm S.E.M.) แสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ Glutamate ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กน้ำหนักรัต) และ HPP (80 และ 160 มก/กน้ำหนักรัต) เข้าทางช่องท้อง หลังการให้สารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (n=5 ในแต่ละกลุ่ม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

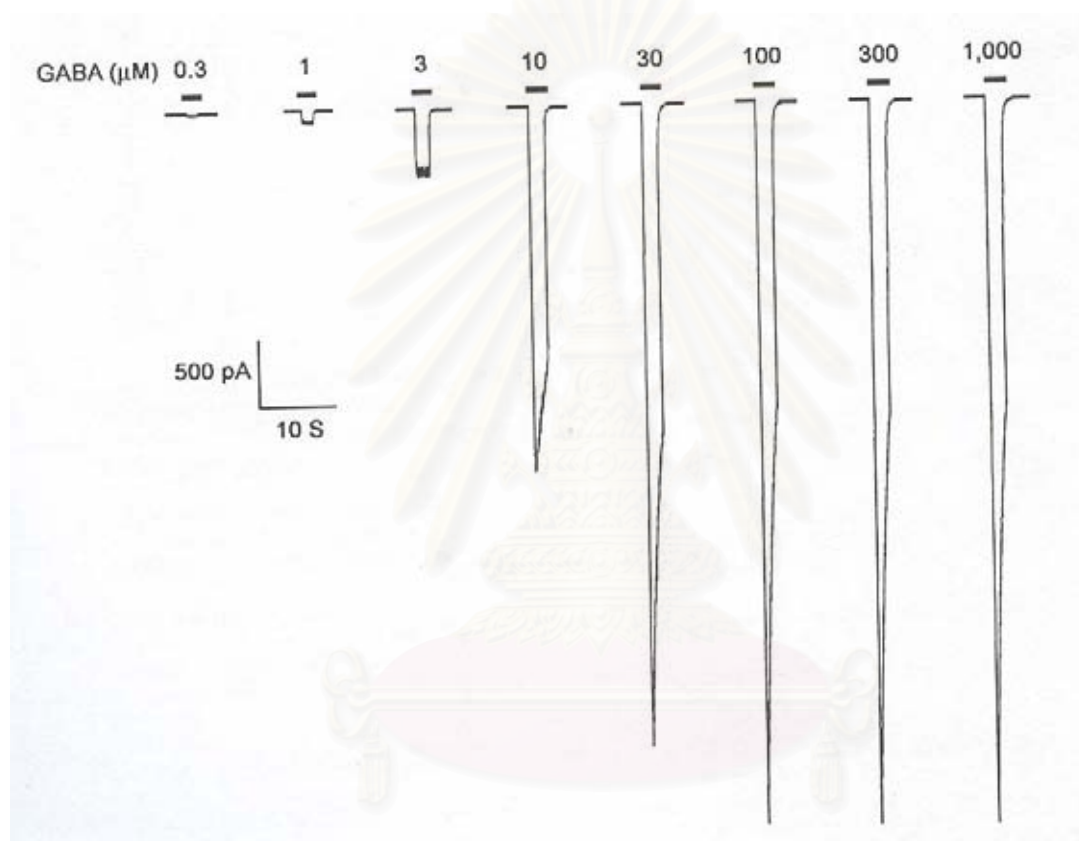


* $p < 0.05$ denotes statistically significant difference from NSS

รูปที่ 22 ระดับของสารสื่อประสาท Aspartate ในเวลาต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กน้ำหนักตัว) และ HPP (80 และ 160 มก/กน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง โดยที่จำนวนหนูในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ตัว

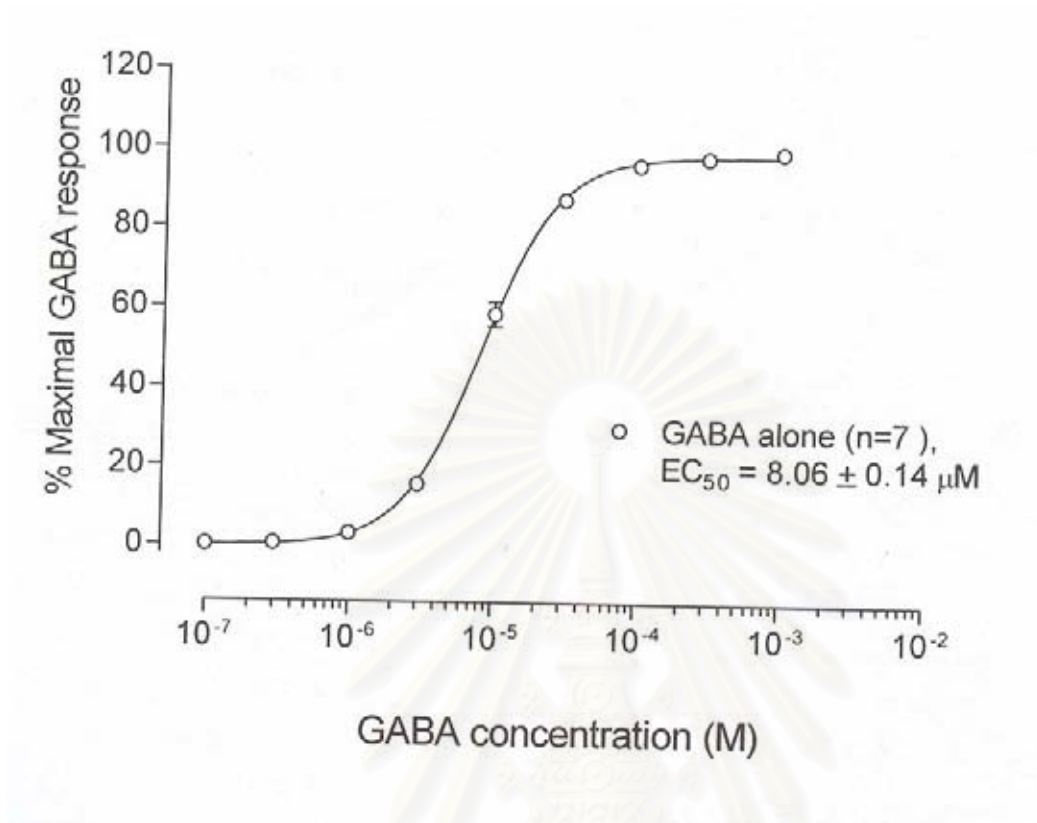


รูปที่ 23 กราฟแท่ง (mean \pm S.E.M.) แสดงการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของปริมาณ Aspartate ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวกลุ่มที่ได้รับ NSS, PEG400, VPA (220 และ 440 มก/กกน้ำหนักตัว) และ HPP (80 และ 160 มก/กกน้ำหนักตัว) เข้าทางช่องท้อง หลังการให้สารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (n=5 ในแต่ละกลุ่ม)



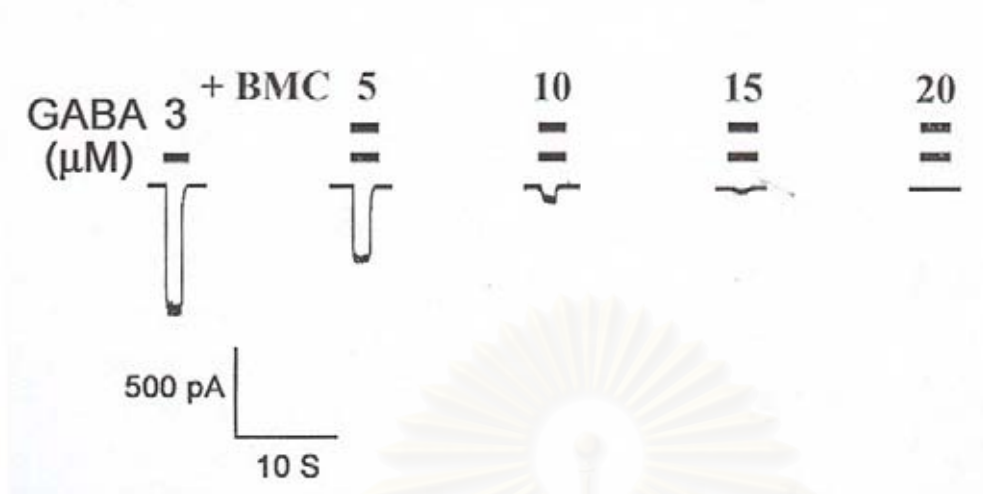
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24 Inward current ของเซลล์ประสาทบริเวณฮิปโปแคมปัสต่อการตอบสนองของ GABA ที่ความเข้มข้น 0.3-1,000 ไมโครโมล โดยที่ จะตรึงค่า potential ของเซลล์ประสาทไว้ที่ -20 มิลลิโวลต์



