

ฤทธิ์การต้านการชักและผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง
ของวัลโปรอิล-มอโพลีนโนหนูไมซ์และหนูแรท



นางสาว เตือนใจ น้ำทองสกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543


ISBN 974-346-724-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24 ก.ย. 2546

I 20608446

ANTICONVULSANT ACTIVITY AND CNS EFFECTS
OF VALPROYL MORPHOLINE IN MICE AND RATS



Miss Taunjai Numthongsakun

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Inter-Departmental Program in Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-346-724-6

เดือนใจ น้ำทองสกุล: ฤทธิ์ด้านการชักและผลต่อระบบประสาทส่วนกลางของวัลโปรอิล-มอโฟลีนในหนูไมซ์และหนูแรท.
(ANTICONVULSANT ACTIVITY AND CNS EFFECTS OF VALPROYL MORPHOLINE IN MICE AND RATS) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.
บุญยงค์ ดันติสิระ อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.มยุรี ดันติสิระ , 85 หน้า. ISBN 974-346-724-6.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการชัก ความเป็นพิษเฉียบพลัน พิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง ตลอดจนผลต่อปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่หนูแรทขณะตื่นโดยวิธีไมโครไดอะลิสซิสของวัลโปรอิล-มอโฟลีนซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ใหม่ของกรดวัลโปรอิกที่ได้สังเคราะห์ขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกรดวัลโปรอิกซึ่งเป็นสารต้นแบบ

จากการศึกษาฤทธิ์ด้านชักของสารทดสอบทั้งสองในหนูไมซ์ที่ได้รับสารทดสอบในขนาดต่างๆกันพบว่า กรดวัลโปรอิกมีฤทธิ์ด้านการชักในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักทั้งโดยการกระตุ้นสมองด้วยกระแสไฟฟ้าและสารเพนทิลีนเตตราซอลได้ ในขณะที่วัลโปรอิล-มอโฟลีนมีฤทธิ์ด้านการชักในหนูไมซ์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักโดยการกระตุ้นสมองด้วยกระแสไฟฟ้าเท่านั้น โดยวัลโปรอิล-มอโฟลีนออกฤทธิ์ด้านชักได้ดีกว่ากรดวัลโปรอิก ขนาดของวัลโปรอิล-มอโฟลีนและกรดวัลโปรอิกที่สามารถด้านการชักในหนูไมซ์ได้จำนวนครั้งหนึ่ง(ED_{50}) เท่ากับ 107 และ 230 มก/กก น้ำหนักตัว ตามลำดับ จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันพบว่าสารทดสอบทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษเฉียบพลันใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำผลดังกล่าวมาคำนวณหาค่าขอบเขตความปลอดภัยสัมพัทธ์ (Relative safety margin, LD_{50}/ED_{50}) พบว่าวัลโปรอิล-มอโฟลีนมีค่าขอบเขตความปลอดภัยสัมพัทธ์สูงกว่ากรดวัลโปรอิกประมาณ 2 เท่า (ขอบเขตความปลอดภัยสัมพัทธ์ของวัลโปรอิล-มอโฟลีนและกรดวัลโปรอิกเท่ากับ 5.89 และ 2.97 ตามลำดับ) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยวิธี Rotorod test พบว่าขนาดของสารทดสอบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางในหนูไมซ์จำนวนครั้งหนึ่งของวัลโปรอิล-มอโฟลีนกับกรดวัลโปรอิกเท่ากับ 151 และ 309 มก/กก น้ำหนักตัว ตามลำดับ เมื่อนำค่าดังกล่าวมาคำนวณหาค่าดัชนีปกป้อง (Protective index, TD_{50}/ED_{50}) พบว่าดัชนีปกป้องของวัลโปรอิล-มอโฟลีนและกรดวัลโปรอิกมีค่าใกล้เคียงกัน (1.41 และ 1.34 ตามลำดับ) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางโดยวิธีอื่นพบว่า ถึงแม้สารทดสอบทั้งสองในขนาดสูงและต่ำมีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการเคลื่อนไหวในหนูไมซ์ไม่ต่างจากที่อื่น 400 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็พบว่าวัลโปรอิล-มอโฟลีนมีฤทธิ์ไปเพิ่มระยะเวลาในการหลับของหนูไมซ์ที่ได้รับบาร์บิทูเรตเป็นอย่างมาก นอกจากนี้สารทดสอบดังกล่าวยังสามารถทำให้หนูไมซ์หลับได้อีกด้วย โดยพบว่าขนาดของวัลโปรอิล-มอโฟลีนที่ทำให้หนูไมซ์จำนวนครั้งหนึ่งหลับ (HD_{50}) เท่ากับ 250 มก/กก น้ำหนักตัว

การศึกษามผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนที่บริเวณเปลือกสมองใหญ่ของหนูแรทที่เคลื่อนไหวได้อิสระโดยวิธีไมโครไดอะลิสซิส พบว่ามีผลแตกต่างกัน กล่าวคือกรดวัลโปรอิกมีฤทธิ์ลดปริมาณของกลูตาเมตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่เพียงอย่างเดียว ในขณะที่วัลโปรอิล-มอโฟลีนนอกจากสามารถลดปริมาณของกลูตาเมตแล้วยังลดปริมาณไกลซินซึ่งทำหน้าที่เป็น co-agonist ของกลูตาเมตในการกระตุ้นตัวรับ NMDA ในสมองอีกด้วย

งานวิจัยดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าวัลโปรอิล-มอโฟลีนมีฤทธิ์แรงโดยออกฤทธิ์ด้านชักในลักษณะจำเพาะ มีผลทำให้สัตว์ทดลองหลับ แต่ก็มีความปลอดภัยในการใช้สูงกว่ากรดวัลโปรอิก สารทดสอบทั้งสองมีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนที่บริเวณเปลือกสมองใหญ่ของหนูแรทแตกต่างกัน การปรับปรุงโครงสร้างของวัลโปรอิล-มอโฟลีน อาจทำให้ได้อนุพันธ์ของกรดวัลโปรอิกตัวใหม่ซึ่งอาจมีฤทธิ์เป็นยานอนหลับ หรือได้อนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ด้านชักได้ดียิ่งขึ้น

ภาควิชา สหสาขาวิชาสัตววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C4075218030 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORDS: ANTICONVULSANT/ AMINO ACID NEUROTRANSMITTER / VALPROYL MORPHOLINE

TAUNJAI NUMTHONGSAKUN: ANTICONVULSANT ACTIVITY AND CNS EFFECTS OF VALPROYL

MORPHOLINE IN MICE AND RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D.

CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D. 85 pp. ISBN 974-346-724-6

The purposes of the present study were to investigate anticonvulsant activity of valproyl morpholine (VPM), a newly synthesized valproic acid (VPA) analog, with regards to efficacy, lethality, neurotoxicity and some other effects on the central nervous system. In addition, *in vivo* microdialysis experiments on freely moving rats were performed to search for the possible effects of VPM on cortical amino acid neurotransmitters that may underlie its anticonvulsant activity.

While VPA was effective in both Maximal Electroshock Seizure (MES) and Pentylentetrazole (PTZ) test, VPM was exclusively effective in the MES but not PTZ test. When given by the intraperitoneal route, VPM was more potent than VPA, exhibiting the median effective dose (ED_{50}) of 107 mg/kg body weight (B.W.) whereas the corresponding value for VPA was 230 mg/kg B.W. In terms of safety, based on the results that the relative safety margin (LD_{50}/ED_{50}) of VPM (5.89) was higher than that of VPA (2.97), VPM seemed to be safer than VPA. The median neurotoxic dose (TD_{50}) as established by the rotorod test were 151 and 309 mg/kg B.W. for VPM and VPA, respectively. Thus, the protective index (TD_{50}/ED_{50}) of VPM (1.41) and VPA (1.34) was almost equal. VPM was rather sedative exhibiting the median hypnotic dose (HD_{50}) at 250 mg/kg B.W. and significantly prolong pentobarbital sleeping time. However, the depressant effects on locomotor activity of both VPM (100 and 200 mg/kg B.W. i.p.) and VPA (100 and 250 mg/kg B.W. i.p.) were not significantly different from those of PEG400. Microdialysis studies on freely moving rats revealed different profile of response on cortical amino acid neurotransmitters exhibited by VPM and VPA. Unlike VPA which significantly decreased the level of cortical glutamate while had no effect on other amino acid neurotransmitters, VPM possessed two distinct effects that may underlie its anticonvulsant activity. One was a reduction of cortical glutamate level and the other was the decrease in cortical glycine level which is co-agonist of glutamate in activation of NMDA receptor.

In conclusion, the present study demonstrated a potent and rather selective anticonvulsant activity of a new valproic acid analogs. VPM was rather sedative and seemed to be safer than VPA, however, therapeutic dose of VPM and VPA might presumably produce similar degree of motor impairment. In addition, VPM and VPA were found to exert different effects on cortical amino acid neurotransmitters. Further chemical modification of VPM may lead to the discoveries of valproic acid analogs with hypnotic activity or some other improving anticonvulsant valproic acid analogs.

Department Inter-department of Physiology

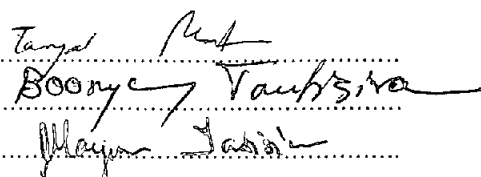
Field of study Physiology

Academic year 2000

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....



Acknowledgements

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

My thanks are also due to Assist. Prof. Dr. Chamnan Patarapanich for synthesis and supplying the test substance (VPM), Miss Tipsuchon Chunngan for teaching microdialysis technique.

Similarly, I am indebted to all staff members of the Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their valuable helps as well as to all experimental animals for their sacrifice, which bring me to success in my studies.

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



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Contents

	Page
Abstract (Thai)	iv
Abstract (English)	v
Acknowledgements	vi
Contents.....	vii
List of Tables	ix
List of Figures.....	x
List of Abbreviations.....	xii
Chapter	
I Introduction	
Epilepsy	1
1. Epileptogenesis	1
2. Classification of epilepsy.....	2
3. Amino acid neurotransmitters in epilepsy.....	4
4. Therapy of epilepsy.....	10
Valproic acid	13
Valproyl morpholine.....	15
II Materials and Methods	
Experimental animals	17

Chemicals	17
Drug preparations and administrations.....	18
Equipments.....	18
Experiment methods.....	19
Calculation and statistical analysis.....	25
III Results	
Anticonvulsant activity	26
Toxicity	26
Effects on some cortical amino acid neurotransmitter levels in freely moving rats.....	28
IV Discussion and conclusions.....	46
References	50
Appendices.....	57
Curriculum Vitae.....	85

14	Effects of an intraperitoneal administration of VPM and VPA on barbiturate sleeping times in mice.....	39
15	Log dose response curves of hypnotic effect by VPM (i.p.) in mice.....	40
16	HLPC chromatogram of OPA- derivatized amino acids from the rat cerebral cortex.....	41
17	Effects of an intraperitoneal administration of VPM and VPA on the total amount of the rat cortical aspartate levels in the dialysate collected for 3 hours.....	42
18	Effects of an intraperitoneal administration of VPM and VPA on the total amount of the rat cortical glutamate levels in the dialysate collected for 3 hours.....	43
19	Effects of an intraperitoneal administration of VPM and VPA on the total amount of the rat cortical glycine levels in the dialysate collected for 3 hours.....	44
20	Effects of an intraperitoneal administration of VPM and VPA on the total amount of the rat cortical GABA levels in the dialysate collected for 3 hours.....	45

List of Tables

Table		Page
1	Classification of epilepsy.....	3
2	ED ₅₀ , TD ₅₀ , ED ₅₀ , PI (TD ₅₀ / ED ₅₀) and relative safety margin (LD ₅₀ / ED ₅₀) of an intraperitoneal administration of VPM and VPA in MES and PTZ models.....	36



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure		Page
1	Structure of GABA _A receptor.....	5
2	Schematic diagram of Glutamate	9
3	Structural formula of Valproic acid, VPA	13
4	Structural formula of Vaproyl morpholine, VPM	15
5	Log dose response curves of VPM (i.p.) against MES in mice at 15, 30 and 60 min pretreated times.....	29
6	Log dose response curves of VPA (i.p.) against MES in mice at 15, 30 and 60 min pretreated times.....	30
7	Log dose response curves of VPA (i.p.) against PTZ in mice at 30 min pretreated times.....	31
8	Comparison of ED ₅₀ at various pretreated times of VPM and VPA (i.p.) against MES in mice.	32
9	Log dose response curves of acute toxicity (lethality) of VPM and VPA (i.p.) in mice.....	33
10	Log dose response curves of neurotoxicity (Rotorod test) exhibited by VPM and VPA (i.p.) mice.....	34
11	Illustration of the LD ₅₀ , TD ₅₀ and ED ₅₀ elicited by an intraperitoneal administration of VPM and VPA in mice in MES and PTZ models.....	35
12	Effects of an intraperitoneal administration of VPM and VPA on horizontal counts (Mean ± SEM) of locomotor activity in mice at various times.....	37
13	Effect of an intraperitoneal administration of VPM and VPA on total horizontal counts (Mean ±SEM) within 75 min of locomotor activity in mice.....	38

List of Abbreviations

α	=	Alpha
β	=	Beta
ε	=	Epsilon
δ	=	Delta
γ	=	Gamma
ρ	=	Rho
μ	=	Micro
μg	=	Microgram
μl	=	Microlitre
%	=	Percent
Ca^{++}	=	Calcium ion
Mg^{++}	=	Magnesium ion
K^+	=	Potassium ion
Cl^-	=	Chloride ion
Na^+	=	Sodium ion
aCSF	=	Artificial cerebrospinal fluid
AEDs	=	Antiepileptic drugs
a.m.	=	ante meridian (before noon)
AMPA	=	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl- isoxazole-4- propionic acid
B.W.	=	Body weight
CNS	=	Central nervous system
cm	=	Centimeter
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree celsius
ED_{50}	=	Median effective dose
EEG	=	Electroencephalogram
e.g.	=	exempli gratia (for example)

et.al.	=	et alii (and other)
etc.	=	et cetera (and so on)
FBM	=	Felbamate
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GABA-T	=	Gamma aminobutyric acid transaminase
GAD	=	Glutamic acid decarboxylase
GHD	=	Gamma hydroxybutyric acid
g	=	gram
Hz	=	Hertz
HPLC	=	High performance liquid chromatography
HD ₅₀	=	Median hypnotic dose
Hr	=	Hour
ILAE	=	International League Against Epilepsy
i.p.	=	Intraperitoneal
kg	=	Kilogram
L	=	Litre
LD ₅₀	=	Median lethal dose
LTG	=	Lamotrigine
mA	=	Milliampere
M	=	Molar
MES	=	Maximal electroshock
mg	=	Milligram
min	=	Minute
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
mM	=	Millimolar
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NSS	=	Normal saline solution
OPA	=	ortho - Phthaldialdehyde

PB	=	Phenobarbital
PEG400	=	Polyethylene glycol 400
PI	=	Protective index
p.m.	=	post meridian (afternoon)
PTZ	=	Pentylentetrazole
rev/min	=	revolution per minute
sc.	=	Subcutaneous
SEM	=	Standard error of the mean
sec.	=	Second
SSAD	=	Succinic semialdehyde
SSADH	=	Succinic semialdehyde dehydroxygenase
TGB	=	Tiagabine
TPB	=	Topiramate
VGB	=	Vigabatrin
TD ₅₀	=	Median toxic dose
VPA	=	Valproic acid
VPM	=	Valproyl morpholine

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย