



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

ผลของวัลโปรอิล ยูเรีย ต่อดั้วรับกลูตาเมทที่ถูก
เหนี่ยวนำให้แสดงออกบนผนังเซลล์ไข่กบ

โดย

ศูนย์วิทยุทรัพยากร

มยุรี ตันตีสิริระ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บุญยงค์ ตันตีสิริระ

ชำนาญ ภัทรพานิช

เพ็ญพิมล ผลทรัพย์

เมษายน 2552

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้องต่างๆดังนี้

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัย

คณะกรรมการติดตามและประเมินผลโครงการวิจัยที่ให้ข้อแนะนำและแก้ไขโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ลีวนิช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการทำการทดลองและเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการบันทึกผล

Prof. K. Igarashi คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเตรียมดีเอ็นเอ

ภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความอนุเคราะห์การใช้สถานที่ วัสดุและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัย : ผลของวัลโปรซิล ยูเรีย ต่อตัวรับกลูตาเมทที่ถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกบนผนังเซลล์ไขกบ

ผู้วิจัย : รศ.ดร.มยุรี ตันติสิระ
 รศ.ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ
 ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช
 อ.เพ็ญพิมล ผลทรัพย์

ทำวิจัยเสร็จเมื่อ : กันยายน 2550

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษากลไกในการด้านซึกของสารเอ็น-(2-โพพิลเพนทาโนอิล)ยูเรีย หรือ วีพียู ซึ่งเป็นอนุพันธ์ใหม่ของวาลโปรเอทที่สังเคราะห์ขึ้นมา โดยศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ ชนิดเอ็นอาร์เอ1เอ/เอ็นอาร์2บี ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกบนผิวเซลล์ไขกบสายพันธุ์ซีโนปุต ด้วยการฉีดซีอาร์เอ็นเอและใช้เทคนิคการวัดกระแสที่ศักย์ไฟฟ้าคงที่ด้วยขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว

การให้สารวีพียูเพียงชนิดเดียว ในขนาด 1-300 ไมโครโมลาร์ ไม่มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงความสามารถในการนำไฟฟ้าของไขกบ สายพันธุ์ซีโนปุต ในขณะที่การให้กลูตาเมทขนาด 0.01-300 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับกลัยซีนในขนาด 10 ไมโครโมลาร์ จะทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเข้าสู่เซลล์ไขกบในปริมาณที่แปรตามความเข้มข้นของกลูตาเมทที่ให้ โดยมีค่าความเข้มข้นที่จะทำให้เกิดการตอบสนองกึ่งหนึ่งของการตอบสนองสูงสุดที่ 2.26 ± 0.31 ไมโครโมลาร์ เมื่อให้สารวีพียูร่วมกับกลูตาเมท พบว่าสารวีพียูในขนาด 100-300 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งฤทธิ์ของกลูตาเมทที่มีต่อตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ ชนิดเอ็นอาร์เอ1เอ/เอ็นอาร์2บี ได้ในเชิงแข่งขันและผันกลับได้คล้ายคลึงกับสาร AP5 ซึ่งเป็นสารต้านฤทธิ์ในเชิงแข่งขันที่จำเพาะกับตำแหน่งการจับของกลูตาเมทกับตัวรับเอ็นเอ็มดีเอ ดังจะเห็นจากการเคลื่อนกราฟแสดงการตอบสนองของกลูตาเมทออกไปทางด้านขวาโดยไม่เปลี่ยนแปลงระดับการตอบสนองสูงสุด จากการที่พบว่าฤทธิ์ยับยั้งของสารวีพียูในขนาด 100 ไมโครโมลาร์ต่อกลูตาเมทในขนาด 3 ไมโครโมลาร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง holding potential ที่ลดจก -150 จนถึง +50 มิลลิโวลท์หรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลัยซีน แสดงว่าการต้านฤทธิ์ดังกล่าวไม่ขึ้นกับ voltage หรือความเข้มข้นของกลัยซีน นอกจากนี้ยังพบว่าสารวีพียูในขนาด 100-300 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งฤทธิ์กระตุ้นของสเปียร์มีนต่อตัวรับกลูตาเมท ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ว่า กลไกการด้านซึกของสารวีพียูในสัตว์ทดลองอาจมีส่วนหนึ่งที่เป็นผลสืบเนื่องจากการออกฤทธิ์ยับยั้งต่อตัวรับเอ็นเอ็มดีเอชนิดเอ็นอาร์เอ1เอ/เอ็นอาร์2บี

Project title : Effects of valproyl urea on glutamate receptors expressed on cell membrane of oocytes of *Xenopus laevis*.

Name of the Investigators : Assoc.Prof.Mayuree Tantisira, Ph.D.
Assoc.Prof. .Boonyong Tantisira, Ph.D.
Assist.Prof Chamnan Piarapanich, Ph.D.
Ms.Penphimon Ponsup, M.Sc

Year : 2007

Abstract

The main goal of this study was to gain insight into the mechanisms underlying the anticonvulsant activity of N-(2-Propylpentanoyl)Urea (VPU), a new synthetic valproate derivative, on NR1A/NR2B NMDA receptors subtype using the two-electrode voltage-clamp technique in *Xenopus laevis* oocytes injected with cRNAs.

Application of VPU (1-300 μM) produced no changes on the membrane conductance of *Xenopus* oocytes. However, co-application of glutamate (0.01 - 300 μM) and 10 μM glycine induced inward currents with a dose-response curve giving the EC_{50} of glutamate at $2.26 \pm 0.31 \mu\text{M}$. Whereas 1 mM of VPA produced very marginal effect, VPU (100- 300 μM) exerted a reversible and competitive inhibition of glutamate response on NR1A/NR2B NMDA receptor characterized by shifting the glutamate concentration curve to the right with no alteration of maximal response. Similar response was elicited by AP5, a selective, competitive NMDA binding site antagonist at the concentration of 10 μM . Thus the inhibitory of VPU seems to be comparatively weaker than AP5. Furthermore, based on the results that the inhibitory effects of 100 μM VPU on inward currents induced by 3 μM glutamate did not alter either when the holding potential was stepwise increased from -150 to + 50mV or when different concentration of glycine, a co-agonist of glutamate, was co-applied, it is apparent that antagonistic effect of VPU on glutamate-induced inward current was neither voltage nor glycine dependent. In addition, it was found that VPU (100-300 μM) significantly decrease stimulatory effect of spermine on glutamate response. Taken into consideration that polyamines has been reported to be increased on the face of seizure or ischemia, it is suggestive that inhibitory effect of VPU on NR1A/NR2B NMDA receptors, though rather weak, may, in concert with its effect on GABA_A receptor and perhaps with some other mechanism that remain to be identified, contribute to its anticonvulsant effect in vivo.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญ.....	iv
รายการตารางประกอบ.....	v
รายการภาพประกอบ.....	vi
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	4
วัสดุและวิธีการวิจัย.....	5
ผลการวิจัย.....	10
การอภิปรายและการสรุปผล.....	28
ข้อเสนอแนะ.....	31
เอกสารอ้างอิง.....	32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่า Mean $EC_{50} \pm S.E.M.$ และ Hill coefficient ของ glutamate หรือ glutamate ร่วมกับ AP5, VPA และ VPU ที่คำนวณมาจากค่า log concentration-responses curves20



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1. Valproic acid และ N-(2-propylpentanoyl) urea or VPU.....	1
รูปที่ 2. NMDA receptor model แสดงบริเวณการจับของ ยาที่ไปออกฤทธิ์.....	4
รูปที่ 3.1 แสดงรูปของกระแสที่เกิดขึ้นจากการใช้ glutamate ในระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM ร่วมกับ glycine 10 μM ต่อตัวรับเอ็นเอ็มดีเอชนิด NR1A/NR2B ที่ถูกทำให้ปรากฏบนผนังเซลล์ไซกอบ <i>Xenopus</i> โดยการฉีด mRNA (ตึงค่า potential ไว้ที่ $V_h = -70$ mV).....	13
รูปที่ 3.2 Glutamate log concentration-response relationship.....	14
รูปที่ 3.3 Glutamate log concentration responses curves ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลในการยับยั้งของ AP5 ที่ความเข้มข้น 10 μM	15
รูปที่ 3.4 Glutamate log concentration-responses curves เมื่อมีและไม่มี VPU ที่ความเข้มข้น 10 μM	16
รูปที่ 3.5 ผลการยับยั้งของ VPU ที่ความเข้มข้น 100 μM ต่อ glutamate log concentration-responses curves.....	17
รูปที่ 3.6 ผลของการยับยั้งของ VPU ที่ความเข้มข้น 300 μM ต่อ glutamate log concentration-responses curves	18
รูปที่ 3.7 ภาพโดยรวม แสดงถึงผลการยับยั้ง glutamate concentration-responses curves บนตัวรับ NMDA โดย VPU ที่ความเข้มข้น 10, 100 หรือ 300 μM	19
รูปที่ 3.8 ผลของการยับยั้งของ VPA ที่ความเข้มข้น 1mM ต่อ glutamate log concentration-responses curves	21
รูปที่ 3.9 ผลการยับยั้งของ VPU (100 μM) และ AP5(10 μM) ต่อ การเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate (3 μM) + glycine (10 μM)	22
รูปที่ 3.10 I-V relationships ของ glutamate จากไซกอบที่ได้รับการฉีด NR1A/NR2B mRNA ก่อนและหลังการให้ VPU ที่ความเข้มข้น 100 μM	23
รูปที่ 3.11 log concentration-responses relationship ของ glutamate (3 μM) ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆของ glycine	24

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.12 log concentration-responses relationship ของ glutamate (3 μM) ต่อความเข้มข้นระดับต่างๆของ glycine ในขณะที่มีและไม่มี VPU (10 μM).....	25
รูปที่ 3.13 กราฟแท่งแสดงถึงฤทธิ์ในการยับยั้งของ VPU (100 μM) ต่อการเกิดกระแสไฟฟ้าจาก glutamate เมื่อมีหรือไม่มี spermine (100 μM).....	26
รูปที่ 3.14 ผลของการยับยั้งของ VPU (100 μM) ต่อ glutamate log concentration-responses curves เมื่อมีหรือไม่มี spermine(100 μM).....	27

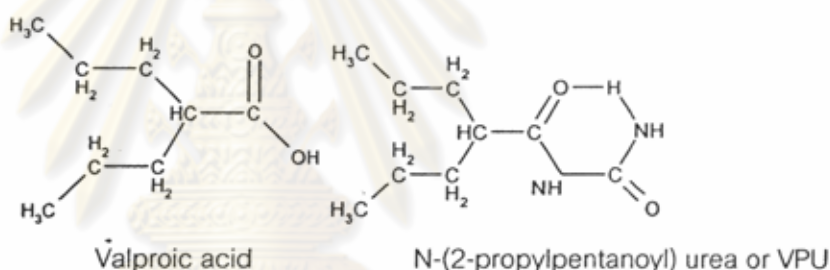


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคลมชัก (Epilepsy) เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติทางสมองที่พบมากที่สุดโรคหนึ่ง ปัจจุบันยังไม่ทราบพยาธิสรีรวิทยาของโรคลมชักอย่างแน่ชัด แต่เชื่อกันว่ากลไกการเกิดโรคลมชักมักมีหลายกลไก ซึ่งอาจเกิดร่วมกันได้ (Rowgawski และPorter,1990; Kwanและคณะ, 2001) โดยเฉลี่ยแล้วเราพบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคลมชัก 1 คน ต่อประชากร 200 คน (Ure และ Parassolo, 2000) ในจำนวนประชากรที่ประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคลมชักนี้ พบว่ามีผู้ป่วยถึง 20% ที่เราไม่สามารถควบคุมการชักได้อย่างสมบูรณ์ด้วยยาต้านชักที่มีในปัจจุบัน (Penry, 1988 ; Porter, 1993) จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีผู้พยายามเสาะแสวงหายาต้านชักตัวใหม่ทั้งชนิดที่เป็นสารใหม่ และชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของยาต้านชักตัวเก่าที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (Hadad และ Bailer, 1997 ; Bailer และคณะ, 1994 ; Bailer, 1999 ; Bailer และคณะ, 2004 ; Isoherranen และคณะ, 2001 ; Spiegelstein และคณะ, 1999)