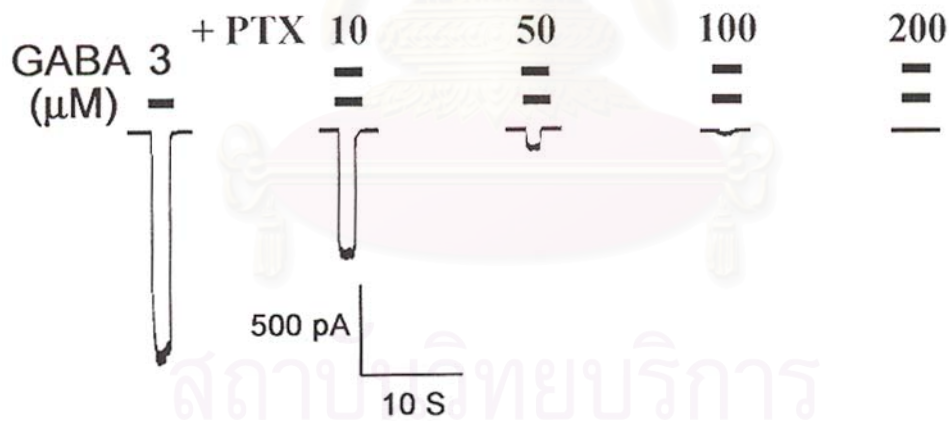
รูปที่ 25 GABA log concentration-response relationship ของเซลล์ประสาทที่ถูกแยกทันที ในบริเวณฮิปโปแคมปัส ทุกจุดแสดงค่าของการตอบสนองของ inward current เป็น mean \pm S.E.M. และแสดงอยู่ในลักษณะเปอร์เซ็นต์ของความเปลี่ยนแปลงต่อการตอบสนองสูงสุด

GABA + Bicucullin (BMC)

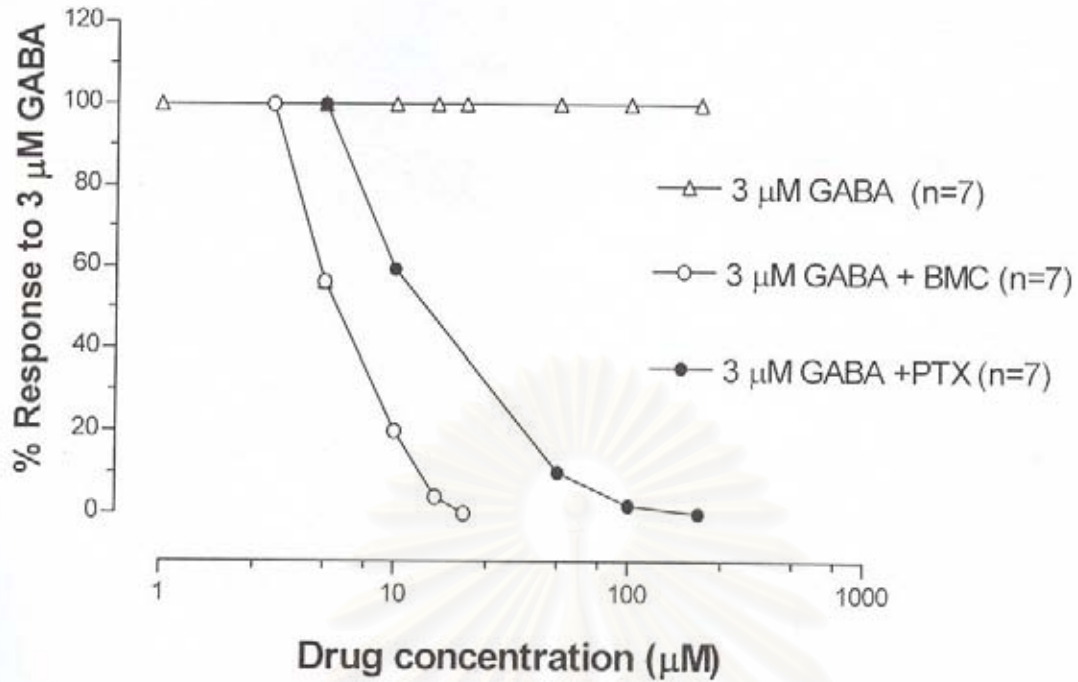


รูปที่ 26 แสดงผลการยับยั้ง inward current ของ BMC ต่อตัวรับ $GABA_A$ ที่ขนาด 5, 10, 15 และ 20 μM

GABA + Picotoxinin (PTX)

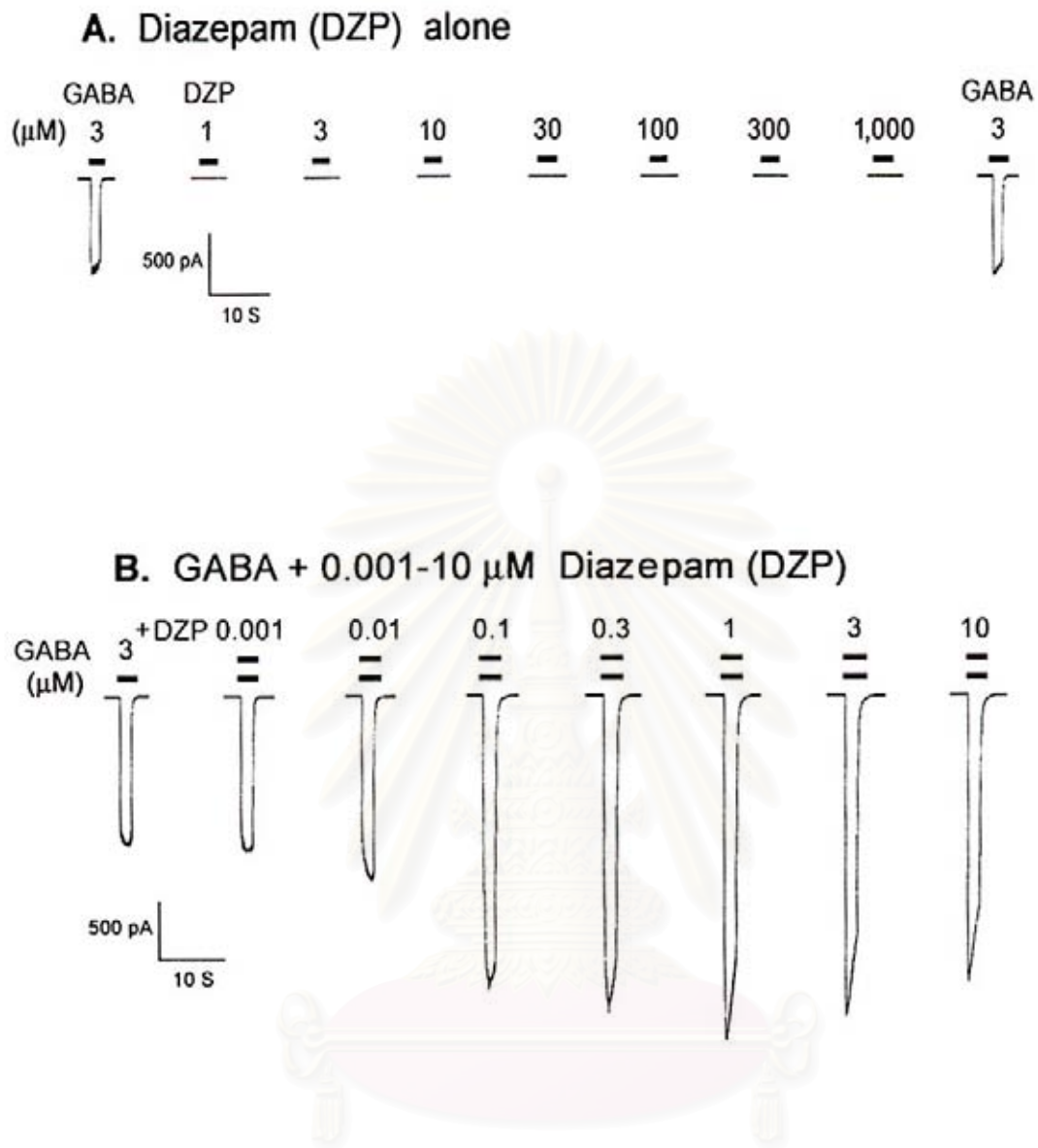


รูปที่ 27 แสดงผลการยับยั้ง inward current ของ PTX ต่อตัวรับ $GABA_A$ ที่ขนาด 10, 50, 100 และ 200 μM



