การศึกษากลไกของฤทธิ์ต้านชักของ (เอ็น-ไฮดรอกซีเม็ทธิล)-2-โพรพิลเพ็นทามายด์

นางสาว สุมิตรา โกมลเจริญสิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3897-8

STUDY ON THE MECHANISMS OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF (N-HYDROXYMETHYL)-2-PROPYLPENTAMIDE

Miss Sumittra Gomonchareonsiri

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology (Inter-Departmental)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-3897-8

Thesis Title	Study on the Mechanisms of Anticonvulsant Activity of (N-Hydroxymethyl)-2-propylpentamide
By	Miss Sumittra Gomonchareonsiri
Field of Study	Physiology
Thesis Advisor	Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

Suchada Kiranandana
..... Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Prasong Siriviriyakun, M.D.)

Boonyong Tantisira
..... Thesis Advisor

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

Mayuree Tantisira
..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

Ratree Sudsuang
..... Member

(Professor Ratree Sudsuang, Ph.D.)

Wara Panich
..... Member

(Associate Professor Wara Panichkriangkrai, Ph.D.)

สุมิตรา โกมลเจริญสิริ : การศึกษากลไกของฤทธิ์ต้านชักของ(เอ็น-ไฮดรอกซีเม็ทธิล)-2-โพรพิลเพ็นทามายด์. (STUDY ON THE MECHANISMS OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF (N-HYDROXYMETHYL)-2-PROPYLPENTAMIDE) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ: 96 หน้า. ISBN 974-17-3897-8.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ (เอ็น-ไฮดรอกซีเม็ทธิล)-2-โพรพิลเพ็นทามายด์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ใหม่ของกรดวาลโปรอิกที่มีฤทธิ์ต้านชัก ต่อระดับของสารสื่อประสาทที่เป็นกรดอะมิโนในเปลือกสมองของหนูแรทในขณะตื่น โดยวิธีไมโครไดอะลัยซีส กรดอะมิโนที่ทำการศึกษาเหล่านี้ได้แก่กลูตาเมท แอสพาร์เตท กลัยซีนและกาบารวมทั้งศึกษาฤทธิ์ของสารดังกล่าวที่มีต่อตัวรับชนิด กาบา เอ, ไกลซีน และ เอ็นเอ็มดีเอ ในเซลล์ประสาทที่แยกได้ทันทีจากฮิปโปแคมปัสของหนูแรท และทำการศึกษาโดยการวัดกระแสทั้งหมดที่ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาท

(เอ็น-ไฮดรอกซีเม็ทธิล)-2-โพรพิลเพ็นทามายด์ ในขนาด 80 และ 160 มก/กก น้ำหนักตัว มีฤทธิ์ทำให้ระดับของกลูตาเมทในเปลือกสมองของหนูแรทในขณะตื่นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่จะพบการลดของกลูตาเมทเฉพาะแต่ในกลุ่มของหนูแรทที่ได้รับกรดวาลโปรอิกในขนาดสูง (440 มก/กก น้ำหนักตัว) เท่านั้น สารทดสอบนี้ไม่มีผลโดยตรงในการที่จะทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเข้าเซลล์ประสาทปิรามิดที่แยกได้ทันทีจากฮิปโปแคมปัสของหนูแรท และไม่มีผลต่อตัวรับชนิดกาบา เอ, ไกลซีนและ เอ็นเอ็มดีเอ การลดของระดับกลูตาเมทซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีฤทธิ์กระตุ้น น่าจะเป็นกลไกปฐมภูมิในการออกฤทธิ์ต้านชักของสารทดสอบ

เมื่อเปรียบเทียบผลของสารทดสอบกับกรดวาลโปรอิกในการทดลองนี้ที่พบว่า กรดวาลโปรอิกไม่มีฤทธิ์ต่อสารสื่อประสาทที่เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นใด นอกจากทำให้ระดับของกลูตาเมทลดลงหากให้กรดวาลโปรอิกแก่หนูแรทในขนาดสูง 440 มก/กก น้ำหนักตัว อาจกล่าวได้ว่า (เอ็น-ไฮดรอกซีเม็ทธิล)-2-โพรพิลเพ็นทามายด์ มีกลไกในการออกฤทธิ์ต้านชักไม่แตกต่างจากกรดวาลโปรอิก แต่มีความแรงมากกว่า โดยที่มีกลไกปฐมภูมิเกี่ยวข้องกับการลดลงของกลูตาเมท อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกที่ทำให้ระดับของกลูตาเมทลดลง รวมทั้งกลไกในการออกฤทธิ์ต้านชักอื่น นอกเหนือจากที่รายงานไว้ในการวิจัยนี้

สหสาขาวิชาสรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4175433730: MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: ANTICONVULSANT ACTIVITY / MECHANISMS OF ACTION / (N-HYDROXYMETHYL)-2-PROPYLPENTAMIDE

SUMITTRA GOMONCHAREONSIRI: STUDY ON THE MECHANISMS OF ANTICONVULSANT ACTIVITY OF (N-HYDROXYMETHYL)-2-PROPYLPENTAMIDE. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR BOONYONG TANTISIRA, Ph.D. 96 pp. ISBN 974-17-3897-8.

The purposes of the present study were to study the anticonvulsant mechanisms of N-Hydroxymethyl-2-propylpentamide (HPP), a newly synthesized valproic analogue with anticonvulsant activity, on the level of brain amino acid neurotransmitters of freely moving rats. Changes of brain amino acid namely, glutamate, aspartate, glycine and GABA (gamma-aminobutyric acid) were investigated by microdialysis technique. Furthermore, the effects of this compound on $GABA_A$, glycine and NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors in acutely dissociated rat hippocampal neurons using the whole-cell application of the patch-clamp techniques was also investigated.

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 only in rats receiving high dose (440 mg/kg B.W.) of VPA. However, HPP did not directly elicite inward currents in acutely dissociated rat hippocampal neurons. Additionally, $GABA_A$, glycine and NMDA currents were unaltered by HPP. Thus it is highly likely that a decrease in brain glutamate could primarily account for anticonvulsant effect of HPP observed in rats.

Based on our finding that VPA in the dose of 440 but not 220 mg/kg B.W. exclusively decreased the level of brain glutamate, it could be concluded hereby that HPP possessed the same mechanism of anticonvulsant activity as that exhibited by VPA but much stronger. A decrease in cortical glutamate seemed to be a primary anticonvulsant mechanism of HPP. Some mechanisms other than that demonstrated in the present study should be further investigated.

Inter-departmental Physiology	Student's signature.....
Field of study Physiology	Advisor's signature.....
Academic year 2003	Co-advisor's signature.....

Acknowledgements

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

I would like to extend my grateful thank to Prof. Hiroshi Watanabe and members of Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan as my hosts and kindly providing me experience on microdialysis study.

I would like to thank Assist. Prof. Dr. Chamnan Patarapanich, Department of Pharmaceutical Chemistry, for kindly supplying N-hydroxymethyl-2-propylpentamide and Lieutenant Suthep Jenthet for teaching whole cell patch-clamp technique. I am deeply in debted to Miss Pongpun Siripong and her members for allowing me to use the HPLC apparatus at Natural Product Research Section, Research Section, National Cancer Institute.

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

Finally, I would like to thank my family and my friends for their love and encouragement.

Contents

Contents (cont.)

List of Table

List of Figures

Figure Page

Figure Page

Figure Page

List of Abbreviations

α	=	alpha
δ	=	delta
ε	=	epsilon
γ	=	gamma
%	=	percent
θ	=	theta
β	=	beta
Ω	=	omega
π	=	pi
ρ	=	rho
μm	=	micrometre
μM	=	micromolar
^{0}C	=	degree Celcius
a.m.	=	ante meridian (before noon)
aCSF	=	artificial cerebrospinal fluid
AEDs	=	antiepileptic drug
AP-5	=	DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid
ATP	=	adenosine 5′-triphosphate
B.W.	=	body weight
BMC	=	bicuculline methochloride
BZ	=	benzodiazepine
Ca^{++}	=	calcium ion
CBZ	=	carbamazepine
Cl^{-}	=	chloride ion
Cm	=	centimeter
CNS	=	central nervous system
CSF	=	cerebrospinal fluid
DMSO	=	dimethyl sulfoxide

List of Abbreviations (cont.)

DZP	=	diazepam
e.g.	=	Exampli gratia (for example)
ED_{50}	=	median effective dose
EEG	=	electroencephalogram
ESM	=	ethosuximide
et al.	=	et alii (and others)
etc.	=	et cetera (and so on)
FBM	=	felbamate
g	=	gram
GABA	=	gamma-aminobutyric acid
GABA-T	=	gamma-aminobutyric acid transaminase
GBP	=	gabapentin
Gly	=	glycine
HPLC	=	high performance liquid chromatography
HPP	=	N-hydroxymethyl-2-propylpentamide
Hr	=	hour
i.p	=	intraperitoneal
ILAE	=	International League Against Epilepsy
IP_3	=	inositol-1, 4, 5,-triphosphate
K^+	=	potassium ion
LD_{50}	=	median lethal dose
LEV	=	levetiracetam
LTG	=	lamotrigine
MES	=	maximal electroshock seizure
Mg^{++}	=	magnesium ion
min	=	minute
ml	=	milliliter

List of Abbreviations (cont.)

mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
ms	=	millisecond
mV	=	millivolt
Na^+	=	sodium ion
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NSS	=	normal saline solution
OPA	=	ortho -phthaldialdehyde
OXC	=	oxcarbazepine
p.m.	=	post meridian (afternoon)
pA	=	picoampare
PB	=	pentobarbital sodium
PEG400	=	polyethylene glycol 400
PHT	=	phenytoin
PSS	=	physiological salt solution
PTX	=	picrotoxinin
PTZ	=	pentylenetetrazole
S.E.M.	=	standard error of the mean
sec	=	second
STR	=	strychnine
TGB	=	tiagabine
TPM	=	topiramate
v/v	=	volume by volume
VGB	=	vigabatrin
VPA	=	valproic acid
w/v	=	weight by volume
Zn^{++}	=	zinc ion
ZNS	=	zonisamide