

ฤทธิ์ทางประสาทเภสัชวิทยาของเตตราไฮโดรฟูเรน



นางสาวนุตติยา วีระวัชรชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-1867-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 16884139

# NEUROPHARMACOLOGICAL PROFILES OF TETRAHYDROFURAN

Miss Nuttiya Werawattanachai

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biopharmaceutical Sciences  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2005  
ISBN 974-14-1867-1

481857



นุตติยา วีระวัชรชัย : ฤทธิ์ทางประสาทเภสัชวิทยาของเตตราไฮโดรฟูแรน

(NEUROPHARMACOLOGICAL PROFILES OF TETRAHYDROFURAN)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ร.ท. หญิง ภัสราภา ไคววัฒน์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : PROF. TIMOTHY J. MAHER และ ผศ.ดร. สุรัชย์ อัญเชิญ, 94 หน้า. ISBN 974-14-1867-1.

วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยนี้คือการศึกษาค้นคว้าผลต่อพฤติกรรมของเตตราไฮโดรฟูแรน (THF) เปรียบเทียบกับแกมมาไฮโดรอกซีบิวไทโรแลคโตน (GBL) ซึ่งอาจมีรูปแบบคล้ายคลึงกันและเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน THF ไปเป็นแกมมาไฮดรอกซีบิวไทโรแลคโตน (GHB) ซึ่งออกฤทธิ์ผ่านตัวรับจำเพาะของ GABA<sub>B</sub> หรือ GHB การทดสอบความเป็นไปได้ของสมมติฐานนี้ใช้แบบจำลองพฤติกรรมของหนูถีบจักรหลายชนิดเป็นเครื่องมือ ได้แก่ การเคลื่อนไหว (locomotor activity) การพินสติ (righting reflex) การทรงตัวบนแกนหมุน (rotarod) พฤติกรรมในที่เปิดโล่ง (open-field) การสำรวจในทางกลกาทที่ยกสูง (elevated plus maze) การสำรวจในทางกรรูปตัววาย (Y-maze) การเอาตัวรอดในทางกลน้ำของมอริส (Morris water maze) การว่ายน้ำในที่เปิดกว้าง (open-space swimming) และการเลือกที่อยู่แบบมีเงื่อนไข (conditioned place preference)

ผลการทดลองแสดงว่าทั้ง THF และ GBL มีผลกดระบบประสาทส่วนกลางอย่างชัดเจน THF มีความแรงต่ำกว่า GBL เมื่อพิจารณาจากค่า TD<sub>50</sub> จากการฉีดเข้าช่องท้องในการทดสอบการพินสติ (15.18 มิลลิโมล/กก. เทียบกับ 4.60 มิลลิโมล/กก.) และการทรงตัวบนแกนหมุน (7.00 มิลลิโมล/กก. เทียบกับ 0.85 มิลลิโมล/กก.) THF และ GBL มีรูปแบบของผลกดการเคลื่อนไหวแตกต่างกัน โดยที่ THF ในช่วงขนาดยา 3, 5, และ 10 มิลลิโมล/กก. ลดการเคลื่อนไหวแบบขึ้นกับขนาดยาตลอดเวลา 150 นาทีของการทดสอบ ขณะที่ GBL ในช่วงขนาดยาค่า (1, 3, และ 5 มิลลิโมล/กก.) มีผลกดการเคลื่อนไหวระยะสั้น (60-80 นาที) และการเคลื่อนไหวกลับสู่ปกติในเวลาต่อมา อย่างไรก็ตาม GBL ในขนาด 10 มิลลิโมล/กก. กดการเคลื่อนไหวตลอดเวลา 150 นาทีของการทดสอบ THF และ GBL ไม่แสดงคุณสมบัติคล้ายกันในการทดสอบพฤติกรรมในที่เปิดโล่งและการสำรวจในทางกลกาทที่ยกสูง นอกจากนั้น THF และ GBL ในขนาดยา 0.1 และ 0.3 มิลลิโมล/กก. ไม่มีผลต่อความจำสถานที่เฉพาะหน้า (ระยะสั้น) ในการทดสอบการสำรวจในทางกรรูปตัววาย อย่างไรก็ตาม THF (1 และ 3 มิลลิโมล/กก.) และ GBL (1 มิลลิโมล/กก.) ต่อเนื่องทำให้เกิดความบกพร่องในการระลึกความจำสถานที่ระยะยาวและการเรียนรู้ซ้ำในการเอาตัวรอดในทางกลน้ำของมอริส THF และ GBL ในขนาดยา 0.1 และ 0.3 มิลลิโมล/กก. ไม่แสดงผลด้านซึมเศร้าในการทดสอบการว่ายน้ำในที่เปิดกว้าง การให้ THF (10 มิลลิโมล/กก.) แบบกึ่งเฉียบพลันแล้วทำทดสอบด้วย THF (15 มิลลิโมล/กก.) แสดงการชินยาอย่างชัดเจนต่อผลสงบระงับ-ทำให้หลับ อย่างไรก็ตาม THF (3 และ 5 มิลลิโมล/กก.) และ GBL (0.5 และ 1 มิลลิโมล/กก.) ไม่มีคุณสมบัติกระตุ้นความพึงพอใจเมื่อพิจารณาจากการทดสอบการเลือกที่อยู่แบบมีเงื่อนไข การศึกษาด้วยสารต้านฤทธิ์ต่างๆ แสดงว่า CGP-35348 ซึ่งเป็นสารต้านฤทธิ์ตัวรับ GABA<sub>B</sub> สามารถต้านผลทำให้การเคลื่อนไหวบกพร่องของ THF ในการทดสอบการทรงตัวบนแกนหมุนได้โดยมีช่วงออกฤทธิ์สั้น

ดังนั้นการศึกษาทั้งหมดชี้แนะว่า THF มีรูปแบบของผลกดระบบประสาทส่วนกลางคล้ายคลึงกับ GBL เมื่อพิจารณาจากการทดสอบกับพฤติกรรมต่างๆ ของหนูถีบจักร อย่างไรก็ตาม THF มีความแรงต่ำกว่า ขณะที่ในช่วงออกฤทธิ์ยาวกว่า GBL โดยที่กลไกการทำให้เกิดผลกดระบบประสาทส่วนกลางของ THF ซึ่งอย่างน้อยที่สุดในการทำให้การเคลื่อนไหวบกพร่อง อาจเกี่ยวข้องกันกับตัวรับ GABA<sub>B</sub>

สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิติ..... นุตติยา วีระวัชรชัย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ร.ท. หญิง ภัสราภา ไคววัฒน์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4376956033 : MAJOR BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES

KEY WORDS : TETRAHYDROFURAN / GAMMA-BUTYROLACTONE/ GAMMA-HYDROXYBUTYRIC ACID

NUTTIYA WERAWATTANACHAI : NEUROPHARMACOLOGICAL PROFILES OF TETRAHYDROFURAN. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. LT. PASARAPA TOWIWAT, Ph. D., THESIS CO-ADVISORS : PROF. TIMOTHY J. MAHER, Ph. D., AND ASST. PROF. SURACHAI UNCHERN, Ph. D., 94 pp. ISBN 974-14-1867-1.

The primary objective of this research was to study behavioral effects of tetrahydrofuran (THF) in comparison to those of gamma-butyrolactone (GBL) which might probably display a similar profile and eventually related to the possible conversion of THF to gamma-hydroxybutyric acid (GHB) which acts through GABA<sub>B</sub> or GHB specific receptors. Many animal behavioral models in mice were used to test the validity of this hypothesis including locomotor activity, righting reflex, rotarod, open-field, elevated plus maze, Y-maze, Morris water maze, open-space swimming, and conditioned place preference tests.

The results indicated that both THF and GBL caused marked CNS depression. THF was less potent than GBL as considered from intraperitoneal TD<sub>50</sub> values derived from righting reflex (15.18 mmol/kg versus 4.60 mmol/kg) and rotarod tests (7.00 mmol/kg versus 0.85 mmol/kg). THF and GBL had a different pattern of depressant effects on locomotor activity. At a dose range of 3, 5, and 10 mmol/kg, THF reduced locomotor activity in a dose-dependent manner for the entire 150-min test period. At a low dose range (1, 3, and 5 mmol/kg), GBL induced short-lived depressant effects on locomotor activity (60-80 min) and then locomotor activity was returned to baseline. However, at a dose of 10 mmol/kg, GBL suppressed locomotor activity for the entire 150-min test period. THF and GBL did not demonstrate anxiolytic property in the open-field and elevated plus maze tests. In addition, THF and GBL at the doses of 0.1 and 0.3 mmol/kg had no effects on working (short-term) spatial memory in the Y-maze test. However, deficits in retrieval and relearning of spatial long-term memory were observed with repeated administration of THF (1 and 3 mmol/kg) and GBL (1 mmol/kg) in Morris water maze test. At doses of 0.1 and 0.3 mmol/kg, THF and GBL did not demonstrate antidepressant effects in the open-space swimming test. Subacute treatment with THF (10 mmol/kg) followed by a challenging dose of THF (15 mmol/kg) showed marked tolerance on the sedative-hypnotic effects. However, THF (3 and 5 mmol/kg) and GBL (0.5 and 1 mmol/kg) did not possess reinforcing properties as considered from the conditioned place preference test. The study with different antagonists demonstrated that effects of THF on impairment of motor function in the rotarod test could be antagonized for a short duration by CGP-35348, a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist.

It is suggestive that THF possessed a similar profile of CNS depressive effects to that of GBL, as considered from various behavioral tests in mice. However, THF showed a less potency with a longer duration of action than those of GBL. The mechanism of THF-induced CNS depression, at least in the motor impairment, may involve the GABA<sub>B</sub> receptor.

Field of study Biopharmaceutical Sciences

Academic year 2005

Student's signature Nuttiya Werawattanachai.

Advisor's signature Lt. Pasarapa Towiwat

Co-advisor's signature Surachai Unchern

## ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to thank my thesis advisor, Assistant Professor Lt. Pasarapa Towiwat, and my thesis co-advisor, Professor Timothy J. Maher for giving me a chance to conduct a research at Massachusetts College of Pharmacy and Allied Health Sciences, Boston, Massachusetts, The United States of America. Their supervision, kindness and help are appreciated.

I would like to express my sincere gratitude to Assistant Professor Surachai Unchern, Associate Professor Pornpen Pramyothin, Associate Professor Boonyong Tantisira, Associate Professor Mayuree Tantisira, Assistant Professor Thongchai Sooksawate, Assistant Professor Warintorn Chavasiri, and Assistant Professor Nattaya Ngamrojanavanich for their advice, encouragement and kindly support.

I would like to thank the thesis committee for their valuable suggestions and helpful discussion.

I would like to extend my special appreciation to all staff members and friends in the Department of Pharmacology, as well as Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their assistances and consideration in my laboratory work.

Furthermore, my thanks are also extended to the staff of Office of Food and Drug Administration, Ministry of Public Health, Thailand for their valuable suggestion to import Gamma-hydroxybutyric acid (GHB), a schedule I controlled substance, a GHB-antagonist and a GABA<sub>B</sub>-receptor antagonist from the abroad supplier.

I would like to acknowledge the support of [(2E)-(5-hydroxy-5,7,8,9-tetrahydro-6H-benzo[a][7]annulen-6-ylidene} (NCS-382) and 3-aminopropyl-diethoxy-methyl-phosphinic acid (CGP-35348) from National Institutes on Drug Abuse (NIDA, USA), and the support by the grants from the Graduate School of Chulalongkorn University, and the Ministry of University Affairs, Thailand.

Finally, I am grateful to my family for their love, understanding and support.

# CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEWS.....	6
GHB and Its Precursor.....	6
Endogenous GHB in the Brain.....	7
Pharmacokinetics of GHB.....	9
Dose-Related Effects of GHB.....	10
Toxicological Analysis of GHB.....	11
Clinical Management of GHB Intoxication.....	12
GABA <sub>B</sub> and GHB Receptor Antagonists.....	13
CGP-35348, a Selective GABA <sub>B</sub> Receptor Antagonist.....	13
NCS-382, a Selective GHB Receptor Antagonist.....	14
GHB Addiction and Withdrawal.....	14
GHB and Dopamine.....	15
GHB and GABA Neurotransmission.....	15
Tetrahydrofuran.....	16
Chemical and Physical Properties.....	16
Uses.....	17
Pharmacokinetics.....	17
General Toxicity.....	17
Acute and Subchronic Toxicity.....	18
Genetic Toxicity.....	19
Carcinogenicity.....	19

	<b>Page</b>
Effect of THF on Drug-Metabolizing Enzymes.....	19
Human Exposure.....	20
Evidences for the Biotransformation of THF to GHB.....	21
Evidences for the Biotransformation of GBL to GHB.....	25
III MATERIALS & METHODS.....	28
1. Animals, Chemicals and Reagents .....	28
2. Experimental Methods.....	29
Righting Reflex Test.....	29
Rotarod Test.....	29
Technique of Injection into Cerebral Ventricles.....	29
Locomotor Activity Test.....	30
Open-Field Test.....	30
Elevated Plus Maze Test.....	31
Y-Maze Task.....	31
Morris Water Maze Test.....	32
Open-Space Swimming Test.....	32
Conditioned Place Preference Test.....	33
3. Experimental Designs.....	35
3.1 Determining the Dose-Response of THF and GBL for the Loss of Righting Reflex and Failure in the Rotarod Test.....	35
3.2 Investigating the Effects of THF and GBL on the Locomotor Activity.....	36
3.3 Investigating the Effects of THF and GBL on the Open-Field Study.....	36
3.4 Investigating the Effects of THF and GBL on the Elevated Plus Maze Test.....	36
3.5 Investigating the Effects of THF and GBL on the Spontaneous Alternation Behavior.....	36
3.6 Investigating the Effects of THF and GBL on the Spatial Memory.....	37
3.7 Investigating the Effects of THF on the Open-Space Swimming Test.....	37



	<b>Page</b>
3.8 Investigating the Tolerance to Chronic THF Treatment on the Loss of Righting Reflex Test.....	37
3.9 Investigating the Effects of THF and GBL on the Conditioned Place Preference Test.....	38
3.10 Clarifying whether the Motor Impairment Induced by THF Is Mediated by Activation of GHB Receptor, GABA <sub>B</sub> Receptor, and/or GABA <sub>A</sub> Receptor by Pretreatment with Receptor Antagonists.....	38
4. Data Analysis.....	39
IV RESULTS.....	40
1. Dose-Response of THF and GBL as Considered from the Loss of Righting Reflex and Failure in the Rotarod Test.....	40
2. Effects of THF and GBL on Locomotor Activity.....	40
3. Effects of THF and GBL on Open-Field Activity.....	42
4. Effects of THF and GBL on Elevated Plus Maze.....	42
5. Effects of THF and GBL on Spontaneous Alternation Behavior....	42
6. Effects of THF and GBL on Spatial Memory.....	42
7. Effects of THF and GBL on Open-Space Swimming Test.....	43
8. Tolerance of Mice with Chronic THF Treatment on the Loss of Righting Reflex and the Rotarod Test.....	43
9. Effects of THF and GBL on Conditioned Place Preference.....	43
10. Role of GABA and GHB Receptor Involvement in the Motor Impairment Induced by THF.....	44
V DISCUSSION.....	64
VI CONCLUSION.....	76
VII FUTURE RESEARCH.....	78
REFERENCES.....	79
VITAE.....	94

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>		<b>Page</b>
2-1	Pharmacological and Clinical Effects of GHB.....	11
4-1	Comparison of TD <sub>50</sub> Values of THF and GBL as Considered from the Failure in the Righting Reflex Test.....	45
4-2	Comparison of TD <sub>50</sub> Values of THF and GBL as Considered from the Failure in the Rotarod Test.....	45
4-3	Effects of THF and GBL on Open-Field Behavior.....	52

## LIST OF FIGURES

<b>Figure</b>		<b>Page</b>
1-1	The Conversion of GHB-Related Chemicals.....	3
1-2	Tetrahydrofuran Pathway Map.....	4
1-3	The Conceptual Framework of Neuropharmacological Profiles of Tetrahydrofuran Research.....	5
2-1	The Biotransformations of GHB and Its Precursors.....	7
2-2	The Chemical Structure of Tetrahydrofuran.....	16
2-3	Three Possible Activation Pathways of Ftorafur (FT) that Lead to 5-Fluorouracil (FUra) and the Expected Products of the Tetrahydrofuran Moiety.....	24
2-4	Proposed Activation Pathway of Ftorafur to 5-Fluorouracil (FUra) by the Microsomal Enzymes and the Major Metabolite of Succinaldehyde.....	24
4-1	Dose-Response Curves of THF and GBL for the Righting Reflex Test.....	46
4-2	Dose-Response Curves of THF and GBL for the Rotarod Test.....	47
4-3	Effects of Normal Saline, Corn Oil, and Butylated Hydroxytoluene (BHT) on Locomotor Activity.....	48
4-4	Effect of THF on Locomotor Activity.....	49
4-5	Effect of GBL on Locomotor Activity.....	50
4-6	Effects of Low Doses of THF and GBL on Locomotor activity.....	51
4-7	Effects of THF and GBL on the Elevated Plus Maze Test.....	53
4-8	Effects of THF and GBL on the Y-Maze Task.....	54
4-9	Effects of Chronic THF and GBL Treatments on Memory Retrieval as Determined by the Morris Water Maze Test.....	55
4-10	Effects of THF and GBL Treatments on the Open-Space Swimming Test.....	57
4-11	Induction of Tolerance to Chronic THF Treatment as Determined by the Righting Reflex Test.....	58

<b>Figure</b>		<b>Page</b>
4-12	Effects of THF and GBL on the Conditioned Place Preference Test.....	59
4-13	Effect of Pretreatment with CGP-35348, a GABA <sub>B</sub> Receptor Antagonist, on THF-Induced Impairment of the Rotarod Test.	60
4-14	Effect of Pretreatment with NCS-382, a GHB Specific Receptor Antagonist, on THF-Induced Impairment of the Rotarod Test.....	61
4-15	Effect of Pretreatment with Picrotoxin, a GABA <sub>A</sub> Receptor Antagonist, on THF-Induced Impairment of the Rotarod Test.	62
4-16	Effect of Pretreatment with Flumazenil, a GABA <sub>A</sub> Receptor Antagonist, on THF-Induced Impairment of the Rotarod Test.	63

## LIST OF ABBREVIATIONS

%	=	percent
°C	=	degree Celsius
μl	=	microliter
μmol	=	micromole
1,4-BD	=	1,4-butanediol
2 <sup>nd</sup>	=	the second
3 <sup>rd</sup>	=	the third
4 <sup>th</sup>	=	the forth
CGP-35348	=	3-aminopropyl-diethoxy-methyl-phosphinic acid
cm	=	centimeter
CNS	=	central nervous system
CYP	=	cytochrome
DA	=	dopamine
DZP	=	diazepam
e.g.	=	exempli gratia (for example)
ed.	=	edition
ED <sub>50</sub>	=	dose that causes an effect in 50% of animals
et al.	=	et alii (and other people)
etc.	=	et cetera (and other similar things)
Fig	=	figure
g	=	gram
GABA	=	gamma-aminobutyric acid
GABA <sub>A</sub>	=	gamma-aminobutyric acid subtype A
GABA <sub>B</sub>	=	gamma-aminobutyric acid subtype B
GABA-T	=	gamma-aminobutyric transaminase
GBL	=	gamma-butyrolactone
GC-MS	=	gas chromatography – mass spectrometry
GHB	=	gamma-hydroxybutyric acid
GIRK	=	G- protein-coupled inward rectifying K <sup>+</sup> channels
h	=	hour
i.c.v.	=	intracerebroventricular
i.p.	=	intraperitoneal injection

i.v.	=	intravenous injection
IC <sub>50</sub>	=	median inhibition concentration
IRL	=	inspiratory resistive load
K <sub>d</sub>	=	dissociation constant
kg	=	kilogram
L	=	liter
LD <sub>50</sub>	=	median concentration of a toxicant that will kill 50% of the test animals within a designated period
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mmol	=	millimole
MO	=	morphine
NADP	=	nicotinamide adenosine dinucleotide Phosphate
NADPH	=	nicotinamide adenosine dinucleotide Phosphate reduced
NCS-382	=	[(2E)-(5-hydroxy-5,7,8,9-tetrahydro-6H-benzo[a][7]annulen-6-ylidene)}
ND	=	not determined
nmol	=	nanomole
NMR	=	nuclear magnetic resonance
non- REM	=	non- rapid eye movement
ppm	=	part per million
REM	=	rapid eye movement
s.c.	=	subcutaneous
S.E.M.	=	standard error of mean
sec	=	second
SSA	=	succinic semialdehyde
SSADH	=	succinic semialdehyde dehydrogenase
SSR	=	succinic semialdehyde reductase
TD <sub>50</sub>	=	dose that causes toxic effect in 50% of animals
THF	=	tetrahydrofuran
U.S.	=	The United States of America
vol.	=	volume