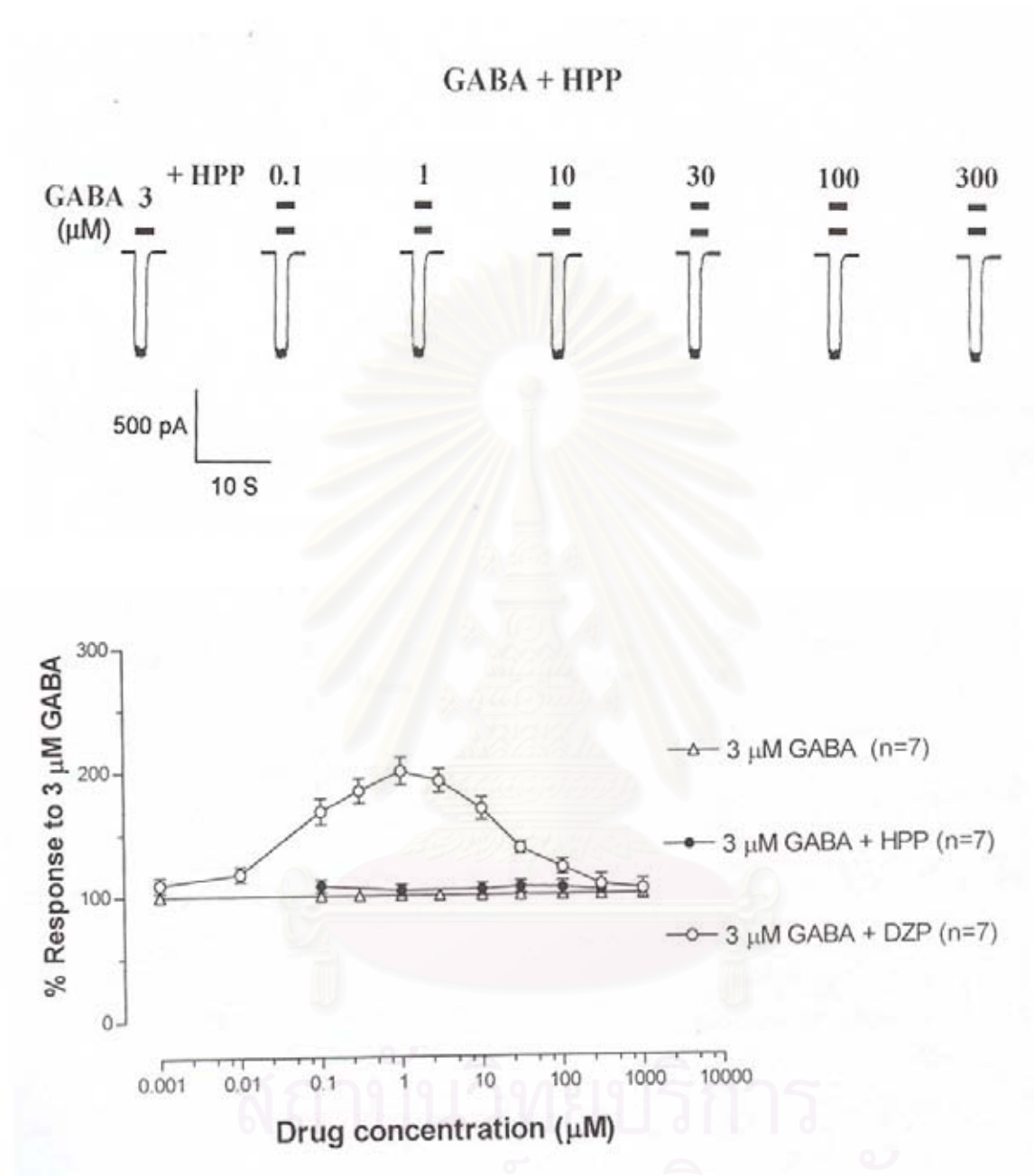
รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลในการยับยั้ง inward current ของเซลล์ประสาทต่อตัวรับ GABA_A ของ BMC และ PTX.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

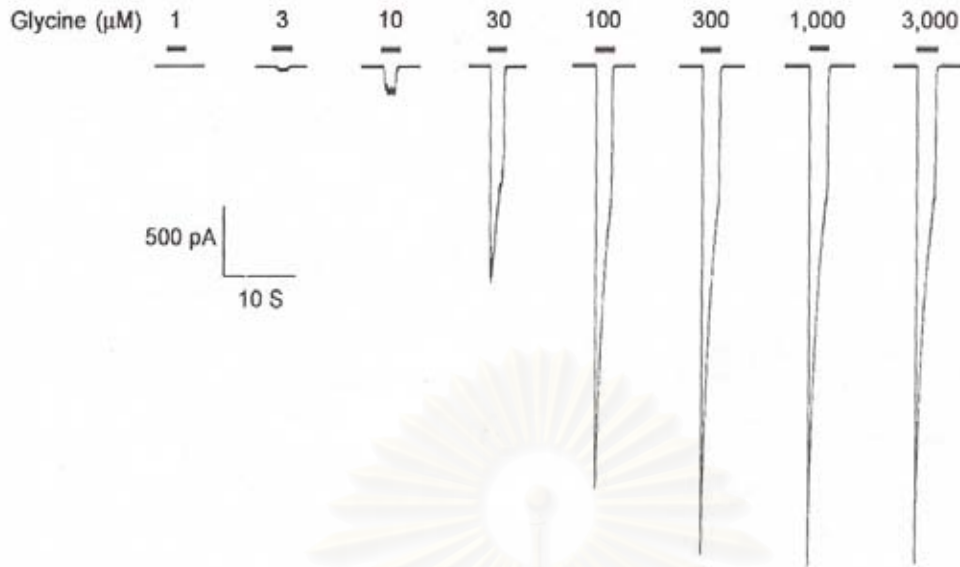


รูปที่ 29 แสดงผลของ DZP ต่อ inward current ของเซลล์ประสาทเมื่อไม่มี (A) และมี (B) GABA ที่ขนาดความเข้มข้น $3 \mu\text{M}$

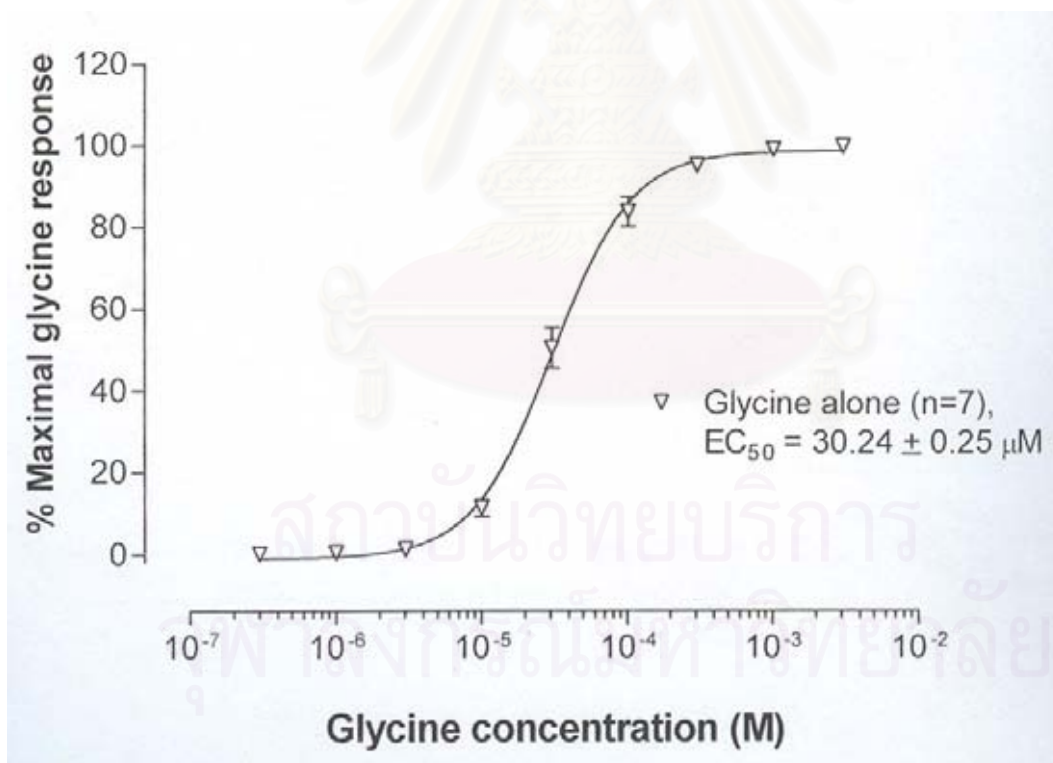
DZP ($1-1,000 \mu\text{M}$) ไม่มีผลต่อตัวรับ GABA_A เมื่อไม่มี GABA (A) แต่จะแสดงการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง DZP ($0.001-10 \mu\text{M}$) และ GABA ($3 \mu\text{M}$) ในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น ผลเสริมฤทธิ์ของ DZP มีค่าสูงสุดเมื่อให้ความเข้มข้นที่ $1 \mu\text{M}$ (B)



