



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ผลของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย และกรดวาลโปรอิก
ที่มีต่อตัวรับชนิดยับยั้งกาบาเอและไกลซีน
ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสของหนูขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ธงชัย สุขเสวต

มิถุนายน พ.ศ. 2550

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุน
เงินทุนวิจัย ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือใน
การวิจัย หน่วยปฏิบัติการวิจัยประสาทสรีรวิทยาและประสาทเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ ที่ให้
การสนับสนุนด้านเครื่องมือในการวิจัย ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช ที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวก
สะดวกในการสังเคราะห์สาร N-(2-propylpentanoyl) urea อาจารย์ บุคลากรและนิสิตบัณฑิตศึกษาของ
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ ที่ให้การช่วยเหลือด้านต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย ผลของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย และกรดวาลโพรอิก ที่มีต่อตัวรับ
ชนิดยับยั้งกาบาเอและไกลซีนในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสของหนูขาว

ชื่อผู้วิจัย รศ.ดร.ธงชัย สุขเสวต

เดือนและปี มิถุนายน พ.ศ. 2550

บทคัดย่อ

เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย (วีพียู) เป็นอนุพันธ์ของกรดวาลโพรอิก (วีพีเอ) ที่มีฤทธิ์ด้าน
ชักในแบบจำลองการชักในสัตว์ทดลองทั้งหนูแรทและหนูเม้าส์ อย่างไรก็ตามกลไกการด้านชักของวีพียู
ยังไม่ทราบแน่ชัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบผลของวีพียูและวีพีเอต่อตัวรับชนิดยับยั้ง
กาบาเอและไกลซีนในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่แยกออกมาของหนูขาว (หนูแรท) โดยใช้เทคนิค
แพทช์แคลมป์แบบทั้งเซลล์ แม้ว่าสารวีพีเอ (ความเข้มข้นจนถึง 3 มิลลิโมลาร์) และวีพียู (ความเข้มข้น
จนถึง 300 ไมโครโมลาร์) ไม่มีผลกระตุ้นโดยตรงให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และไม่มีผล
ใดๆ ต่อกระแสที่เหนี่ยวนำด้วยไกลซีน สารทั้งสองสามารถเสริมฤทธิ์กระแสที่เหนี่ยวนำด้วยกาบาแบบ
ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร อย่างไรก็ตามสารวีพีเอจะเสริมฤทธิ์ได้เฉพาะที่ความเข้มข้นสูงมาก
เท่านั้น (300-3000 ไมโครโมลาร์) สำหรับการเสริมฤทธิ์ของสารวีพียูก็ควรใช้ความเข้มข้น (10-300 ไม
โครโมลาร์) ที่สูงกว่าสารไดอะซีเปม เพนโทบาร์บิทัลโซเดียมและโพรพอฟอล ซึ่งการเสริมฤทธิ์ของวี
พียูนี้ไม่สามารถยับยั้งด้วยสารฟลูมาเซนิล ซึ่งเป็นสารต้านที่บริเวณเบนโซไดอะซีปีนบนตัวรับกาบาเอ
แสดงให้เห็นว่า VPU มีได้ออกฤทธิ์ผ่านบริเวณเบนโซไดอะซีปีนบนตัวรับนี้ เมื่อศึกษาผลของวีพียูที่มี
ต่อการเสริมฤทธิ์ของเพนโทบาร์บิทัลโซเดียมต่อตัวรับกาบาเอก็พบว่า วีพียูจะเพิ่มการเสริมฤทธิ์ของ
เพนโทบาร์บิทัลโซเดียมต่อตัวรับกาบาเอ แต่เมื่อศึกษาผลของวีพียูต่อฤทธิ์กระตุ้นโดยตรงต่อตัวรับกา
บาเอของเพนโทบาร์บิทัลโซเดียมกลับพบว่า วีพียูสามารถยับยั้งฤทธิ์ของเพนโทบาร์บิทัลโซเดียมได้
ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า วีพียูมีปฏิริยาต่อกันโดยตรงหรือโดยอ้อมกับเพนโทบาร์บิทัลโซเดียม ที่
บริเวณบาร์บิทูเรทบนตัวรับกาบาเอ อย่างไรก็ตามยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกของการ
เกิดปฏิริยาต่อกันนี้ โดยสรุปแล้วผลการเสริมฤทธิ์ของวีพียูต่อตัวรับกาบาเออาจจะมีส่วนในการออก
ฤทธิ์ด้านชักของสารตัวนี้

Project Title	Effects of N-(2-propylpentanoyl) urea and valproic acid on inhibitory GABA _A and glycine receptors in rat hippocampal neurones
Name of Investigator	Associate Professor Dr. Thongchai Sooksawate
Year	June 2007

Abstract

N-(2-propylpentanoyl) urea (VPU) is a valproic acid (VPA) analogue which exhibited an anticonvulsant activity in several animal models in rats and mice. However, the mechanisms of its anticonvulsant effects are not clear. Thus, this study was aimed to investigate the effects of VPU and VPA on the inhibitory GABA_A and glycine receptors in isolated rat hippocampal neurons using whole-cell patch clamp technique. Although VPA (concentration up to 3 mM) or VPU (concentration up to 300 μ M) did not induce a membrane current or enhance a glycine-induced current, both of them enhanced the GABA-induced currents in a concentration-dependent manner. However, VPA potentiated the GABA-induced currents only at very high concentrations (300-3000 μ M). The GABA potentiation effect of VPU required higher concentrations (10-300 μ M) in comparison to diazepam, pentobarbital sodium (PB) and propofol. The potentiation of GABA_A currents by VPU was not inhibited by a benzodiazepine antagonist flumazenil. This result indicates that the effect of VPU on the GABA_A receptor is not mediated via the benzodiazepine site on this receptor. In the experiment to investigate the interaction between VPU and PB on the GABA_A receptor, it was found that VPU enhanced the GABA potentiation effect of PB. However, the GABA_A currents induced by PB were inhibited by VPU. These results indicate that VPU may interact directly or indirectly with the barbiturate site(s) on the GABA_A receptor to exhibit its GABA potentiation effect. However, further investigation is needed to examine the mechanism(s) of this interaction. In conclusion, the potentiation effect of VPU on the GABA_A receptors may, at least in part, contribute to its anticonvulsant activity.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญ	v
รายการภาพประกอบ	vii
รายการสัญลักษณ์	x
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
Valproic acid	2
N-(2-propylpentanoyl) urea หรือ Valproyl urea	3
กรดแกมมาอะมิโนบิวไทริกหรือกาบา	4
ไกลซีน	7
วิธีการวิจัย	8
1. สัตว์ทดลอง	8
2. การแยกเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเดี่ยวจากสมองของหนูขาว (หนูแรท)	8
3. การบันทึกกระแสที่ไหลผ่านเซลล์ประสาทด้วยวิธี Whole-cell patch clamp	9
4. ศึกษาผลของสาร เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย และกรดวาลโปรอิก	9
5. สารเคมี	10
6. การวิเคราะห์ห้ข้อมูล	10
ผลการวิจัย	12
1. ผลของ Valproyl urea (VPU) และ Valproic acid (VPA) ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลผ่านเซลล์ประสาทโดยตรง	12
2. ผลของ Valproyl urea (VPU) และ Valproic acid (VPA) ในการเสริมฤทธิ์ GABA ที่มีต่อ GABA _A receptors	15

3. ผลของ Valproyl urea (VPU) และ Valproic acid (VPA) ที่มีต่อ Glycine receptors	24
4. ผลของ Flumazenil ที่มีต่อ การเสริมฤทธิ์ ของ Valproyl urea ที่มีต่อ GABA _A receptors	30
5. ผลของ Valproyl urea ที่มีต่อฤทธิ์ของ Pentobarbital ต่อ GABA _A receptors	34
การอภิปรายผล	38
ผลของ VPA ที่มีต่อตัวรับของสารสื่อประสาทกรดอมิโนชนิดยับยั้ง	38
ผลของ VPU ที่มีต่อตัวรับของสารสื่อประสาทกรดอมิโนชนิดยับยั้ง	39
ข้อสรุป	42
ข้อเสนอแนะ	43
ส่วนอ้างอิง	44



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. โครงสร้างของ N-(2-propylpentanoyl) urea เปรียบเทียบกับ Valproic acid และ Barbiturates	3
2. ภาพบันทึกแสดงผลของ A. Valproyl urea (50-300 μM) และ B. Valproic acid (10-3000 μM) C. Diazepam (1-1000 μM) ที่ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส	13
3. ภาพบันทึกแสดงผลของ A. Pentobarbital sodium (30-1000 μM) และ B. Propofol (10-300 μM) ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย 10 μM Bicuculline methochloride	14
4. ภาพบันทึกแสดงผลของ VPU ความเข้มข้น 100 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส A. ผลจากการให้ GABA เดี่ยว, B. ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ VPU	16
5. ผลของ VPU 100-300 μM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM	17
6. ภาพบันทึกแสดงผลของ VPA ความเข้มข้น 3 mM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส A. ผลจากการให้ GABA เดี่ยว, B. ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ VPA	18
7. ผลของ VPA 1-3 mM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM	19

รูปที่

8. ภาพบันทึกแสดงผลของ **A.** VPU (1-300 μM) และ **B.** VPA (10-5000 μM) ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส 21
9. ภาพบันทึกแสดงผลของ **A.** Diazepam (0.01-10 μM), **B.** Pentobarbital (1-1000 μM) และ **C.** Propofol (1-100 μM) ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส 22
10. ผลของ VPU (1-300 μM), VPA (10-5000 μM), Propofol (PPF, 1-100 μM), Pentobarbital (PB, 1-1000 μM) และ Diazepam (DZP, 0.01-30 μM) ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส 23
11. ภาพบันทึกแสดงผลของ VPU ความเข้มข้น 300 μM ต่อ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส **A.** ผลจากการให้ Glycine เดี่ยว, **B.** ผลจากการให้ Glycine ร่วมไปกับ VPU 25
12. ผลของ VPU 300 μM ที่มีต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM 26
13. ภาพบันทึกแสดงผลของ VPA ความเข้มข้น 3 mM (3000 μM) ต่อ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส **A.** ผลจากการให้ Glycine เดี่ยว, **B.** ผลจากการให้ Glycine ร่วมไปกับ VPA 27
14. ผลของ VPA 3 mM ที่มีต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM 28

15. ภาพบันทึกแสดงผลที่แสดงว่า **A.** VPU (1-300 μM) (n=9) และ **B.** VPA (10-3000 μM) (n=4) ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ Glycine ความเข้มข้น 30 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส 29
16. ภาพบันทึกแสดงผลของ flumazenil (FMZ) ความเข้มข้น 5-15 μM ที่ **(A)** ไม่สามารถกระตุ้นโดยตรงให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (n=3) และ **(B)** ไม่มีผลต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (n=6) 31
17. ภาพบันทึก **(A)** และกราฟแสดงผล **(B)** ของ flumazenil (FMZ) (5-15 μM) ที่ยับยั้งฤทธิ์ของ Diazepam 1 μM ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (n=5) 32
18. ภาพบันทึก **(A)** และกราฟแสดงผล **(B)** ของ flumazenil (FMZ) (5-15 μM) ที่ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ VPU 300 μM ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (n=7) 33
19. ภาพบันทึกแสดงผล Valproyl urea (VPU) 300 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ Pentobarbital (PB; 10-1,000 μM) ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (n=14) **A.** เมื่อให้ Pentobarbital เดี่ยว **B.** เมื่อให้ VPU ร่วมกับ Pentobarbital 35
20. ภาพแสดงผล Valproyl urea (VPU) 100-300 μM ที่มีต่อ Pentobarbital concentration-response curve **(A)** และผลการยับยั้งกระแสที่เกิดจาก Pentobarbital (PB) ขนาด 1,000 μM **(B)** 36
21. ภาพบันทึก **(A)** และกราฟแสดงผล **(B)** ของ Valproyl urea (VPU) 300 μM ที่มีต่อฤทธิ์ของ Pentobarbital 10 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส 37

รายการสัญลักษณ์

ANOVA	=	analysis of variance
ATP	=	adenosine triphosphate
BIC	=	bicuculline methochloride
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DZP	=	diazepam
FMZ	=	flumazenil
GABA	=	gamma-aminobutyric acid
HCl	=	hydrochloric acid
MES	=	maximal electroshock seizure
μM	=	micromolar
mM	=	millimolar
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
PB	=	pentobarbital sodium
PPF	=	propofol
PTZ	=	pentylenetetrazol
S.E.M.	=	standard error of the mean
TBPS	=	<i>t</i> -butylbicyclophosphorothionate
TM	=	transmembrane
VPA	=	valproic acid
VPU	=	valproyl urea

บทนำ

โรคลมชัก (Epilepsy) เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากความผิดปกติของสมองที่ทำให้เกิดอาการชัก (seizure) ซึ่งภาวะดังกล่าวอาจเกิดขึ้นอย่างทันทีทันใด และอาการชัคนั้นหยุดได้เองในระยะเวลาสั้นๆ รวมถึงอาจเกิดขึ้นอย่างซ้ำๆ กันได้ ส่งผลให้การทำหน้าที่ของสมองในการรับรู้สื่อก ควบคุมการเคลื่อนไหว และระบบประสาทอิสระผิดปกติไป (McNamara, 2001; Stringer, 1998) ภาวะความผิดปกติดังกล่าวยังไม่ทราบพยาธิสภาพที่แน่ชัด โดยอาจเกิดจากสภาวะของการเสียสมดุลของสารสื่อประสาทหรือคุณสมบัติทางสรีรวิทยาไฟฟ้าของกลุ่มเซลล์ประสาทบางตำแหน่งในสมอง (Fukuzako and Izumi, 1991; Gilroy, 2000) ในการรักษาโรคลมชัก กรดวาลโพรอิก (Valproic acid, VPA) ถูกนำมาใช้เป็นยาต้านชักอย่างกว้างขวางทั้งในโรคลมชักทั้งชนิด generalized และ partial seizures และในปัจจุบันได้นำมาใช้รักษาในโรคอื่นๆ เพิ่มขึ้นได้แก่ bipolar disorders, neuropathic pain และใช้ป้องกันการปวดหัวไมเกรน โดยกลไกการออกฤทธิ์ของกรดวาลโพรอิกมีหลายกลไก การต้านชักของกรดวาลโพรอิกน่าจะเกิดจากผลรวมของกลไกต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่ การเพิ่มการทำงานของ GABAergic system การลดการทำงานของ glutamatergic system และผลที่มีต่อ membrane electrical properties ซึ่งจะลด neuronal excitability ผ่านทางการยับยั้ง sodium ion channels และเพิ่ม potassium conductance (Johannessen, 2000) อย่างไรก็ตามกรดวาลโพรอิกก็พบอาการข้างเคียงที่รุนแรง คือการเป็นพิษต่อตับ (Hepatotoxicity) และการเกิดลูกวิรูป (Teratogenicity) รวมทั้งในจำนวนประชากรที่ประสบปัญหาโรคลมชัก พบว่ามีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถควบคุมอาการชักได้ด้วยยาต้านชักที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีความพยายามที่จะแสวงหายาต้านชักชนิดใหม่ หรือเป็นอนุพันธ์ของยาต้านชักที่ใช้อยู่เพื่อให้ได้ยาที่มีคุณสมบัติต้านชักที่ดีขึ้น ในปี ค.ศ. 1992 บุญอรธร สายสร และคณะ ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของยาต้านชัก Valproic acid โดยได้สารตัวหนึ่ง คือ N-(2-propylpentanoyl) urea ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับยาในกลุ่ม Barbiturates ซึ่งเพิ่มการทำงานของตัวรับ GABA_A และมีฤทธิ์ต้านการชักได้ดีกว่า Valproic acid ทั้งในหนูแรทและหนูเม้าส์ (Tantisira *et al.*, 1997) จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้ ที่ผ่านทางตัวรับ GABA_A และตัวรับไกลซีนในเซลล์ประสาท

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของ N-(2-propylpentanoyl) urea และ Valproic acid ที่มีต่อตัวรับ GABA_A และ glycine บนเยื่อหุ้มเซลล์ในเซลล์ประสาทที่แยกได้ทันทีจากฮิปโปแคมปัสของหนูขาว (หนูแรท) โดยใช้เทคนิค Patch clamp

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Valproic acid (VPA)

Valproic acid (2-propylpentanoic acid; di-*n*-propylacetic acid, VPA) ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกโดย Burton ในปี ค.ศ. 1882 (Kupferberg, 1982) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นตัวทำละลาย (Bruni, 1996) ต่อมาในปี ค.ศ. 1963 Meunier ค้นพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านชักเมื่อถูกนำมาใช้เป็นสารละลายในโปรแกรมการค้นคว้าหายาใหม่ (Johnston และ Slater, 1982) Valproic acid มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1

Valproic acid ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาโรคลมชักทั้งชนิด generalized และ partial epilepsy (Rowan, 2000; Johannessen และ Johannessen, 2003; Peterson และ Naunton, 2005) แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด โดยเชื่อว่า Valproic acid อาจมีกลไกการออกฤทธิ์ได้หลายกลไกร่วมกันในการออกฤทธิ์ต้านชัก ได้แก่

