

ANTICONVULSANT ACTIVITY AND EFFECTS OF AMIDE 1C
ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Miss Wandee Yeamvanichanun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacology
Inter-Department of Pharmacology Graduate School

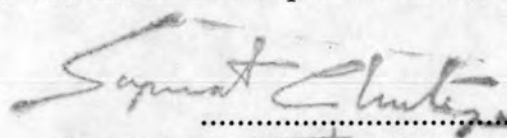
Chulalongkorn University

Academic Year 1997

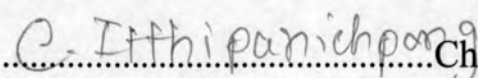
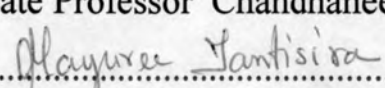
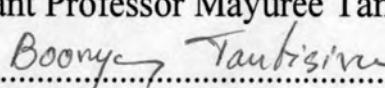
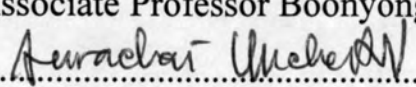
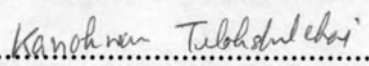
ISBN 974-637-268-8

Thesis Title Anticonvulsant Activity and Effects of Amide 1C
 on the Central Nervous System.
By Miss Wandee Yeamvanichanun
Inter-Department Pharmacology
Thesis Advisor Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph. D
Thesis Co-advisor Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph. D

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's degree.


.....Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

..........Chairman
(Associate Professor Chandanee Itthipanichpong, M.S.)
..........Thesis Advisor
(Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)
..........Thesis Co-advisor
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)
..........Member
(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)
..........Member
(Assistant Professor Kanokwan Tilokskulchai, Ph.D.)

วันดี เยี่ยมวาณิชพันธ์ : ฤทธิ์ด้านการชักและผลต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารเอมายด์ 1ซี (ANTICONVULSANT ACTIVITY AND EFFECTS OF AMIDE 1C ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM) อ. ที่ปริกษา ผศ. ดร. มยุรี ตันติสิระ อ. ที่ปริกษาร่วม : รศ. ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ, 76 หน้า, ISBN 974-637-268-8.

สารเอมายด์ 1ซีเป็นอนุพันธ์ใหม่ของกรควาลโปรอิกที่ถูกพัฒนาโดยคาดว่าจะมีฤทธิ์ด้านการชักและมีความเป็นพิษน้อยกว่ากรควาลโปรอิก การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการชัก, การทำให้ตาย และพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารเอมายด์ 1ซีในหนูถีบจักรเปรียบเทียบกับกรควาลโปรอิก ตลอดจนศึกษาฤทธิ์ต่อสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนโนเปิ้ลือกสมองใหญ่ของหนูขาวในขณะหลับด้วยวิธีไมโครไดอะลิสซิส