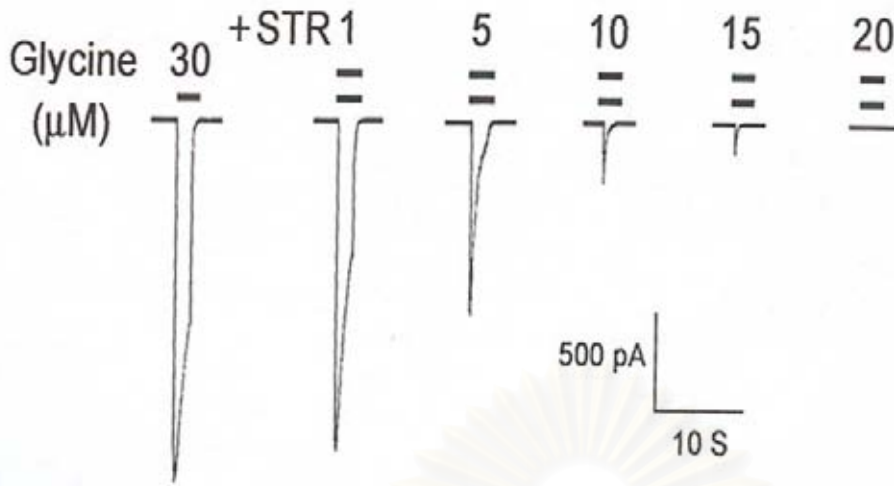
รูปที่ 30 แสดงผลของ HPP ต่อ inward current ของเซลล์ประสาทเมื่อให้ร่วมกับ GABA ที่ขนาดความเข้มข้น 3 μ M (A) และเมื่อเปรียบเทียบกับ DTZ (B)



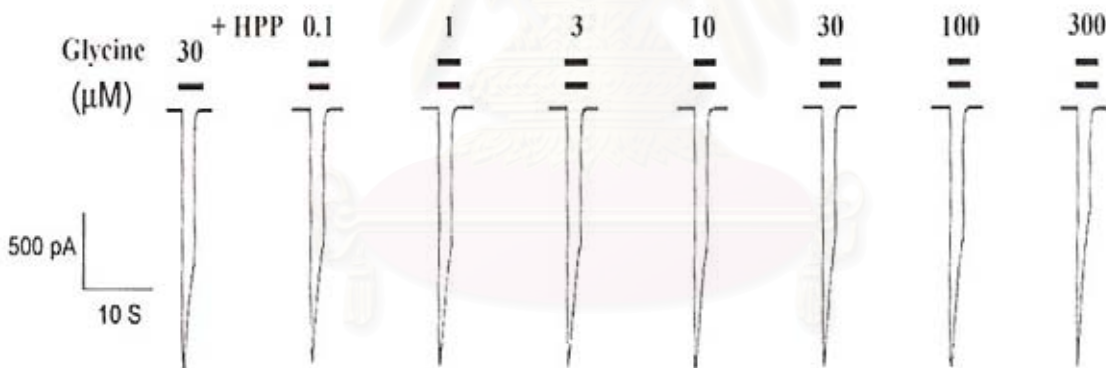
รูปที่ 31 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก Glycine ที่ขนาดความเข้มข้น 1-3,000 ไมโครโมล โดยที่จจะตรึงค่า potential ของเซลล์ประสาทไว้ที่ -20 มิลลิโวลต์



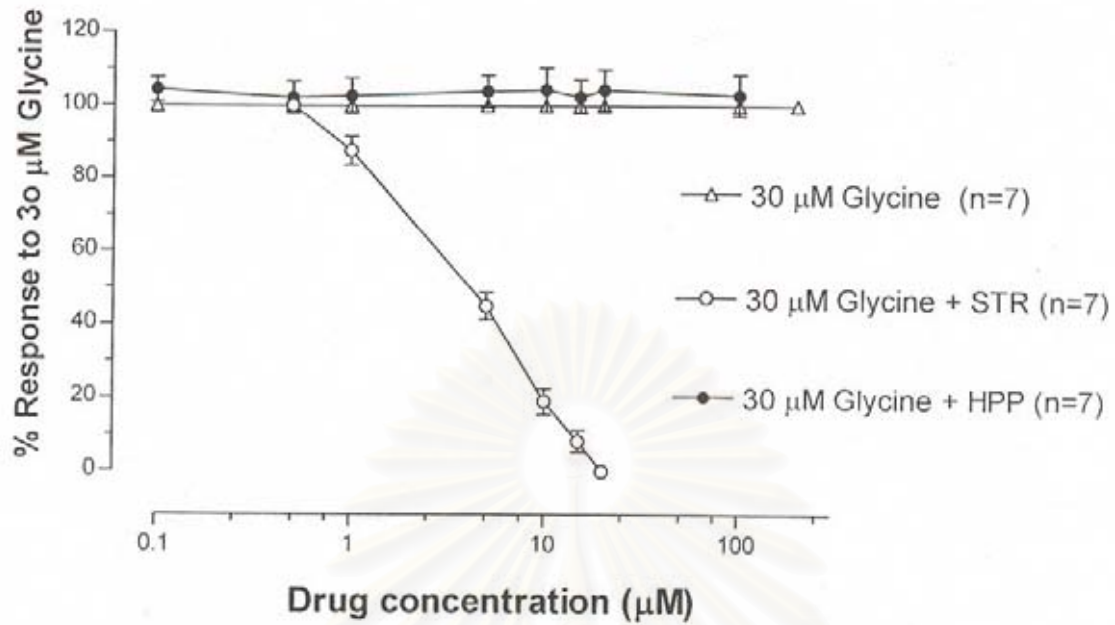
รูปที่ 32 Glycine log concentration-response relationship ของเซลล์ประสาทที่ถูกแยกทันทีในบริเวณฮิปโปแคมปัส ทุกจุดแสดงค่าของการตอบสนองของ inward current เป็น mean \pm S.E.M. และแสดงอยู่ในลักษณะเปอร์เซ็นต์ของความเปลี่ยนแปลงต่อการตอบสนองสูงสุด



รูปที่ 33 แสดงผลการยับยั้งของ Strychnine sulfate (STR) ที่ขนาด 1, 5, 10, 15 และ 20 μM ต่อ inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก Glycine (30 μM)