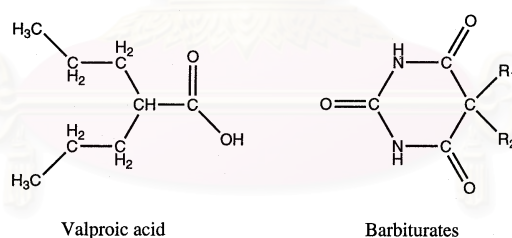
- 1) Valproic acid มีผลไปเพิ่มระดับของ Gamma - aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งในสมอง โดยยาอาจมีผลไปยับยั้งเอนไซม์ที่ทำลาย GABA เช่น GABA amino transferase และ succinic semialdehyde dehydrogenase และ aldehyde reductase หรือไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutamic acid decarboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ GABA (Johannessen, 2000; Johannessen และ Johannessen, 2003)
- 2) Valproic acid มีผลไปยับยั้ง Voltage-dependent Na^+ channel และ T-type Ca^{2+} channel และเพิ่ม K^+ -conductance (Willmore, 1999)
- 3) Valproic acid มีผลลดการตอบสนองของ N-methyl-D-aspartate (NMDA) ที่มีต่อตัวรับ NMDA และลดการสังเคราะห์สาร glutamate ส่งผลให้ลด glutamatergic neurotransmission (Johannessen, 2000; Johannessen และ Johannessen, 2003)
- 4) Valproic acid สามารถลด cerebral glucose metabolism ซึ่งภาวะการชักมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ cerebral glucose metabolism อย่างมาก เมื่อลด metabolism นี้ได้ย่อมส่งผลให้การทำหน้าที่ของเซลล์ประสาทผ่านทางการยับยั้งช่องไอออนของโซเดียม (Johannessen และ Johannessen, 2003)

สำหรับฤทธิ์ของ VPA ที่มีต่อตัวรับ GABA_A นั้น พบว่า VPA สามารถเสริมฤทธิ์ของสาร muscimol ซึ่งเป็นสารกระตุ้นตัวรับ GABA_A ได้ก็แต่เฉพาะในขนาดความเข้มข้นที่สูงมากในระดับมิลลิโมลาร์เท่านั้น (Harrison และ Simmonds, 1982)

ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ Valproic acid กันอย่างกว้างขวาง แต่ Valproic acid ก็มีความแรงของการออกฤทธิ์ต้านชักในระดับปานกลาง เนื่องจากผ่าน blood-brain barrier ได้ไม่ดีนักเมื่อเทียบกับยาต้านชักตัวอื่น เช่น phenobarbital, phenytoin และ carbamazepine (Bialer *et al.*, 1994) นอกจากนี้ Valproic acid ยังทำให้เกิดพิษและอาการข้างเคียงที่สำคัญ 2 ประการคือ พิษต่อตับ (hepatotoxicity) และ พิษต่อการพัฒนาตัวอ่อนในครรภ์ (teratogenicity) รวมทั้งยังอาจเป็นพิษต่อไต กล้ามเนื้อลายและเกิดอาการเซื่องซึม (Davis *et al.*, 1994) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงได้มีผู้พยายามปรับปรุงสูตรโครงสร้างของ Valproic acid เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงขึ้น และมีอาการอันไม่พึงประสงค์ลดลง (Johannessen และ Johannessen, 2003)

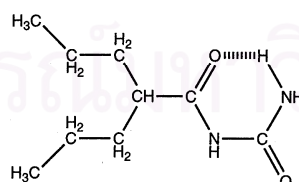
N-(2-propylpentanoyl) urea หรือ Valproyl Urea (VPU)

N-(2-propylpentanoyl) urea หรือ Valproyl Urea (VPU) เป็นสารสังเคราะห์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Valproic acid สังเคราะห์ขึ้นโดย บุญอรรด สายสร และคณะในปี ค.ศ. 1992 (Saisorn *et al.*, 1992) สารชนิดนี้มีลักษณะ โครงสร้างของโมเลกุลด้านหนึ่งมีโครงสร้างคล้าย Valproic acid และอีกด้านหนึ่งมีโครงสร้างคล้าย Barbiturates ซึ่งมีฤทธิ์ต้านชักเช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 1



Pentobarbital : R1 = ethyl, R2 = 1-methylbutyl

Phenobarbital : R1=ethyl, R2 = phenyl



N-(2-Propylpentanoyl) urea

รูปที่ 1 โครงสร้างของ N-(2- propylpentanoyl) urea เปรียบเทียบกับ Valproic acid และ Barbiturates

จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของ VPU พบว่า VPU มีความแรงในการออกฤทธิ์ด้านการชักได้สูงกว่า Valproic acid ในหนูแรทและหนูเม้าส์ ทั้งในการทดสอบด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (maximal electroshock seizure; MES) การใช้สาร pentylenetetrazole (PTZ) และสาร bicuculline รวมทั้งมีความปลอดภัยในการใช้สูงกว่า Valproic acid (Tantisira และคณะ, 1997) นอกจากนี้ VPU ยังสามารถยับยั้งการชักที่เหนี่ยวนำให้เกิดได้ด้วยสาร pilocarpine ในหนูแรท (Khongsombat, 2004) โดยพบว่า VPU สามารถลดระดับของสารกลูตาเมตในเปลือกสมองใหญ่ของหนูแรท (Chunngam, 1996) ยับยั้งการทำงานของตัวรับกลูตาเมต ชนิด NMDA (Ponsub, 2003) ลดความถี่ในการเกิดสัญญาณประสาทของเซลล์ประสาทเปลือกสมองใหญ่และสมองน้อย (Khongsombat, 1997)

กรดแกมมาอะมิโนบิวไทริกหรือกาบา (γ -aminobutyric acid, GABA)

กรดแกมมาอะมิโนบิวไทริก (γ -aminobutyric acid) หรือกาบา (GABA) เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งหลัก ในระบบประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยที่จุดประสานประสาท (synapse) ภายในระบบประสาทส่วนกลาง ที่ใช้กาบาเป็นสารสื่อประสาทจะมีประมาณ 20-50% ขึ้นกับบริเวณของสมอง (Sieghart, 1995) ในการออกฤทธิ์ของกาบานั้นจะผ่านทางตัวรับ 2 ชนิด คือ ตัวรับกาบาเอ ($GABA_A$ receptor) ซึ่งเป็นตัวรับชนิดช่องไอออน (ionotropic receptor) และตัวรับกาบาบี ($GABA_B$ receptor) ซึ่งเป็นตัวรับชนิดเมแทบอโทรฟิก (metabotropic receptor) (Sieghart, 1995; Barnard *et al.*, 1998) การกระตุ้นตัวรับกาบาเอ จะเกิดการตอบสนองอย่างรวดเร็วทำให้ช่องไอออน (ion channel) ที่เฉพาะเจาะจงกับคลอไรด์ไอออนเปิดออก ซึ่งโดยทั่วไปจะทำให้คลอไรด์ไอออนแพร่เข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดภาวะการเกิดขั้วเกิน (hyperpolarization) เป็นการยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท (Sieghart, 1995) สำหรับการกระตุ้นตัวรับกาบาบี จะมีการตอบสนองที่ช้ากว่าและยาวนานกว่า โดยจะส่งสัญญาณต่อไปยัง จี-โปรตีน (G-protein) ซึ่งจะไปมีผลต่อช่องโพแทสเซียม (potassium channel) ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane conductance) ต่อโพแทสเซียมไอออน ทำให้เกิดภาวะการมีขั้วเกินของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นการลดการทำงานของเซลล์ประสาท และยังมีผลต่อช่องแคลเซียม (calcium channel) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ก่อนจุดประสานประสาท (presynaptic membrane) ทำให้มีการลดลงของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อแคลเซียมไอออน ช่วยลดการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น นอกจากนี้ยังอาจออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นหรือยับยั้ง (ขึ้นกับชนิดของจี-โปรตีนที่จับอยู่กับตัวรับกาบาบี) เอ็นไซม์อะดีโนไซคลาส (Adenylate cyclase) ในการสร้างไซคลิกอะดีโนซีน โมโนฟอสเฟต (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) ซึ่งเป็นหนึ่งในระบบนำ

รหัสดิษฏุมิ (secondary messenger system) (รายละเอียดตัวรับกาบาบี ดูที่ Bowery, 2000; Bettler et al., 2004; Kornau, 2006)

ตัวรับกาบาเอ (GABA_A receptor) จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มใหญ่ของช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Ligand-gated ion channel superfamily) อันได้แก่ ตัวรับนิโคตินิกแอซีติลโคลีน (nicotinic acetylcholine receptor), ตัวรับกาบาเอ (GABA_A receptor), ตัวรับไกลซีน (glycine receptor), ตัวรับกลูตาเมตชนิดช่องไอออน (ionotropic glutamate receptor), ตัวรับไฟฟ์-เอชทีทีรี (5-HT₃ receptor) และตัวรับพิทูเอกซ์ (P2X receptor) สำหรับโครงสร้างของตัวรับกาบาเอประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อย (subunit) 5 หน่วย มารวมตัวกันเป็นตัวรับชนิดนี้ (Nayeem et al., 1994) ซึ่งหน่วยย่อยเหล่านี้สามารถจัดแบ่งเป็นหมู่ (class) ได้หลายหมู่ จนถึงปัจจุบัน ได้แก่ หน่วยย่อยแอลฟา (α subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟา1-6 (α 1- α 6 subunits), หน่วยย่อยบีตา (β subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยบีตา1-4 (β 1- β 4 subunits), หน่วยย่อยแกมมา (γ subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยแกมมา1-3 (γ 1- γ 3 subunits), หน่วยย่อยเดลตา (δ subunit), หน่วยย่อยเอฟซิลอน (ϵ subunit), หน่วยย่อยไพ (π subunit), หน่วยย่อยโรห์ (ρ subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยโรห์1-3 (ρ 1- ρ 3 subunits) (Barnard et al., 1998; Sieghart et al., 1999; Möhler, 2006) และหน่วยย่อยเทตา (θ subunit) (Whiting, 1999; Whiting, 2006)

หน่วยย่อยของตัวรับกาบาเอซึ่งเป็นสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide) จะมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับตัวรับอื่นในกลุ่มใหญ่ของช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Whiting et al., 1995; Whiting, 2006) แต่ละสายพอลิเพปไทด์ จะประกอบขึ้นด้วยส่วนที่สำคัญ (Macdonald and Olsen, 1994; Whiting et al., 1995) ได้แก่

- ส่วนไม่ชอบน้ำและผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane hydrophobic segment) จำนวน 4 ตอน (ตอนผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ที่ 1-4, TM1-4) โดยเชื่อว่าตอนผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ที่ 2 (TM2) ของทั้ง 5 หน่วยย่อยที่มารวมกันเป็นตัวรับ อาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างที่เป็นท่อของตัวรับชนิดนี้
- โดเมน (domain) ภายนอกเซลล์ซึ่งเป็นส่วนชอบน้ำขนาดใหญ่ที่ปลายด้านในโตรเจน (N-terminal) ของสายพอลิเพปไทด์ จะมีหลายบริเวณที่เป็นบริเวณไกลโคซิเลชัน (glycosylation site) และบริเวณขมวดเป็นวง (loop) ที่เกิดจากกรดอะมิโนซิสตีน 2 โมเลกุลบนสายพอลิเพปไทด์ มาทำปฏิกิริยาจับกันอยู่ ซึ่งเชื่อว่าเป็นบริเวณที่สารกาบาและลิแกนด์บางชนิดมาจับกับตัวรับนี้
- โดเมนขนาดใหญ่ลักษณะเป็นวง (loop) ภายในเซลล์ ระหว่างตอนผ่านข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ที่ 3 กับ ที่ 4 (TM3 and TM4) เป็นส่วนที่มีบริเวณที่จะเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟไรเลชัน

(phosphorylation) โดยเอนไซม์ไคเนส (kinase) หลายชนิด ซึ่งจะควบคุมการทำงานของตัวรับชนิดนี้

เนื่องจากการสร้างตัวรับกาบาเอ 1 ตัวรับ ต้องอาศัยหน่วยย่อย (subunit) มารวมกัน 5 หน่วย ในขณะที่มีการพบหน่วยย่อยแล้วอย่างน้อย 20 ชนิด ถ้าหน่วยย่อยเหล่านี้สามารถมารวมกันเป็นตัวรับกาบาเอได้แบบสุ่ม จะมีโอกาสที่จะได้โครงสร้างของตัวรับกาบาเอที่แตกต่างกันเป็นจำนวนมาก (Sieghart *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงแล้วจะมีจำนวนไม่เกิน 800 ชนิด (Barnard *et al.*, 1998) โดยทั่วไปตัวรับกาบาเอธรรมชาติ (native GABA_A receptor) จะมีโครงสร้างปริมาณสัมพันธ์ (Stoichiometry) ของหน่วยย่อย เป็น 2 α 2 β 1 γ หรือ 2 α 1 β 2 γ โดยที่หน่วยย่อยแกมมา (γ subunit) อาจทดแทนได้ด้วย หน่วยย่อยเดลตา (δ subunit) หรือเอพซิลอน (ϵ subunit) (Barnard *et al.*, 1998) ในสมองหนูแรทพบมีตัวรับกาบาเอชนิด $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ มากที่สุด (43%) รองลงมาเป็น ชนิด $\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_2$ (18%) และ $\alpha_3\beta_{n/2/3}$ (17%) และชนิดอื่นๆ อีกไม่มากนัก (McKernan and Whitting, 1996) จากการที่ตัวรับกาบาเอมีส่วนประกอบในโครงสร้างที่แตกต่างกัน ทำให้ตัวรับกาบาเอมีคุณสมบัติทางสรีรวิทยาไฟฟ้าและเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน (Sieghart, 1995; Barnard *et al.*, 1998; Sieghart *et al.*, 1999)

การจับของกรดอะมิโนกาบากับตัวรับกาบาเอจะทำให้เกิดการเปิดของช่องในตัวรับนี้ ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับคลอไรด์ไอออน ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane conductance) ต่อคลอไรด์ไอออน โดยทั่วไปจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท (Study and Barker, 1981; Sieghart, 1995) ในการกระตุ้นตัวรับกาบาเอต้องอาศัยกรดอะมิโนกาบาอย่างน้อย 2 ตัวจึงจะเพียงพอที่จะกระตุ้นตัวรับชนิดนี้ได้ (Sakmann *et al.*, 1983) นอกจากกรดอะมิโนกาบาแล้วยังมีตัวทำการ (agonist) อีกหลายชนิดที่กระตุ้นตัวรับนี้ ได้แก่ muscimol, isoguvacine, piperidine-4-sulphonic acid และ 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolol [5,4-c]pyridin-3-ol เป็นต้น สาร bicuculline จะเป็นตัวต้านชนิดแข่งขัน (competitive antagonist) ในขณะที่ picrotoxinin, pentylenetetrazol (PTZ) and *t*-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) เป็นสารต้านชนิดไม่แข่งขัน (non-competitive antagonist) นอกจากนี้ยาหรือสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยาหลายชนิดยังสามารถปรับแต่ง (modulate) การกระตุ้นของกรดอะมิโนกาบาต่อตัวรับกาบาเอ ซึ่งได้แก่ benzodiazepines, barbiturates, neuroactive steroids, ethanol, propofol, etomidate, loreclezole, anesthetics และ Zn²⁺ เป็นต้น สารเหล่านี้ออกฤทธิ์โดยการจับกับบริเวณยึดเหนี่ยวอลโลสเตอริก (allosteric binding site) ที่แตกต่างกันบนตัวรับกาบาเอ (Macdonald and Olsen, 1994; Sieghart, 1995; Upton and Blackburn, 1998)

ไกลซีน (Glycine)

กรดอมิโนไกลซีน ถูกจัดเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งในระบบประสาทของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนมที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะที่ไขสันหลัง (spinal cord) และก้านสมอง (brain stem) (Betz, 1991) โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองแบบรีเฟล็กซ์ การควบคุมการเคลื่อนไหวภายใต้อำนาจบังคับของจิตใจ และการรับรู้ความรู้สึกของสมองส่วนกลาง (Rajendra *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอมิโนไกลซีนยังมีบทบาทเป็น ตัวทำการร่วม (coagonist) กับกรดอมิโนกลูตาเมต ที่ตัวรับเอนเอมดีเอ (NMDA receptor) ซึ่งเป็นตัวรับย่อยชนิดหนึ่งของตัวรับกลูตาเมตชนิดช่องไอออน (ionotropic glutamate receptor) ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ประสาท (รายละเอียด ดู Danysz and Parsons, 1998)

ตัวรับไกลซีน (glycine receptor หรือ strychnine-sensitive glycine receptor) เช่นเดียวกับตัวรับกาบาเอ จัดอยู่ในกลุ่มใหญ่ของช่องไอออนที่กระตุ้นให้เปิดด้วยลิแกนด์ (Ligand-gated ion channel superfamily) ประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อย (subunit) 5 หน่วย มารวมตัวกันเป็นตัวรับชนิดนี้ (Betz, 1991; Kuhse *et al.*, 1995; Rajendra *et al.*, 1997) หน่วยย่อยของตัวรับไกลซีนจนถึงปัจจุบันพบ 2 กลุ่ม คือ หน่วยย่อยแอลฟา (α subunit) ประกอบด้วยหน่วยย่อยแอลฟา1-4 ($\alpha 1$ - $\alpha 4$ subunits) และ หน่วยย่อยบีตา (β subunit) (Rajendra *et al.*, 1997; Maksay *et al.*, 2001) (สำหรับรายละเอียดโครงสร้างและหน้าที่ของตัวรับไกลซีน โปรดดู Betz และ Laube, 2006; Lynch, 2004)

ตัวรับนี้ส่วนใหญ่พบอยู่ที่ก้านสมองและไขสันหลัง (Young and Snyder, 1973; Triller *et al.*, 1985) นอกจากนี้ยังสามารถพบตัวรับชนิดนี้ได้ทั่วไปที่สมองส่วนที่เหนือขึ้นไปได้ รวมถึงสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Malosio *et al.*, 1991) แต่ก็ไม่มากเท่าที่ก้านสมองและไขสันหลัง การกระตุ้นที่ตัวรับนี้ จะทำให้เกิดการเปิดของช่องในตัวรับซึ่งเฉพาะเจาะจงกับคลอไรด์ไอออน ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความนำของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อคลอไรด์ไอออน ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาทเช่นเดียวกับตัวรับกาบาเอ (Betz, 1991; Kuhse *et al.*, 1995; Rajendra *et al.*, 1997)

วิธีการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนูแรท (rat, หนูขาว) พันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 16-27 วัน จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ.นครปฐม นำมาเลี้ยงที่ โรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับแสงไฟสว่าง 12 ชั่วโมง มีด 12 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 25 องศาเซลเซียส ได้รับน้ำและอาหารอย่างเพียงพอ โดยเลี้ยงรวมไว้กับแม่หนู

2. การแยกเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเดี่ยวจากสมองของหนูขาว (หนูแรท)

ในการการแยกเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเดี่ยวจากสมองของหนูแรท โดยเซลล์ประสาทยังมีชีวิต ใช้วิธีการของ Sooksawat และ Simmonds (1998, 2001) กล่าวโดยย่อได้ดังนี้ ทำหนูให้หมดความรู้สึกโดยวิธี cervical dislocation and decapitation จากนั้นผ่าตัดแยกสมองออกมา แช่ในสารละลายเกลือสรีรวิทยา (Physiological salt solution) (ประกอบด้วย NaCl 140 mM, KCl 4.7 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, Glucose 11 mM และ HEPES 10 mM โดยปรับค่า pH เท่ากับ 7.4 ด้วย Tris-base) ที่อุณหภูมิประมาณ 4°C ประมาณ 5 นาที แล้วจึงผ่านสมองให้เป็นแผ่นบางๆ หนา 400 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง Vibroslice (752M, Campden Instruments, England) ทำการย่อยแผ่นสมองด้วยเอนไซม์กลุ่ม Protease 2 ตัว คือ Pronase และ Thermolysin (Sigma, USA) ด้วยการแช่แผ่นสมองกับเอนไซม์ใน สารละลายเกลือสรีรวิทยา ที่ 31°C โดยแช่สมองกับเอนไซม์แต่ละตัวนาน 20 นาที แล้วแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ออกมา จากนั้นแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวจากแผ่นสมองฮิปโปแคมปัส ด้วยการดูดแผ่นสมองขึ้นลง (Trituration) ผ่านปิเปตต์แก้ว (glass pipette) ขนาดเล็กที่ปลายลบคมด้วยความร้อน แล้วทำการแยกเซลล์ประสาทเดี่ยวออกจากซากเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ที่ไม่ต้องการ ด้วยวิธีตั้งให้ตกตะกอน (gravity sedimentation) นาน 10 นาที แล้วจึงนำไปใส่ลงใน ช้องบันทึก (recording chamber) บนแท่นของกล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (Inverted microscope; IMT2, Olympus, Japan) ที่ตั้งไว้ประมาณ 30-40 นาที เพื่อให้เซลล์ประสาทตกลงไปที่ฐานของช่องบันทึก และยึดกับฐานได้แน่นพอสมควร แล้วจึงปล่อยให้สารละลายเกลือสรีรวิทยาไหลผ่านช่องบันทึกด้วยอัตราประมาณ 2-3 มิลลิลิตร/นาที

3. การบันทึกกระแสที่ไหลผ่านเซลล์ประสาทด้วยวิธี Whole-cell patch clamp

โดยพัฒนามาจาก Hamil และคณะ (1981) และ Sooksawate and Simmonds (1998, 2001) ซึ่งมีวิธีการโดยย่อ ดังนี้ คือ แพทช์ปิเปตต์ (patch pipette) จะเตรียมมาจากหลอดแก้วรูเล็กบอโรซิลิเกตชนิดผนังบาง (Clark thin wall borosilicate glass capillary; Harvard Apparatus, UK) โดยใช้เครื่องดึงปิเปตต์ชนิดแนวตั้งแบบ 2 ขั้น (two-step vertical pipette puller; PP-83, Narishige, Japan) แพทช์ปิเปตต์ (patch pipette) ที่ได้จะบรรจุสารละลายในปิเปตต์ (intrapipette solution) ซึ่งประกอบด้วย CsCl 140 mM, MgCl₂ 4 mM, Na₂ATP 4 mM, EGTA 11 mM, CaCl₂ 1 mM และ HEPES 10 mM โดยปรับค่า pH เท่ากับ 7.2 ด้วย Tris-base ความต้านทานไฟฟ้าระหว่างแพทช์ปิเปตต์ (patch pipette) กับขั้วเปรียบเทียบ (reference electrode) ในสารละลายภายนอก (External solution) ในช่องบันทึกเท่ากับ 3-6 เมกาโอห์ม (MΩ) เยื่อหุ้มเซลล์ประสาทจะถูกโวลเทจแคลมป์ (voltage-clamp) ไว้ที่ -20 มิลลิโวลต์ (mV) กระแสไฟฟ้าที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบทั้งเซลล์ (whole-cell recording) จะถูกวัดและขยายสัญญาณโดยเครื่องขยายสัญญาณแพทช์แคลมป์ (patch clamp amplifier) (Axopatch 200B, Axon Instruments, USA) ทำการสังเกตสัญญาณบนจอออสซิลโลสโคป (VC10, Nihon Kohden, Japan) และเปลี่ยนสัญญาณจาก อนุาลอก (analog) ไปเป็นดิจิทัล (digital) ด้วยเครื่องแปลงสัญญาณอนุาลอก-เป็น-ดิจิทัล (analog-to-digital converter) (PowerLab, ADInstruments, Australia) แล้วทำการบันทึกสัญญาณที่ได้ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ชนิดแมคอินทอช (Macintosh iMAC, Apple computer, USA) โดยใช้โปรแกรม Chart v.4.0 (ADInstruments, Australia)

4. ศึกษาผลของสาร เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย และกรควาลโปรอิก

ทำการบันทึกการไหลของกระแสผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าหรือออกจากเซลล์ประสาทรุนั้น เมื่อให้สารออกฤทธิ์ (agonists) ต่อตัวรับชนิดนั้นๆ เช่น กาบามาและไกลซีน ศึกษาผลโดยตรงของเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย และกรควาลโปรอิกที่มีต่อการไหลของกระแสผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นจึงทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย และกรควาลโปรอิกที่มีต่อสารออกฤทธิ์ (agonists) เปรียบเทียบกับสารเสริมฤทธิ์ตัวอื่นๆ เช่น diazepam, pentobarbital sodium, propofol เป็นต้น

นอกจากนี้ยังศึกษาถึงปฏิกริยาต่อกันของสารเอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ที่มีต่อสารเสริมฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้น โดยเฉพาะ diazepam และ pentobarbital sodium เพื่อพิสูจน์กลไกการออกฤทธิ์และบริเวณ (sites) 2 บริเวณ คือ benzodiazepine site และ barbiturate site บนตัวรับ GABA_A ที่เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย อาจจะออกฤทธิ์

5. สารเคมี

สาร เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย ทำการสังเคราะห์ขึ้นตามวิธีของ ผศ.ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สารตัวทำการ (agonists) สารเสริมฤทธิ์ (potentiators) และสารต้าน (antagonists) จะเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ด้วยการละลายลงในน้ำกลั่น หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วจึงละลายเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการลงใน สารละลายเกลือสรีรวิทยา (Physiological salt solution) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO จะน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1% ซึ่งจะไม่ส่งผลใดๆ ต่อการทำงานของตัวรับชนิดต่างๆ การให้สารเหล่านี้ไปยังด้านนอกของเซลล์ประสาทจะใช้วิธี U-tube method ตามวิธีการของ Sooksawate and Simmonds (1998) ซึ่งจะให้ความเข้มข้นของสารที่ให้รอบๆ เซลล์ประสาทเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วจนถึงความเข้มข้นที่ต้องการ ก่อนที่จะเกิดภาวะการลดความไวต่อการกระตุ้น (Desensitization) ของตัวรับต่างๆ

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมดสั่งซื้อมาจาก Sigma (USA) ยกเว้น NaCl, KCl, CaCl₂·2H₂O, MgCl₂·6H₂O จาก Riedel-deHäen (Germany)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าผิดพลาดมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of the mean; mean \pm S.E.M.) การวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารและการตอบสนองของเซลล์ประสาท (Concentration-response analysis) จะใช้โปรแกรม GraphPad PRISM version 3.0 (GraphPad Software, USA) ด้วยสมการ

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / (1 + (EC_{50} / [X])^H)$$

เมื่อ I คือ กระแสไฟฟ้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดด้วยสารทำการ (agonist-induced current), I_{\min} คือ กระแสตอบสนองต่ำสุด, I_{\max} คือ กระแสตอบสนองสูงสุด, EC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารทำ

การที่ทำให้เกิดกระแสตอบสนองร้อยละ 50 ของกระแสตอบสนองสูงสุด, $[X]$ คือ ความเข้มข้นของสารทำการ, H คือ สัมประสิทธิ์ความชัน (Hill coefficient)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ เมื่อข้อมูลมากกว่า 2 กลุ่มจะใช้สถิติ Analysis of Variance (ANOVA) หลังจากนั้นจะเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มเป็นคู่โดยใช้ Dunnett's test ถ้าข้อมูลมีเพียง 2 กลุ่มจะใช้สถิติ Student's t -test โดยที่ค่า P (P value) น้อยกว่า 0.05 แสดงว่าข้อมูลที่เปรียบเทียบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

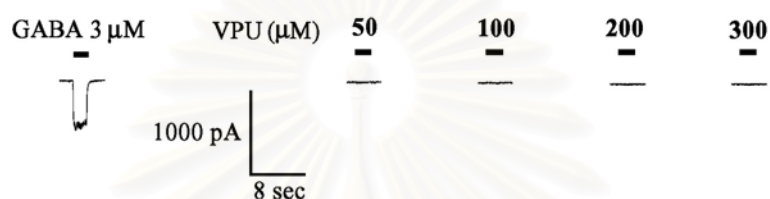
ผลการวิจัย

1. ผลของ Valproyl urea (VPU) และ Valproic acid (VPA) ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลผ่านเซลล์ประสาทโดยตรง

ในการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นโดยตรงต่อตัวรับ ที่ทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของประสาทฮิปโปแคมปัสของสารทดสอบทั้ง 2 ตัว คือ valproyl urea (VPU) และ valproic acid (VPA) จะทดสอบโดยการให้สารเดี่ยวไปยังเซลล์ประสาทโดยตรง พบว่าจากการให้สาร VPU ($n = 12$) และ VPA ($n = 10$) ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่แยกออกจากตัวของหนูแรท โดยเทคนิค U-tube และบันทึกกระแสที่ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาทโดยเทคนิค whole-cell patch clamp recordings พบว่าไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง ในขณะที่การให้สาร GABA ($3 \mu\text{M}$) (รูปที่ 2) จะกระตุ้นโดยตรงที่ตัวรับ GABA_A จะทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเข้าเซลล์ได้ และสามารถยับยั้งได้โดยสาร bicuculline methochloride ซึ่งเป็นสารต้านตัวรับ GABA_A

เมื่อศึกษาเช่นเดียวกันกับสารเพิ่มฤทธิ์ของ GABA ที่ตัวรับ GABA_A ชนิดอื่น พบว่าผลที่ได้ของทั้ง 2 สารนี้คล้ายคลึงกับสาร diazepam ($n = 12$) (รูปที่ 2) ที่ออกฤทธิ์ผ่านทาง benzodiazepine site บนตัวรับ GABA_A ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเซลล์ประสาทเช่นเดียวกัน สำหรับสารเพิ่มฤทธิ์ของ GABA ที่ตัวรับ GABA_A ชนิดอื่น ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ pentobarbital sodium ($n = 12$) ขนาดความเข้มข้น $30\text{-}1000 \mu\text{M}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยตรง โดยสามารถยับยั้งได้โดยสาร bicuculline methochloride ($n = 10$) (รูปที่ 3) รวมทั้งสาร propofol ขนาดความเข้มข้น $10\text{-}300 \mu\text{M}$ ก็สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้และถูกยับยั้งได้โดย bicuculline methochloride เช่นเดียวกัน ($n=3$)

A. Valproyl Urea (VPU)



B. Valproic Acid (VPA)

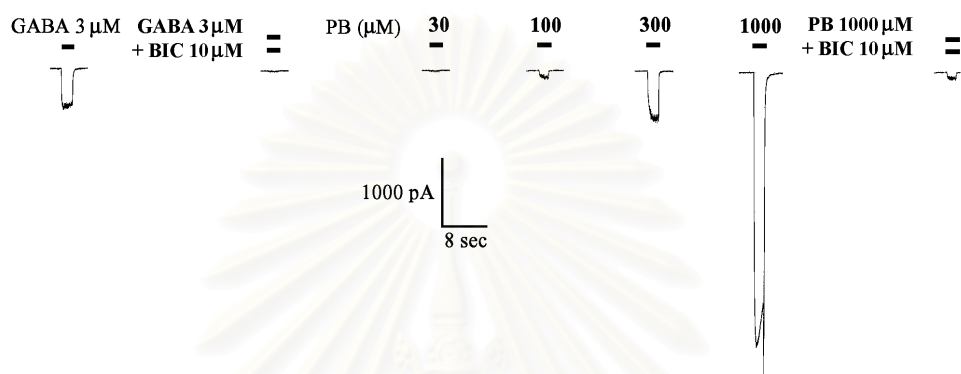


C. Diazepam (DZP)

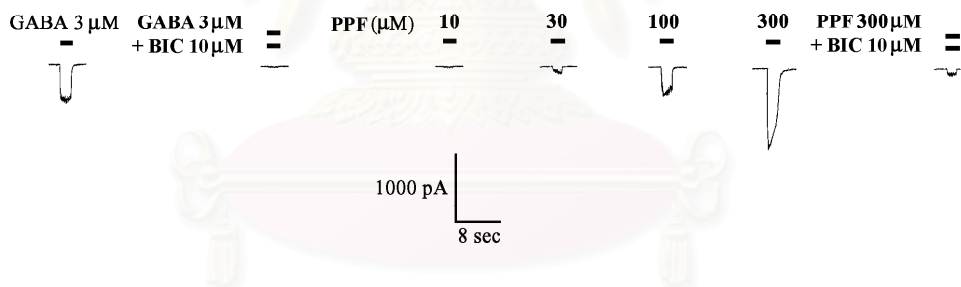


รูปที่ 2 ภาพบันทึกแสดงผลของ A. Valproyl urea (50-300 μM) และ B. Valproic acid (10-3000 μM) C. Diazepam (1-1000 μM) ที่ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

A. Pentobarbital sodium (PB)



B. Propofol (PPF)



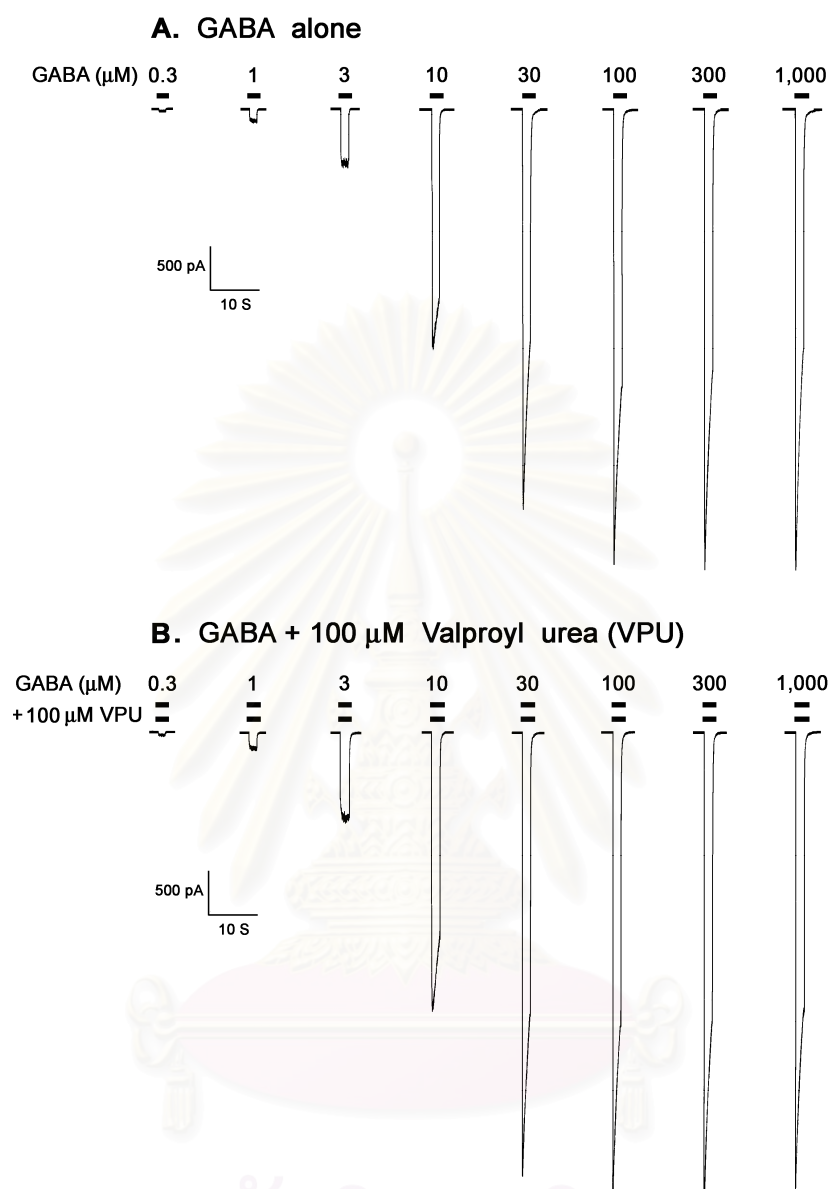
รูปที่ 3 ภาพบันทึกแสดงผลของ A. Pentobarbital sodium (30-1000 μ M) และ B. Propofol (10-300 μ M) ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย 10 μ M Bicuculline methochloride

2. ผลของ Valproyl urea (VPU) และ Valproic acid (VPA) ในการเสริมฤทธิ์ GABA ที่มีต่อ GABA_A receptors