รูปที่ 1 Valproic acid และ N-(2-propylpentanoyl) urea or VPU

Valproic acid (2-propenpentanoic acid, n-dipropylacetic acid, VPA รูปที่ 1) เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ. 1882 และถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ต้านชักโดย Meunier และคณะในปี ค.ศ. 1963 (Bruni, 1996 ; Rowen, 2000) ต่อมาได้มีการนำ VPA มาใช้เป็นยาต้านชักในปี ค.ศ. 1976 ปัจจุบันได้มีการนำ VPA มาใช้รักษาโรคลมชักกันอย่างแพร่หลาย โดยจัดเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านชักในระดับปานกลาง VPA มีสูตรโครงสร้างไม่ซับซ้อน สามารถออกฤทธิ์ได้กว้าง กล่าวคือใช้ได้ผลดีกับทั้ง generalized seizure (absence, tonic-clonic, myoclonic) และ partial seizure ซึ่งปกติจะถูกควบคุมได้ดีโดยยาต่างกลุ่มกัน นอกจากนี้ยังมีมีรายงานว่า เรามาสามารถนำ VPA มาใช้รักษาความผิดปกติทางจิตประสาทอื่นๆได้อีกด้วย(Davis และคณะ, 1994)

ถึงแม้จะมีการใช้ VPA เป็นยาต้านชักกันอย่างกว้างขวาง แต่ในปัจจุบันเรายังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของ VPA อย่างชัดเจน พบว่า VPA อาจมีกลไกการออกฤทธิ์หลายกลไกได้แก่

- 1) VPA อาจเพิ่มระดับ Gamma aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (Davis และคณะ, 1994 ; Loscher, 1993)
- 2) VPA อาจสนับสนุนฤทธิ์การยับยั้งของ GABA โดยไปเพิ่มการตอบสนองของสมองต่อ GABA (Davis และคณะ, 1994)
- 3) VPA อาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำให้มีการลด excitability ของเซลล์ประสาทลง (Loscher, 1993 ; MacDonald และ Kelly, 1993 ; Brodie, 1996 ; Davis และคณะ, 1994)

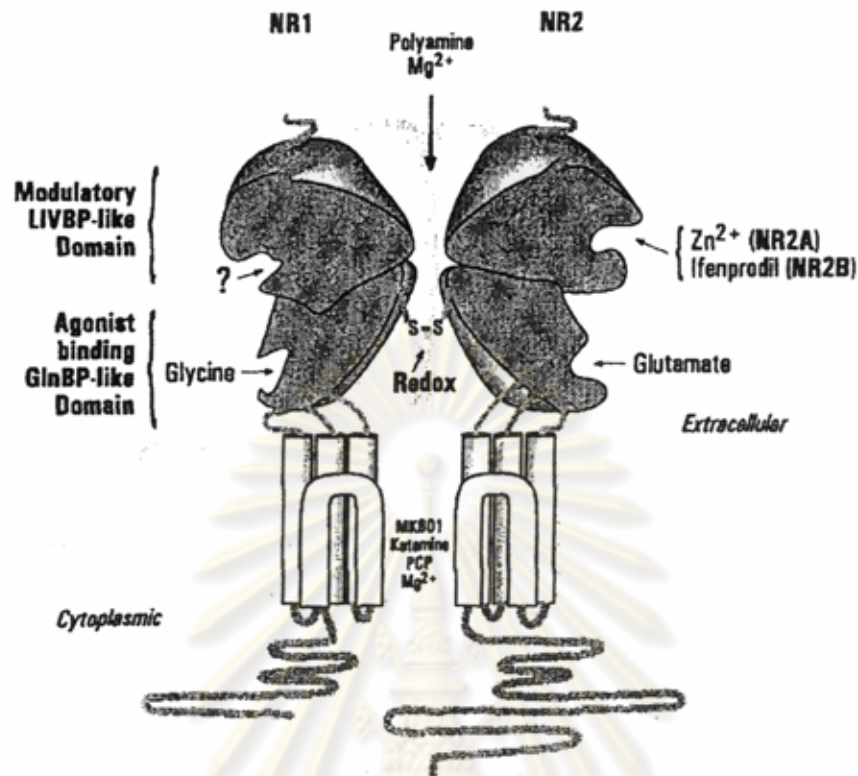
ถึงแม้จะมีการใช้ VPA ทางคลินิกอย่างกว้างขวางแต่ VPA ก็จัดเป็นยาต้านชักที่ออกฤทธิ์ระดับปานกลาง เนื่องจากผ่าน blood-brain barrier ได้ไม่ดีเท่ายาต้านชักตัวอื่นๆ และยังพบว่า VPA ทำให้เกิดอาการข้างเคียงตั้งแต่ระดับเล็กน้อยจนถึงรุนแรงมาก ที่สำคัญได้แก่ความเป็นพิษต่อตับทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (Eadie และคณะ, 1990; Davis และคณะ, 1994) มีผลต่อทารกในครรภ์ หรือตัวอ่อนในสัตว์ทดลองโดยทำให้เกิดความผิดปกติตั้งแต่กำเนิด (Davis และคณะ, 1994) มีพิษต่อไต, กล้ามเนื้อโครงร่าง, ทำให้เกิดอาการซึมเศร้า เคนโพรเซ และมีผลต่อทางเดินอาหาร (Davis และคณะ, 1994; Brodie และ Dichter, 1996; Stringer, 1998) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีผู้พยายามพัฒนาสูตรโครงสร้างของ VPA เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงขึ้น แต่มีความเป็นพิษและผลข้างเคียงลดน้อยลง (Elmarzar และคณะ, 1993; Bailer และคณะ, 1994; Liu และ Pollack, 1994; Tantisira และคณะ, 1997; Hadad และ Bailer, 1997; Spielstein และคณะ, 1999; Bailer, 1999; Isoherranen และคณะ 2001; Bailer และคณะ, 2004)

Valproyl Urea (N-(2 propylpentanoyl) urea, VPU) VPU (รูปที่1) ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 1992 (Saisorn และคณะ, 1992) โดยมีโครงสร้างเป็น monoureide analog ของ VPA โครงสร้างดังกล่าวมีลักษณะส่วนหนึ่งเป็น VPA และอีกส่วนหนึ่งคล้ายกับโครงสร้างของ barbiturate ring ซึ่งทั้ง VPA และ barbiturate ต่างมีฤทธิ์ต้านชักได้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านชักของ VPU (บุญยงค์ ดันดีสิระ และคณะ, 2541; Tantisira และคณะ, 1997) พบว่า VPU มีฤทธิ์การต้านชักดีกว่า VPA ซึ่งเป็นสารต้นแบบทั้งโดยการทดสอบด้วยการกระตุ้นสมองสัตว์ทดลองด้วยกระแสไฟฟ้า (maximal electroshock seizure, MES test) และโดยการกระตุ้นสมองสัตว์ทดลองด้วยสาร pentylenetetrazole (PTZ test) VPU สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในสัตว์ทดลองที่ได้รับนี้ทางปาก นอกจากนี้ยังพบว่า VPU มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำกว่า VPA มาก ทำให้ VPU มีความปลอดภัยสัมพัทธ์สูงกว่า VPA เกือบ 10 เท่า นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ก็ยังพบอีกว่า VPU มีฤทธิ์ข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่ำกว่า VPA (Tantisira และคณะ, 1997)

ผลการศึกษาเบื้องต้นบ่งชี้ว่า VPU เป็นอนุพันธ์ที่น่าจะมีศักยภาพดีพอที่จะพัฒนาเป็นยาต้านชักตัวใหม่ได้ จึงทำให้มีการศึกษาเพิ่มเติมในแง่มุมต่างๆโดยเปรียบเทียบกับ VPA โดยนักวิจัยในคณะเภสัชศาสตร์ พบว่า VPU มีฤทธิ์ต่อตัวอ่อนสัตว์ทดลอง และต่อดับสัตว์ทดลองน้อยกว่า VPA (Meesomboon และคณะ, 1998; Patchamart, 1996) จากการศึกษาเภสัชจลศาสตร์ของ VPU โดยใช้ ^{14}C VPU ซึ่งดำเนินการโดยคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ร่วมกับนักวิจัยจาก Biomedical Research Institute, Chiba, ประเทศญี่ปุ่น พบว่า VPU ถูกดูดซึมออกจากทางเดินอาหารอย่างรวดเร็ว และพบมีสะสมอยู่ในอวัยวะหลายอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสมองเป็นจำนวนมาก (Kijsanayothin และคณะ, 1997) จากการศึกษาที่ VPU เป็นสารที่มีศักยภาพสูงที่น่าจะได้รับการพัฒนาไปเป็นยาต้านชัก คณะวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับนักวิจัยจาก Biomedical Research Institute จึงได้ร่วมกันจดสิทธิบัตรไว้ ณ ประเทศญี่ปุ่น ในปี 1997

นอกเหนือจากการศึกษาศักยภาพในการเป็นยาต้านชักของ VPU แล้วคณะวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ยังได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ VPU โดยวิธีการต่างๆ อาทิ วิธีทาง electrophysiology และ microdialysis พบว่า VPU น่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างไปจาก VPA และกลไกการออกฤทธิ์ของ VPU อาจมีความเกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทกรดอะมิโนชนิดกระตุ้น ซึ่งได้แก่ glutamate และ aspartate (Sooksawate, 1995; Khongsombat, 1997) NMDA receptor ซึ่งเป็น subtype หนึ่งของ glutamate receptor เป็นที่รู้จักกันดีว่าสามารถทำให้เนื้อเยื่อเกิดการตายในลักษณะ excitotoxicity (Lynch และ Guttman, 2002) ซึ่ง NMDA receptor มี binding site ที่สามารถให้ยาออกฤทธิ์ได้เป็นจำนวนมาก (รูป 2) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ VPU โดยศึกษาผลโดยตรงที่มีต่อตัวรับกลูตาเมต ที่ถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกบนผนังเซลล์ไขกบ (South Africa clawed frog, *Xenopus laevis*)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2. NMDA receptor model แสดงบริเวณการจับของ ยาที่ไปออกฤทธิ์ (Kemp and McKernan, 2002)

Xenopus laevis oocytes เป็น model ที่นำมาศึกษาหน้าที่ของตัวรับ (receptor) ชนิดต่างๆโดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะตัวของไขกบพันธุ์นี้ที่เมื่อมันได้รับ messenger RNA (mRNA) ที่เตรียมจากสมองหนูขาว ไขจะสามารถ translate mRNA และสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่าง ๆ ตลอดจนโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของตัวรับชนิดต่างๆ (Smart และ Drishek, 1995) *Xenopus laevis oocytes* สามารถ express ตัวรับได้หลายชนิด เช่น glycine (Wahl และคณะ, 1993), Serotonin (Gurdensen และคณะ, 1983; Julius และคณะ, 1988) และ NMDA (Moriyoshi และคณะ, 1991) หากมีสารทดสอบใดสามารถจับตัวรับบนผนัง *Xenopus laevis oocytes* แล้วทำให้ช่องทาง ion เปิด ion สามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ ทำให้เราสามารถบันทึกการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าภายในเซลล์ไซได้ ดังนั้นเราจึงนำมาใช้เป็น model ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของVPUในระดับของตัวรับ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ VPU โดยเปรียบเทียบกับ VPA ต่อตัวรับ glutamate ชนิด NMDA ที่ถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกบนผนังไขกบ (*Xenopus laevis oocytes*)

วัสดุและวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 สัตว์ทดลอง

1.1.1 South African clawed frogs, *Xenopus laevis* (Xenopus Express, USA) จำนวน 20 ตัว เลี้ยงในน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 25° C โดยให้แสงเป็นกลางวัน 12 ชั่วโมง และกลางคืน 12 ชั่วโมง ให้อาหารอย่างเพียงพอ สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง ทำความสะอาดและเปลี่ยนน้ำที่ใช้เลี้ยง สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

1.2 อุปกรณ์

- 1) Analog to Digital Converter (MacLab™, ADInstruments, Australia)
- 2) Automatic Injector (Nanoject, Drummond Scientific Company, USA)
- 3) Borosilicate Glass Capillary tubes (GD-1.5, Narishige, Japan)
- 4) Faraday Cage
- 5) Optic Fiber Illuminator (C-FI115, Nikon, Japan)
- 6) Incubator 18° C (SuperCool, Memmert, Sweden)
- 7) MAXIsript™ Kit (Ambion, Inc., USA)
- 8) Qaigen Plasmid Kit (Qaigen, Inc., USA)
- 9) Macintosh Computer (LC630, ADInstruments, Australia)
Software: Chart™ V3.5.6
- 10) Micromanipulator (M330IL, World Precision Instruments, USA)
- 11) pH Meter (210, Orion, USA)
- 12) Steroscopic Zoom Microscope (SZ-ST, Olympus, Japan)
- 13) Vertical ground Bath Clamp (VG-2A-X100, Axon Instruments, USA)
- 14) Vertical Micropipette Puller (PP-83, Narishige, Japan)

1.3 สารเคมี

- | | |
|-------------------------------------|------------------|
| 2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5) | (Sigma, USA) |
| Calcium chloride dihydrate | (Merck, Germany) |