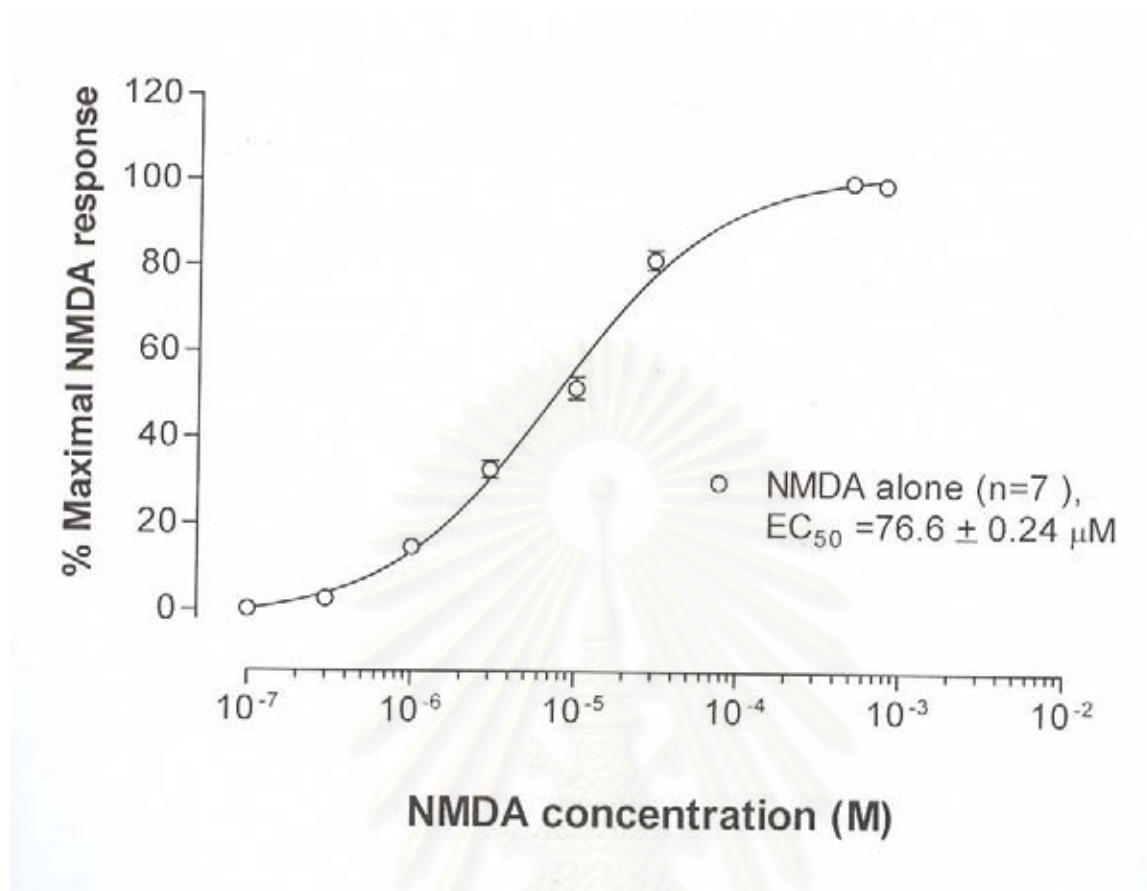
รูปที่ 34 แสดงผลของ HPP ที่ขนาดความเข้มข้น 0.1-300 μM ต่อ inward current ของเซลล์ประสาทเมื่อให้ร่วมกับ Glycine (30 μM)



รูปที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลในการยับยั้ง inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก Glycine โดย Strychnine (STR) และ HPP

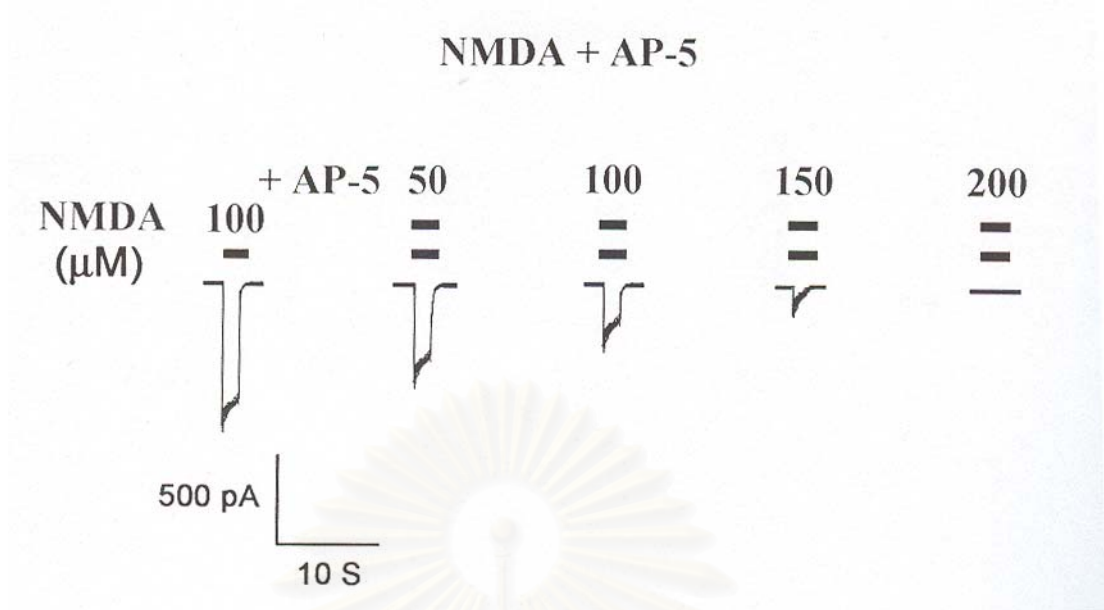


รูปที่ 36 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA ที่ขนาดความเข้มข้น 1-800 μM โดยที่จอตริงค่า potential ของเซลล์ประสาทไว้ที่ -20 มิลลิโวลต์

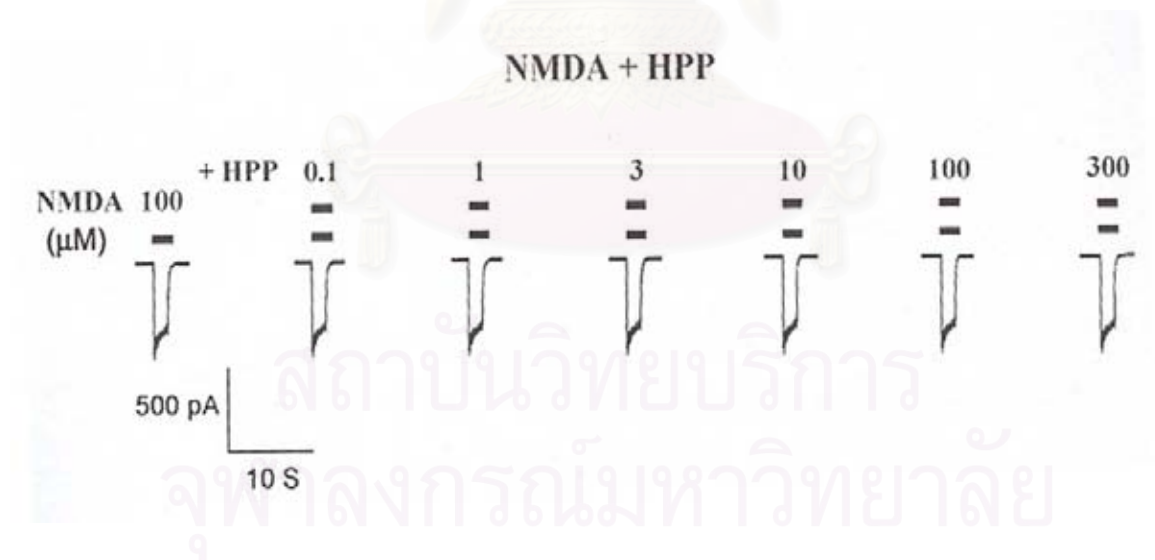


รูปที่ 37 NMDA log concentration-response relationship ของเซลล์ประสาทที่ถูกแยกทันทีในบริเวณฮิปโปแคมปัส ทุกจุดแสดงค่าของการตอบสนองของ inward current ว่าเป็น mean ± S.E.M. และแสดงอยู่ในลักษณะเปอร์เซ็นต์ของความเปลี่ยนแปลงต่อการตอบสนองสูงสุด

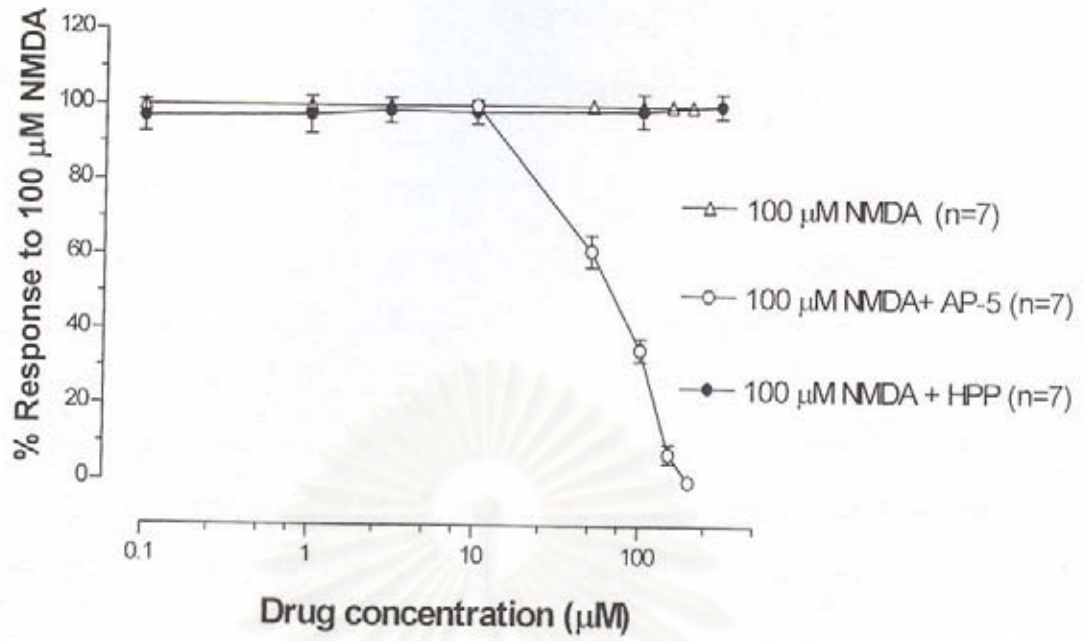
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 38 แสดงผลการยับยั้งกระแสไฟฟ้าของ DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5) ที่ขนาด 50, 100, 150 และ 200 μM ต่อ inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA (100 μM)