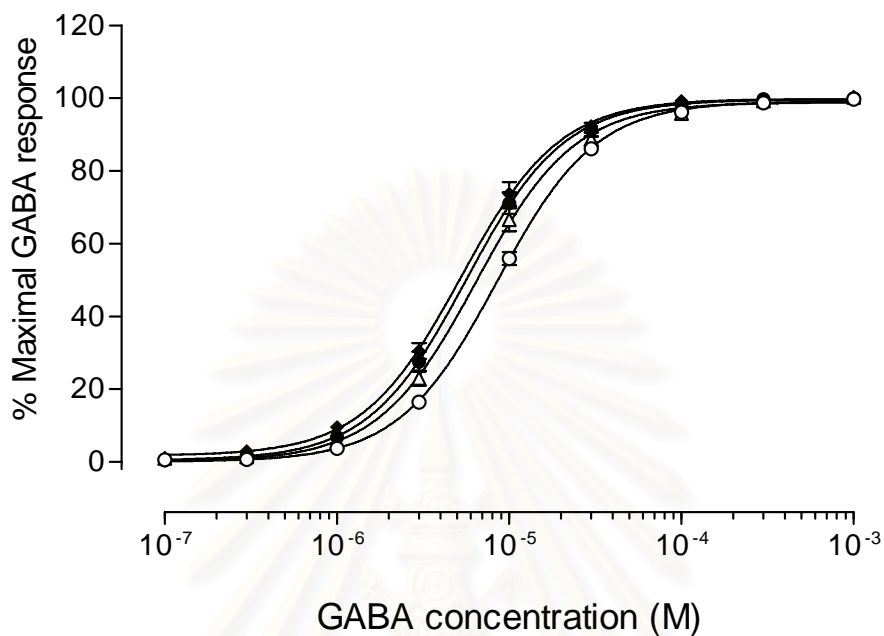
การให้สาร VPU ความเข้มข้น 100-300 μM (รูปที่ 4, 5) ร่วมกับ GABA (ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3-1000 μM) แก่เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส พบว่าสาร VPU จะเสริมฤทธิ์ GABA ทำให้เกิดการตอบสนองมากขึ้น โดยกระแสที่ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาทเพิ่มสูงขึ้น โดย VPU ขนาด 100, 200, 300 μM ทำให้ค่า EC_{50} ของ GABA concentration-response curve ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่า control คือ 8.52 ± 0.11 μM ไปเป็น 6.43 ± 0.20 , 5.63 ± 0.20 และ 5.25 ± 0.19 μM ตามลำดับ ($P < 0.001$, Dunnett's test)

ในขณะที่ VPA ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงถึง 1000-3000 μM จึงจะให้ผลเช่นเดียวกัน (รูปที่ 6, 7) โดย VPA ขนาด 1 และ 3 mM ทำให้ค่า EC_{50} ของ GABA concentration-response curve ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่า control คือ 11.14 ± 0.18 μM ไปเป็น 10.27 ± 0.25 μM ($P < 0.05$, Dunnett's test) และ 6.41 ± 0.23 μM ($P < 0.001$, Dunnett's test) ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



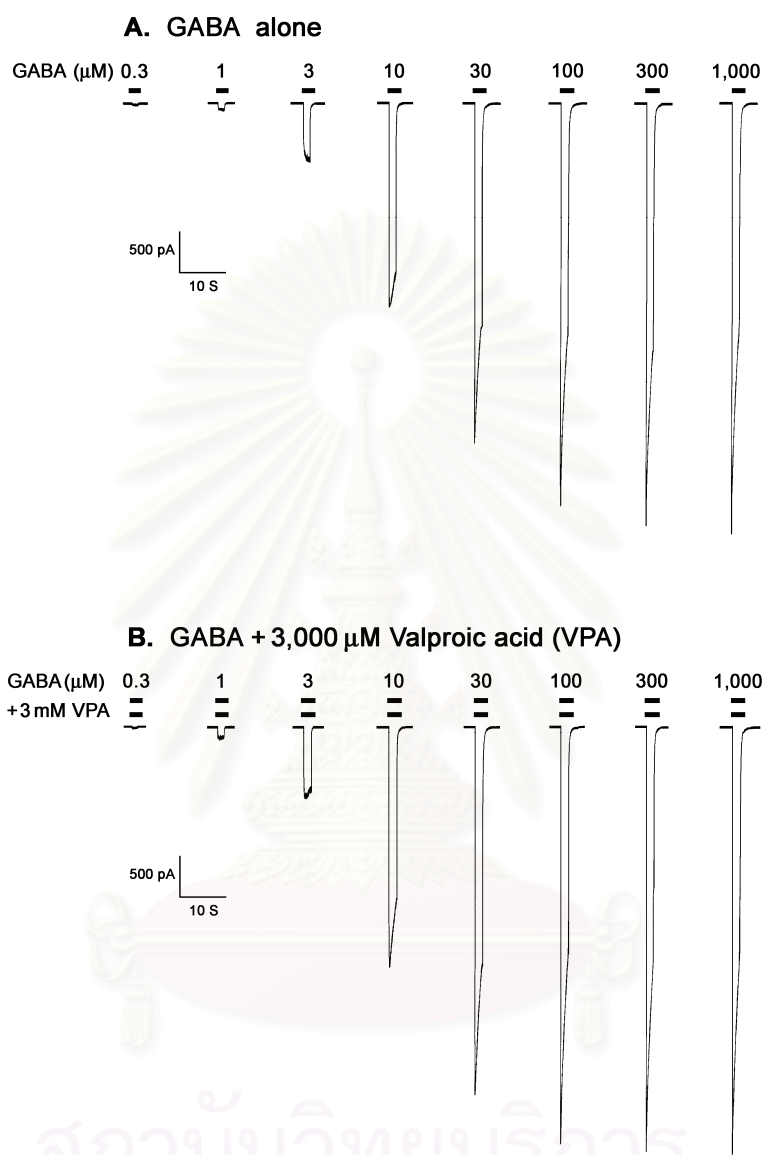
รูปที่ 4 ภาพบันทึกแสดงผลของ VPU ความเข้มข้น 100 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส A. ผลจากการให้ GABA เดี่ยว, B. ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ VPU



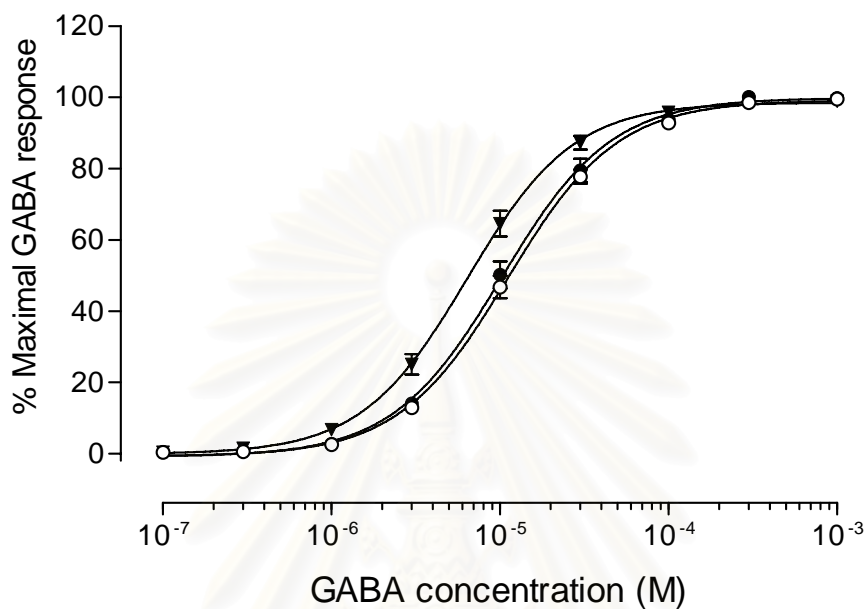
- GABA alone (n=44), EC₅₀= 8.52 ± 0.11 μM
- △ GABA + 100 μM VPU (n=15), EC₅₀= 6.43 ± 0.20 μM***
- GABA + 200 μM VPU (n=15), EC₅₀= 5.63 ± 0.20 μM***
- ◆ GABA + 300 μM VPU (n=14), EC₅₀= 5.25 ± 0.19 μM***

****P* < 0.001 Significantly different from GABA alone (Dunnett's test)

รูปที่ 5 ผลของ VPU 100-300 μM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM



รูปที่ 6 ภาพบันทึกแสดงผลของ VPA ความเข้มข้น 3 mM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส **A.** ผลจากการให้ GABA เดี่ยว , **B.** ผลจากการให้ GABA ร่วมไปกับ VPA



○ GABA alone (n=16), $EC_{50} = 11.14 \pm 0.18 \mu\text{M}$

● GABA + 1 mM VPA (n=8), $EC_{50} = 10.27 \pm 0.25 \mu\text{M}^*$

▼ GABA + 3 mM VPA (n=8), $EC_{50} = 6.41 \pm 0.23 \mu\text{M}^{***}$

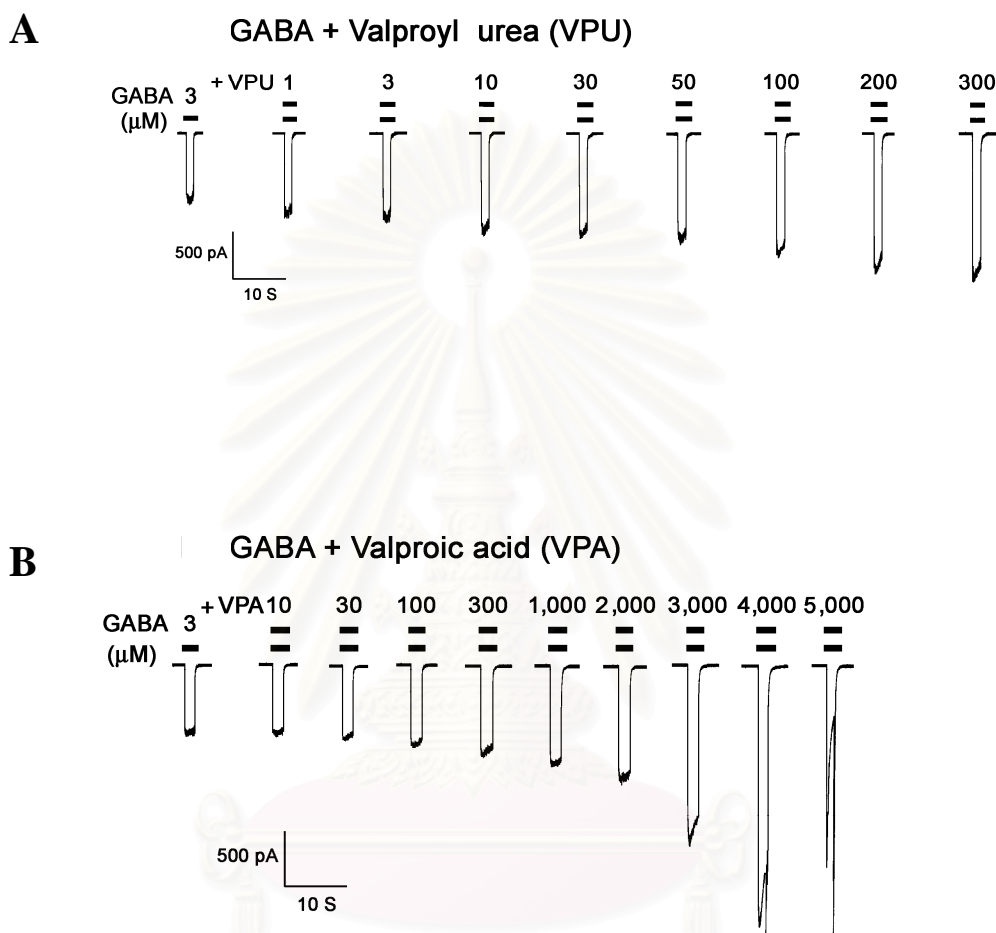
* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ Significantly different from GABA alone (Dunnett's test)

รูปที่ 7 ผลของ VPA 1-3 mM ที่มีต่อ GABA concentration-response curve ที่ได้จากการให้ GABA ความเข้มข้น 0.3-1000 μM

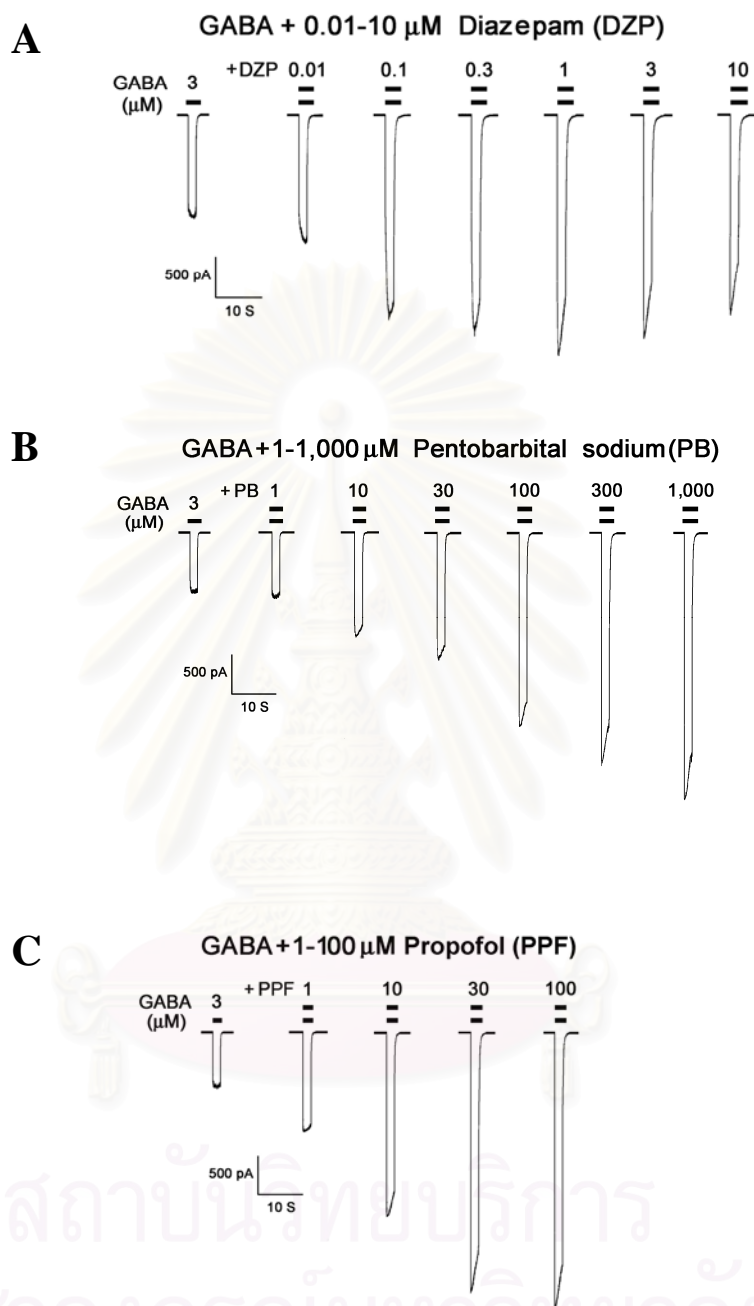
ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสาร VPU และ VPA ที่มีต่อการเสริมฤทธิ์ของ GABA ที่ทำให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A โดยให้สารดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสาร GABA ขนาดความเข้มข้น 3 μM พบว่า VPU ความเข้มข้น 1-300 μM สามารถเสริมฤทธิ์ GABA ได้ โดยการเสริมฤทธิ์สูงสุดของ VPU อยู่ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 300 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 196.9 ± 9.01 % (n=14) ในการทดลองนี้ไม่สามารถเตรียม VPU ให้มีความเข้มข้นสูงกว่านี้ได้ เนื่องจากปัญหาการละลาย ในขณะที่ VPA ความเข้มข้น 100-5000 μM สามารถเสริมฤทธิ์ GABA ได้เช่นกัน แต่ต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่ามากจึงจะเห็นผลชัดเจน โดยการเสริมฤทธิ์สูงสุดของ VPA อยู่ที่ 4000 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 328.3 ± 14.8 % (n=16) (รูปที่ 8, 10)

สำหรับสารอีก 3 ตัวที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบ คือ pentobarbital sodium, propofol และ diazepam ก็พบว่าสามารถเสริมฤทธิ์ GABA (3 μM) ในการทำให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A ได้เช่นเดียวกัน โดย diazepam ความเข้มข้น 0.01-10 μM สามารถเสริมฤทธิ์สูงสุดที่ความเข้มข้น 1 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 196.1 ± 9.21 % (n=11) ขณะที่ pentobarbital sodium ความเข้มข้น 1-1000 μM สามารถเสริมฤทธิ์สูงสุดที่ความเข้มข้น 300-1000 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 537.4 ± 26.3 % (n=13) และ propofol สามารถเสริมฤทธิ์สูงสุดที่ความเข้มข้นประมาณ 100 μM เสริมฤทธิ์ได้เท่ากับ 576.0 ± 18.3 % (n=3) (รูปที่ 9, 10)

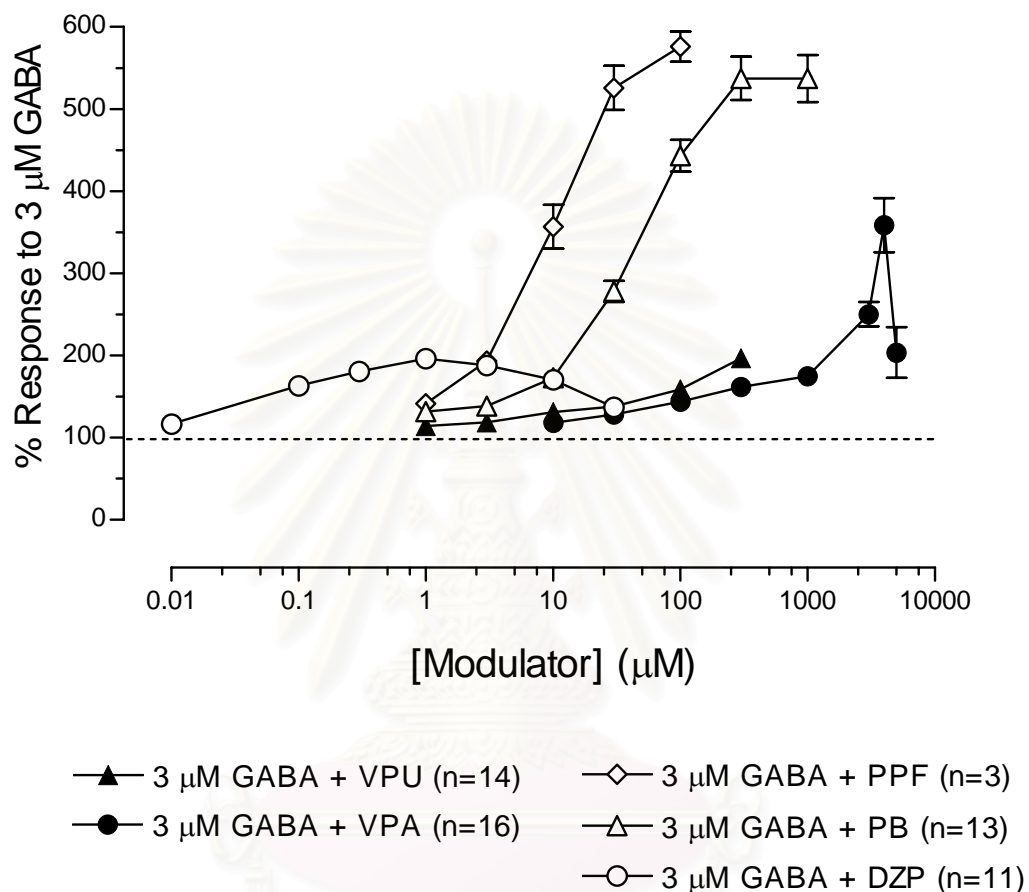
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ภาพบันทึกที่แสดงผลของ A. VPU (1-300 μM) และ B. VPA (10-5000 μM) ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส



รูปที่ 9 ภาพบันทึกแสดงผลของ A. Diazepam (0.01-10 μM), B. Pentobarbital (1-1000 μM) และ C. Propofol (1-100 μM) ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส



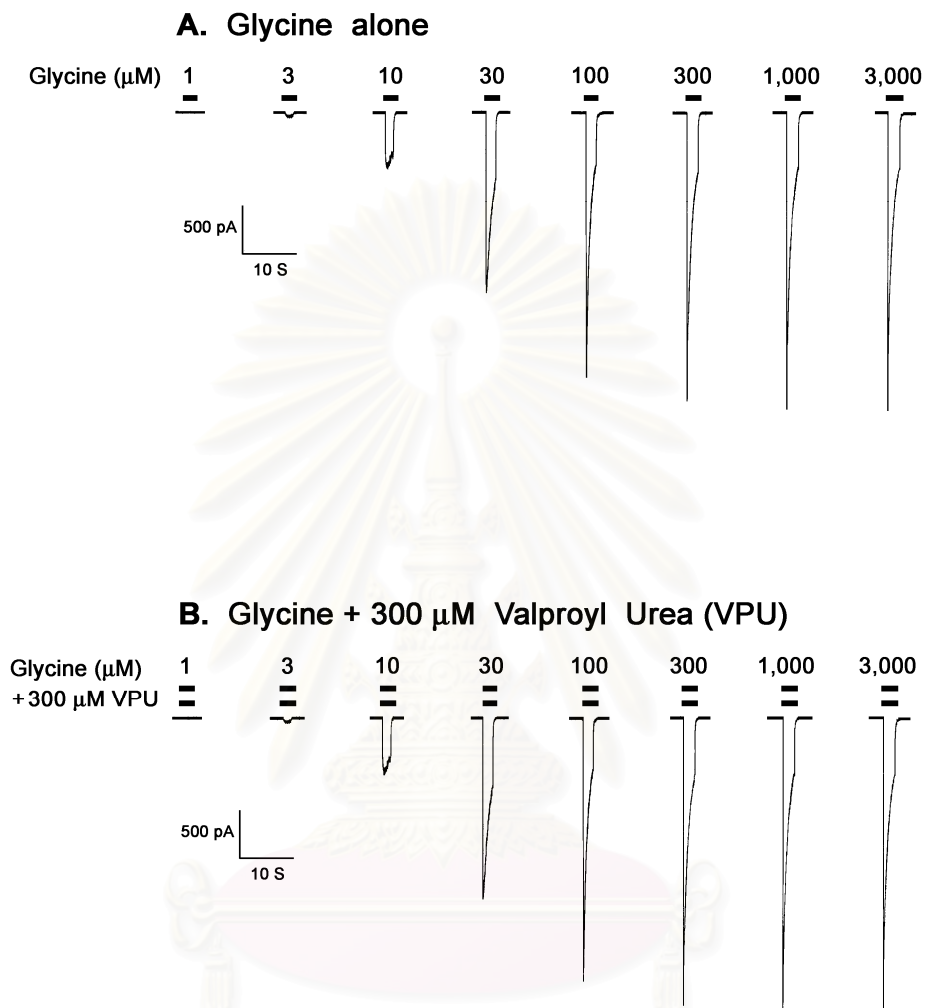
รูปที่ 10 ผลของ VPU (1-300 μM), VPA (10-5000 μM), Propofol (PPF, 1-100 μM), Pentobarbital (PB, 1-1000 μM) และ Diazepam (DZP, 0.01-30 μM) ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

3. ผลของ Valproyl urea (VPU) และ Valproic acid (VPA) ที่มีต่อ Glycine receptors

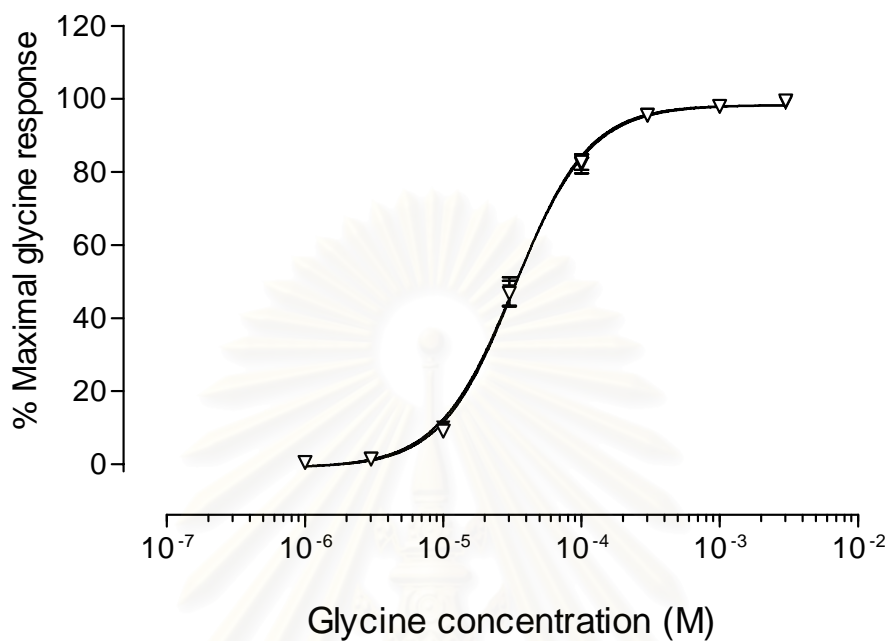
สาร glycine ความเข้มข้น 1-3000 μM สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเข้าเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ผ่านทางตัวรับ glycine ได้ (รูปที่ 11A) และการให้สาร VPU ความเข้มข้น 300 μM ร่วมไปกับ glycine (ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-3000 μM) แก่เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส พบว่าสาร VPU จะไม่มีผลต่อการที่สาร Glycine กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ glycine โดยค่า EC_{50} ของ Glycine concentration-response curve เท่ากับ $32.67 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ซึ่งไม่แตกต่างจากค่า control คือ $32.99 \pm 0.19 \mu\text{M}$ ($n=9$) ($P<0.275$, Student's t-test) (รูปที่ 11, 12) สาร VPA ความเข้มข้น 3000 μM ก็ไม่มีผลต่อการที่สาร glycine กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ glycine โดยค่า EC_{50} ของ Glycine concentration-response curve เท่ากับ $32.64 \pm 0.22 \mu\text{M}$ ซึ่งไม่แตกต่างจากค่า control คือ $32.57 \pm 0.20 \mu\text{M}$ ($n=9$) ($P<0.816$, Student's t-test) (รูปที่ 13, 14)

เมื่อดูผลของความเข้มข้นของสาร VPU ที่มีต่อการที่สาร glycine กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ glycine โดยให้สาร VPU ที่ความเข้มข้น 1-300 μM ร่วมกับสาร glycine ขนาดความเข้มข้น 30 μM พบว่าสาร VPU ความเข้มข้น 1-300 μM ไม่มีผลต่อการที่สาร glycine กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ glycine ($n=9$) (รูปที่ 15A) แต่กระแสที่เกิดขึ้นนี้สามารถยับยั้งได้โดยสาร strychnine ความเข้มข้น 5 μM ซึ่งสารนี้เป็นตัวต้านที่เฉพาะเจาะจงต่อตัวรับ glycine ผลเช่นเดียวกันนี้ก็พบกับสาร VPA ที่ความเข้มข้น 10-3000 μM ก็ไม่มีผลต่อการที่สาร glycine 30 μM กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ glycine เช่นเดียวกัน ($n=4$) (รูปที่ 15B)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 ภาพบันทึกแสดงผลของ VPU ความเข้มข้น 300 μM ต่อ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาท ฮิปโปแคมปัส **A.** ผลจากการให้ Glycine เดี่ยว, **B.** ผลจากการให้ Glycine ร่วมไปกับ VPU

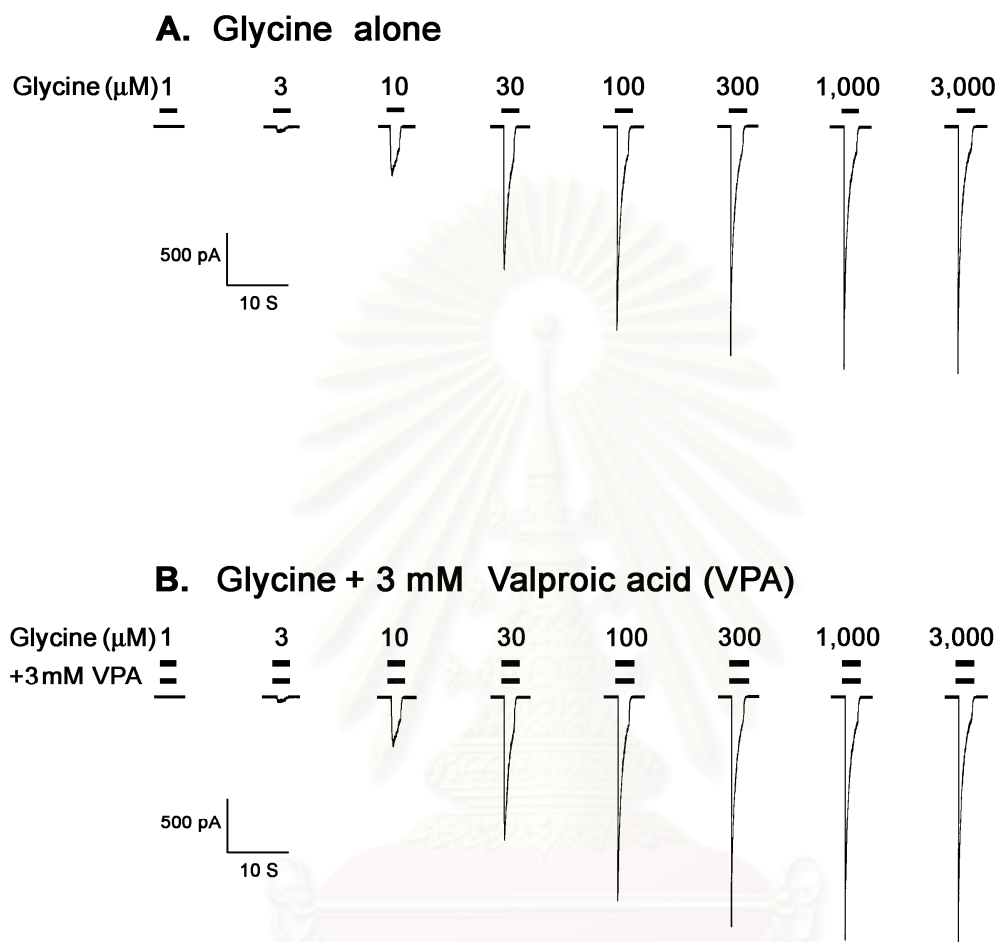


▽ Glycine alone (n=9), EC₅₀= 32.99 ± 0.19 μM

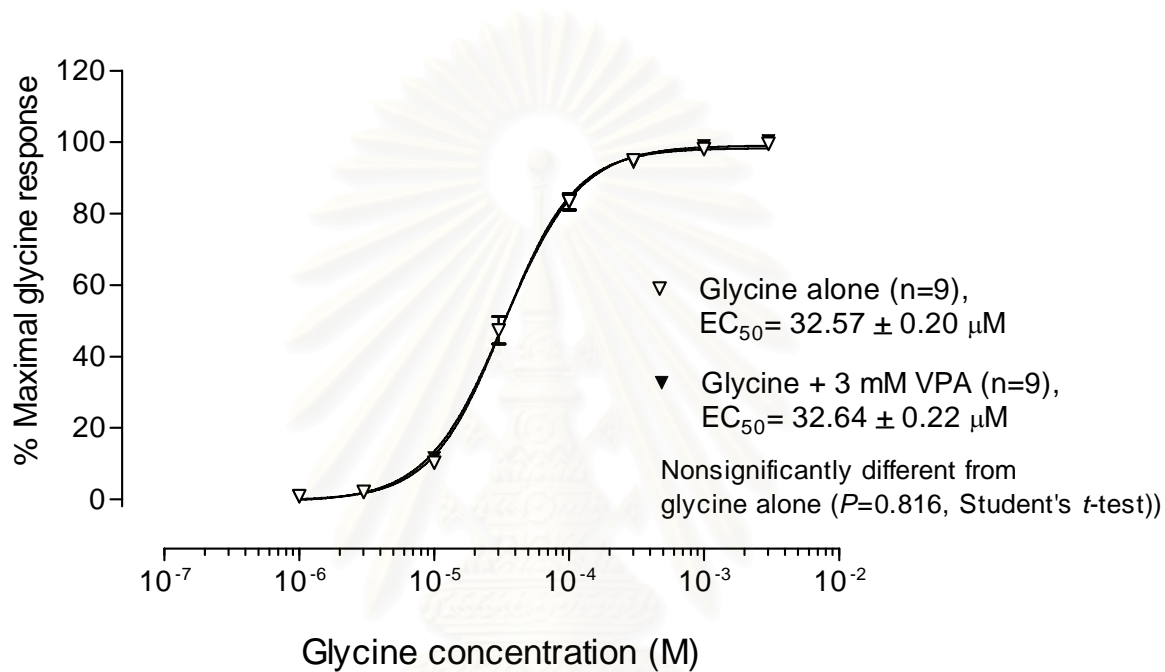
▼ Glycine + 300 μM VPU (n=9), EC₅₀= 32.67 ± 0.21 μM

Nonsignificantly different from glycine alone
($P=0.275$, Student's *t*-test)

รูปที่ 12 ผลของ VPU 300 μM ที่มีต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากการให้ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM

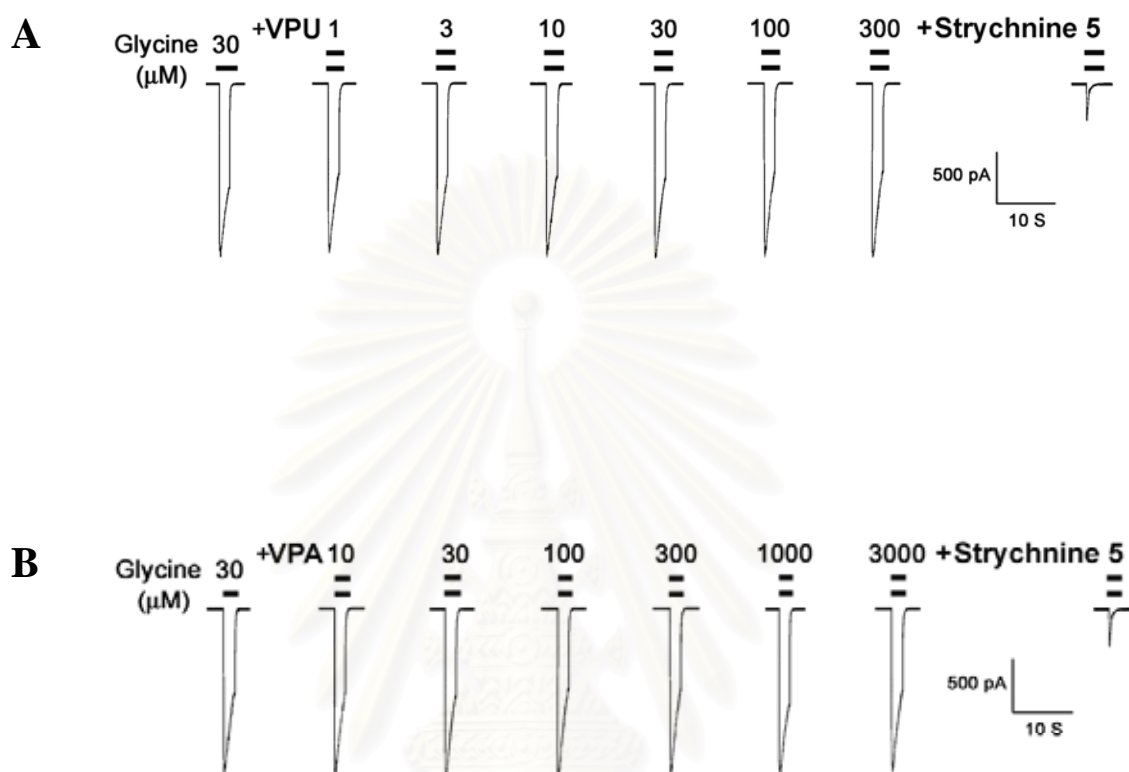


รูปที่ 13 ภาพบันทึกแสดงผลของ VPA ความเข้มข้น 3 mM (3000 μM) ต่อ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส **A.** ผลจากการให้ Glycine เดี่ยว, **B.** ผลจากการให้ Glycine ร่วมไปกับ VPA



รูปที่ 14 ผลของ VPA 3 mM ที่มีต่อ Glycine concentration-response curve ที่ได้จากทำให้ Glycine ความเข้มข้น 1-3,000 μM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 ภาพบันทึกแสดงผลที่แสดงว่า **A.** VPU (1-300 μM) ($n=9$) และ **B.** VPA (10-3000 μM) ($n=4$) ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ Glycine ความเข้มข้น 30 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ (Inward currents) ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

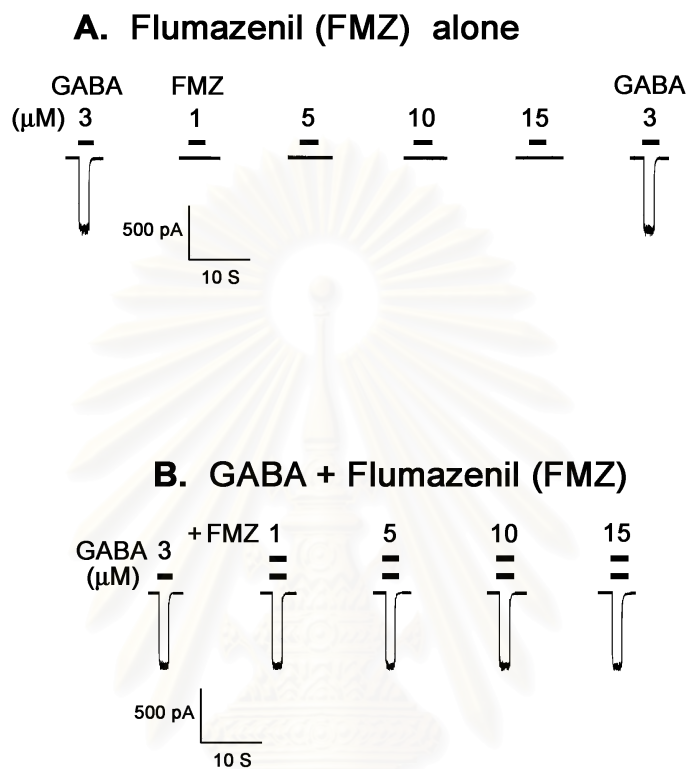
4. ผลของ Flumazenil ที่มีต่อการเสริมฤทธิ์ ของ Valproyl urea ที่มีต่อ GABA_A receptors

ในการศึกษาผลของสาร flumazenil (FMZ) ซึ่งเป็นสารต้าน (Antagonist) ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อบริเวณ benzodiazepine (Benzodiazepine site) บนตัวรับ GABA_A พบว่าสาร flumazenil ความเข้มข้น 5-15 μM ไม่สามารถกระตุ้นโดยตรงให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (n=3) (รูปที่ 16A) และไม่มีผลต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (n=6) (รูปที่ 16B)

อย่างไรก็ตามสาร flumazenil นี้สามารถยับยั้งผลในการเสริมฤทธิ์ของสาร diazepam ซึ่งเป็นสารกระตุ้น (agonist) ที่เฉพาะเจาะจงต่อบริเวณ benzodiazepine นี้ได้ โดยสาร flumazenil ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM ทำให้ผลเสริมฤทธิ์ของ diazepam ความเข้มข้น 1 μM ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ลดลงจาก $178.58 \pm 12.67\%$ เมื่อไม่มีสาร flumazenil ไปเป็น $121.06 \pm 10.01\%$, $118.93 \pm 5.52\%$ และ $102.86 \pm 6.97\%$ ตามลำดับ (n=5) ($P < 0.001$, Dunnett's test) (รูปที่ 17)

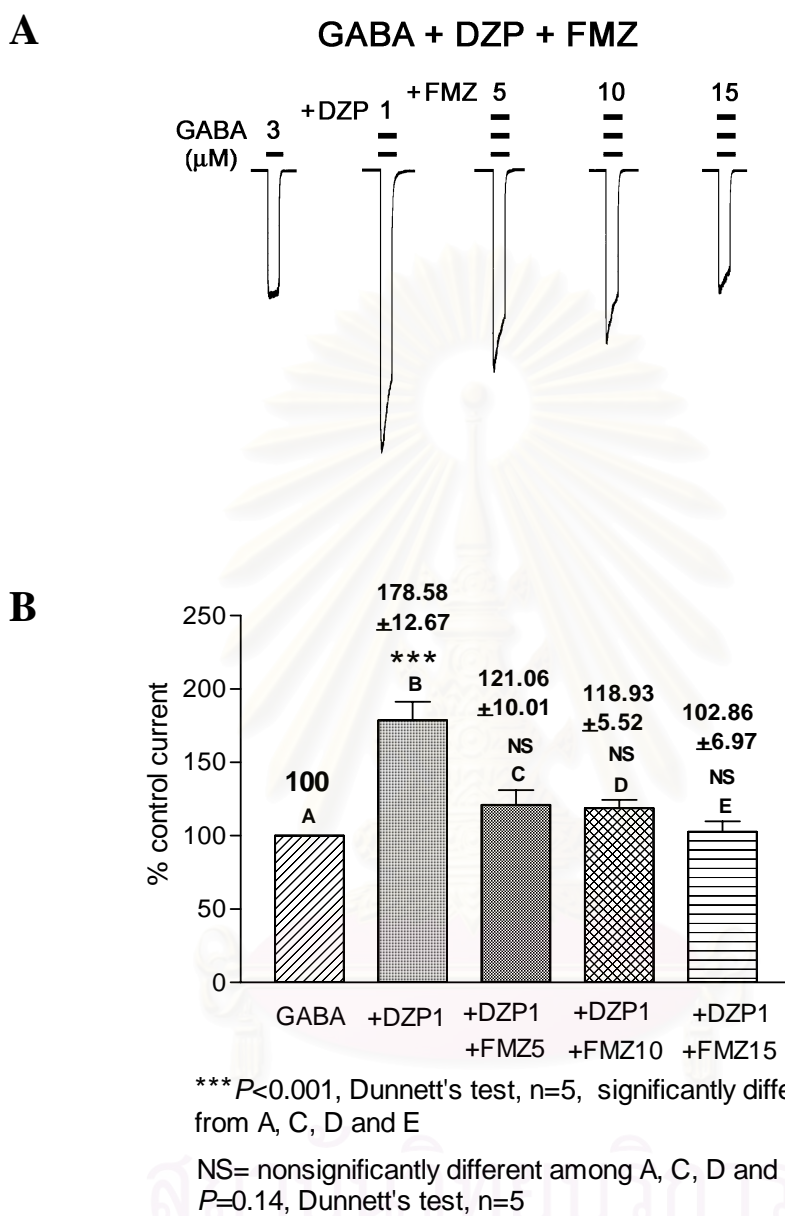
เมื่อศึกษาผลของสาร flumazenil ต่อสาร VPU ที่มีต่อการเสริมฤทธิ์ของ GABA ที่ทำให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A พบว่าสาร flumazenil ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μM ไม่มีผลต่อการเสริมฤทธิ์ของ VPU ความเข้มข้น 300 μM ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA โดยสารค่าการเสริมฤทธิ์มีค่าเท่ากับ $133.73 \pm 5.66\%$, $133.52 \pm 5.76\%$ และ $133.55 \pm 5.95\%$ ตามลำดับ (n=7) ซึ่งไม่ต่างจากการเสริมฤทธิ์ของ VPU เมื่อไม่มีสาร flumazenil ซึ่งเท่ากับ $135.99 \pm 5.72\%$ ($P=0.98$, Dunnett's test) (รูปที่ 18)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

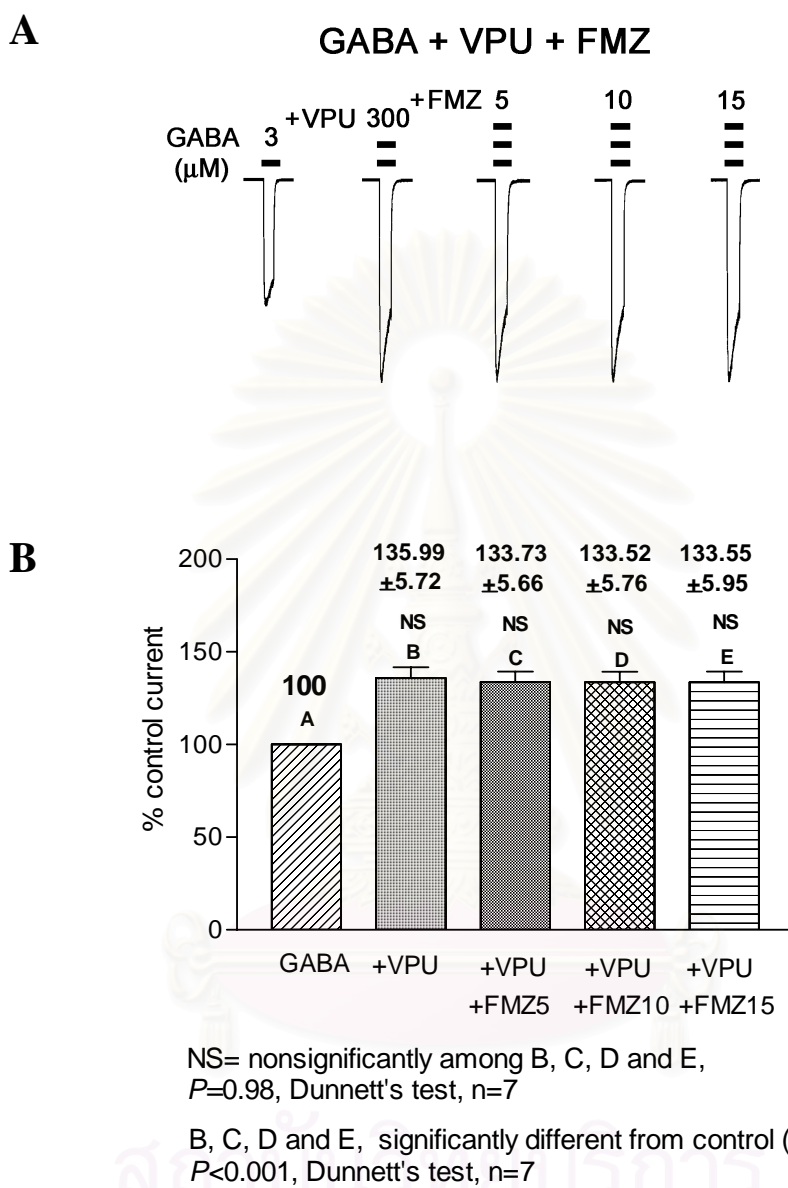


รูปที่ 16 ภาพบันทึกแสดงผลของ flumazenil (FMZ) ความเข้มข้น 5-15 μM ที่ (A) ไม่สามารถกระตุ้นโดยตรงให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ($n=3$) และ (B) ไม่มีผลต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ($n=6$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ภาพบันทึก (A) และกราฟแสดงผล (B) ของ flumazenil (FMZ) (5-15 μM) ที่ยับยั้งฤทธิ์ของ Diazepam 1 μM ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ($n=5$)



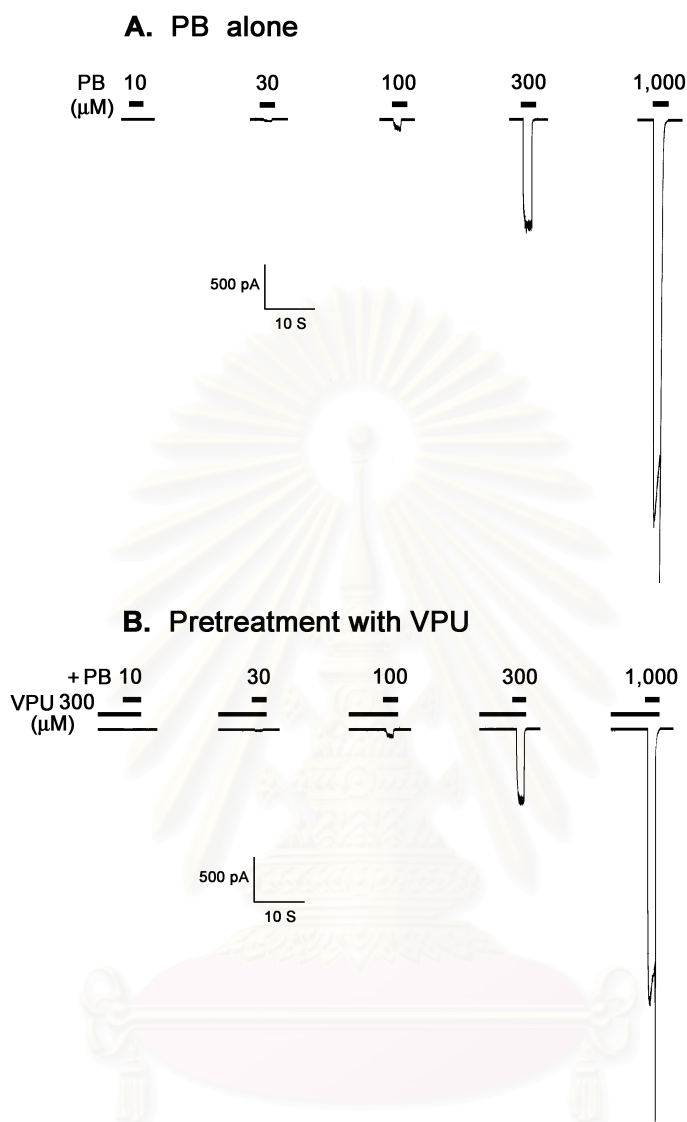
รูปที่ 18 ภาพบันทึก (A) และกราฟแสดงผล (B) ของ flumazenil (FMZ) (5-15 μM) ที่ไม่มีผลต่อฤทธิ์ของ VPU 300 μM ที่มีต่อกระแสที่เกิดจากการให้ 3 μM GABA ไปยังเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส ($n=7$)

5. ผลของ Valproyl urea ที่มีต่อฤทธิ์ของ Pentobarbital sodium ต่อ GABA_A receptors

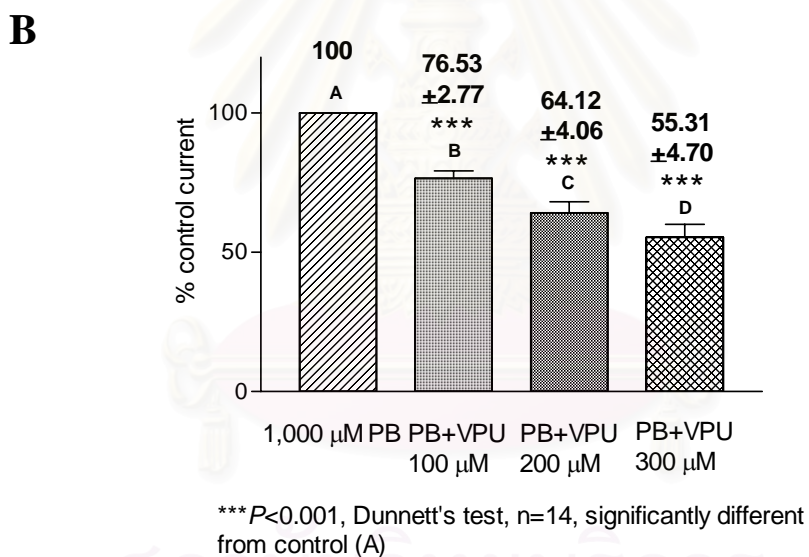
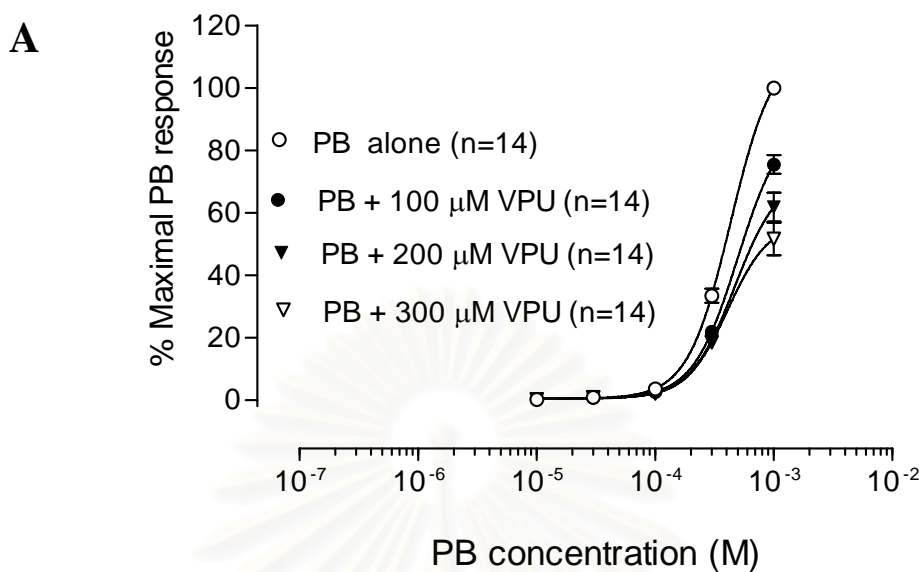
ในการศึกษาการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่าง VPU และ pentobarbital sodium นั้นจะแบ่งการศึกษาเป็นสองส่วน ในส่วนแรกจะศึกษาผลของ VPU ที่มีต่อฤทธิ์กระตุ้นโดยตรงของ pentobarbital sodium ต่อตัวรับ GABA_A ในการทำให้เกิดกระแสไหลผ่านเข้าสู่เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส โดยการให้สาร VPU ขนาด 100-300 μM ก่อน 5-10 วินาทีจากนั้นจึงให้สาร VPU ร่วมกับสาร pentobarbital sodium ขนาดความเข้มข้นตั้งแต่ 10- 1000 μM และดูผลกระแสที่ไหลผ่านเข้าสู่เซลล์ พบว่าสาร VPU สามารถยับยั้งผลของสาร pentobarbital sodium ได้โดยเป็นไปตามขนาดความเข้มข้นของสาร VPU (รูปที่ 19-20) เมื่อดูผลที่เกิดจาก pentobarbital sodium ความเข้มข้น 1,000 μM พบว่าสาร VPU ขนาดความเข้มข้น 100, 200 และ 300 μM สามารถลดกระแสที่ไหลผ่านเข้าสู่เซลล์ จาก 100% เหลือ $76.53 \pm 2.77\%$, $64.12 \pm 4.06\%$ และ $55.31 \pm 4.70\%$ ตามลำดับ (ทุกค่าต่างจาก control มี $P < 0.001$, Dunnett's test, $n=14$) (รูปที่ 20)

ส่วนที่สองจะเป็นการศึกษาผลของ VPU ความเข้มข้น 300 μM ที่มีต่อ pentobarbital sodium ความเข้มข้น 10 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A พบว่าสาร VPU (300 μM) สามารถเสริมฤทธิ์ GABA ได้เป็น $172.26 \pm 11.73\%$ ($P < 0.001$, Dunnett's test, $n=15$) สาร pentobarbital sodium สามารถเสริมฤทธิ์ GABA ได้เป็น $197.73 \pm 17.25\%$ ($P < 0.001$, Dunnett's test, $n=15$) แต่เมื่อให้สารพร้อมกันทั้ง 3 ตัว พบว่ากระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A เพิ่มขึ้นเป็น $261.30 \pm 20.54\%$ ($P < 0.001$, Dunnett's test, $n=15$) ซึ่งค่านี้สูงกว่าการให้สาร VPU หรือสาร pentobarbital sodium ร่วมกับ GABA เท่านั้น ($P < 0.01$, Dunnett's test) (รูปที่ 21)

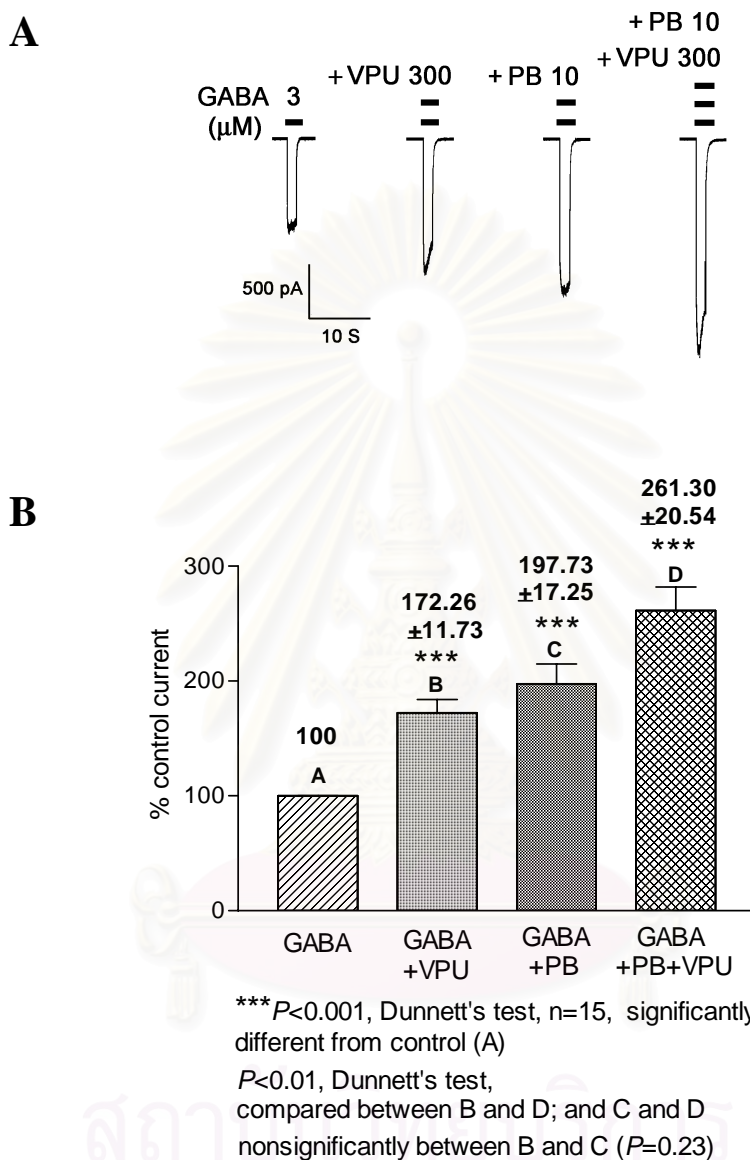
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 ภาพบันทึกแสดงผล Valproyl urea (VPU) 300 μM ในการยับยั้งฤทธิ์ของ Pentobarbital (PB; 10-1,000 μM) ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส (n=14) **A.** เมื่อให้ Pentobarbital เดี่ยว **B.** เมื่อให้ VPU ร่วมกับ Pentobarbital



รูปที่ 20 ภาพแสดงผล Valproyl urea (VPU) 100-300 μ M ที่มีต่อ Pentobarbital concentration-response curve (A) และผลการยับยั้งกระแสที่เกิดจาก Pentobarbital (PB) ขนาด 1,000 μ M (B)



รูปที่ 21 ภาพบันทึก (A) และกราฟแสดงผล (B) ของ Valproyl urea (VPU) 300 μM ที่มีต่อฤทธิ์ของ Pentobarbital 10 μM ในการเสริมฤทธิ์ของ GABA ความเข้มข้น 3 μM ที่ทำให้เกิดกระแสไหลเข้าเซลล์ ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส

อภิปรายผลการวิจัย

ผลของ VPA ที่มีต่อตัวรับของสารสื่อประสาทกรดอมิโนชนิดยับยั้ง

ในปัจจุบัน valproic acid (VPA) เป็นยาที่นำมาใช้เป็นยาด้านชักกันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังถูกนำไปใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคต่างๆ หลายชนิด ทางจิตเวชและประสาทวิทยา ได้แก่ bipolar disorders, neuropathic pain ปวดหัวไมเกรน และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Henry, 2003; Johannessen และ Johannessen, 2003; Peterson และ Naunton, 2005) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่า VPA น่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย และกลไกเหล่านั้นช่วยเสริมกันในการออกฤทธิ์ของ VPA (Johannessen และ Johannessen, 2003; Löscher, 1999; Peterson และ Naunton, 2005) ซึ่งกลไกสำคัญกลไกหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษามาก คือ การออกฤทธิ์ผ่านระบบ GABA ของสมอง โดย VPA จะเพิ่มการทำงานของระบบ GABA เพิ่มการสังเคราะห์และการคัดหลั่ง GABA นอกจากนี้ยังยับยั้งเอ็นไซม์ที่ทำลาย GABA ทำให้ระดับ GABA ในสมองเพิ่มสูงขึ้น (Johannessen, 2000; Johannessen และ Johannessen, 2003) ได้มีผู้ศึกษาผลของ VPA ที่มีต่อ inhibitory synaptic transmission ซึ่งเห็นยวนำโดย GABA ผ่านตัวรับ GABA_A นั้น พบว่า VPA ในขนาดความเข้มข้นสูงจึงจะสามารถเสริมการทำงานของ Inhibitory postsynaptic responses โดยตรงได้ (Cunningham *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1997; Löscher, 1999) นอกจากนี้ VPA ในความเข้มข้นสูงระดับมิลลิโมลาร์เท่านั้นจึงจะสามารถเสริมฤทธิ์สาร muscimol ในการกระตุ้นตัวรับ GABA ใน cuneate afferent fibres ของหนูแรท (Harrison และ Simmonds, 1982) ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่า VPA ที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 μM จึงจะสามารถเสริมฤทธิ์สาร GABA ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A ได้ (รูปที่ 10) โดยที่ VPA ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง (รูปที่ 2) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผลในการเสริมฤทธิ์ของ VPA ที่มีต่อสาร GABA ที่ตัวรับ GABA_A จึงไม่น่าจะเป็นกลไกหลักในการออกฤทธิ์ของ VPA ในการต้านชัก

สำหรับผลของ VPA ที่มีต่อตัวรับของสารสื่อประสาทกรดอมิโนชนิดช่องไอออนชนิดอื่นนั้น จากการทดลองนี้พบว่า VPA มีความเฉพาะเจาะจงต่อตัวรับของสารสื่อประสาทกรดอมิโนชนิดยับยั้ง คือ ตัวรับ GABA_A มากกว่า glycine โดย VPA ความเข้มข้นสูงถึง 3 mM ไม่มีผลใดๆ ต่อตัวรับ glycine เลย (รูปที่ 13-14) ซึ่งก็สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Karkar และคณะ (2004) ที่พบว่า VPA ความเข้มข้นสูงถึง 5 mM ก็ไม่มีผลต่อกระแสที่เกิดจากสาร glycine เช่นเดียวกัน ในเซลล์เพาะเลี้ยงประสาทฮิปโปแคมปัสของหนูเมาส์ แต่ที่ความเข้มข้นถึง 10 mM จะยับยั้งกระแสที่เกิดจากสาร glycine ได้เล็กน้อย

นอกจากนี้ VPA ยังมีฤทธิ์ยับยั้งตัวรับของสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น คือ ตัวรับ glutamate ชนิด NMDA ได้ (Lee *et al.*, 1997; Löscher, 1999) และ VPA ความเข้มข้น 100 μM ยังสามารถลด excitatory postsynaptic activity ผ่านทางการยับยั้งตัวรับ glutamate ชนิด non-NMDA (ตัวรับ AMPA และ kainite) (Martin และ Pozo, 2004) ซึ่งกลไกของ VPA ในการเสริมการทำงานของระบบ GABA และยับยั้งการทำงานของระบบ glutamate ของสมองน่าจะมีส่วนสำคัญในกลไกการต้านชักของ VPA ร่วมกับกลไกอื่นๆ ได้แก่ การยับยั้ง voltage-gated sodium channel และ T-type Ca^{2+} channel และการเพิ่มขึ้นของความนำ potassium ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Löscher, 1999) และการลดเมตาบอลิซึมของกลูโคส (Johannessen และ Johannessen, 2003) เป็นต้น

ผลของ VPU ที่มีต่อตัวรับของสารสื่อประสาทกรอมิโนชนิดยับยั้ง

N-(2-propylpentanoyl) urea หรือ valproyl urea (VPU) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ valproic acid นั้นผู้ที่สังเคราะห์ขึ้นมีความต้องการทำให้สารชนิดนี้ มีลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลด้านหนึ่งมีโครงสร้างคล้าย VPA และอีกด้านหนึ่งมีโครงสร้างคล้าย barbiturates ซึ่งมีฤทธิ์ต้านชักเช่นเดียวกัน เพื่อจะได้เพิ่มฤทธิ์ในการต้านชักของอนุพันธ์ของ VPA ตัวนี้ (Saisorn *et al.*, 1992) ซึ่งผลจากการทดสอบในสัตว์ทดลองทั้งหนูแรทและหนูเม้าส์ก็พบว่า VPU มีผลตามที่คาดหวังไว้ คือ สามารถลดการชักได้ดีกว่า VPA ในโมเดลชักในสัตว์ทดลองต่างๆ ทั้ง การชักจากไฟฟ้า หรือ สารเคมี (Tantisira *et al.*, 1997; Khongsombat, 2004) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ VPU นั้นยังไม่ชัดเจน โดย VPU ลดความถี่ในการเกิดสัญญาณประสาทของเซลล์ประสาทเปลือกสมองใหญ่และสมองน้อยได้ (Khongsombat, 1997) ซึ่งกลไกที่อาจเป็นไปได้ คือ VPU ลดระดับของสารกลูตาเมตในเปลือกสมองใหญ่ของหนูแรท (Chumngam, 1996) และยับยั้งการทำงานของตัวรับกลูตาเมต ชนิด NMDA (Ponsub, 2003) อย่างไรก็ตามทั้ง 2 นี้ก็ยังไม่เด่นชัดนักเพราะต้องใช้ขนาดของ VPU ที่ค่อนข้างสูงและผลที่ได้ก็ไม่มากนัก ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่อาจมีกลไกอื่นอีก ตลอดจน VPU มีโครงสร้างส่วนหนึ่งคล้าย barbiturates จึงน่าจะมีผลต่อตัวรับ GABA_A ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบสาร VPU ที่มีต่อตัวรับ GABA_A ซึ่งพบว่าผลของ VPU ความเข้มข้นสูงจนถึง 300 μM นั้นมีความคล้ายคลึงกับ VPA และ diazepam ในแง่ที่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง (รูปที่ 2) แต่สามารถเสริมฤทธิ์สาร GABA ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A ได้ (รูปที่ 10) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่เริ่มเสริมฤทธิ์ของ VPU จะต่ำกว่า VPA ถึงประมาณ 10 เท่า แต่จะสูงกว่า diazepam ประมาณ 100 เท่า คือ เริ่มเห็นผลชัดเจนที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 μM ขึ้นไป ในการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดของความเข้มข้นของ VPU ซึ่งไม่สามารถละลายใน physiological salt solution ได้มากกว่า 300 μM โดยที่ความเข้มข้นของ DMSO

ไม่เกิน 0.1% ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้ DMSO จะไม่มีผลต่อกระแสที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย GABA (มิได้แสดงผล) ทำให้ไม่สามารถหาค่าการเสริมฤทธิ์สูงสุดของ VPU ได้ว่าเป็นเท่าไร (รูปที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบผลของ VPU กับสารอีกพวกหนึ่ง คือ pentobarbital sodium และ propofol พบว่ามีความแตกต่างกันโดยที่ pentobarbital sodium และ propofol สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรงผ่านทางตัวรับ $GABA_A$ (รูปที่ 3) และสามารถเสริมฤทธิ์สาร GABA ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ $GABA_A$ ได้ (รูปที่ 9, 10) โดยทั้ง pentobarbital sodium และ propofol มีความแรงมากกว่าทั้ง VPA และ VPU อย่างเห็นได้ชัดเจน ในส่วนของผลที่มีต่อตัวรับ glycine นั้น ก็ให้ผลคล้ายคลึงกับ VPA โดยที่ VPU ความเข้มข้นสูงจนถึง 300 μM ไม่มีผลต่อตัวรับ glycine เช่นเดียวกัน (รูปที่ 11-15)

เมื่อศึกษาผลของ flumazenil ซึ่งเป็นสารต้านที่บริเวณ benzodiazepine บนตัวรับ $GABA_A$ ก็พบว่า flumazenil ไม่สามารถยับยั้งการเสริมฤทธิ์ของ VPU ที่ตัวรับนี้ได้ (รูปที่ 18) ในขณะที่ flumazenil สามารถยับยั้งผลของ diazepam ซึ่งออกฤทธิ์ผ่านบริเวณดังกล่าว (รูปที่ 17) แสดงให้เห็นว่า VPU มิได้ออกฤทธิ์ผ่านบริเวณ benzodiazepine บนตัวรับ $GABA_A$ ในการเสริมฤทธิ์ GABA ที่ตัวรับ $GABA_A$ เมื่อศึกษาผลของ VPU ที่มีต่อการเสริมฤทธิ์ของ pentobarbital sodium ต่อตัวรับ $GABA_A$ ก็พบว่าเมื่อให้ VPU ร่วมไปกับ pentobarbital sodium ในขนาดที่ไม่สามารถกระตุ้นตัวรับ $GABA_A$ โดยตรง (ความเข้มข้น 10 μM , รูปที่ 19) จะมีผลเสริมฤทธิ์ GABA ที่ตัวรับ $GABA_A$ มากกว่าการให้สารตัวใดตัวหนึ่งร่วมไปกับ GABA (รูปที่ 21) แต่เมื่อศึกษาผลของ VPU ต่อฤทธิ์กระตุ้นโดยตรงต่อตัวรับ $GABA_A$ ของ pentobarbital sodium กลับพบว่า VPU สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ pentobarbital sodium ได้ และมีลักษณะเป็น dose-dependent manner (รูปที่ 20) ผลการศึกษาชิ้นนี้ชี้ให้เห็นว่า VPU อาจออกฤทธิ์ที่บริเวณที่สารในกลุ่ม barbiturates ออกฤทธิ์บนตัวรับ $GABA_A$ โดยอาจจะออกฤทธิ์เป็นสารกระตุ้น (agonist) ที่บริเวณเสริมฤทธิ์ แต่อาจจะออกฤทธิ์เป็นสารต้าน (antagonist) ที่บริเวณกระตุ้นโดยตรงของสาร barbiturates บนตัวรับ $GABA_A$ อย่างไรก็ตามยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคอื่น เพื่อให้มีหลักฐานที่ชัดเจนหนักแน่นพอเพื่อที่จะสามารถสรุปกลไกของ VPU ที่มีต่อบริเวณ barbiturate บนตัวรับ $GABA_A$ ได้

จากการศึกษาผลของ VPU ที่มีต่อตัวรับ $GABA_A$ นี้ ทำให้เห็นว่าผลในการเสริมฤทธิ์น่าจะเป็นฤทธิ์หนึ่ง นอกเหนือจากผลในการลดระดับของสารกลูตาเมตในเปลือกสมองใหญ่ (Chumngam, 1996) และยับยั้งการทำงานของตัวรับกลูตาเมต ชนิด NMDA (Ponsub, 2003) ที่ทำให้ผลในการต้านชักของ VPU มีมากกว่า VPA และผลต่อตัวรับ $GABA_A$ ที่ได้ก็น้อยกว่าสาร pentobarbital sodium, propofol และ

diazepam ที่มีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางทำให้อ่อนหลับหรือสลบ ซึ่งก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ VPU มีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางน้อยกว่าสารในกลุ่มดังกล่าว อย่างไรก็ตามเนื่องจาก VPU เป็นอนุพันธ์ของ VPA จึงควรที่จะศึกษาผลของ VPU ที่มีต่อ การสร้าง การหลั่งสารสื่อประสาท GABA (Johannessen และ Johannessen, 2003) และ glutamate และผลที่มีต่อ ion channels ต่างๆ เช่น sodium channel, calcium channels และ potassium channel เป็นต้น (Willmore, 1999) ซึ่งอาจเป็นกลไกร่วมในการออกฤทธิ์ด้านชักของ VPU ได้ เช่นเดียวกับ VPA

ในการที่ VPU มีกลไกการออกฤทธิ์ในหลายๆ ด้านที่คล้ายคลึงกับ VPA และให้ผลที่ดีกว่าในการต้านชักในสัตว์ทดลอง และมีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางน้อยกว่า สารตัวนี้จึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไป โดยควรที่จะต้องศึกษาทางพิษวิทยาของสารตัวนี้ โดยเฉพาะพิษที่มีต่อดับและเด็กทารกในครรภ์มารดาซึ่งเป็นอาการข้างเคียงของยา VPA ที่สำคัญ (Davis *et al.*, 1994) นอกจากนี้จากการที่ VPA สามารถใช้รักษาโรคต่างๆ ได้หลายโรค (Henry, 2003; Johannessen และ Johannessen, 2003; Peterson และ Naunton, 2005) จึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์อื่นๆ นอกจากฤทธิ์ด้านชักของ VPU ทั้งฤทธิ์ที่มีต่อ neuropathic pain ปวดหัวไมเกรน การยับยั้งการเสื่อมของเซลล์ประสาท และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น เพื่อศึกษาถึงประโยชน์ที่อาจเป็นไปได้ของสาร VPU ในด้านอื่นๆ อีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

ในการศึกษาผลของ เอ็น-(2-โพรพิลเพนทาโนอิล) ยูเรีย (VPU) และกรดวาลโพรอิก (VPA) ที่มีต่อตัวรับชนิดยับยั้ง GABA_A และ glycine ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสของหนูขาว (หนูแรท) ครั้งนี้พบว่า สาร VPA (ความเข้มข้นจนถึง 3 mM) และ VPU (ความเข้มข้นจนถึง 300 μ M) ไม่มีผลกระตุ้นโดยตรงให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และไม่มีผลใดๆ ต่อตัวรับ glycine สำหรับผลของสารทั้งสองที่มีต่อตัวรับ GABA_A นั้น พบว่า VPU (1-300 μ M), VPA (100-5000 μ M) และ diazepam (0.01-10 μ M) สามารถเสริมฤทธิ์ GABA ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A ได้ โดยความเข้มข้นที่เริ่มเสริมฤทธิ์ของ VPU จะต่ำกว่า VPA ถึงประมาณ 100 เท่า แต่จะสูงกว่า diazepam ประมาณ 100 เท่า ในการศึกษาที่มีข้อจำกัดของความเข้มข้นของ VPU ซึ่งไม่สามารถละลายใน physiological salt solution ได้มากกว่า 300 μ M ทำให้ไม่สามารถหาค่าการเสริมฤทธิ์สูงสุดของ VPU ได้ว่าเป็นเท่าไร เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับสารอีกกลุ่มหนึ่ง คือ pentobarbital sodium และ propofol พบว่า pentobarbital sodium และ propofol สามารถกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรงผ่านทางตัวรับ GABA_A และสามารถเสริมฤทธิ์สาร GABA ในการกระตุ้นให้เกิดกระแสไหลผ่านตัวรับ GABA_A ได้ โดยทั้ง pentobarbital sodium และ propofol มีความแรงมากกว่าทั้ง VPA และ VPU เมื่อศึกษาผลของ flumazenil ซึ่งเป็นสารต้านที่บริเวณ benzodiazepine บนตัวรับ GABA_A ต่อการออกฤทธิ์ของ VPU ก็พบว่า flumazenil ไม่สามารถยับยั้งการเสริมฤทธิ์ของ VPU ที่ตัวรับนี้ได้ แสดงให้เห็นว่า VPU มีได้ออกฤทธิ์ผ่านบริเวณ benzodiazepine บนตัวรับ GABA_A เมื่อศึกษาผลของของ VPU ที่มีต่อการเสริมฤทธิ์ของ pentobarbital sodium ต่อตัวรับ GABA_A ก็พบว่าเมื่อให้ VPU ร่วมไปกับ pentobarbital sodium ในขนาดที่ไม่สามารถกระตุ้นตัวรับ GABA_A โดยตรง จะมีผลเสริมฤทธิ์ GABA ที่ตัวรับ GABA_A มากกว่าการให้สารตัวใดตัวหนึ่งร่วมกับ GABA แต่เมื่อศึกษาผลของ VPU ต่อฤทธิ์กระตุ้นโดยตรงต่อตัวรับ GABA_A ของ pentobarbital sodium กลับพบว่า VPU สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ pentobarbital sodium ได้ และมีลักษณะเป็น dose-dependent manner ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า วิพียูมีปฏิกิริยาต่อกันโดยตรงหรือโดยอ้อมกับเพนโตบาร์บิทัลโซเดียม ที่บริเวณบาร์บิทูเรทบนตัวรับกาบาเอ อย่างไรก็ตามยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกของการเกิดปฏิกิริยาต่อกันนี้ โดยสรุปแล้วผลการเสริมฤทธิ์ของวิพียูต่อตัวรับกาบาเออาจจะมีส่วนในการออกฤทธิ์ด้านชักของสารตัวนี้

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของ VPU ที่มีต่อตัวรับ $GABA_A$ นี้ ทำให้เห็นว่าผลในการเสริมฤทธิ์น่าจะเป็นฤทธิ์หนึ่ง นอกเหนือจากผลในการลดระดับของสารกลูตาเมตในเปลือกสมองใหญ่ (Chunngam, 1996) และยับยั้งการทำงานของตัวรับกลูตาเมต ชนิด NMDA (Ponsub, 2003) ที่ทำให้ผลในการต้านชักของ VPU มีมากกว่า VPA และผลต่อตัวรับ $GABA_A$ ที่ได้ก็น้อยกว่าสาร pentobarbital sodium, Propofol และ diazepam ที่มีฤทธิ์ทำให้ออนหลับหรือสลบ ซึ่งก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ VPU มีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางน้อยกว่าสารในกลุ่มดังกล่าว อย่างไรก็ตามเนื่องจาก VPU เป็นอนุพันธ์ของ VPA จึงควรที่จะศึกษาผลของ VPU ที่มีต่อ การสร้าง การหลั่งสารสื่อประสาท GABA และ glutamate และผลที่มีต่อ ion channels ต่างๆ เช่น sodium channel, calcium channels และ potassium channel เป็นต้น ซึ่งอาจเป็นกลไกร่วมในการออกฤทธิ์ต้านชักของ VPU ได้ เช่นเดียวกับ VPA

ในการที่ VPU มีกลไกการออกฤทธิ์ในหลายๆ ด้านที่คล้ายคลึงกับ VPA และให้ผลที่ดีกว่าในการต้านชักในสัตว์ทดลอง และมีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางน้อยกว่า สารตัวนี้จึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไป โดยควรที่จะต้องศึกษาทางพิษวิทยาของสารตัวนี้ โดยเฉพาะพิษที่มีต่อดับและทารกในครรภ์มารดาซึ่งเป็นอาการข้างเคียงของยา VPA ที่สำคัญ นอกจากนี้จากการที่ VPA สามารถใช้รักษาโรคต่างๆ ได้หลายโรค จึงมีความน่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์อื่นๆ นอกจากฤทธิ์ต้านชักของ VPU ทั้งฤทธิ์ที่มีต่อ neuropathic pain ปวดหัวไมเกรน การยับยั้งการเสื่อมของเซลล์ประสาท และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น เพื่อศึกษาถึงประโยชน์ที่อาจเป็นไปได้ของสาร VPU ในด้านอื่นๆ อีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N. and Langer, S.Z. (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.*, **50**: 291-313.
- Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J, and Gassmann. (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol. Rev.*, **84**: 835-867.
- Betz, H. (1991) Glycine receptors : Heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trend Neurosci.*, **14** : 458-461.
- Betz, H. and Laube, B. (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J.Neurochem.*, **97**: 1600-1610.
- Bialer, M., Haj-yehia, A., Badir, K., and Hadad, S. (1994) Can we develop improved derivatives of valproic acid? *Pharmacy World & Science.*, **16** : 2-6.
- Bowery, N.G. (2000) GABA_B receptors : Structure and function. In Martin D.L. and Olsen R.W. (eds.) *GABA in the Nervous System. The View at Fifty Years.*, pp. 233-244, Lippincott Williams & Wilkin : Philadelphia.
- Bruni, J. (1996) Valproate. In Shorvon S., Dreifuss F.E., Fish D., and Thomas D. (eds.) *The Treatment of Epilepsy*, pp. 482-490. London : Blackwell Science.
- Chunngam, T. (1996) Preliminary studies of anticonvulsant mechanisms of N-(2-propylpentanoyl) urea. *Master Thesis*. Chulalongkorn University, Thailand.
- Cunningham, M.O., Woodhall, G.L., and Jones, R.S.G. (2003) Valproate modifies spontaneous excitation and inhibition at cortical synapses in vitro. *Neuropharmacology*, **45**: 907-917.
- Danysz, W. and Parsons, A.C. (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev.*, **50**(4): 597-664
- Davis, R., Peters, D.H., and McTavish, D. (1994) Valproic acid : A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drug*, **47** : 332-372.
- Fukuzako, H., and Izumi, K. (1991) Clinical aspects of the epilepsies. In Tunnicliff, G., and Raess, B.U.(eds.), *GABA mechanisms in epilepsy*, pp.1–30. New York : Wiley-Liss.
- Gilroy, J. (2000) *Basic Neurology*, 3rd ed., pp. 85- 121. New York: McGraw-Hill.
- Hamil, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch clamp technique for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pfluger Arch.*, **391**: 85-100.

- Harrison, N.L. and Simmonds, M.A. (1982) Sodium valproate enhances responses to GABA receptor activation only at high concentrations. *Brain Res.*, **250**: 201-204.
- Henry, T.R. (2003) The history of valproate in clinical neuroscience. *Psychopharmacol. Bull.*, **37** (suppl 2): 5-16.
- Johannessen, C.U. (2000) Mechanisms of action of valproate : a commentary. *Neurochem. Int.*, **37** : 103-110.
- Johannessen, C.U. and Johannessen, S.I. (2003) Valproate : Past, present, and future. *CNS Drug Rev.*, **9**: 199-216.
- Johnston, D. and Slater, G.E. (1982) Valproate: Mechanisms of action. In Woodbury, D.M., Penry, J.K., and Pippenger, C.E. (eds.) *Antiepileptic Drugs*. 2nd ed., pp. 611-616, New York : Raven Press.
- Karkar, K.M., Thio, L.L., Yamada, K.A. (2004) Effects of seven clinically important antiepileptic drugs on inhibitory glycine receptor currents in hippocampal neurons. *Epilepsy Res.*, **58** (1): 27-35
- Khongsombat, O. (1997) Effects of N(2'-propylpentanoyl)-2-pyrrolidinone and N-(2-propylpentanoyl) urea on neurons of cerebral cortex and cerebellar Purkinje cells in rats.. *Master Thesis*. Chulalongkorn University, Thailand.
- Khongsombat, O. (2004) Effects of N-(2-propylpentanoyl) urea on pilocarpine-induced seizure in rats. *Ph.D. Thesis*. Chulalongkorn University, Thailand.
- Kornau, H.C. (2006) GABA_B receptors and synaptic modulation. *Cell Tissue Res.*, **326**: 517-533.
- Kuhse, J., Betz, H. and Kirsch, J. (1995) The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**: 318-323.
- Kupferberg, H.J. (1982) Valproate : Chemistry and methods of determination. In Woodbury, D.M., Penry, J.K., and Pippenger, C.E. (eds.), *Antiepileptic Drugs*, 2nd ed., pp. 549-554. New York : Raven Press.
- Lee, Ko G.Y., Brown-Crofts, L.M. and Teyler, T.J. (1997) The effects of anticonvulsant drugs on NMDA-EPSP, AMPA-EPSP, and GABA-IPSP in the rat hippocampus. *Brain Res. Bull.*, **42**: 297-302.
- Löscher, W. (1999) Valproate: A reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog. Neurobiol.*, **58**: 31-59.
- Lynch, J.W. (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.*, **84**: 1051-1095.
- Macdonald, R.L. and Olsen, R.W. (1994) GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.*, **17**: 569-602.

- Maksay, G., Laube, B. and Betz, H. (2001) Subunit-specific modulation of glycine receptors by neurosteroids. *Neuropharmacology*, **41** : 369-376.
- McKernan, R.M. and Whitting, P.J. (1996) Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci.*, **19**(4): 139-143.
- Malosio, M.L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J., and Betz, H. (1991) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J.*, **10**(9): 2401-2409.
- Martin, E.D. and Pozo, M.A. (2004) Valproate reduced excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology*, **46**: 555-561.
- McNamara, J.O. (2001) Drug effective in the therapy of the epilepsy. In Hardman, J.G., and Limbird, L.E. (eds.), *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of the Therapeutics*, 10thed., pp. 521-547. New York : McGraw-Hill.
- Möhler, H. (2006) GABA_A receptor diversity and Pharmacology. *Cell Tissue Res.*, **326**: 505-516.
- Nayeem, N., Green, T.P., Martin, I.L., and Barnard, E.A. (1994) Quaternary structure of the native GABA_A receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem.*, **62**(2): 815-818.
- Peterson, G.M. and Naunton, M. (2005) Valproate: a simple chemical with so much to offer. *J. Clin. Pharmacy Ther.*, **30**: 417-421
- Ponsub, P. (2003) Effects of N-(2-propylpentanoyl) urea on NMDA receptor subtype NR1A/NR2B expressed in *Xenopus laevis* oocyte.. *Master Thesis*. Chulalongkorn University, Thailand.
- Rajendra, S., Lynch, J.W. and Schofield, P.R. (1997) The glycine receptor. *Pharmacol. Ther.*, **73** (2): 121-146.
- Rowan, A.J. (2000) Diagnosis and treatment of seizures in the elderly : current recommendations. In Schmidt, D., Schachter, S.C. (eds.), *Epilepsy : Problem Solving in Clinical Practice*, pp. 65-76. London : Martin Dunitz.
- Saisorn, B., Patarapanich, C., and Janwitayanuchit, W. (1992) Synthesis of monoureide analogues of Valproic acid. *Thai J.Pharm Sci.*, **16** : 145-150.
- Sakmann, B., Hamill, O.P., and Bormann, J. (1983) Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by the putative inhibitory transmitter GABA and glycine in mammalian spinal neurons. *J. Neural. Transm.*, Suppl. **18**: 83-95.
- Sieghart, W. (1995) Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.*, **47**: 181-234.
- Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., Hoyer, H. and Adamiker, D. (1999) Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochem. Int.*, **34**: 379-385.

- Sooksawate, T. and Simmonds, M.A. (1998) Increase membrane cholesterol reduces the potentiation of GABA_A currents by neurosteroids in dissociated hippocampal neurones. *Neuropharmacology*, **37**: 1103-1110.
- Sooksawate, T. and Simmonds, M.A. (2001) Influence of membrane cholesterol on modulation of the GABA_A receptor by neuroactive steroids and other potentiators. *British Journal of Pharmacology*, **134** (6):1303-11.
- Stringer, J.L. (1998) Drug for seizure disorders (Epilepsies). In Brody, T.M., Larier, J., and Minneman, K.P. (eds.), *Human Pharmacology : Molecular to clinical*, 3rd ed., pp. 373-382. New York : Mosby.
- Study, R.E. and Barker, J.L. (1981) Diazepam and (-) pentobarbital : Fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of γ -aminobutylic acid responses in cultured central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7180-7184.
- Tantisira, B., Tantisira, M.H., Patarapanich, C., Sooksawate, T., and Chunngam T. (1997) Preliminary evaluation of the anticonvulsant activity of a valproic acid analogue : N-(2-propylpentanoyl) urea. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, **97** :151-164.
- Triller, A., Cluzeaud, F., Pfeiffer, F., Betz, H., and Korn, H. (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J. Cell Biol.*, **101**(2): 683-688.
- Upton, N. and Blackburn, T. (1997) Pharmacology of mammalian GABA_A receptors. In Enna S.J. and Bowery N.G. (eds.) *The GABA Receptors*, pp. 83-120, Humana Press : New Jersey.
- Whiting P.J., McKernan R.M. and Wafford K.A. (1995) Structure and pharmacology of vertebrate GABA_A receptor subtypes. *Int. Rev. Neurobiol.*, **38**: 95-138.
- Whitting, P.J. (1999) The GABA_A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem. Int.*, **34** : 387-390.
- Whitting, P.J. (2006) GABA-A receptors: a viable target for novel anxiolytics? . *Curr. Opin. Pharmacol.*, **6** : 24-29.
- Willmore, L.J. (1999) New antiepileptic drugs : Basic science and clinical use in children and adults. *Epilepsia*, **40** (Suppl. 5) : S 1-10.
- Young, A.B. and Snyder, S.H. (1973) Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**(10): 2832-2836.