

ฤทธิ์ด้านการชักและผลของเอ็น (2'-โพพิลเพนทาโนอิล)-2-ไพโรลิโดโนน
ต่อระดับกรดแกมมาอะมิโนบิวทิลริกในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาว



นาย ฉัตรชัย เผ่าทองจีน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-553-113-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

117166263

ANTICONVULSANT ACTIVITY OF
N(2'-PROPYLPENTANOYL)-2-PYRROLIDINONE
AND ITS EFFECTS ON
 γ -AMINOBTYRIC ACID (GABA) LEVELS
IN RAT CEREBRAL CORTEX

Mr. Chatchai Powthongchin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1994
ISBN 974-553-113-8

Thesis Title Anticonvulsant Activity of N(2'-propylpentanoyl)-2-pyrrolidinone and Its Effects on γ -Aminobutyric acid (GABA) Levels in Rat Cerebral Cortex

By Mr. Chatchai Powthongchin

Department Physiology

Thesis Advisor Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.

Thesis Co-advisor Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.



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

Thavorn Vajrabhaya..... Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

S. Jaidee..... Chairman
(Assistant Professor Samlee Jaidee, M.S. in Physiology)

Boonyong Tantisira..... Thesis Advisor
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

Mayuree Tantisira..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

Sodsai Assavavili..... Member
(Associate Professor Sodsai Assavavili, M.S. in Pharmacology)

Prasan Dhumma-upakorn..... Member
(Associate Professor Prasan Dhumma-upakorn, Ph.D.)



ฉัตรชัย เผ่าทองจีน : ฤทธิ์ด้านการชักและผลของ เอ็น (๒'-โพรพิลเพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน
ต่อระดับกรดแกมมาอะมิโนบิวทิลริกในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาว (ANTICONVULSANT
ACTIVITY OF N(2'-PROPYLPENTANOYL)-2-PYRROLIDINONE AND
ITS EFFECTS ON γ -AMINO BUTYRIC ACID (GABA) LEVELS IN RAT
CEREBRAL CORTEX) อ. ที่ปรึกษา รศ. ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ อ. ที่ปรึกษาร่วม ผศ. ดร.
มยุรี ตันติสิระ, ๘๘ หน้า. ISBN 974-553-113-8

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะทำการตรวจสอบหาฤทธิ์การต้านอาการชักของสาร เอ็น (๒'-โพรพิล
เพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน ซึ่งเป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อให้มีฤทธิ์ต้านอาการชัก โดยสมมุติฐานที่
ใช้ในการสังเคราะห์สารนี้อาศัยหลักการที่ว่าเมื่อให้สารนี้เข้าไปในร่างกายจะเข้าสู่สมองและถูกเปลี่ยนแปลง
เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอาการชักสองตัวคือ กรดวาโพรอิก และ กรดแกมมาอะมิโนบิวทิลริก

ผลจากการวิจัยพบว่าสารเอ็น (๒'-โพรพิลเพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน มีฤทธิ์ต้านอาการชักที่เกิด
จากการเหนี่ยวนำโดยใช้กระแสไฟฟ้าและสารเคมี (เพนทิลีนเตตราซอล) ได้ดีกว่ากรดวาโพรอิกซึ่งเป็นสารต้น
แบบทั้งในด้านความแรงและความเร็วในการออกฤทธิ์ นอกจากนี้จากการทดสอบในหลอดทดลองยังพบอีก
ว่าสาร เอ็น (๒'-โพรพิลเพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน ไม่เปลี่ยนแปลงที่สมองแต่จะเปลี่ยนแปลงที่ตับเกิดเป็น
กรดวาโพรอิก แต่จะไม่ให้กรดแกมมาอะมิโนบิวทิลริก ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบหาระดับกรดแกมมาอะมิ
โนบิวทิลริกในเปลือกสมองใหญ่ของหนูขาว เมื่อเปรียบเทียบกับระดับก่อนและหลังให้สารเอ็น (๒'-โพรพิลเพน
ทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงว่า สารเอ็น (๒'-โพรพิลเพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน มีฤทธิ์ต้าน
อาการชักได้ดีกว่ากรดวาโพรอิกที่เป็นสารต้นแบบและฤทธิ์ต้านอาการชักที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากการที่สารเอ็น
(๒'-โพรพิลเพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน เปลี่ยนแปลงที่สมองให้ กรดวาโพรอิก และ กรดแกมมาอะมิโน
บิวทิลริก แต่คาดว่าน่าจะเป็นที่เกิดจากการที่สาร เอ็น (๒'-โพรพิลเพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน มีฤทธิ์ในการต้าน
อาการชักด้วยตัวเอง ซึ่งกลไกต้านอาการชักของสาร เอ็น (๒'-โพรพิลเพนทานอยล์)-๒-ไพโรลิโดโนน ควรจะ
ต้องมีการศึกษาต่อไป

ภาควิชา สรีรวิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2536

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C275376 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD : N(2'-PROPYLPENTANOYL)-2-PYRROLIDINONE /
VALPROIC ACID / 2-PYRROLIDINONE / GABA /
MICRODIALYSIS

CHATCHAI POWTHONGCHIN : ANTICONVULSANT ACTIVITY
OF N(2'-PROPYLPENTANOYL)-2-PYRROLIDINONE AND ITS
EFFECTS ON γ -AMINOBUTYRIC ACID (GABA) LEVELS IN RAT
CEREBRAL CORTEX. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.
BOONYONG TANTISIRA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR ASSIST.
PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., 88 PP. ISBN 974-553-113-8

Investigation of anticonvulsant activity of Valproic acid (VPA) and N(2'-propylpentanoyl)-2-pyrrolidinone (VPP) has been carried out both *in vitro* and *in vivo*. Experimental design employed Maximal electroshock and Pentylentetrazole (PTZ) seizures in mice. Activities of the test compound have been examined at various doses and at different pretreated time. The peak protection effects of VPA and VPP against the Maximal electroshock seizure (MES) were observed at the pretreated time of 30 and 15 minutes respectively and they were used as pretreated time for further experiments on chemical seizure. The results obtained were evaluated and the dose-response curve were fitted by linear regression method. The calculated median effective dose is 221.72 mg/kg for VPA and 81.19 mg/kg for VPP in MES whilst 108.84 mg/kg for VPA and 77.89 mg/kg for VPP in chemical seizure. These results indicate that in comparison to VPA, VPP exhibit a greater potency in protection against MES with shorter onset.

Degradation of VPP has been performed *in vitro* by an incubation of the test compound with either liver or brain homogenate from 0 to 240 minutes. A progressive increase in VPA was observed only in liver but not in brain homogenate. Together with the result that no statistically significant changes of γ -aminobutyric acid (GABA) was observed in either liver or brain homogenate, it is suggested that the degradation of VPP to VPA occurred only in the liver. The negative effect of VPP on GABA which is the inhibitory neurotransmitter that play important roles in epilepsy was further investigated *in vivo*. In line with *in vitro* experiment ; microdialysis method revealed no increment in cortical GABA.

These results suggests that anticonvulsant activity observed in mice is resulted from VPP *per se*. This compound is degraded to VPA in liver. However its anticonvulsant activity appears not to be related to a conversion of VPP to VPA and GABA in the brain. Further investigation is needed to elucidate its mechanism as a potent anticonvulsant.

ภาควิชา สรีรวิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2536

ลายมือชื่อผู้ผลิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



Acknowledgements

I would like to thank Drs. Boonyong and Mayuree Tantisira for their guidance and helpful advice during the period of my research. My thanks are also due to Head of Department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences Chulalongkorn University and to Dean of Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, for allowing me to carry out this work in their departments.

I further acknowledge the colleagues in the laboratory for many helpful discussions and excellent assistance.

Similarly I am indebted to my colleagues at Silpakorn University for their tolerance and encouragement during the period of my leave.

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

Contents



	Page
Abstract (Thai)	iv
Abstract (English)	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
List of Tables	viii
List of Figures	ix
List of Abbreviations	xi
Chapter	
I Introduction	1
II Materials and Method	23
III Results and Discussion	31
IV Conclusion	50
References	52
Appendix	60
Curriculum Vitae	88

List of Tables

Table	Page
1. International Classification of Epileptic Seizures in 1981.	5
2. Distribution of seizure types in 1,005 epileptic patients with classifiable seizure.	6
3. Antiepileptic drugs of choice based on seizure classification.	7
4. Anticonvulsant activity of VPA given at 15 min. before MES.	35
5. Anticonvulsant activity of VPA given at 30 min. before MES.	35
6. Anticonvulsant activity of VPA given at 60 min. before MES.	35
7. Anticonvulsant activity of VPP given at 15 min. before MES.	36
8. Anticonvulsant activity of VPP given at 30 min. before MES.	36
9. Anticonvulsant activity of VPP given at 60 min. before MES.	36
10. Anticonvulsant activity of VPA given at 30 min. before PTZ seizure.	39
11. Anticonvulsant activity of VPP given at 15 min. before PTZ seizures.	39
12. Data for plotting dose-response curve of the anticonvulsive effect of VPA given at 30 min. before MES.	40
13. Data for plotting dose-response curve of the anticonvulsive effect of VPP given at 15 min. before MES.	40
14. Data for plotting dose-response curve of the anticonvulsive effect of VPA given at 30 min. before PTZ seizures.	41
15. Data for plotting dose-response curve of the anticonvulsive effect of VPP given at 15 min. before PTZ seizures.	41

List of Figures

Figure	Page
1. Drawings of electrocorticogram, extracellular unit recording, and intracellular recording during interictal and ictal behavior.	9
2. The model of GABA _A receptor protein complex.	11
3. Single channel GABA-evoked currents were concentration-dependent.	14
4. Histograms showing different effects of diazepam and phenobarbital on the properties of GABA evoked bursts.	15
5. The structure of 2-pyrrolidinone, GABA, 1-Acyl-2-pyrrolidinone.	17
6. Hydrolysis of 2-pyrrolidinone to GABA.	17
7. The synthesis scheme of VPP	21
8. The possible pathways of hydrolysis of 1-Acyl-2-pyrrolidinone to GABA.	22
9. Effect of pretreated time on anticonvulsant activity exhibited by various doses of VPA.	37
10. Effect of pretreated time on anticonvulsant activity exhibited by various doses of VPP.	38
11. Dose-response curve of VPA on MES at 30 minutes pretreated time.	42
12. Dose-response curve of VPP on MES at 15 minutes pretreated time.	43

Figure	Page
13. Dose-response curve of VPA on PTZ seizures at 30 minutes pretreated time.	44
14. Dose-response curve of VPP on PTZ seizures at 15 minutes pretreated time.	45
15. Histogram illustrating ED50 of VPA and VPP in MES and PTZ seizures models.	46
16. VPA concentration in rat's brain homogenate and in rat's liver homogenate at various times.	47
17. GABA concentration in rat's brain homogenate and in rat's liver homogenate at various times.	48
18. Per cent brain GABA concentration (before and after administration) of VPA treated rats and VPP treated rats VS time.	49

List of Abbreviations

%	=	Per cent
α	=	alpha
β	=	beta
γ	=	gamma
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celcius
μm	=	micrometre
μl	=	microlitre
-/kg	=	per kilogram
-/min	=	per minute
μM	=	micromolar
ADAM	=	9-anthryldiazomethane
BDZ	=	Benzodiazepine
CNS	=	Central Nervous System
ED ₅₀	=	Median effective dose
EEG	=	Electroencephalography
et. al.	=	et alii
etc.	=	et cetera
g	=	gram
GABA	=	gamma aminobutyric acid
GAD	=	L-glutamic acid decarboxylase
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
Hz	=	Hertz
i.e.	=	such as
ILAE	=	International League Against Epilepsy
M	=	Molar
mA	=	milli ampere

MES	=	Maximal Electroshock Seizure
mg	=	milligram
min.	=	minute
ml	=	milli litre
mM	=	milli molar
mm.	=	millimetre
nm	=	nanometre
PDS	=	Paroxysmal Depolarization Shift
PTZ	=	Pentylentetrazole
VPA	=	Valproic acid
VPP	=	N(2-propylpentanoyl)-2-pyrrolidinone