

ผลของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ต่อสารสื่อประสาทกลุ่มกรดอะมิโน
ในเปลือกสมองใหญ่ของหนูแรท



นางสาว อารี วนสุนทรวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544 ✓

ISBN 974-17-0077-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF VALPROYL HYDROXAMIC ACID
ON CORTICAL AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS IN RATS

Miss Aree Wanasuntronwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Physiology
Inter-Departmental Program in Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2001
ISBN 974-17-0077-6

อารี วนสุนทรวงค์ : ผลของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ต่อสารสื่อประสาทกลุ่มกรดอะมิโนในเปลือกสมองใหญ่ของหนูแรท. (Effect of valproyl hydroxamic acid on cortical amino acid neurotransmitters in rats) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.มยุรี ตันติสิระ 65 หน้า. ISBN 974-17-0077-6.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ซึ่งเป็นอนุพันธ์ใหม่ของกรดวาลโปรอิลที่มีฤทธิ์ต้านชัก โดยหาขนาดของสารทดสอบในการป้องกันหนูแรทครึ่งหนึ่งจากการถูกเหนี่ยวนำให้ชักโดยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า และศึกษาผลของสารทดสอบดังกล่าว ต่อระดับของสารสื่อประสาทที่เป็นกรดอะมิโนในเปลือกสมองของหนูแรทในขณะตื่น โดยวิธีไมโครไดอะลैซซิส กรดอะมิโนที่ทำการศึกษาเหล่านี้ได้แก่กลูตาเมต แอสพาร์เตท กลัยซีนและกาบา

จากการที่พบว่าขนาดของกรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิก ในการป้องกันหนูแรทครึ่งหนึ่งจากการถูกเหนี่ยวนำให้ชักโดยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า คือ 80(51-124) มก/กก น้ำหนักตัว ผู้วิจัยจึงทำการศึกษามผลของสารทดสอบนี้ในขนาด 100 และ 200 มก/กก น้ำหนักตัว ต่อระดับของสารสื่อประสาทที่เป็นกรดอะมิโน ในเปลือกสมองของหนูแรทในขณะตื่น และพบว่ากรดวาลโปรอิล ไฮดรอกซามิกในขนาดที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ขนาด มีฤทธิ์ทำให้ระดับของกลัยซีนในเปลือกสมองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่จะพบการเพิ่มของกาบาเฉพาะแต่ในกลุ่มของหนูแรทที่ได้รับสารทดสอบนี้ในขนาดสูง (200 มก/กก น้ำหนักตัว) เท่านั้น ดังนั้นการเพิ่มของระดับกลัยซีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง น่าจะเป็นกลไกปฐมภูมิในการออกฤทธิ์ต้านชักของสารทดสอบและนอกจากกลัยซีนแล้ว อีกส่วนหนึ่งของกลไกต้านชักของสารทดสอบในขนาดที่สูงขึ้น (200 มก/กก น้ำหนักตัว) อาจเป็นผลสืบเนื่องจากการที่สารทดสอบมีฤทธิ์เพิ่มระดับของกาบาซึ่งก็เป็นสารสื่อประสาทที่มีฤทธิ์ยับยั้งด้วยเช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบผลของสารทดสอบกับกรดวาลโปรอิกในการทดลองนี้พบว่า กรดวาลโปรอิกไม่มีฤทธิ์ต่อสารสื่อประสาทที่เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นใด นอกจากทำให้ระดับของกลูตาเมตลดลงหากให้กรดวาลโปรอิกแก่หนูแรทในขนาด 400 มก/กก น้ำหนักตัว อาจกล่าวได้ว่ากรดวาลโปรอิลไฮดรอกซามิก มีกลไกในการออกฤทธิ์ต้านชักแตกต่างไปจากกรดวาลโปรอิก โดยที่มีกลไกปฐมภูมิเกี่ยวข้องกับการเพิ่มของกลัยซีน ร่วมกับการที่มีฤทธิ์ทำให้ระดับของกาบาเพิ่มขึ้นในขนาดใช้ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกอื่น ๆ นอกเหนือจากที่รายงานไว้ในการวิจัยนี้

สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต..... อารี วนสุนทรวงค์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... มยุรี ตันติสิระ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... บุญยงค์ ตันติสิระ

4289719720: MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: ANTICONVULSANT/ AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS/ VALPROYL HYDROXAMIC ACID/MICRODIALYSIS

AREE WANASUNTRONWONG: EFFECT OF VALPROYL HYDROXAMIC ACID ON CORTICAL AMINO ACID NEUROTRANSMITTERS IN RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF.BOONYONG TANTISIRA, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC.PROF.MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., 65 pp. ISBN 974-17-0077-6.