รูปที่ 39 แสดงผลของ HPP ที่ขนาดความเข้มข้น 0.1-300 μM ต่อ inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA (100 μM)



รูปที่ 40 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและผลต่อ inward current ของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก NMDA โดย AP-5 และ HPP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนี้พบว่า HPP มีฤทธิ์ด้านชักที่แรงกว่า VPA ถึง 3 เท่าที่ optimal pretreated time (81 และ 221 มก/กก น้ำหนักตัวตามลำดับ) optimal pretreated time ของ HPP คือ 15 นาที แสดงว่า HPP น่าจะผ่าน blood brain barrier เข้าสู่สมองได้เร็วกว่า VPA จึงออกฤทธิ์ได้เร็วกว่า อย่างไรก็ตาม HPP มีข้อด้อยกว่า VPA คือ มีระยะเวลาการออกฤทธิ์สั้นดังจะเห็นได้จากการที่ค่า ED₅₀ ที่ 2 ชั่วโมงเพิ่มขึ้นเป็นอีกหนึ่งเท่าตัว ในขณะที่ VPA ยังมีค่า ED₅₀ เกือบเท่าเดิม ดังนั้นจึงควรที่จะมีการแก้ไขโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีเพื่อให้ HPP สามารถออกฤทธิ์ได้นานกว่านี้ การที่ HPP มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ที่ค่อนข้างสั้นน่าจะเป็นเหตุผลที่อาจอธิบายถึง การที่ความเป็นพิษต่อการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลายของ HPP ที่ค่อย ๆ น้อยลงและหายไป ในขณะที่ฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ดังกล่าวของ VPA จะคงอยู่ได้นานกว่า เมื่อพิจารณาจากค่า ED₅₀ ของ HPP ที่ลดลงเมื่อให้ร่วมกับสาร SKF 252A ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P 450 แสดงว่าเมแทบอลิซึมของสาร HPP น่าจะมีอย่างน้อยส่วนหนึ่งที่ต้องอาศัยเอนไซม์ cytochrome P 450 เช่นเดียวกับ VPA

จากผลของการทดลองที่พบว่า HPP แม้จะออกฤทธิ์ด้านชักได้เร็ว แต่ก็มีระยะเวลาของการออกฤทธิ์สั้น ผลดังกล่าวอาจเกิดจากการที่ HPP สลายตัว โดยอาศัยเอนไซม์ในตับหรือสมองได้ VPA ซึ่งเป็นสารที่มีความคงตัวมากกว่าการที่จะพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวอาจทำได้โดยการศึกษาใน brain หรือ liver homogenate โดยแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกมาผสมกับ HPP แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ VPA ที่เกิดจากการสลายตัวของ HPP ด้วยเครื่อง HPLC ใช้ fluorescence detector และใช้ 9-Anthryldiazomethane (ADAM) เป็นสารที่ทำให้ VPA ที่อาจเกิดจากการสลายตัวของ HPP เรืองแสง แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการวิจัยในส่วนนี้ได้เนื่องจากสาร ADAM เป็นสารก่อมะเร็ง ไม่สามารถหาซื้อในประเทศไทย ผู้วิจัยเคยหาได้ในประเทศญี่ปุ่น แต่ปัจจุบันก็ไม่สามารถหาสารตัวนี้ได้อีกแล้ว จึงไม่สามารถศึกษาข้อมูลการแตกตัวของ HPP ได้

การไม่สมดุลงันระหว่างสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นและยับยั้งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการชักได้ (Holmes, 1997; MaNamara, 1996; Avanzini และ Franceschetti, 2003) HPP เป็นอนุพันธ์ของ VPA ซึ่งได้ทำการทดสอบแล้วว่า มีฤทธิ์ในการด้านชักแรงกว่า VPA (Supatchaipisit, 1995) ทั้งในการด้านชักด้วย MES และ PTZ แม้ว่า HPP จะไม่มีฤทธิ์ด้านชักในการทดลองที่ใช้ Bicucullin และ Strychnine ที่กระตุ้นโดยการให้สารผ่านทางช่องท้อง อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีการศึกษาโดยตรงต่อตัวรับชนิด GABA_A และ Glycine. จากการศึกษาข้างต้นพบว่า HPP สามารถป้องกันการชักที่ถูกระ

กระตุ้นโดย PTZ ได้ ซึ่งทราบกันดีอยู่แล้วว่าการยับยั้งการชักมักจะเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ GABA ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อตัวรับ GABA_A หรือมีผลต่อการยับยั้งสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นก็ได้

การศึกษาผลของ HPP ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ในเปลือกสมองใหญ่หนูขาวที่เคลื่อนไหวโดยอิสระ โดยเปรียบเทียบกับผลของ VPA ด้วยวิธี microdialysis เพื่อวัดปริมาณสารสื่อประสาท amino acid 4 ตัว คือ GABA กับ Glycine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท amino acid ชนิดยับยั้ง และ Glutamate กับ Aspartate ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท amino acid ชนิดกระตุ้น ซึ่งพบว่า HPP ทั้ง 2 ขนาด (80 และ 160 มก/กก น้ำหนักตัว) ไม่มีผลต่อสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง ทั้ง 2 ชนิดคือ GABA และ Glycine ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ (Supatchaipisit, 1995) ที่พบว่า HPP ในขนาดที่สูงมีผลเพิ่มระดับของสารสื่อประสาท GABA ในเปลือกสมองใหญ่ของหนูแรท ผลที่ออกมาตรงข้ามกันก็ขึ้นอยู่กับรูปแบบการทดลองที่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ทำในสัตว์ทดลองที่สลบ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ทำในสัตว์ทดลองที่เคลื่อนไหวได้โดยอิสระ ผลที่แตกต่างกันจากการศึกษาของ Supatchaipisit (1995) อีกอย่างหนึ่งคือ VPA ทั้ง 2 ขนาดไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสื่อประสาทชนิด GABA ซึ่งก็ตรงกับการศึกษาของ Numthongsakun (2000) และ Yeamvanichanun (1997) อย่างไรก็ตาม ผลของ VPA ในแต่ละการทดลองก็มีความแตกต่างกัน เช่น มีผลการรายงานว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ GABA ในการให้ VPA อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ GABA มักจะพบที่บริเวณสมองส่วน striatum, hippocampus และ cerebellum หลังจากให้สาร VPA แล้ว (Chapman และคณะ 1982) แม้ว่า Farrent และ Webstar (1989) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ GABA หลังจากให้ VPA ไปแล้วในสมองส่วน substantia nigra. อย่างไรก็ตามผลการต้านชักของ VPA ก็ยังมีหลายกลไก เช่น Glycine ซึ่งจากการทดลองพบว่าไม่มีผลการเปลี่ยนแปลงระดับของ Glycine ในเปลือกสมองใหญ่ ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Numthongsakun (2000) และ Wanasuntronwong (2001) Glycine เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งที่พบได้ในไขสันหลัง (Godin และคณะ 1969) แต่ก็มีรายงานว่าพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณสาร Glycine ในเปลือกสมองใหญ่เมื่อให้สาร VPA (Loscher และ Horsetermann, 1994) แม้ว่าจะไม่มีหลักฐานว่า Glycine มีผลในการเป็นฤทธิ์ต้านชักของ VPA เมื่อพิจารณาจากการที่ HPP สามารถป้องกันการชักในหนูถีบจักรที่ได้รับ PTZ แต่ไม่พบการเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท GABA เมื่อศึกษาโดยวิธี microdialysis แต่อย่างไรก็ตาม ผลดังกล่าวอาจเป็นไปได้ที่ HPP อาจมีฤทธิ์ทางอ้อมโดยไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของขบวนการใดขบวนการหนึ่งซึ่งมีผลทำให้ affinity ของ GABA receptor เพิ่มมากขึ้น หรืออาจมีผลยับยั้งสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นก็ได้

