


การประเมินฤทธิ์ต้านชักของสาร เอ็น-(4-อะมิโน-2-เมทิลฟีนิล)ทาลิมีด



นางสาวพรรณภา เล็กภู

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา


คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4992-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF
N-(4-AMINO-2-METHYLPHENYL)PHTHALIMIDE



Miss Panapa Lekphoo

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4992-9

พรรณณา เล็กภู : การประเมินฤทธิ์ต้านชักของ เอ็น-(4-อะมิโน-2-เมทิลฟีนิล)ทาลิไมด์ (Evaluation of anticonvulsant activity of N-(4-Amino-2-methylphenyl)phthalimide) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร.มยุรี ดันตสิริระ; อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.บุญยงค์ ดันตสิริระ; 105 หน้า; ISBN 974-17-4992-9

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านชักของสารเอ็น-(4-อะมิโน-2-เมทิลฟีนิล)ทาลิไมด์, (เอเอ็มพี) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ใหม่ของทาลิไมด์ โดยจะประเมินฤทธิ์ต้านชักในหนูถีบจักรที่เหนียวน่าให้เกิดการชักด้วยกระแสไฟฟ้าและสารเพนทิลีนเตตระซอลและศึกษาพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางในการควบคุมการทำงานประสานกันของกล้ามเนื้อลายเปรียบเทียบกับกรควาลโปรอิกตลอดจนศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่อาจเป็นไปได้ต่อการหลังสารสื่อประสาทชนิดกรควอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาวขณะตื่น โดยวิธีไมโครไดอะลैซซิส

ขนาดของสารทดสอบที่ต้านชักในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (ED_{50}) จากการเหนียวน่าการชักด้วยไฟฟ้าเท่ากับ 17 และ 214 และเท่ากับ 68 และ 86 มก/กก จากการเหนียวน่าการชักด้วยสารเพนทิลีนเตตระซอลสำหรับสารเอเอ็มพีและกรควาลโปรอิกตามลำดับ สารเอเอ็มพีไม่มีฤทธิ์ต้านชักจากการเหนียวน่าการชักด้วยสารสตริกนิน ขนาดของสารเอเอ็มพีและกรควาลโปรอิกที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งตาย (LD_{50}) เท่ากับ 101 และ 605 มก/กก และขนาดที่ทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (TD_{50}) สำหรับสารเอเอ็มพีและกรควาลโปรอิกเท่ากับ 38 และ 309 มก/กก ถึงแม้ว่าสารเอเอ็มพีสามารถต้านชักได้ดีจากการเหนียวน่าการชักด้วยไฟฟ้า พบว่าต้องใช้สารในขนาดที่สูงกว่าขนาดที่ทำให้เกิดพิษและใกล้เคียงกับขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งตายจึงสามารถต้านชักจากการเหนียวน่าด้วยสารเพนทิลีนเตตระซอล ดังนั้นสารเอเอ็มพีสามารถนำมาใช้ต้านการชักซึ่งมีรูปแบบคล้ายเหนียวน่าการชักด้วยไฟฟ้า