The purposes of the present study were to study the effects of valproyl hydroxamic acid (VHA), a newly synthesized valproic analogue with anticonvulsant activity, on the level of brain amino acid neurotransmitters of freely moving rats. The maximal electroshock seizure (MES) test was used to determine the median effect dose (ED_{50}) of VHA. Changes of brain amino acid namely, glutamate, aspartate, glycine and GABA were investigated by microdialysis technique.

The ED_{50} of VHA to protect rats against MES test was found to be 80(51-124) mg/kg B.W. Thus the effects of VHA in the dose of 100 and 200 mg/kg B.W. were further investigated in freely moving rats. Significant increases in the level of cortical glycine, an inhibitory amino acid neurotransmitter, were noted in both of VHA-treated group whereas an increment of GABA was observed only in rats receiving high dose (200 mg/kg B.W.) of VHA. Thus it is highly likely that an increase in brain glycine could primarily account for anticonvulsant effect of VHA observed in rats. In addition the effect of VHA on GABA which is a major inhibitory brain amino acid could also play role when high dose of VHA was used.

Based on our finding that valproic acid (VPA) in the dose of 400 but not 200 mg/kg B.W. exclusively decreased the level of brain glutamate, it could be concluded hereby that VHA possessed different mechanism of anticonvulsant activity from that exhibited by VPA. An increase in cortical glycine seemed to be a primary anticonvulsant mechanism of VHA whereas an increment of GABA could take part as well if higher dose of VHA was used. Some mechanisms other than those demonstrated in the present study should be further investigated.

Inter-department Program of Physiology

Field of study Physiology

Academic year 2001

Student's signature..... Aree wanasuntronwong

Advisor's signature..... Boonyong Tantisira

Co-advisor's signature..... Mayuree Tantisira

Acknowledgements

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

I would like to thank Assist. Prof. Dr. Chamnan Patarapanich, Department of Pharmaceutical Chemistry, for kindly supplying valproyl hydroxamic acid and Miss Taunjai Numthongsakun for teaching microdialysis technique.

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

| | Page |
|---|------|
| Abstract (Thai) | iv |
| Abstract (English) | v |
| Acknowledgements | vi |
| Contents | vii |
| List of Table | ix |
| List of Figures | x |
| List of Abbreviations | xii |
| | |
| Chapter | |
| | |
| I Introduction | |
| Epilepsy | 1 |
| 1. Epileptogenesis | 2 |
| 2. Classification of epilepsy | 3 |
| 3. Amino acid neurotransmitters in epilepsy | 5 |
| 4. Therapy of epilepsy | 10 |
| Valproic acid | 14 |
| Valproyl hydroxamic acid | 16 |
| | |
| II Materials and Method | |
| Experimental animals | 19 |
| Chemicals | 19 |
| Drug preparations and administrations | 20 |
| Equipments | 21 |
| Experiment methods | 22 |
| Calculation and statistical analysis | 25 |

| | |
|---|----|
| III Results | |
| Median effective dose of VHA in rat with MES | 26 |
| Effects on some cortical amino acid neurotransmitter levels in freely moving rat | 26 |
| IV Discussion and conclusions | 41 |
| References | 44 |
| Appendix | 50 |
| Curriculum Vitae | 65 |

List of Table

| Table | | Page |
|-------|----------------------------------|------|
| 1 | Classification of epilepsy | 4 |

List of Figures

| Figure | Page |
|--|------|
| 1 Structure of GABA _A receptor complex | 6 |
| 2 Schematic views of four types of glutamate receptor | 9 |
| 3 Structural formula of valproic acid | 14 |
| 4 Structural formula of vaproyl hydroxamic acid | 16 |
| 5 Log dose-response curve of VHA (i.p.) against MES in rat at 15 min pretreated times | 27 |
| 6 HPLC chromatogram of OPA- derivatized amino acids from the rat cerebral cortex | 28 |
| 7 Change in the rat cortical aspartate levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400 | 29 |
| 8 Change in the rat cortical glutamate levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400 | 30 |
| 9 Change in the rat cortical glycine levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400 | 31 |
| 10 Change in the rat cortical GABA levels at various times after an intraperitoneal administration of NSS and PEG 400 | 32 |
| 11 Effects of an intraperitoneal administration of VPA and VHA on the rat cortical aspartate levels at various times | 33 |
| 12 Effects of an intraperitoneal administration of VPA and VHA on the rat cortical glutamate levels at various times | 34 |
| 13 Effects of an intraperitoneal administration of VPA and VHA on the rat cortical glycine levels at various times | 35 |
| 14 Effects of an intraperitoneal administration of VPA and VHA on the rat cortical GABA levels at various times | 36 |
| 15 Effects of VPA and VHA on the total amount of the rat cortical aspartate in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the tested substances | 37 |