เป็นที่น่าสนใจว่า HPP มีผลลดปริมาณของสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นคือ Glutamate ในหนูแรทที่เคลื่อนไหวได้โดยอิสระแม้ว่าจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Aspartate ก็ตาม ซึ่ง VPA ใน

ขนาดที่สูงก็สามารถลดระดับของสารสื่อประสาท Glutamate ได้ แต่ก็ไม่มีผลต่อระดับ Aspartate เช่นกัน ผลดังกล่าวตรงกับผลการทดลองของ Wanasuntronwong (2001) การลดลงของระดับสารสื่อประสาทชนิด Glutamate น่าจะเป็นผลจากฤทธิ์ต้านชักของ HPP ซึ่งตรงกับผลของฤทธิ์ต้านชักตัวอื่น ๆ ที่ลดการหลั่งของสารสื่อประสาท glutamate เช่น Lamotrigine หรือ Riluzole ซึ่งมีผลลดระดับของสารสื่อประสาท Glutamate โดยยับยั้งการทำงานของช่องทางผ่านของ Na^+ ion ในการศึกษาจากชิ้นเนื้อเยื่อพบว่าการยับยั้งการทำงานของ Na^+ channel ของยา Carbamazepine และ Oxcarbazepine จะมีผลลดการหลั่งของสารสื่อประสาทชนิด Glutamate (Waldmeier และคณะ 1996) ซึ่งมีรายงานว่า VPA สามารถปรับเปลี่ยนการทำงานของ Na^+ channel จะมีผลต่อการหลั่งของสารสื่อประสาท Glutamate (Rowley และคณะ 1995) ซึ่งผลของ VPA ต่อการลดลงของสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นจึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาโดยวิธี patch-clamp technique ของสาร HPP ต่อตัวรับ 3 ชนิดคือ GABA_A , Glycine และ NMDA พบว่า HPP ขนาด 0.1-300 μM จะไม่มีผลเสริมฤทธิ์ของ GABA ขนาด 3 μM และ HPP ขนาด 300 μM ก็ไม่มีผลต่อตัวรับ Glycine เช่นกัน ผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Supatchaipisit 1995 ว่า HPP ไม่มีผลต้านชักที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย Bicuculline และ Strychnine ดังนั้น HPP จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งที่ post-synaptic cell ที่ทำการศึกษาจากเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ในขณะที่ HPP จะมีผลในการลด Glutamate ใน pre-synaptic cell ในหนูแรทที่เคลื่อนไหวที่ได้โดยอิสระ แต่ HPP ก็ไม่สามารถลดกระแสไหลผ่านตัวรับ NMDA ที่ post-synaptic cell ได้

จากผลการทดลอง HPP มีฤทธิ์การลดการหลั่งของสารสื่อประสาท Glutamate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเราพบว่า กลไกการยับยั้งการทำงานของ glutamate มักจะเกิดจากสังเคราะห์และการเก็บกลับของ วงจร Glutamate (Daikhin และ Yudkoff, 2000) ยาต้านชักมีกลไกในการออกฤทธิ์หลายอย่างซึ่งจะมีผลต่อ Ca^{2+} และ Na^+ channels มากกว่า Glutamate system (Stefani และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตาม ผลการต้านชักของ HPP ก็ยังเป็นที่น่าสนใจต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Avanzini, G and Franceschetti, S. Prospects for novel antiepileptic drugs. Curr.Opin.Investig.Drugs. 2003 Jun; 4(7): 805-14.
- Avoli, M. Molecular mechanisms of antiepileptic drugs. Science & Medicine. August (1997): 54-63.
- Bailer M. Pharmacokinetic considerations in the design of better and safer new antiepileptic drugs. J.Control.Release 62(1-2)(1999):187-192.
- Bialer M, Haj-Yehia A, Badir K and Hadad S. Can we develop improved derivatives of valproic acid?. Pharmacy World&Science. 16(1994) : 2-6.
- Bailer M, Johannesson SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Loiseau P, and Perucca E. Progress report on new antiepileptic drugs : a summary of the Fifth Eilat Conference (EILAT V). Epilepsy Res. 43 (2001) : 11-58.
- Bailer M, Johannesson SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Loiseau P, and Perucca E. Progress report on new antiepileptic drugs : a summary of the Sixth Eilat Conference (EILAT VI). Epilepsy Res. 2002 Sep;51(1-2):31-71
- Ben Salem C, Biour M, Hmouda H, Bouraoui A. Valproic acid-induced pancreatitis. J Gastroenterol. (2007) ;42(7):598-9.
- Benveniste, H., and Huttemeier, P.C. Microdialysis: Theory and application. Prog. Neurobiol. 35(1990): 195-215.
- Biton V. Clinical pharmacology and mechanism of action of zonisamide. Clin. Neuropharmacol (2007);30(4):230-40.
- Brodie, M.J., and Dichter, M.A. Antiepileptic drugs. N. Engl. J. Med. 18(1996): 168-175.
- Bruni. J., Valproate. In Shorvon S, Dreifuss FE, Fish D, and Thomas D (eds). The treatment of epilepsy. pp. 482-490. London : Blackwell Science 1996.
- Chapman, A., Keane, P.E., Meldrum, B.S., Simiand, J., and Vernieres, J.C. Mechanism of anticonvulsant action of valproate. Prog.Neurobiol. 19(1982) : 315-359.
- Chunngam, T. Preliminary studies of anticonvulsion mechanisms of N-(2-propylpentanoyl) urea. Master's Thesis, Chulalongkorn University, 1996
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., and Roth, R.H. The biochemical basis of neuropharmacology, 7th ed., pp. 126-183. New York: Oxford University Press, 1996.

- Crowder, J.M., and Bradford, H.F. Common anticonvulsants inhibit Ca^{2+} uptake and amino acid neurotransmitter release in vitro. Epilepsia 28(1987) : 378-382.
- Daikhin, Y., and Yudkoff, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. J.Nutr. 130 (2000):1026S-1031S.
- Davis, R., Peter, D.H., and McTavish, D. valproic acid: A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in Epilepsy. Drugs. 47(2) (1994): 332-372.
- de Jong FA, van der Bol JM, Mathijssen RH, Loos WJ, Mathot RA, Kitzen JJ, van den Bent MJ, Verweij J. Irinotecan chemotherapy during valproic acid treatment: pharmacokinetic interaction and hepatotoxicity. Cancer.Biol.Ther. (2007) 13;6 (9).
- Dichter, M.A. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: Implications for new antiepileptic drug development. Epilepsia. 35(suppl. 4)(1994): S51-S57.
- Dixon, J.F., and Hokin, L.E. The antibipolar drug valproate mimics lithium in stimulating glutamate release and inositol 1,4,5-triphosphate accumulation in brain cortex slices but not accumulation of inositol monophosphates and bisphosphates. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94(1997) : 4757-4760.
- Dreifuss, F.E. Classification of epileptic seizures. In Engel, J. and Pedley, T.A. Epilepsy : A comprehensive textbook. pp. 517-524. Philadelphia : Lippincott Raven 1997.
- Dunham, N.W., and Miya, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. J.Am.Pharm.Assoc. 46(1957): 208-209.
- Eikel D, Hoffmann K, Zoll K, Lampen A, Nau H. S-2-pentyl-4-pentynoic hydroxamic acid and its metabolite s-2-pentyl-4-pentynoic acid in the NMRI-exencephaly-mouse model: pharmacokinetic profiles, teratogenic effects, and histone deacetylase inhibition abilities of further valproic acid hydroxamates and amides. Drug Metab Dispos. (2006) Apr;34(4):612-20.
- Farrant, M. and Webster, R. A. Neuronal activity, amino acid concentration and amino acid release in the substantia nigra of the rat after sodium valproate. Brain Res. 386(1989): 1-11.
- Fukuzako, H. and Izumi, K. Clinical aspect of the epilepsies. In G. Tunniciiff and U.B. Raess (eds), GABA mechanism in epilepsy. Pp. 1-30. New York.: Wiley-Liss, 1991.

- Gean, P.W. Valproic acid suppresses the synaptic response mediated by the NMDA receptors in rat amygdalar slices. Brain Res.Bull. 33(1994) : 333-336.
- Gilroy, J. Basic neurology. 3rd ed., pp. 85-121. New York : McGraw-Hill, 2000.
- Godin, Y., Heiner, L., Mark, J., and Mandle, P. Effects of di-n-propylacetate and anticonvulsive compound, on GABA metabolism. J. Neurochem. 16(1969); 869-873.
- Hadad S, and Bailer M. Pharmacokinetic analysis and antiepileptic activity of two new isomers of N-valproyl glycineamide. Biopharm.Drug.Dispos. 7(1997) : 557-566.
- Hakimian S, Cheng-Hakimian A, Anderson GD, Miller JW. Rufinamide: a new anti-epileptic medication. Expert Opin Pharmacother. (2007); 8(12):1931-40.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.L. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers.Arch. 391(1981):85-100.
- Hausen, W.A. Incidence and prevalence. In J.Engel, and T.A. Pedley (eds.). Epilepsy : A Comprehensive Textvbook. pp. 47-57. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- Holmes, G.L. Epilepsy in the developing brain : Lessons from the laboratory and clinic. Epilepsia. 38(1)(1997): 12-30.
- Hurh E, Lee E, Lee A, Kim Y, Kim S, Kim S, Lee M. Effects of enzyme inducers or inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous parathion in rats. Biopharm Drug Dispos. 2000 Jul;21(5):193-204.
- Isoherranen N, Woodhead JH, White HS and Bailer M. Anticonvulsant profile of Valroceamide (TV 1901) : a new antiepileptic drug. Epilepsia. 42(7), 2001 : 831-836.
- Johannessen, C.U. Mechanisms of action of valproate: A commentary. Neurochem. Int. 37(2000): 103-110.
- Khongsombat O, Watanabe H, Tantisira B, Patarapanich C, Tantisira MH. Acute effects of N-(2-propylpentanoyl)urea on hippocampal amino acid neurotransmitters in pilocarpine-induced seizure in rats. Epilepsy Res. 2008 May; 79(2-3):151-7
- Kwan P, Brodie MJ. Emerging drugs for epilepsy. Expert.Opin.Emerg.Drugs.(2007) Sep;12(3):407-22.

- Lindroth, P. and Mopper, K. High performance liquid chromatography determination of subpicromole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization O-phthaldialdehyde. Ann.Chem. 51(1979): 1667-1674.
- Litchfield, J.T., and Wilcoxon, F.W. A simplified method of evaluating dose effect experiments. J.Pharmacol.Exp.Ther. 96(1949): 99-109.
- Lomlim, L. Synthesis of amide derivatives of valproic acid. Master Thesis, Chulalongkorn University; 1998.
- Löscher, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. Eur. J. Pharmacol. 342(1998): 1-13.
- Löscher, W. and Horestermann, D., Differential effects of vigabatrin, γ -Acetylenic GABA, aminooxyacetic acid, and valproate on levels of various amino acids in rat brain regions and plasma. Nauyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 349(1994): 270-278.
- Löscher, W. Effects of the antiepileptic drug valproate on metabolism and function of inhibitory and excitatory amino acid in the brain. Neurochem.Res. 18(1993): 485-502.
- Löscher, W., Nolting, B. The role of technical, biological and pharmacological factor in the laboratory evaluation anticonvulsant drugs, IV: Protective indices. Epilepsy Res. 9(1991): 1-10.
- MacNamara, J.O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In J.G. Hardman and L.E. Limbird (eds.) Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, pp. 521-547. U.S.A.; McGraw-Hill, 2001.
- MacNamara, J.O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In, A.G. Gilman, R.W. Ruddon, P.B. Molinoff, L.E. limbird and J.G. Hardman (eds.), Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th ed., pp. 461-485. New York : Raven Press, 1996.
- McLachlan, R.S. Seizures. In S.G. Carruthers. B.B. Hoffman, K.L. Melmon, and D.W. Nierenberg (eds.). Clinical Pharmacology. pp. 411-423. Malaysia : McGraw-Hill, 2000.
- Meldrum, B.S. Neurotransmission in epilepsy. Epilepsia. 36(suppl. 1) (1995) : S30-S35.
- Numthongsakun, T., Anticonvulsant activity and CNS effects of valproyl morpholine in mice and rats. Master's thesis, Chulalongkorn University, 2000.

- Okada A, Aoki Y, Kushima K, Kurihara H, Bialer M, Fujiwara M. Polycomb homologs are involved in teratogenicity of valproic acid in mice Birth Defects Res. Clin.Mol.Teratol. 2004 Nov;70(11):870-9.
- Pedley, T.A., The epilepsies. Textbook of medicine. 21st ed. pp. 2151-2163. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2000.
- Penry, J.K. and Dean, J.C. The scope and use of valproate in epilepsy. J.Clin.Psychiatry 50 : (suppl 3) (1993) : 17-22.
- Porter, R.J. Classification of epileptic seizures and epileptic seizures and epileptic syndrome. In J.Laidlaw, A. Richens and D. Chadwick, Textbook of Epilepsy. 4th ed., pp. 1-19. London : Churchill Livingstone, 1993).
- Porter, R.J., and Meldrum, B.S. Antiepileptic drugs. In B.G. Katzung (ed.), Basic & Clinical pharmacology. 7th ed., pp 386-408. U.S.A. : Appleton & Lange, 1998.
- Rogawski MA. Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline. Epilepsy Res. 2006 Jun;69(3):273-94.
- Rowan, A.J. Valproate. In J. Engel, and T.A. Pedley (eds.). Epilepsy : A Comprehensive Textbook, pp. 1599-1607. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- Rowley, H.L., Masden, C.A., & Martin, K.F. Differential effects of phenytoin and sodium valproate on seizure-induced changes in gaminobutyric acid and glutamate release in vivo. Eur J Pharmacol 294(1995):541-546.
- Shank, R.P., Smith-Swintosky, V.L., and Twyman, R.E. Comprehensive textbook of psychiatry. Volume 1 pp. 50-84. New York: Philadelphia, 2000.
- Shorvon, S.D. Handbook of epilepsy treatment. Oxford: Malden, M.A., Black well Science, 2000.
- Similae, S., Von Wendt, L., Linna, S.L., Saukkonen, A.L., and Huhtaniemi, I. Dipropylacetate and hyperglycemia. Neuropaediatric 1(1979) : 158-160.
- Spiegelstein O. Yagen B and Bailer M. Structure-pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of N-alkyl derivatives of the new antiepileptic drug valproyl glycinamide Epilepsia 40(5) 1999 : 545-552.

- Stefani, A., Spadoni, F., and Bernardi, G. Voltage-activated calcium channels: targets of antiepileptic drug therapy. Epilepsia 38 (1997): 959-965.
- Stringer, J.L., Drug for seizure disorders (Epilepsies). In Brody, T.M., Larier, J., and Minneman, K.P. (eds.), Human pharmacology: molecular to clinical, 2nd ed., pp. 373-382. New York : Mosby, 1998.
- Supatchaipisit, P. Anticonvulsant activity and effects of N-hydroxymethyl-2-propylpentamide on the central nervous system. Master's Thesis, Chulalongkorn University, 1995.
- Tasso SM, Moon SCh, Bruno-Blanch LE, Estiu GL. Characterization of the anticonvulsant profile of valpromide derivatives. Bioorg.Med.Chem. (2004)15;12(14):3857-69.
- Trescher, W.H., and Lesser, R.P. The epilepsies. In W.G. Bradley. R.B. Daroff, G.M. Fenichel, and C.D. Marsden (eds.), Neurology in clinical practice. volume II, 2nd ed., pp. 1625-1654. U.S.A. : Butterworth-Heinemann, 2000.
- Ure, J.A., and Perassolo, M. Update on the pathophysiology of the epilepsies. J. Neurosci. 177(2000): 1-17.
- Waldmeier, P.C., Martin, P., Stocklin, K., Portet, C., Schmutz, M. Effect of carbamazepine, oxcarbazepine and lamotrigine on the increase in extracellular glutamate elicited by veratridine in rat cortex and striatum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 354(1996): 164-172.
- Wanasuntronwong, A. Effect of valproyl hydroxamic acid on cortical amino acid neurotransmitters in rats. Master's Thesis, Chulalongkorn University, 2001.
- Yeamvanichanun, W. Anticonvulsant activity and effects of amide 1C on the central nervous system. Master's thesis, Chulalongkorn University, 1997.