Calcium dinitrate tetrahydrate	(Merck, Germany)
Collagenase from <i>Clostridium histolyticum</i> (Wako, Japan)	
Dimethyl dichlorosilane	(Sigma, USA)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	(Merck, Germany)
Glycine(Gly)	(Sigma, USA)
Glutamate(Glu)	(Sigma, USA)
Magnesium sulfate heptahydrate	(Merck, Germany)
N-(2-propylpentanoyl)urea(VPU)	
Penicillin G sodium	(General Drug House, Thailand)
Sodium chloride	(Merck, Germany)
Sodium hydrogencarbonate	(Merck, Germany)
Sodium hydroxide pellets	(Merck, Germany)
Spermine	(Sigma, USA)
Streptomycin	(General Drug House, Thailand)
Tricaine	(Sigma, USA)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride(USB, USA)	
Valproic acid(VPA)	(Sigma, USA)

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การเตรียม oocytes (Leewanich, 1998)

- 1) ทำให้กบสลบโดยแช่ในสารละลาย 0.12 % Tricaine ประมาณ 30 นาที แล้วให้ Penicillin G Sodium 2,500 units/ml และ Streptomycin 2.5 mg/ml โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 0.5 ml
- 2) วางกบบนน้ำแข็งเพื่อให้กบสลบต่อไป ผ่าตัดเปิดช่องท้องเหนือบริเวณขาประมาณ 1 cm เพื่อแยก oocytes ออกมาประมาณ 80-100 ฟอง แล้วปิดแผลด้วยกาวชนิดแห้งเร็ว รอจนกระทั่งกบฟื้นจึงนำลงอ่างพักฟื้น และรออีก 4-5 ชั่วโมงจึงนำกลับไปเลี้ยงรวมกับกบตัวอื่น ๆ

3) ส่วน oocytes ให้ใส่ลงใน Modified Bath Solution (MBS) ซึ่งประกอบด้วย

NaCl	88	mM
KCl	1	mM
NaHCO ₃	2.4	mM

Ca(NO ₃).4H ₂ O	0.33	mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.14	mM
Mg(SO ₄).7H ₂ O	0.82	mM
Tris-(Hydroxymethyl)aminomethane	7.5	mM

และปรับ pH เป็น 7.4

- 4) แยกไข่กบออกจากกันเหลือเป็นฟอง ๆ ละ 3-4 ฟอง โดยเลือกเอาเฉพาะไข่กบใน Stage V-VI (Wagner, 2000) และล้างด้วย Ca²⁺-free MBS
- 5) แยกเนื้อเยื่อ collagen รอบ ๆ ไข่กบออก โดยแช่ใน collagenase 2 mg/Ca²⁺-free MBS 1 ml ใน water bath shaker ที่อุณหภูมิ 23°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 6) ลอกเนื้อเยื่อ collagen ส่วนที่ยังเหลืออยู่ด้วย forceps ภายใต้อ่างล้างจุลทรรศน์ แล้วจึงเก็บไข่กบไว้ใน MBS ที่อุณหภูมิ 18°C

2.2 การเตรียม mRNA

- 2.2.1 เพิ่มปริมาณ cDNA ซึ่งอยู่ใน plasmid pN60NR1A และ pBSNR2B โดย transformation เข้าในแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ DH5- α แล้วจึง culture เพิ่มปริมาณแบคทีเรียดังกล่าว
- 2.2.2 สกัด plasmid จากแบคทีเรียโดยใช้ Qaigen Plasmid Kits
- 2.2.3 ใช้ restriction enzyme ที่เหมาะสมตัด plasmid เพื่อเตรียมเป็น DNA template
- 2.2.4 สังเคราะห์ mRNA จาก cDNA ในข้อ 2.2.3 โดยใช้ MAXIscript Kit วิธี in vitro transcription

2.3 การฉีด mRNA

เจือจาง mRNA ของ NR1A subunit ให้มีความเข้มข้น 0.4 μ g/ μ l และ mRNA ของ NR2B subunit ให้มีความเข้มข้น 0.5 μ g/ μ l แล้วจึงนำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:4 ตามลำดับ นำ mRNA ดังกล่าวประมาณ 250 μ l มาบรรจุใน capillary tube ที่มีความยาว 1 cm และเคลือบด้วย dimethyl dichlorosilane ในขั้นตอนนี้ต้องใช้กรรมวิธีปลอดเชื้อใน laminar airflow จากนั้นฉีด mRNA เข้าไป oocytes โดยใช้เครื่อง automatic oocyte injector ฉีดปริมาณ 25 nanolitre ของ mRNA ในไข่แต่ละฟอง แล้วจึงเก็บไข่กบไว้ใน MBS ที่อุณหภูมิ 18°C รอให้ไข่กบแสดงตัวรับที่ต้องการ ใช้เวลาประมาณ 2 วัน การทดสอบจะใช้ในวันที่ 2-7 หลังจากวันที่ฉีด RNA

2.4 การบันทึกสัญญาณทางสรีรวิทยาไฟฟ้า

เป็นการบันทึกโดยใช้ Two electrode voltage clamp (TEVC) technique ซึ่งเป็นการวัด whole cell currents โดยใช้เครื่อง Gene clamp 500 ที่ holding potential เป็น -70 mV และทำการบันทึกที่ 25 °C โดยใช้ glass microelectrode ที่มีความต้านทานระหว่าง 0.5-5 MΩ ซึ่งจะบรรจุด้วย potassium Chloride 3 M วัดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าของ oocyte ที่อยู่ใน chamber ที่มีการปล่อย MBS ลงมาในอัตราเร็ว 1.5 ml/min โดยให้ยาผ่านทาง chamber นี้ ร่วมกับ MBS

2.5 ขั้นตอนการศึกษาการออกฤทธิ์ของ VPU บนตัวรับ NMDA

- 1) ศึกษา concentration-response curve ของ glutamate โดยให้ร่วมกับ glycine 10 μM
- 2) ศึกษาผลของ VPU และ VPA ต่อ concentration-response curve ของ glutamate ที่ให้ร่วมกับ glycine 10 μM
- 3) เปรียบเทียบผลของ VPU ต่อ glutamate-induced current กับ AP5 ซึ่งเป็น competitive NMDA receptor antagonists
- 4) ศึกษาผลของ VPU ต่อ glutamate-induced current เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง Holding potential
- 5) ศึกษาผลของ VPU ต่อ glutamate-induced current เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของ Glycine
- 6) ศึกษาผลของ VPU ต่อ glutamate-induced current เมื่อมีหรือไม่มี spermine

การคำนวณและวิธีวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การตอบสนองแต่ละครั้งของไซกบแต่ละฟองจะแสดงเป็นค่าร้อยละของการตอบสนองสูงสุดของไซฟองนั้น และนำเสนอข้อมูลเฉลี่ย ($n = 4-8$) ในรูปของ Mean + Standard Error of the Mean (S.E.M.)

ใช้ GraphPad PRISM™ Version 3.0 (GraphPad Software, U.S.A.) ในการ fit Concentration – response curve ของ agonist ตามสมการ

$$I = I_{\max} / [1 + (EC_{50}/A)^n]$$

- เมื่อ I = current response
 I_{\max} = maximal response
 n = Hill coefficient
 A = concentration of agonist

EC_{50} = agonist concentration producing a half-maximal response

Antagonist inhibition curve ต่อ Glutamate 300 μ M + Glycine 10 μ M และ fit โดย

$$I = I_{max} - I_{max}/[1+(EC_{50}/A)^n]$$

เมื่อ I_{max} = current response เมื่อไม่มี antagonist

A = concentration of antagonist

EC_{50} = antagonist concentration producing a half-maximal response

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้ *Pair Student's test* และ *one way ANOVA* ร่วมกับ *Dunnett's Test* และ *p-value* ที่น้อยกว่า 0.05 จัดเป็นเกณฑ์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

1. ผลของ glutamate ต่อ membrane current ของไซกบที่ถูกฉีดด้วย mRNAs ของ NR1A/NR2B

จากการให้ glutamate ในขนาดความเข้มข้นต่างๆ (0.01 – 300 μM) และ glycine (10 μM) ต่อไซกบ โดยวิธีการ bath application พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ inward current เมื่อ clamp voltage ที่ -70 mV (รูปที่ 3.1) ในลักษณะที่เป็น concentration - dependent โดยมีค่า Hill coefficient เท่ากับ 0.98 ± 0.12 ($n=4-6$) และมีค่า EC_{50} ของ glutamate เท่ากับ 2.26 ± 0.31 μM (รูปที่ 3.2)

เมื่อให้ AP5 ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะในการยับยั้งต่อตัวรับ NMDA ร่วมกับ glutamate และ glycine (10 μM) พบว่า concentration - response curve ของการตอบสนองต่อ glutamate จะเคลื่อนไปทางขวา แสดงว่า AP5 ลดการตอบสนองต่อ Glutamate (ทำให้ค่า EC_{50} เท่ากับ 5.95 ± 0.37 μM) โดยที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อค่าการตอบสนองสูงสุด หรือค่าของ slope coefficient เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3.3)

2. ผลของ VPU และ VPA ต่อ dose-response curves ของ glutamate

Bath application ของ VPU ที่ความเข้มข้น 1-300 μM ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง membrane current-ของไซกบ

เมื่อศึกษาผลของ VPU ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate (glutamate - induced membrane current) โดยใช้วิธีการ bath application ของ glutamate (0.01-300 μM) ร่วมกับ 10 μM ของ glycine ทำให้เกิดกระแสตามระดับความเข้มข้นที่ให้ แล้วจึงให้ VPU (10, 100 หรือ 300 μM) พบว่า VPU ลดกระแสที่เกิดจาก glutamate ได้แบบแข่งขัน (competitive) และผันกลับได้ และมีผลทำให้ค่า EC_{50} ของ glutamate เพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของ VPU ที่ให้ (ตารางที่ 3.1) แต่ไม่มีผลทำให้ค่า Hill coefficient หรือค่าการตอบสนองสูงสุดต่อ glutamate เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3.4, 3.5, 3.6 และ 3.7) ในขณะที่ VPA ที่ความเข้มข้น 1mM ไม่ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของ EC_{50} , ค่าการตอบสนองสูงสุด และ slope coefficient ที่เกิดจากการกระตุ้นตัวรับ NMDA โดย glutamate แต่อย่างใด (รูปที่ 3.8)

3. ผลของ VPU และ AP5 ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate (*Glutamate-induced current*)

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งของ VPU (0.1-300 μM) ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate (3 μM) + glycine (10 μM) ที่บันทึกได้จากไข่กบกับผลการยับยั้งของ AP5(0.1-300 μM) ซึ่งเป็น competitive NMDA receptor antagonists พบว่า VPU และ AP5 สามารถยับยั้งการเกิดกระแสจาก glutamate ได้ตามรูป 3.9 ค่า IC_{50} จาก inhibition curve ของ AP5 มีค่าเท่ากับ $23.55 \pm 5.33 \mu\text{M}$ แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งของ VPU ต่ำมากจนไม่สามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้(รูปที่ 3.9)

4. ผลของ VPU ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate (*Glutamate-induced current*) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง Holding potential ทีละขั้น (stepping holding potential)

ทำการศึกษาเปรียบเทียบ current-voltage (I-V) relationship ของ glutamate เมื่อมีและไม่มี VPU (รูปที่ 3.10) เพื่อประเมินว่าการยับยั้งที่เกิดจาก VPU ขึ้นกับ voltage หรือไม่ I-V curve ของ glutamate ที่ความเข้มข้น 3 μM + glycine (10 μM) จะถูกบันทึกเมื่อมีการ เปลี่ยนระดับของ voltage จาก -150 ไปถึง +50 mV โดยที่จะเพิ่ม voltage ขึ้นทีละ 10 mV จากผลการทดลองพบว่า current-voltage relationship เมื่อมี VPU ไม่มีลักษณะของ J-shape แสดงว่าผลในการยับยั้งของ VPU ไม่ขึ้นกับ voltage

5. ผลของ VPU ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate (*Glutamate-induced current*) ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ของ glycine

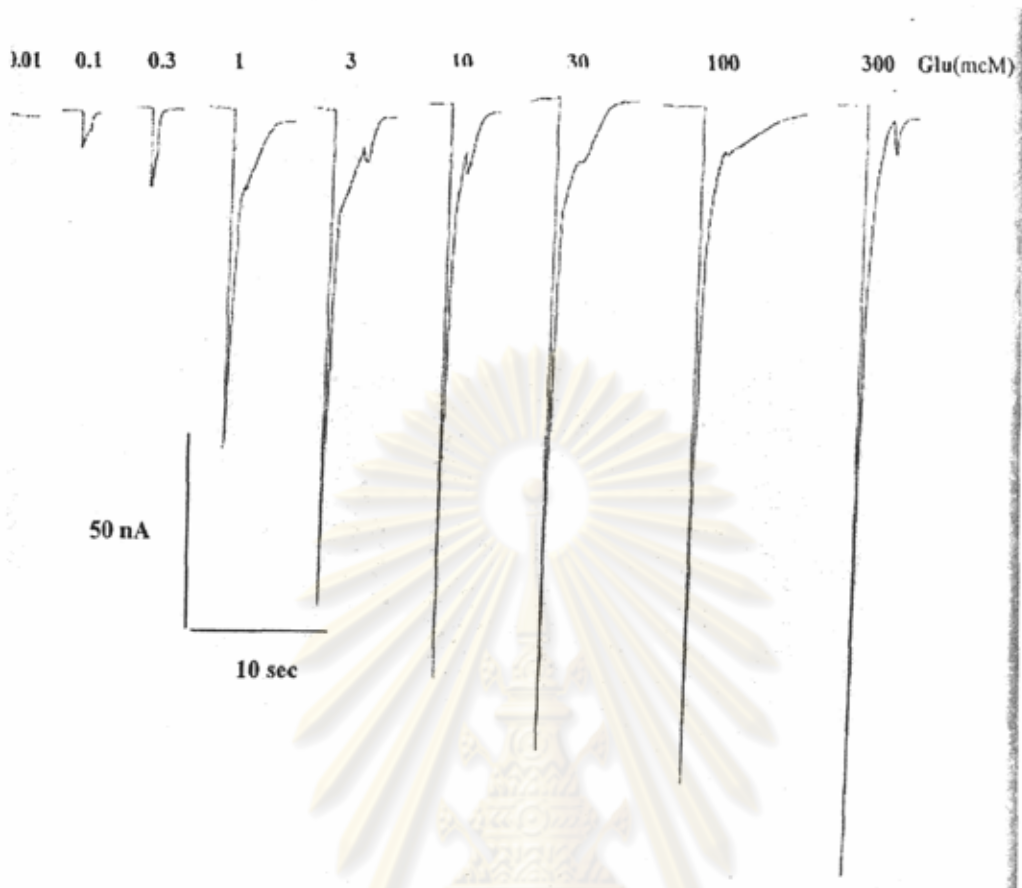
เพื่อที่จะทดสอบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งกระแสของ glutamate ที่เกิดจากตัวรับ NMDA ของ VPU เกิดจากการแย่งจับหรือการปรับเปลี่ยน (modulate) ต่อจุดจับ (binding site) ของ glycine (glycine site) จึงศึกษาผลของ glycine ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆต่อการเกิดกระแสจาก glutamate (3 μM) เมื่อไม่มี (รูป 3.11) หรือมี VPU (100 μM) ดังแสดงไว้ในรูป 3.12 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ glycine โดยที่ระดับของ glutamate คงที่ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าการตอบสนองสูงสุด และ slope coefficient ของ glutamate เมื่อมีและไม่มี VPU

6. ผลของ VPUต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของglutamate (Glutamate-induced current) เมื่อมีหรือไม่มี spermine

เพื่อศึกษาว่าฤทธิ์ในการยับยั้งกระแสของglutamateที่เกิดจากตัวรับ NMDA ของ VPUเกิดจากการแย่งจับหรือการ modulateต่อจุดจับของ spermine จึงศึกษาผลของ spermine ต่อกระแสของglutamateที่เกิดจากตัวรับ NMDA เมื่อมีหรือไม่มี VPU จากรูป 3.13 แสดงให้เห็นว่า VPU(100 μM) มีฤทธิ์หักล้างการเสริมฤทธิ์ของ spermine(100 μM) ต่อกระแสไฟฟ้าที่เกิดจาก glutamate(3 μM) + glycine (10 μM) จากตัวรับ NMDA และจะพบฤทธิ์ดังกล่าวเมื่อให้ VPU ในความเข้มข้น 30,100 และ 300 μM (รูป 3.14)

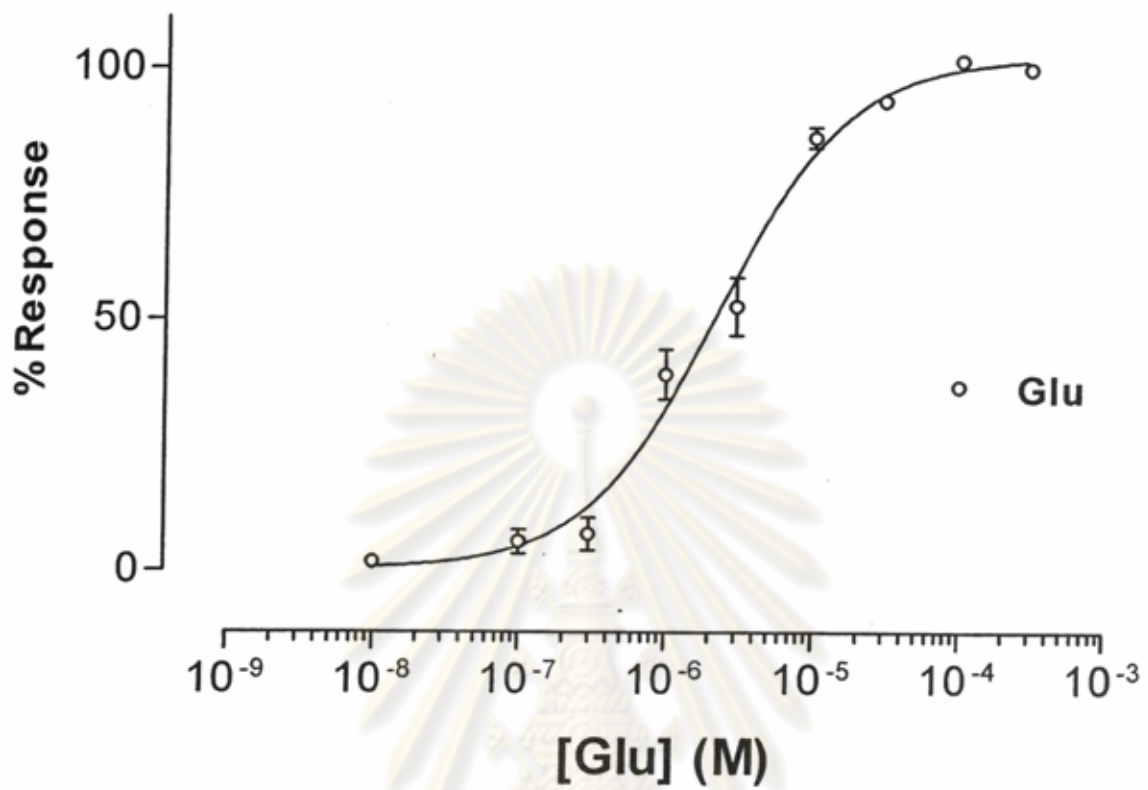


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



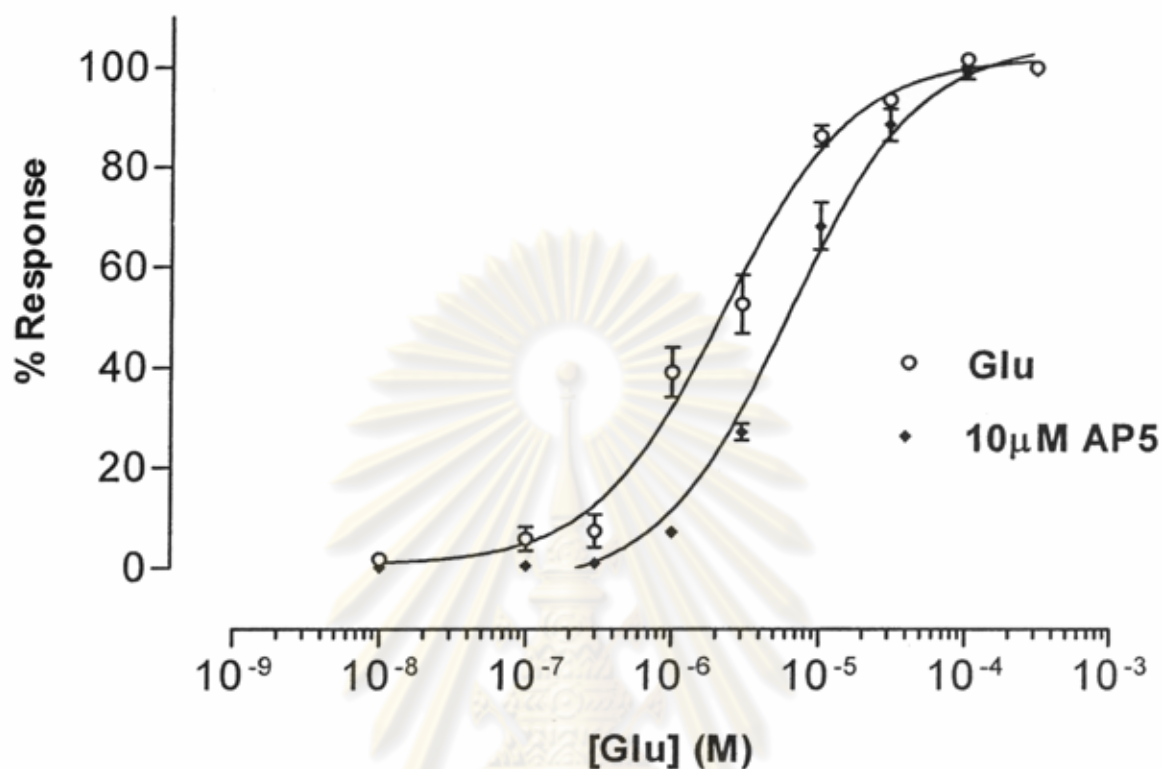
รูปที่ 3.1 แสดงรูปของกระแสที่เกิดขึ้นจากการใช้ glutamate ในระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM ร่วมกับ glycine 10 μM ต่อตัวรับเอ็นเอ็มดีเอซชนิด NR1A/NR2B ที่ถูกทำให้ปรากฏบนผนังเซลล์ไข่มก *Xenopus* โดยการฉีด mRNA (ตรงค่า potential ไว้ที่ $V_h = -70 \text{ mV}$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

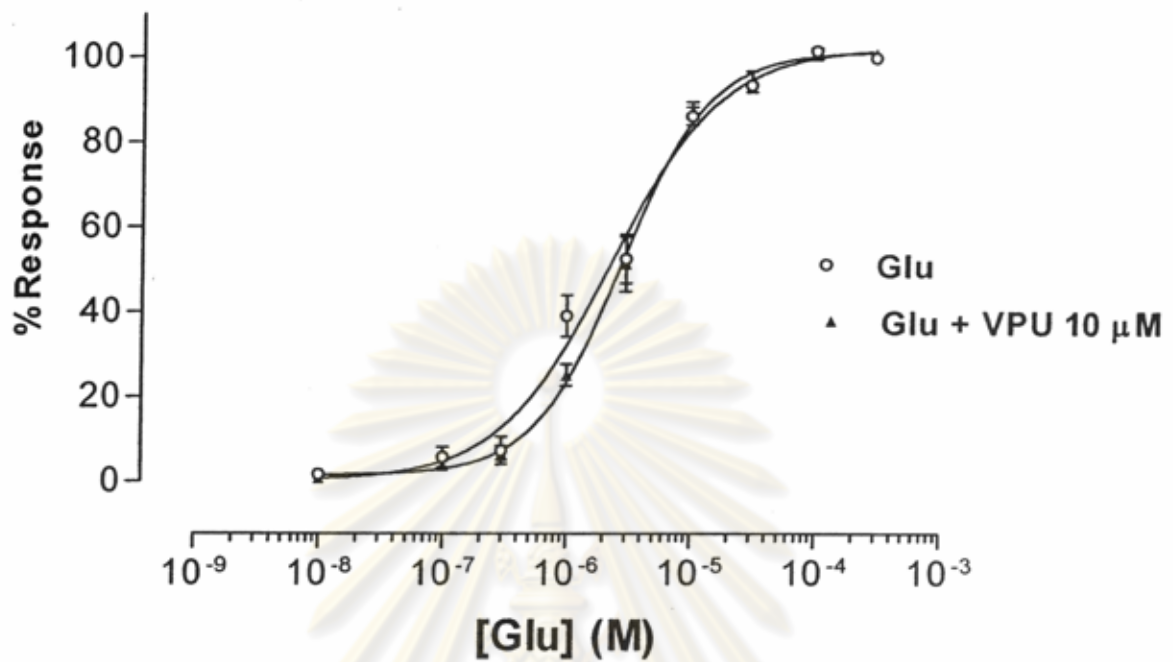


รูปที่ 3.2 Glutamate log concentration-response relationship. แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไซม์ แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด

ศูนย์เวชศาสตร์พยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

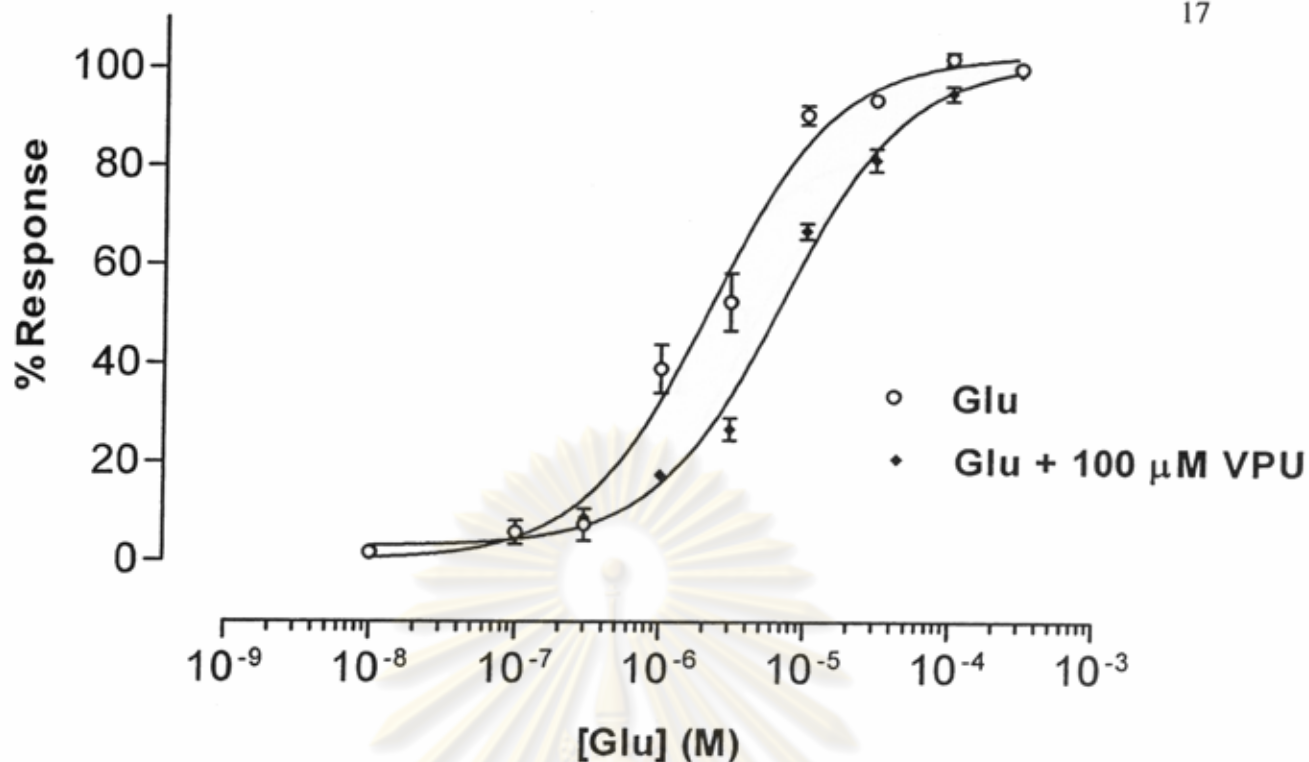


รูปที่ 3.3 Glutamate log concentration-responses curves ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลในการยับยั้งของ AP5 ที่ความเข้มข้น 10 μM เมื่อให้ AP5 จะทำให้ glutamate concentration-response curves เคลื่อนไปทางขวามากขึ้น โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าการตอบสนองสูงสุด เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Pair t-test พบว่า log concentration responses curves ทั้งสองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



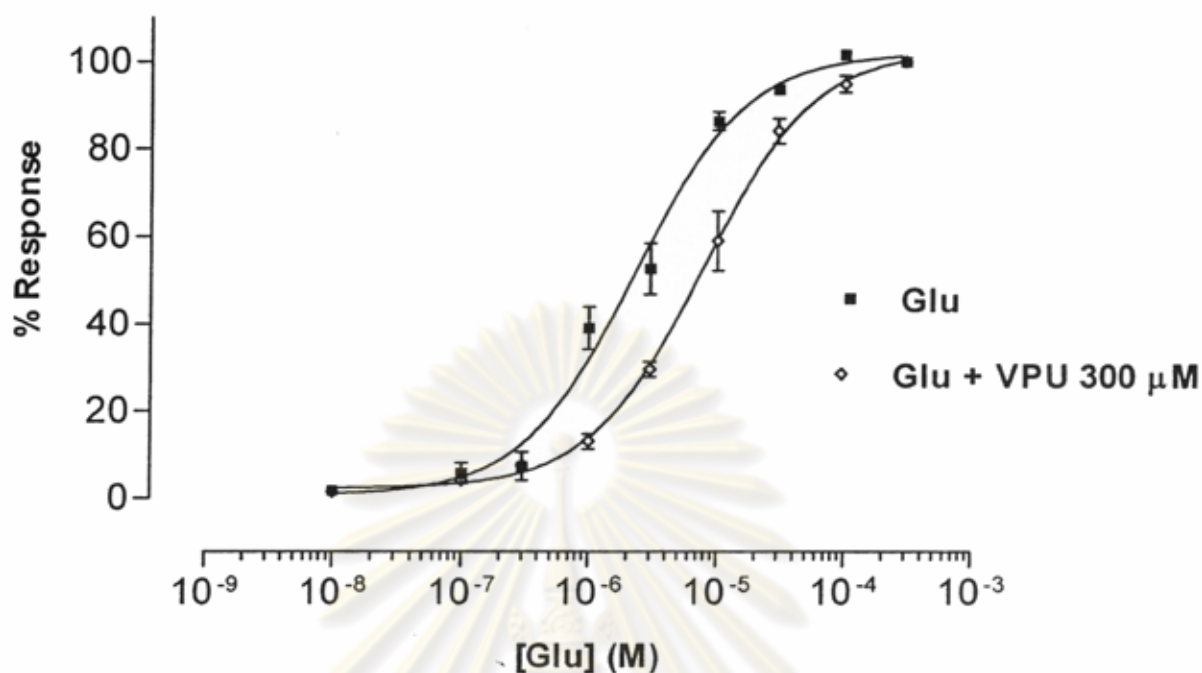
รูปที่ 3.4 Glutamate log concentration-responses curves เมื่อมีและไม่มี VPU ที่ความเข้มข้น 10 μ M แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไขกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด VPU ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการตอบสนองสูงสุด หรือ Hill slope ($P > 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



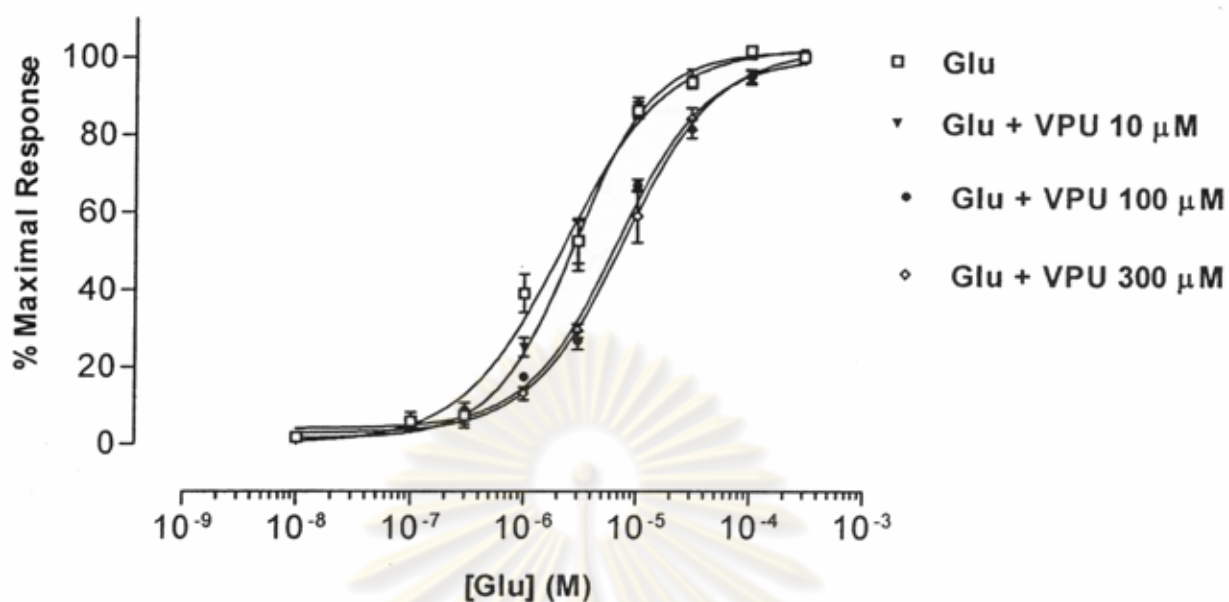
รูปที่ 3.5 ผลการยับยั้งของ VPU ที่ความเข้มข้น 100 μM ต่อ glutamate log concentration-responses curves แต่ละจุดคือ ค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไข่กบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด VPU ทำให้ glutamate concentration-responses curves เคลื่อนไปทางขวามากขึ้น โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าการตอบสนองสูงสุด เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Pair t-test พบว่า concentration-responses curves ทั้งสองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.6 ผลของการยับยั้งของ VPU ที่ความเข้มข้น 300 μM ต่อ glutamate log concentration-responses curves แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไขกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด VPU ทำให้ glutamate concentration-responses curves เคลื่อนไปทางขวามากขึ้น โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าการตอบสนองสูงสุด เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Pair t-test พบว่า concentration-responses curves ทั้งสอง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ($P < 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



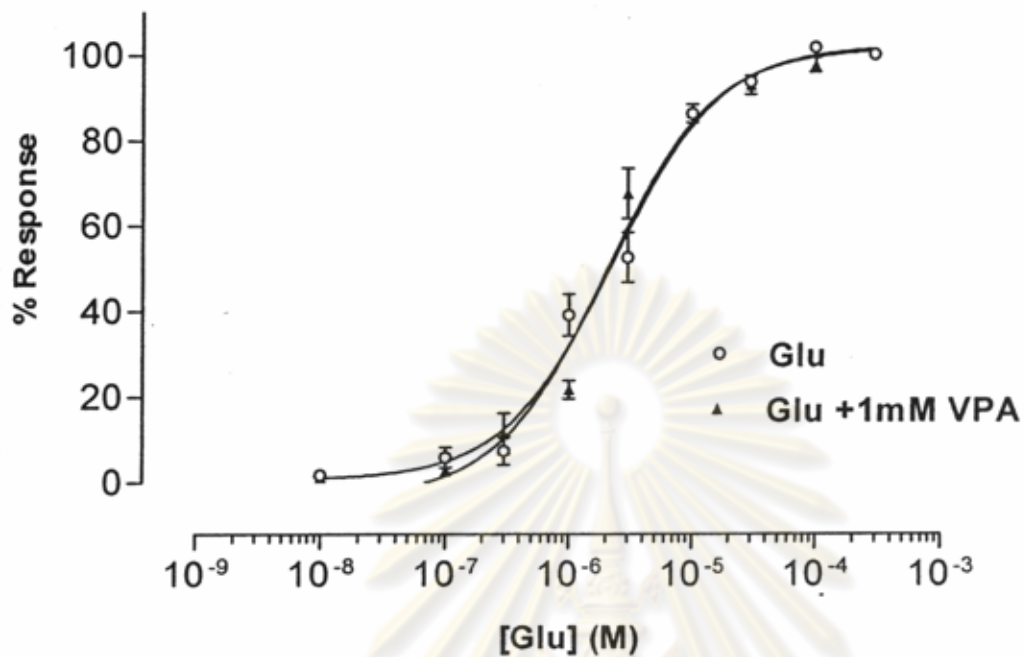
รูปที่ 3.7 ภาพโดยรวม แสดงถึงผลการยับยั้งต่อของ glutamate concentration-responses curves บนตัวรับ NMDA โดย VPU ที่ความเข้มข้น 10, 100 หรือ 300 μ M แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไขกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	EC₅₀ (μM)	Hill coefficient
Glu	2.26 ± 0.31	0.98 ± 0.12
Glu + 10 μM AP5*	5.95 ± 0.37	1.40 ± 0.10
Glu +10 μM VPU	2.79 ± 0.24	1.25 ± 0.04
Glu +100 μM VPU*	6.67 ± 0.55	1.10 ± 0.09
Glu + 300 μM VPU*	7.61 ± 0.81	1.06 ± 0.04
Glu + 1 mM VPA	2.02 ± 0.18	1.73 ± 0.21

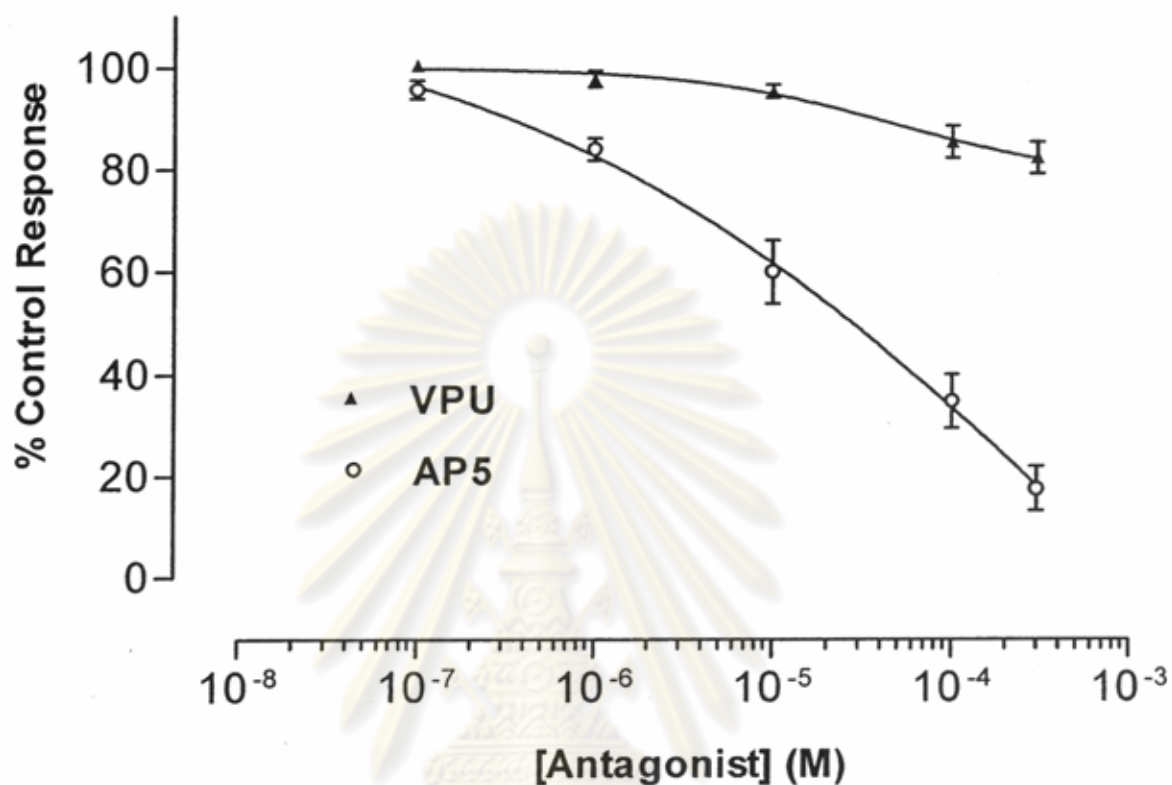
ตารางที่ 3.1 แสดงค่า Mean EC₅₀ ± S.E.M. และ Hill coefficient ของ glutamate หรือ glutamate ร่วมกับ AP5, VPA และ VPU ที่คำนวณมาจากค่า log concentration-responses curves * แสดงถึงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05 ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

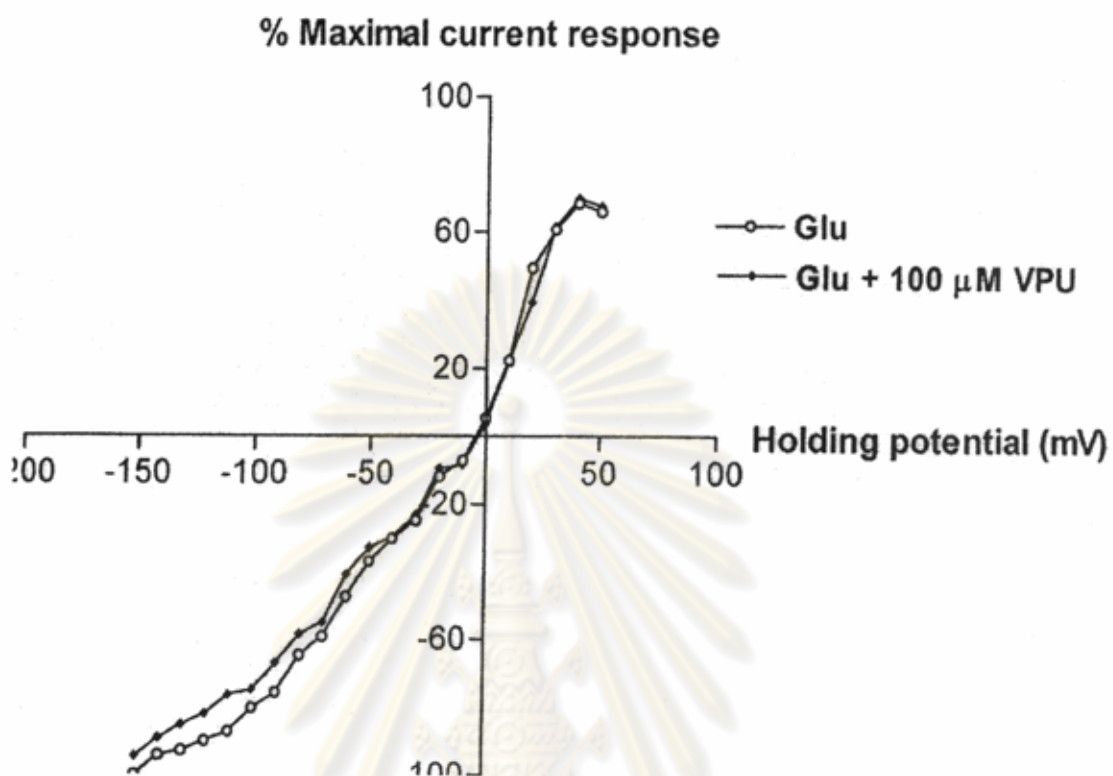


รูปที่ 3.8 ผลของการยับยั้งของ VPA ที่ความเข้มข้น 1mM ต่อ glutamate log concentration-responses curves แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไขกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Pair t-test ไม่พบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

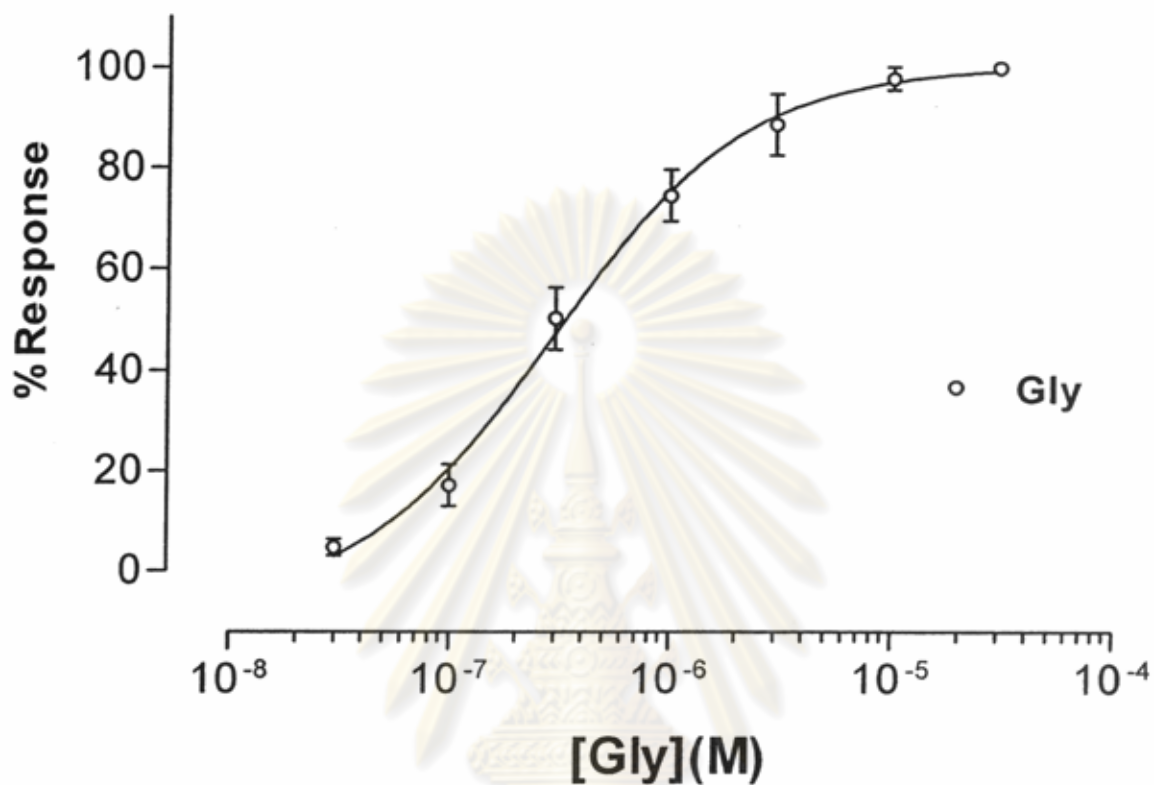


รูปที่ 3.9 ผลการยับยั้งของ VPU (100 μM) และ AP5 (10 μM) ต่อ การเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate (3 μM) + glycine (10 μM) ผลของ antagonist response curves แสดงถึงการยับยั้งต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสของ glutamate และ ค่าที่ได้จะถูกทำไปเทียบกับ extrapolated maximal agonist-induced current ในขณะที่ไม่มีทั้ง VPU และ AP5 ข้อมูลที่ได้แต่ละจุดคือ Mean \pm S.E.M. ของกระแสที่ได้จากการใช้ไซกม 3-5 ฟอง



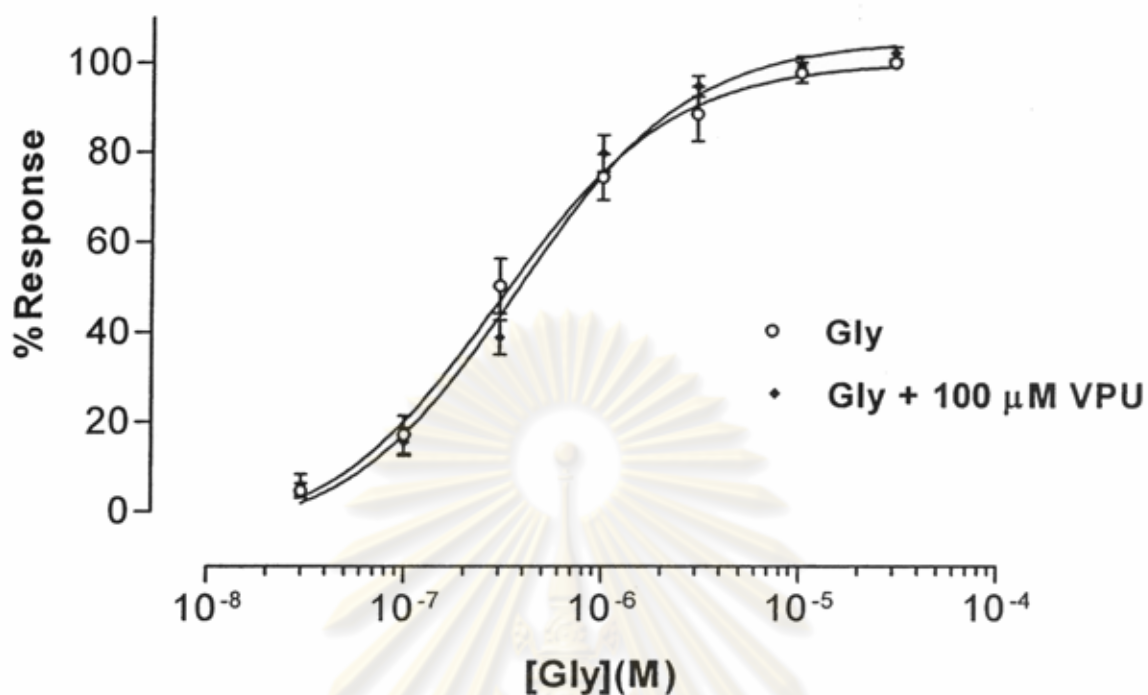
รูปที่ 3.10 I-V relationships ของ glutamate จากไซกบที่ได้รับการฉีด NR1A/NR2B mRNA ก่อน และหลังการให้ VPU ที่ความเข้มข้น 100 μ M แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไซกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การตอบสนองสูงสุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



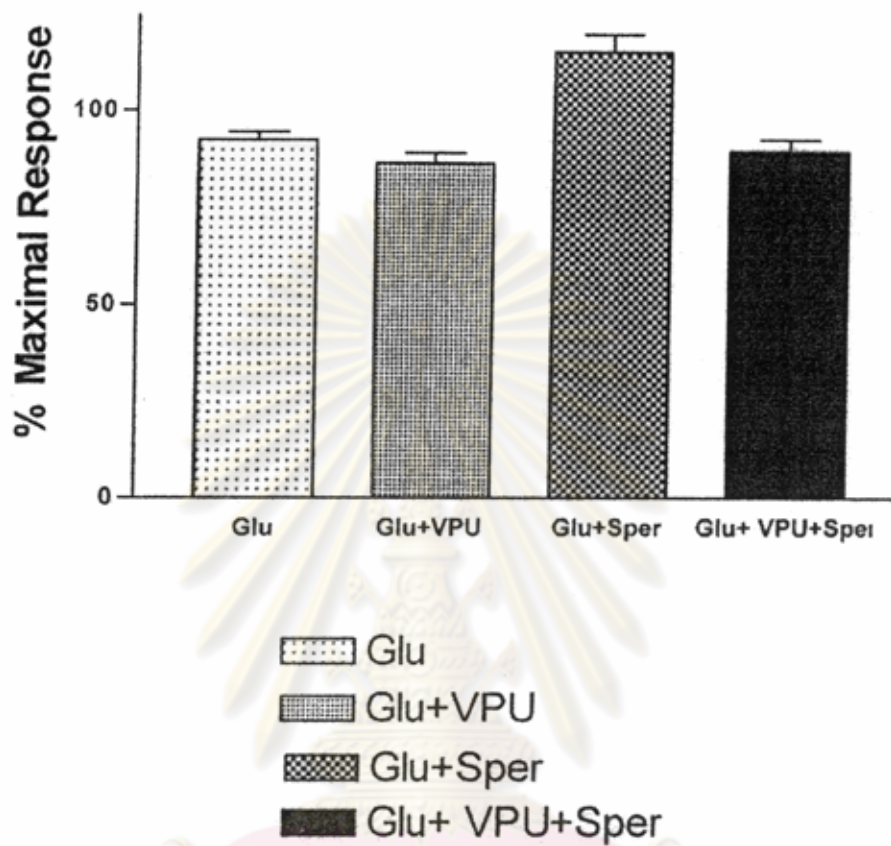
รูปที่ 3.11 log concentration-responses relationship ของ glutamate ($3 \mu\text{M}$) ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆของ glycine แต่ละจุดคือ ค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไขกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



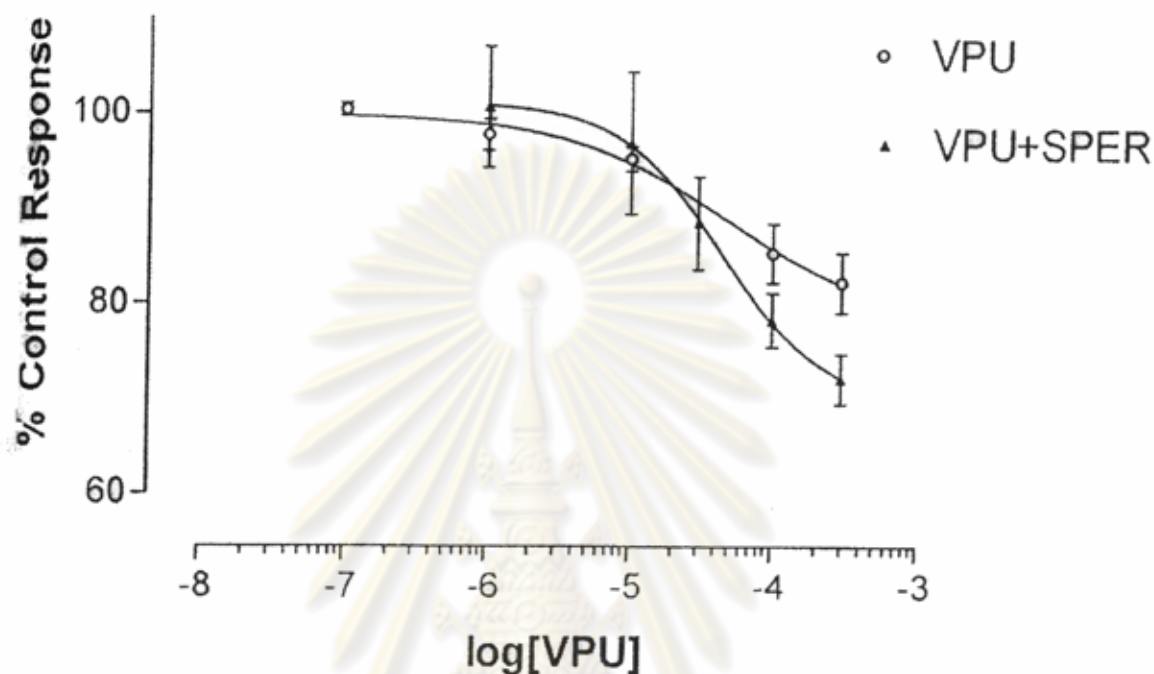
รูปที่ 3.12 log concentration-responses relationship ของ glutamate (3 μM) ต่อความเข้มข้นระดับต่างๆของ glycine ในขณะที่มีและไม่มี VPU (10 μM) แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไขกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด VPU ไม่ทำให้ค่าการตอบสนองสูงสุดหรือ Hill slope เปลี่ยนแปลง ($P > 0.05$)

ศูนย์วิจัยทันตวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.13 กราฟแท่งแสดงถึงฤทธิ์ในการยับยั้งของ VPU (100 μ M) ต่อการเกิดกระแสไฟฟ้าจาก glutamate เมื่อมีหรือไม่มี spermine (100 μ M) กราฟแต่ละแท่งคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไซกบแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด

Inhibition Curve of VPU in the presence of spermine



รูปที่ 3.14 แสดงถึงผลของการยับยั้งของ VPU ($100 \mu\text{M}$) ต่อ glutamate log concentration-responses curves เมื่อมีหรือไม่มี spermine ($100 \mu\text{M}$) แต่ละจุดคือค่า Mean \pm S.E.M. ของ current response ของไข่มุกแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของการตอบสนองสูงสุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายและการสรุปผล

โรคทางระบบประสาทส่วนกลางหลายอย่าง รวมทั้งโรคลมชัก มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติในการทำงานของตัวรับ NMDA (Cull-Candy และคณะ 2001) ดังนั้น จึงได้มีความพยายามที่จะแสวงหายาที่สามารถออกฤทธิ์ผ่านทางตัวรับ NMDA เพื่อรักษาความผิดปกติดังกล่าว ดังตัวอย่าง เช่น antagonists ของ NMDA receptor ที่นำมาใช้ในการรักษาโรคของระบบประสาทส่วนกลางได้แก่ Felbamate ซึ่งเป็นยาต้านชักที่มีฤทธิ์เป็น competitive antagonist กับ glycine และ Memantine ซึ่งเป็น non-competitive NMDA antagonist ที่นำมาใช้กับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Kemp และ Mckernan, 2002, Meldrum และ Rogawski 2007)

ตัวรับ NMDA เป็น heteromeric receptor ประกอบด้วย subunits หลาย subunits เช่น NR1, NR2 และ NR3 โดยที่ NR1 เป็น subunits ที่สำคัญในการ form เป็น NMDA receptors (Ozawa et al., 1998) NR1 subunits มี gene ที่ควบคุมเพียงหนึ่งชนิด แต่ NR1 subunits อาจมีได้ถึง 8 splice variants จะพบ NR1 transcript ในสมองหนูแทบทุกแห่ง (Standaert และ คณะ, 1994) สำหรับ NR2 genes พบว่ามี 4 ชนิด คือ NR2A-D (Katsuwada และ คณะ., 1992) NR1A/NR2A และ NR1A/NR2B เป็น subtype ของตัวรับ NMDA ที่พบมากที่สุดในระบบประสาทส่วนกลาง (Mori และ Mishina, 1995) ซึ่งเชื่อว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ binding site ของ agonists และ antagonists ของตัวรับ NMDA (Laurie และ Seeburg, 1994) ถึงแม้ว่า subtype ของตัวรับ NMDA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการชักยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ก็มีหลักฐานที่แสดงว่า NR1, NR2A และ NR2B subunits มีความเกี่ยวข้องกับการชักที่เกิดจาก glutamatergic agonists (Narita และ คณะ, 2000) นอกจากนั้นยังพบว่า tyrosine phosphorylation ของ NR2B ใน transgenic mice มีส่วนร่วมในการเกิดการชักแบบ kindling ผ่านทางตัวรับ NMDA (Kojima และ คณะ., 1998) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกที่จะศึกษาผลของ VPU ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์กันชักต่อตัวรับ NMDA ซึ่งประกอบด้วย subunit ชนิด NR1A/NR2B

จากผลการทดลองที่พบว่า การให้สาร VPU ปริมาณ 1-300 ไมโครโมล เข้าไปโดยตรงต่อตัวรับ NMDA subtype NR1A/NR2B ที่ถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกบนผิวเซลล์ไขกบ ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า แสดงให้เห็นโดยชัดเจนว่า ลำพังตัวสาร VPU เองจะไม่มีผลต่อ ion channels รวมทั้งตัวรับอื่นใดรวมทั้งตัวรับ NMDA ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ไขกบ แต่จะมีผลยับยั้งการนำไฟฟ้าที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย glutamate ผ่านตัวรับ NMDA ชนิด NR1A/NR2B ที่ถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกบนผิวเซลล์ไขกบ ซึ่งผลการยับยั้งดังกล่าวอาจเกิดจากการออกฤทธิ์ต่อ binding sites ต่างๆ

ของตัวรับ NMDA เช่น agonist recognition site binding, co-agonist recognition site binding, modulatory site binding, open-channel blocking หรือ binding sites อื่นๆ (Kemp และ McKernan, 2002, Meldrum และ Rogawski 2007) ดังนั้น จึงทำการศึกษามลการยับยั้งของสาร VPU ต่อการนำไฟฟ้าของ glutamate subtype NR1A/NR2B ที่ แสดงออกบนผิวเซลล์ไขกบในสภาวะการทดลองที่แตกต่างกันไปเพื่อให้ทราบถึงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของสาร VPU บนตัวรับ NMDA

มีรายงานว่าการกระตุ้นต่อตัวรับ NMDA ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ไขกบ มีผลทำให้เกิดการไหลเข้าของ Calcium ion ซึ่งจะไปกระตุ้น Ca^{2+} -dependent Cl^- channels ที่อยู่ในเซลล์ (Kelso และ คณะ., 1992) ดังนั้น ผลการยับยั้งของสาร VPU ต่อตัวรับ NMDA อาจเกิดจากการ block Ca^{2+} -dependent Cl^- channels อย่างไรก็ตาม ความเป็นไปได้นั้นก็ถูกขจัดออกไป โดยผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า ศักย์ไฟฟ้า และกระแสไฟฟ้าที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Glutamate ต่อตัวรับ NMDA ในขณะที่มีหรือไม่มีสาร VPU ซึ่งพบว่าเกิดการ reverse เมื่อ ค่า potential เข้าใกล้ศูนย์ ซึ่งใกล้เคียงกับ reversal potential ของ NMDA channels ในเซลล์ประสาท (Mayer และ Westbrook, 1987)

เมื่อเปรียบเทียบ glutamate dose-response curve จากการได้รับ glutamate ร่วมกับ glycine โดยมีหรือไม่มีสาร VPU พบว่าการให้สาร VPU จะทำให้ glutamate dose-response curve มีค่าเบี่ยงเบนไปทางขวา แสดงว่าสาร VPU น่าจะมีฤทธิ์เป็น competitive antagonist ต่อตัวรับ NMDA ที่ glutamate recognition sites ในขณะที่ VPA (ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ VPU) ในปริมาณ 1 มิลลิโมล ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าที่ถูกเหนี่ยวนำโดย glutamate บนตัวรับ NMDA สอดคล้องกับผลการทดลองอื่นที่แสดงให้เห็นว่าสาร VPU น่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจาก VPA (Tantisira และ คณะ 1997). อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการต้านฤทธิ์ของสาร VPU ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ glutamate ในการศึกษาเกี่ยวกับการต้านฤทธิ์ glutamate-induced current โดย AP5 ซึ่งเป็น competitive NMDA receptor antagonists ที่เป็นที่รู้จักกันดี (Cull-Candy และ คณะ, 2001) พบว่าสาร VPU เป็น antagonist ที่มีฤทธิ์อ่อนกว่า AP5 มาก ดังนั้นจึงอาจเป็นเพียงกลไกย่อยอันหนึ่งซึ่งออกฤทธิ์เสริมหรือร่วมกับกลไกการออกฤทธิ์ด้านอื่น ๆ (Sooksawate, 1995; Khongsombat, 1997) ทำให้สามารถป้องกันการชักในสัตว์ทดลองได้

จากการศึกษาผลของ VPU (100 μ M) ต่อการออกฤทธิ์กระตุ้นตัวรับ NMDA subtype NR1A/NR2B ด้วย glutamate (3 μ M) โดยให้ glycine ซึ่งเป็น co-agonist ในความเข้มข้นต่างๆ (100 μ M -