การศึกษาผลต่อระดับสารสื่อประสาทชนิดกรควอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาวขณะตื่น โดยวิธีไมโครไดอะลैซซิส พบว่าสารเอเอ็มพีขนาด 70 มก/กก สามารถลดระดับสารสื่อประสาทกลูตาเมตและเพิ่มไกลซีนและแกมมาอะมิโนบิวไทลิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่มีผลต่อระดับสารสื่อประสาทแอสปาเตส แต่สารเอเอ็มพีขนาด 100 มก/กก จะไม่มีผลต่อสารสื่อประสาทใดๆ ซึ่งแตกต่างจากกรควาลโปรอิกที่ลดระดับของกลูตาเมตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาในขณะนี้แสดงให้เห็นว่า สารเอเอ็มพีมีฤทธิ์ต้านชักจากการเหนียวน่าการชักด้วยไฟฟ้าและสารเพนทิลีนเตตระซอล เมื่อพิจารณาว่า $PI (TD_{50}/ED_{50}) = 0.56$ และค่าความปลอดภัยสัมพัทธ์ที่ต่ำ ($LD_{50}/ED_{50} = 1.49$) คาดว่าสารเอเอ็มพีน่าจะมีประโยชน์ทางคลินิกสำหรับป้องกันการชักได้บางประเภท การลดระดับสารสื่อประสาทกลูตาเมตและเพิ่มไกลซีนและแกมมาอะมิโนบิวไทลิกอาจเป็นกลไกในการออกฤทธิ์ต้านชักที่พบในสัตว์ทดลอง จำเป็นจะต้องมีการแก้ไขในสูตรโครงสร้างของสารเอเอ็มพีเพื่อลดความเป็นพิษและปรับปรุงให้เป็นยาต้านชักที่ฤทธิ์ครอบคลุมการชักได้หลายประเภท

ภาควิชา.....เภสัชวิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต..... ผศ.ภก เล็กภู
 สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... รศ.ดร.มยุรี ดันตสิริระ
 ปีการศึกษา..... 2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ.ดร.บุญยงค์ ดันตสิริระ

##4476591633: MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: ANTICONVULSANT/ AMINO ACID NEUROTRANSMITTER/ PHTHALIMIDE
DERIVATIVE/ VALPROIC ACID / MICRODIALYSIS

PANAPA LEKPHOO: EVALUATION OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF N-(4-AMINO-2-METHYLPHENYL)PHTHALIMIDE. THESIS-ADVISOR: ASSOC. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., THESIS-CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D. 105 pp.
ISBN 974-17-4992-9.

The present studies was aimed to investigate the anticonvulsant activity of a newly synthesized phthalimide derivative, *N*-(4-amino-2-methylphenyl)phthalimide, (AMP), in comparison to Valproic acid, (VPA). Maximal electroshock test (MES), Pentylentetrazole test (PTZ) and rotorod test were used to assess the anticonvulsant and neurotoxicity of AMP in mice, respectively. In addition, in vivo microdialysis experiment on freely moving rats was performed to search for possible action of AMP on cortical amino acid neurotransmitters.

The median effective dose (ED_{50}) of AMP and VPA were 17 and 214 mg/kg body weight respectively in MES test and they were 68 and 86 mg/kg body weight respectively in PTZ model, while it was ineffective in strychnine test. The median lethal dose (LD_{50}) of AMP and VPA were found to be 101 and 605 mg/kg body weight respectively. The median neurotoxicity dose (TD_{50}) as measure by rotorod test were 38 and 309 mg/kg body weight for AMP and VPA respectively. Despite favorable profile in MES test, AMP was able to protect the animal in PTZ test in the dose that not only higher than its TD_{50} but also very closed to its LD_{50} . Therefore it is likely that AMP may become clinically acceptable only for seizure types that correlate well with ability to protect against MES but not as a broad-spectrum AED.

Microdialysis studies on awake rats revealed different profile of responses on cortical amino acid neurotransmitters exhibited by AMP and VPA. AMP (70 mg/kg) significantly decreased the level of glutamate and increased the level of glycine and GABA, while had no significant effect on aspartate level. However, AMP (100 mg/kg) was not found to produce any effect on the level cortical amino acid neurotransmitter. In contrast VPA appeared to exert its effect by a decrement of cortical glutamate.

In conclusion, the present study demonstrated anticonvulsant activity of AMP against both the MES and PTZ tests. However due to unfavorable neuroprotective indices ($TD_{50}/ED_{50} = 0.56$) and low relative safety margin ($LD_{50}/ED_{50} = 1.49$) of AMP in PTZ model, AMP is anticipated to be clinically beneficial for certain types of seizure. Reduction of glutamate in concert with increment of GABA and glycine seem to underlie anticonvulsant observed in vivo.

In order to achieve a therapeutic drug which broad spectrum anticonvulsant profile with favorable toxic. Further modification of its chemical structure is needed.

Department.....Program of Pharmacology...Student's signature..... Panapa Lekphoo

Field of study...Pharmacology.....Advisor's signature..... Mayuree Tantisira

Academic year..... 2003.....Co- advisor's signature..... Boonyong Tantisira

Acknowledgements

I wish to express my gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira and my co-advisor, Associate Professor Dr. Boonyong Tantisira for their excellent instruction, guidance, encouragement and support during the long working process, which enable me to carry out this study. Their kindness will be long remembered.

I would like to thank Mr. Wanchai Pleumpanupat, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for kindly supplying N-(4-amino-2-methylphenyl)phthalimide, Miss Saichol Rodpalpan and Miss Aree Wanasuntronwong for teaching me microdialysis technique.

I would like to give a very special thank to Mr. Payon Yothinterachai for his assistance, encouragement and support throughout this study. My thanks also go to all of my friends for their support and understanding.

My grateful appreciation extend to all staff members of the Department of Pharmacology and Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for provision of facilities used in experimental works.

Finally, I would like to thank my dear father, mother and sister for their love, kindness and support throughout this study.

Contents

	page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	ix
List of Abbreviations.....	xii
Chapter	
I Introduction.....	1
II Review Literature.....	4
1. Causes of seizure and epilepsy.....	5
2. Classification of seizure and epilepsy.....	7
3. Amino acid neurotransmitter.....	8
4. Drug for treatment of epilepsy.....	17
III Materials and Methods.....	31
Equipments and Chemicals.....	32
Experimental methods.....	34
Calculation and statistical analysis.....	43
IV Results.....	45
V Discussion and Conclusion.....	70
References.....	78
Appendix.....	93
Curriculum Vitae.....	105

List of Tables

Table	page
1. Common causes of provoked seizure.....	5
2. Structural brain diseases that predispose to epilepsy.....	6
3. Modified ILAE classification of seizures.....	8
4. Anticonvulsant activity of intraperitoneally given AMP and VPA.....	50
on various animal models of epilepsy at optimal pretreated time	
5. ED_{50} , TD_{50} , LD_{50} , PI and relative safety margin of intraperitoneal.....	56
administrations of AMP and VPA in MES and PTZ seizure tests in mice at optimal pretreated time	



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure	Page
1. Glutamate(NMDA) receptor complex.....	11
2. Metabolic pathway for the synthesis and..... degradation of GABA and glutamate	13
3. GABA _A receptor complex.....	15
4. Log dose response curves of AMP (i.p.)..... on MES at 30,60 and 180 min pretreated time	47
5. Protection against MES exhibited by AMP and VPA at various pretreated time in mice	48
6. Log dose response curves of AMP and VPA (i.p.)..... on PTZ at 30 min pretreated time	49
7. Log dose response curves of AMP and VPA (i.p.)..... on acute toxicity in mice	53
8. Log dose response curves of neurotoxicity exhibited..... by AMP and VPA(i.p.) in mice at optimal pretreated time	54
9. Neurotoxicity of AMP and VPA by rotorod test..... at various pretreated time in mice	55
10. Effect of intraperitoneally administration of AMP..... and VPA on barbiturate sleeping time in mice	57
11. Change in the rat cortical aspartate levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400	60

List of Figures (continued)

Figure	Page
12. Change in the rat cortical glutamate levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400	60
13. Change in the rat cortical glycine levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400	61
14. Change in the rat cortical GABA levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400	61
15. Effect of an intraperitoneal administration..... of AMP and VPA on the rat cortical aspartate levels at various times	62
16. Effect of an intraperitoneal administration..... of AMP and VPA on the rat cortical glutamate levels at various times	63
17. Effect of an intraperitoneal administration..... of AMP and VPA on the rat cortical glycine levels at various times	64
18. Effect of an intraperitoneal administration..... of AMP and VPA on the rat cortical GABA levels at various times	65

List of Figures (continued)

Figure	Page
19. Effect of AMP and VPA on the total amount of the rat..... cortical aspartate in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the test substances	66
20. Effect of AMP and VPA on the total amount of the rat..... cortical glutamate in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the test substances	67
21. Effect of AMP and VPA on the total amount of the rat..... cortical glycine in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the test substances	68
22. Effect of AMP and VPA on the total amount of the rat..... cortical GABA in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the test substances	69

List of Abbreviations

%	=	Percent
α	=	Alpha
β	=	Beta
δ	=	Delta
ϵ	=	Epsilon
γ	=	Gamma
μ	=	Micro
ρ	=	Rho
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree celsius
μg	=	Microgram
μl	=	Microlitre
μm	=	Micrometre
μM	=	Micromolar
5-HT	=	5-hydroxytryptamine
a.m.	=	ante meridian (before noon)
aCSF	=	Artificial cerebrospinal fluid
ADD	=	Antiepileptic drug development program
AED	=	Antiepileptic drug
AMP	=	N-(4-amino-2-methylphenyl)phthalimide
AMPA	=	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid
B.W.	=	Body weight

BZDs	=	Benzodiazepines
Ca ²⁺	=	Calcium ion
CaCl ₂	=	Calcium chloride
cAMP	=	Cyclic adenosine monophosphate
CBZ	=	Carbamazepine
Cl ⁻	=	Chloride ion
Cm	=	Centimeter
CNS	=	Central nervous system
e.g.	=	Exempli gratia (for example)
ED ₅₀	=	Median effective dose
EEG	=	Electroencephalogram
ESM	=	Ethosuximide
et.al.	=	et alii (and other)
FBM	=	Felbamate
g	=	gram
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GABA-T	=	Gamma aminobutyric acid transaminase
GAD	=	Glutamic acid decarboxylase
GBP	=	Gabapentin
GHB	=	Gamma hydroxybutyric acid
GluR	=	Iontropic glutamate receptor
GTP	=	Guanidine triphosphate
HCO ³⁻	=	Hydrogen carbonate ion
HPLC	=	High performance liquid chromatography

hr	=	Hour
Hz	=	Hertz
i.p.	=	Intraperitoneal
ILAE	=	International League Against Epilepsy
K ⁺	=	Potassium ion
KA	=	Kainic acid
KCl	=	Potassium chloride
Kg	=	Kilogram
L	=	Litre
LD ₅₀	=	Median lethal dose
LEV	=	Levetiracetam
LTG	=	Lamotrigine
M	=	Molar
mA	=	Milliampere
MES	=	Maximal electroshock seizure
Mg ²⁺	=	Magnesium ion
MgSO ₄	=	Magnesium sulfate
mg	=	Milligram
MgluR	=	Metabotropic glutamate receptor
min	=	minute
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
mM	=	Millimolar
Na ⁺	=	Sodium ion

NaCl	=	Sodium chloride
NaHCO ₃	=	Sodium bicarbonate
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NSS	=	Normal saline solution
OPA	=	Ortho-Phthaldialdehyde
OXC	=	Oxcarbazepine
p.m.	=	post meridian (afternoon)
PTZ	=	Pentylentetrazole-induced seizure test
PEG400	=	Polyethylene glycol 400
PHYT	=	Phenytoin
PI	=	Protective index
S.E.M.	=	Standard error of the mean
Sec	=	Second
SHMT	=	Serine hydroxymethyltransferase
TD ₅₀	=	Median toxic dose
TGB	=	Tiagabine
TPM	=	Topiramate
VGB	=	Vigabatrin
VHA	=	Valproyl hydroxamic acid
VPA	=	Valproic acid
ZNS	=	Zonisamide