การศึกษาฤทธิ์ด้านการชักที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าและสารเคมีในหนูถีบจักร พบว่าการให้สารเอมายด์ 1ซี ทางช่องท้องและทางปากสามารถต้านการชักที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าได้ ส่วนการให้สารเอมายด์ 1ซี ทางช่องท้องสามารถต้านการชักที่เหนี่ยวนำด้วยสารเพนทิลินเตตระซอลและสารไบคูลูลินแต่ไม่สามารถต้านการชักจากสารสตริกนิน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการชักกับกรควาลโปรอิกพบว่าสารเอมายด์ 1ซี ทางช่องท้องมีขอบเขตของการต้านการชักคล้ายคลึงกับกรควาลโปรอิกเพียงแต่สารเอมายด์ 1ซี ออกฤทธิ์เร็ว (เอมายด์ 1ซี 15 นาที, กรควาลโปรอิก 30 นาที) และมีฤทธิ์แรงกว่าต่อการชักที่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า, สารเพนทิลินเตตระซอลและสารไบคูลูลินแต่ไม่สามารถต้านการชักจากสารสตริกนินเช่นเดียวกับกรควาลโปรอิก ขนาดของสารเอมายด์ 1ซีที่ต้านการชักในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (ED_{50}) ที่เหนี่ยวนำการชักด้วยไฟฟ้า, สารเพนทิลินเตตระซอลและสารไบคูลูลินเท่ากับ 81, 33 และ 214 มก/กก ตามลำดับ ส่วนของกรควาลโปรอิก เท่ากับ 218, 93 และ 395 มก/กก ตามลำดับ การศึกษาพิษของสารเอมายด์ 1ซี พบว่าขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งตาย (LD_{50}) ของสารเอมายด์ 1ซีและกรควาลโปรอิก เท่ากับ 602 และ 832 มก/กก ตามลำดับ แต่ค่าขอบเขตความปลอดภัยของสารเอมายด์ 1ซี ซึ่งแสดงด้วยสัดส่วนระหว่างขนาดของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งตายกับขนาดของสารที่ต้านการชักซึ่งเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าและสารเพนทิลินเตตระซอลในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งสูงกว่ากรควาลโปรอิก 2 เท่า (เอมายด์ 1ซี = 7.43, 18.24 และ กรควาลโปรอิก = 3.82, 8.95 ตามลำดับ) รวมทั้งค่า $PI (TD_{50}/ED_{50})$ ของสารเอมายด์ 1ซี (3.86, 9.48) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างขนาดของสารที่ทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (TD_{50}) กับขนาดของสารที่ต้านการชักได้ในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งของการชักที่เหนี่ยวนำทั้งจาก ไฟฟ้าและสารเพนทิลินเตตระซอลของสารเอมายด์ 1ซีก็ยิ่งสูงกว่ากรควาลโปรอิก (เอมายด์ 1ซี = 3.86, 9.48 และกรควาลโปรอิก = 1.77, 4.15) นอกจากนี้สารเอมายด์ 1ซี และกรควาลโปรอิกไม่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรแต่มีผลทำให้เพิ่มเวลาในการหลับของหนูถีบจักรที่ได้รับยาสลเบนโดบาร์บิทัล จากข้อมูลที่ได้แสดงว่าสารเอมายด์ 1ซี มีขอบเขตความปลอดภัยสูงกว่าและมีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการน้อยกว่ากรควาลโปรอิก.

การศึกษาระดับกรดอะมิโนโนเปิ้ลือกสมองใหญ่ของหนูขาวด้วยวิธีไมโครไดอะลิสซิสพบว่าเอมายด์ 1ซี (100, 200 มก/กก) และกรควาลโปรอิก (200, 400 มก/กก) ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับกรดอะมิโนโนเปิ้ลือกสมองในส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้ง(กาบา และ กลัยซีน) หรือมีฤทธิ์กระตุ้น (กลูตามาต และ แอสพาเตต) ต่อสมอง อย่างไรก็ตามการที่เอมายด์ 1ซีสามารถต้านการชักจากสารไบคูลูลินซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการจับของกรควาลโปรอิกกับตัวรับ อาจเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษากลไกการต้านการชักของสารเอมายด์ 1ซีกับตัวรับดังกล่าว

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารเอมายด์ 1ซี เป็นสารออกฤทธิ์ด้านการชักที่มีขอบเขตในการต้านการชักกว้างมีขอบเขตความปลอดภัยสูงและมีอาการข้างเคียงต่ำ ซึ่งขณะนี้ไม่สามารถอธิบายกลไกการต้านการชักได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาสารเอมายด์ 1ซี โดยละเอียดทั้งกลไกการออกฤทธิ์ ตลอดจนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาเพื่อที่จะพัฒนาสารตัวนี้ต่อไป.

ภาควิชาสหสาขาวิชาเภสัชวิทยา.....
สาขาวิชาเภสัชวิทยา.....
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปริกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปริกษาร่วม

C845774 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: ANTICONVULSANT/ GABA/ VALPROIC/ MICRODIALYSIS/AMIDE 1C

WANDEE YEAMVANICHANUN : ANTICONVULSANT ACTIVITY AND EFFECTS OF AMIDE 1C ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. THESIS-ADVISOR : ASSIST. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D. THESIS-CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D. 76 pp. ISBN 974-637-268-8.

Amide 1C is a newly synthesized valproic acid analog, being synthesized in an attempt to obtain a new compound with higher potency and less toxicity than its parent compound. Anticonvulsant activity, lethality and neurotoxicity of Amide 1C were investigated in mice using valproic acid (VPA) as a reference drug. Additionally, microdialysis technique was used to study the effect of Amide 1C on cortical amino acid neurotransmitters of anesthetized rats.

The evaluation of anticonvulsant activity was performed in mice using two standard screening models, the maximal electroshock seizures (MES) and pentylenetetrazol (PTZ) tests. In MES test, Amide 1C was found to be orally and intraperitoneally effective showing the maximal protection around 15 min after pretreatment while the corresponding value for VPA was 30 min. Like VPA, an intraperitoneal administration of Amide 1C exhibited protection in MES, PTZ and bicuculline tests but was ineffective in the strychnine test. The median effective doses (ED_{50}) of Amide 1C were 81, 33 and 214 mg/kg BW. in MES, PTZ and bicuculline tests, respectively, while corresponding values for VPA were 218, 93 and 395 mg/kg BW., respectively. These results indicated that Amide 1C exhibited a greater potency and a more rapid action than those of VPA.

In toxicity testing, although the median lethal dose (LD_{50}) of Amide 1C was lower than that of VPA, the relative safety margin (LD_{50}/ED_{50}) of Amide 1C were substantially higher than those of VPA, about 2 times higher, in both MES and PTZ tests. Minimal neurological deficit assessed by rotorod test and expressed as the median neurotoxic dose (TD_{50}) were 318 and 386 mg/kg BW. for Amide 1C and VPA respectively. Therefore a wider therapeutic of Amide 1C than VPA can be anticipated as the protective indice ($PI = TD_{50}/ED_{50}$) were 3.86 and 9.48 mg/kg BW. for Amide 1C while they were 177 and 4.15 mg/kg BW. for VPA in MES and PTZ test respectively. Furthermore, no significant depressant effect on motor activity was demonstrated by the ED_{50} of Amide 1C, though, Amide 1C in the dose of 100 mg/kg BW. was able to prolong the barbiturate sleeping time.


With regards to possible mechanisms of Amide 1C, microdialysis study in anesthetized rats indicated that neither inhibitory (GABA and glycine) nor excitatory (aspartate and glutamate) cortical amino acid neurotransmitters were altered by Amide 1C.

The present study demonstrated a promising prospect for Amide 1C as a candidate for a potent and broad spectrum antiepileptic drug with higher margin of safety and lower side effects. However, extensive studies are needed to elucidate its precise mechanism of action as well as pharmacological and toxicological profiles.

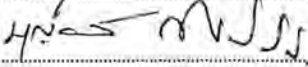
ภาควิชา..... สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา.....

สาขาวิชา..... เภสัชวิทยา.....

ปีการศึกษา..... 2540.....

ลายมือชื่อนิติ..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

Acknowledgements

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

I am also deeply grateful to Assoc. Prof. Dr. Phensri Thongnopnua for her helpful comments and valuable advices, Assist. Prof. Dr. Chamnan Patarapanich and Mr. Pornchai Rodesittisuk for synthesis and supplying the test substance.

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

I wish to express my grateful thanks to my parents and friends for their kindly advices and supports throughout my study.

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.....	1
Epilepsy.....	1
Epidemiologic Aspects of Epilepsy.....	1
Etiologic Aspect of Epilepsy.....	2
Nature and Mechanism of Seizures.....	3
Classification of Seizures.....	6
Amino Acid Neurotransmitters Alteration within Epileptic Brain.....	9
The mechanism of Action of Antiepileptic Durg.....	14
Valproic Acid.....	18
Amide 1C.....	23
II Materials and Methods.....	25
Experimental Animals.....	25
Equipments.....	25
Chemicals.....	26

Experimental Methods.....	27
Calculation and Statistical Analysis.....	34
III Results.....	36
Anticonvulsant Activity.....	36
Toxicity.....	37
Effects on Some Cortical Amino Acid Neurotransmitters in Relation to Anticonvulsant Activity.....	39
IV Discussion and Conclusion.....	60
References.....	65
Curriculum Vitae.....	76

List of Tables

Table	Page
1. International classification of epileptic seizures.....	7
2. Drug treatment in epileptic seizures.....	8
3. Anticonvulsant activity of intraperitoneally given Amide 1C and VPA	45
4. ED ₅₀ , LD ₅₀ , TD ₅₀ , PI and relative safety margin of Amide 1C and VPA	49

List of Figures

Figure	Page
1. Relations among cortical EEG, extracellular and intracellular recordings in a seizure focus.....	5
2. The scheme of GABA synthesis.....	10
3. Schematic illustration of the GABA _A receptor complex	13
4. The chemical structure of valproic acid.....	19
5. The chemical structure of Amide 1C.....	23
6. The diagram of HPLC system.....	35
7. Log dose-response curves of Amide 1C in MES test at pretreated times of 15, 30 and 60 min	40
8. Log dose-response curves of VPA in MES test at pretreated times of 15, 30 and 60 min	41
9. Comparison of ED ₅₀ at various pretreated times of intraperitoneally given Amide 1C and VPA in MES test in mice.....	42
10. Log dose-response curves of Amide 1C and VPA in PTZ test at their respective optimal pretreated time.....	43
11. Log dose-response curves of Amide 1C and VPA against bicuculline induced convulsion in mice.....	44
12. Log dose-curves of Amide 1C and VPA on acute toxicity in mice.....	46
13. Comparative neurotoxicity (%) of vehicle and tested substances, Amide 1C and VPA, given intraperitoneally in mice.....	47

14. Log dose response curves of Amide 1C and VPA in rotorod test in mice.....	48
15. Effects of intraperitoneal administration of Amide 1C and VPA on horizontal counts of locomotor activity in mice.....	50
16. Effects of intraperitoneal administration of Amide 1C and VPA on the barbiturate sleeping time in mice.....	51
17. HPLC chromatogram of OPA-derivatized standard amino acids....	52
18. HPLC chromatogram of OPA-derivatized amino acids from the rat cerebral cortex.....	53
19. Changes in the rat cortical aspartate and glutamate levels at various times after intraperitoneal administration of NSS and PEG 400.....	54
20. Changes in the rat cortical glycine and GABA levels at various times after intraperitoneals administration of NSS and PEG400.....	55
21. Effects of intraperitoneal administration of Amide 1C and VPA on the rat cortical aspartate levels.....	56
22. Effects of intraperitoneal administration of Amide 1C and VPA on the rat cortical glutamate levels.....	57
23. Effects of intraperitoneal administration of Amide 1C and VPA on the rat cortical glycine levels at various times.....	58
24. Effects of intraperitoneal administration of Amide 1C and VPA on the rat cortical GABA levels.....	59

List of Abbreviations

α	=	alpha
β	=	beta
γ	=	gamma
ω	=	omega
%	=	percent
μg	=	microgram
aCSF	=	artificial cerebrospinal fluid
AEDs	=	antiepileptic drugs
a.m.	=	ante meridian (before noon)
AMPA	=	alpha-amino 3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole
BW.	=	body weight
CBZ	=	carbamazepine
CNS	=	central nervous system
DS	=	depolarization shift
ED ₅₀	=	median effective dose
EEG	=	electroencephalogram
ESM	=	ethosuximide
et. al.	=	et alii (and other)
etc.	=	et cetera (and so on)
FBM	=	felbamate
g	=	gram
GABA	=	gamma aminobutyric acid
GABA-T	=	gamma aminobutyric acid transaminase
GAD	=	glutamic acid decarboxylase
GBP	=	gabapentin
GHB	=	gamma hydroxybutyric acid
GI	=	gastrointestinal
HPLC	=	high performance liquid chromatography
i.e.	=	such as
ILAE	=	international league against epilepsy
i.p.	=	intraperitoneal
KA	=	kainate
kg	=	kilogram
l	=	litre
LD ₅₀	=	median lethal dose
LTG	=	lamotrigine
mA	=	milliampere

MES	=	maximal electroshock seizures
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
NMDA	=	N-methyl-D-aspartic acid
NSS	=	normal saline solution
OPA	=	O-Phthaldialdehyde
PEG 400	=	polyethylene glycol 400
PHT	=	phenytoin
PI	=	protective index
p.m.	=	post meridian (afternoon)
p.o.	=	per oral
PTZ	=	pentylenetetrazole
rev/min	=	revolution per minute
sec	=	second
SEM	=	standard error of the mean
SSA	=	succinic semialdehyde
SSADH	=	succinic semialdehyde dehydrogenase
TD ₅₀	=	median toxic dose
TGB	=	tiagabine
TPM	=	topiramate
VGB	=	vigabatrin
VPA	=	valproic acid