| Figure | Page |
|--------|---|
| 16 | Effects of VPA and VHA on the total amount of the rat cortical glutamate in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the tested substances 38 |
| 17 | Effects of VPA and VHA on the total amount of the rat cortical glycine in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the tested substances 39 |
| 18 | Effects of VPA and VHA on the total amount of the rat cortical GABA in the dialysate collected for 3 hours after an intraperitoneal administration of the tested substances 40 |

List of Abbreviations

| | | |
|--------------------|---|---|
| α | = | Alpha |
| β | = | Beta |
| ε | = | Epsilon |
| δ | = | Delta |
| γ | = | Gamma |
| ρ | = | Rho |
| μ | = | Micro |
| μg | = | Microgram |
| μl | = | Microlitre |
| μm | = | Micrometre |
| μM | = | Micromolar |
| % | = | Percent |
| Ca^{2+} | = | Calcium ion |
| Cl^- | = | Chloride ion |
| HCO_3^- | = | Hydrogen carbonate ion |
| Mg^{2+} | = | Magnesium ion |
| K^+ | = | Potassium ion |
| Na^+ | = | Sodium ion |
| aCSF | = | Artificial cerebrospinal fluid |
| a.m. | = | ante meridian (before noon) |
| AMPA | = | Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl- isoxazole-4-propionic acid |
| B.W. | = | Body weight |
| cAMP | = | Cyclic adenosine monophosphate |
| CNS | = | Central nervous system |
| cm | = | Centimeter |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | Degree celsius |
| ED_{50} | = | Median effective dose |

| | | |
|------------------|---|--|
| EEG | = | Electroencephalogram |
| e.g. | = | Exempli gratia (for example) |
| et al. | = | et alii (and other) |
| FBM | = | Felbamate |
| GABA | = | Gamma aminobutyric acid |
| GABA-T | = | Gamma aminobutyric acid transaminase |
| GAD | = | Glutamic acid decarboxylase |
| GBP | = | Gabapentine |
| GHB | = | Gamma hydroxybutyric acid |
| GluR | = | Ionotropic glutamate receptor |
| GTP | = | Guanidine triphosphate |
| g | = | gram |
| HPLC | = | High performance liquid chromatography |
| hr | = | Hour |
| 5-HT | = | 5-hydroxytryptamine |
| Hz | = | Hertz |
| ILAE | = | International League Against Epilepsy |
| i.p. | = | Intraperitoneal |
| KA | = | Kainic acid |
| kg | = | Kilogram |
| L | = | Litre |
| LD ₅₀ | = | Median lethal dose |
| LTG | = | Lamotrigine |
| mA | = | Milliampere |
| M | = | Molar |
| MES | = | Maximal electroshock |
| mGluR | = | Metabotropic glutamate receptor |
| mg | = | Milligram |
| min | = | Minute |
| ml | = | Millilitre |
| mm | = | Millimetre |

| | | |
|------------------|---|--|
| mM | = | Millimolar |
| NMDA | = | N-methyl-D-aspartate |
| NSS | = | Normal saline solution |
| OPA | = | Ortho -Phthaldialdehyde |
| PEG400 | = | Polyethylene glycol 400 |
| PI | = | Protective index |
| p.m. | = | post meridian (afternoon) |
| PTZ | = | Petylenetetrazole-induced seizure test |
| S.E.M. | = | Standard error of the mean |
| sec. | = | Second |
| SSAD | = | Succinic semialdehyde |
| SSADH | = | Succinic semialdehyde dehydroxygenase |
| TD ₅₀ | = | Median toxic dose |
| TGB | = | Tiagabine |
| TPB | = | Topiramate |
| VGB | = | Vigabatrin |
| VHA | = | Valproyl hydroxamic acid |
| VPA | = | Valproic acid |
| VPD | = | Valpromide |