10mM) พบว่า สาร VPU ไม่มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการตอบสนองสูงสุด และ slope coefficient ของ glutamate dose-response curve ไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้นของ glycine ในระดับใด ดังนั้นสาร VPU จึงไม่น่าที่จะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับ glycine binding site นอกจากนั้นยังพบว่า การออกฤทธิ์ของสาร VPU ต่อ glutamate ไม่ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้าของเซลล์ เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่าง current กับ voltage (I – V relationship) ของ glutamate (3 μ M) ที่ holding potential ที่แตกต่างกันไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปแม้จะมีสาร VPU (100 μ M) อยู่ร่วมด้วย

จากการที่มีรายงานว่าสารกลุ่ม polyamines ซึ่งสามารถเข้าจับกับตัวรับของ NMDA ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ประสาทเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีหรือกระแสไฟฟ้า และจะถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นในขณะเกิดอาการชัก (seizure) หรือในภาวะสมองขาดเลือด (Hayashi et al., 1993) ในการศึกษาทดลองนี้ จึงได้ทำการศึกษาผลของสาร VPU เมื่อให้ร่วมกับ spermine พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งต่อ glutamate ของ สาร VPU จะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมี spermine นอกจากนั้นยังพบว่า VPU สามารถปิดกั้นฤทธิ์ของ spermine ที่ไปเพิ่มการตอบสนองต่อ glutamate ในลักษณะที่แปรตามความเข้มข้นของสาร VPU ซึ่งกลไกดังกล่าวมาแล้วนี้อาจเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ใช้อธิบายการออกฤทธิ์ด้านชักของ VPU ซึ่งได้มีการศึกษามาก่อนแล้วว่าสามารถเสริมการออกฤทธิ์ของ GABA โดยการออกฤทธิ์โดยตรงหรือโดยอ้อมต่อ barbiturate binding site (Janthet, 2002)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาร VPU มีฤทธิ์เป็น competitive inhibitor ต่อการออกฤทธิ์ของ glutamate ต่อตัวรับ NMDA ชนิด NR1A/NR2B ดังที่จะเห็นได้จากการที่ทำให้ค่า EC_{50} ของ glutamate เพิ่มขึ้น การออกฤทธิ์ยับยั้งของสาร VPU ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ glycine หรือ voltage เมื่อเปรียบเทียบกับ AP5 จะเห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งของ VPU ต่อการออกฤทธิ์ของ glutamate ต่อตัวรับ NMDA ชนิด NR1A/NR2B ดังกล่าวมาแล้วนี้อ่อนกว่าฤทธิ์ของ AP5 อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงไม่น่าจะเป็นกลไกหลักในการออกฤทธิ์กันชักในโมเดลสัตว์ทดลอง แต่เนื่องจากฤทธิ์ของสาร VPU จะเพิ่มขึ้นได้เมื่อมี spermine ซึ่งจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ประสาทเมื่อมีอาการชัก ซึ่งอาจทำให้สาร VPU มีฤทธิ์แรงขึ้นในผู้ป่วยที่มีอาการชัก เมื่อพิจารณาประกอบกับกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆของสาร VPU ที่รายงานมาก่อนหน้านี้ เช่น การเสริมฤทธิ์กับ GABA หรือการลดปริมาณของ glutamate ในสมอง จึงมีความเป็นไปได้ที่ว่าฤทธิ์ด้านชักของ VPU เป็นผลสืบเนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์หลายๆชนิดที่อาจรวมไปถึงการ modulate การผ่านของอิออนต่างๆ จึงควรมีการศึกษาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์เท่าที่ศึกษามายังไม่มีกลไกใดที่น่าจะเป็นกลไกหลักในการออกฤทธิ์ด้านชักของสาร VPU ในโมเดลสัตว์ทดลอง จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปว่าสาร VPU จะมีฤทธิ์เป็น ionic modulator ด้วยหรือไม่



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- บุญยงค์ ตันติสิระ, มยุรี ตันติสิระ, ชำนาญ ภัทรพานิช และ ธงชัย สุขเสวต การศึกษาฤทธิ์ด้านการชักของอนุพันธ์ valproic acid รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กุมภาพันธ์ 2541.
- Bailer M, Pharmacokinetic considerations in the design of better and safer new antiepileptic drugs. *J.Control.Release* 62(1-2)(1999):187-192.
- Bialer M, Haj-Yehia A, Badir K and Hadad S Can we develop improved derivatives of valproic acid?. *Pharmacy World & Science*. 16(1994) : 2-6.
- Bailer M, Johannesson SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Perucca E and Tomson, T Progress report on new antiepileptic drugs : a summary of the Seventh Eilat Conference (EILAT VII). *Epilepsy Research*. 61 (2004) : 1-48.
- Brodie MJ, and Dichter MA. Antiepileptic drugs. *N.Engl.J.Med*. 334(1996) : 168-175.
- Bruni J, Valproate. In Shorvon S, Dreifuss FE, Fish D, and Thomas D (eds). The treatment of epilepsy. pp. 482-490. London : Blackwell Science 1996.
- Cull-Candy S, Brickley S and Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current opinion in neurobiology* 11(2001) : 327-335.
- Davis R, Peters DH, and McTavish D. Valproic acid : A reappraisal of its Pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drug*. 47 (2) (1994) : 332-372.
- Eadie MT, McKinnon GE, and Dunstan PR. Valproate metabolism during hepatotoxicity associated with the drug. *Quart.J.Med*. 284(1990) : 1229-1240.
- Elmarza MMA, Hauck RS, and Nau H. Anticonvulsant and neurotoxic activities of twelve analogues of valproic acid. *J.Pharm.Sci*. 82(1993) : 1255-1258.
- Gundersen CB, Miledi B and Parker I. Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc.R.Soc.London*. (1983) : B219-103.
- Hadad S, and Bailer M. Pharmacokinetic analysis and antiepileptic activity of two new isomers of N-valproyl p-glycinamide. *Biopharm Drug Dispos*. 7(1997) : 557-566.
- Isoherranen N, Woodhead JH, White HS and Bailer M. Anticonvulsant profile of Valrocemide (TV 1901) : a new antiepileptic drug. *Epilepsia*. 42(7), 2001 : 831-836.

- Janthet, S. Effects of N-(2-propylpentanoyl)urea on GABA_A receptor in acutely dissociated rats hippocampal neurons. Master's thesis. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. 2002.
- Julius D, MacDermott AB, Axel R and Jessell TM. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1C receptor. Science. 241 (1988) : 558.
- Kelso SR and Nelson-Leonard JP. Protein kinase c-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes. J.Physio. 449(1992) : 705-18.
- Kemp JA and McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug target. Nature (Neuroscience Supplement 5) (2002) : 1039-1042.
- Khongsombat O. Effect of N(2'-propylpentanoyl-2-pyrrolidinone and N-(2-propylpentanoyl) urea on neurons of cerebellar Purkinje cell in rats: Master's Thesis Chulalongkorn University, 1997.
- Kijsanayotin P, Hayama E, Shimizu R, Kawai N, Lida A, Nanbo T, Patarapanich C and Satoh T. Preclinical pharmacokinetic evaluation of N-(2-propylpentanoyl) Urea : a new anticonvulsant analogue of valproic acid. Proceedings of the Annual Meeting of American Society of Whole Body Autoradiography. Ann.Arbor.Michigan; U.S.A., 21-23 Sep, 1997.
- Kwan P, Sills GJ and Brodie MJ. The mechanism of action of commonly used antiepileptic drugs. Pharmacol & Therap 90(2001): 21-34
- Laurie DJ, and Seeburg PH. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. J.Neuroscience. 14 (1994) : 3180-3194.
- Leewanich P. Neuropharmacological studies on extracts of a Thai medicinal plants *Hunteria zeylanica* and its main component corymine. Doctoral dissertation, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan, 1998.
- Liu M, and Pollack GM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of valproate analogues in rat. IV. Anticonvulsant action and neurotoxicity of octanic acid. Cyclohexanecarboxylic acid, cyclohexanecarboxylic acid, and 1-methyl-1-cyclohexane carboxylic acid. Epilepsia. 35 (1994) : 234-243.

- Lojima N, Ishibashi H, Obata K and Kandel ER. Higher seizure susceptibility and enhances tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in fyn transgenic mice. Learn.Memory. 5 (1998) : 429-445.
- Loscher W. Effects on the antiepileptic drug valproate on metabolism and function of inhibitory and excitatory amino acid in the brain. Neurochem.Res. 18 (1993) : 485-502.
- Lynch DR and Guttman RP. Excitotoxicity Perspectives based on N-methyl-D-Aspartate Receptor Subtypes. J.Pharm.Exp.Ther. 300(2002) : 717-123.
- Macdonald RL and Kelly KM. Antiepileptic drug mechanism of action. Epilepsia. 34(Suppl5)(1993) : 51-58.
- Mayer ML and Westbrook GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. Prog.Neurobiol. 28(3) (1987) : 197-276.
- Meesomboon R, Chongsutgaweewong R, Patarapanich C, Rojsithisak P and Tantisira MH. (1998) In vitro embryotoxicity of an anticonvulsant. Valproic analogue : N-(2-propylpentanoyl)urea. Proc.Aust.Physio.Pharm.Soc. 29(2) : 270 p.
- Meldrum BS and Rogawski MA. Molecular Target for Antiepileptic Drug Development. J Am Soc Exp Neuro Ther 4(2007) : 18 - 61
- Mori H and Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. Neuropharmacology 34 (1995) : 1219-1237.
- Moriyashi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Rizuno N and Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. Nature 354(1991) : 31-37.
- Narita M, Aoki T and Suzuki T. Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-ethyl-D-aspartate receptors in the development of morphine induced place preference. Neuroscience 101 (2000) : 601-606.
- Ozawa S Kamiya H and Ixuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog Neuro 54(1998) : 581-618.
- Patchamart W. Hepatotoxicity of N-(2-propylpentanoyl) urea in rats. Master Thesis chulalongkorn University, 1996.
- Penry JK. Introduction : Valproate monotherapy in the treatment of epilepsy. Am.J.Med 84 (suppl 1A)(1998) : 1-2.

- Porter R. Classification of epileptic syndrome. In J Laidlaw, A Richens and D Chadwick, Textbook of epilepsy. 4th ed., pp. 1-19. London : Churchill Livingstone. 1993.
- Rogawski MA, and Porter RR. Antiepileptic drug : Pharmacological mechanism and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. Pharmacol Rev. 42 (1990) : 223-286.
- Rowan AJ. Diagnosis and treatment of seizures in the elderly : current recommendations. In Schmidt D, Schachter SC. Epilepsy : Problem solving in clinical practice. pp. 65-76. London : Martin Dunitz, 2000.
- Saisorn B, Patarapaninch C, and Janwitayanuchit W. Synthesis of monoureide analogues of valproic acid. Thai.J.Pharm.Sci. (16) 1992 : 145-150.
- Smart TG and Drishek BJ. *Xenopus* oocytes microinjection and ion-channel expression. In, A Boulton : G, Baker : and W. Walz (eds.). Patch-clamp applications and protocols. pp. 259-305 : Humana Press Inc, 1995.
- Sooksawate T. Anticonvulsant effects of N-(2-propylpentanoyl) urea. Master Thesis Chulalongkorn University, 1995.
- Spiegelstein O, Yagen B and Bailer M. Structure-pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of N-alkyl derivatives of the new antiepileptic drug valproyl glycineamide. Epilepsia 40(5) 1999 : 545-552.
- Standaert DG, Testa CM, Young AB, and Penney JB.Jr. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. J.Comp.Neurol. 343 (1994) : 1-16.
- Stringer J. Drug for seizure disorder (Epilepsies). In Brody, TM, Larier J and Minneman KP (eds.), Human Pharmacology : Molecular to Clinical. 3th ed., pp. 373-382. New York : Mosby, 1998.
- Tantisira B, Tantisira MH, Patarapaninch c sooksawate T and Chunngam T. Preliminary evaluation of the anticonvulsant activity of valproic acid analog. : N-(2-propylpentanoyl) urea. Res.com.Mol.Patho.Pharm. 97(2) 1997 : 151-164.
- Ure JA, and Perassolo M. Update on the pathophysiology of the epilepsies. J Neurological Sciences. 177(2000) : 1-17.

Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, and Bruer S. The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. Cell.Physio.Biochem. 10 (2000) : 1-12.

Wahi P, Ragsdale D, Schousboe A: and Mideli R. Expression of neurotransmitter receptors by mRNAs from neurons developing in vitro : a *Xenopus oocyte* expression study J.Neurochem. 60 (1993) : 57-65.

Williams K. Separating dual effects of zinc at recombinant N-methy-D-Aspartate receptors. Neurosci.Lett 215(1996) : 9-12.

Williams K. Interaction of polyamines with ion channels. Biochem J 325(pt2) (1997): 289 - 297



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย