

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมิตราคัยนีน

นายวิเชียร ลีลาสง่าลักษณ์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

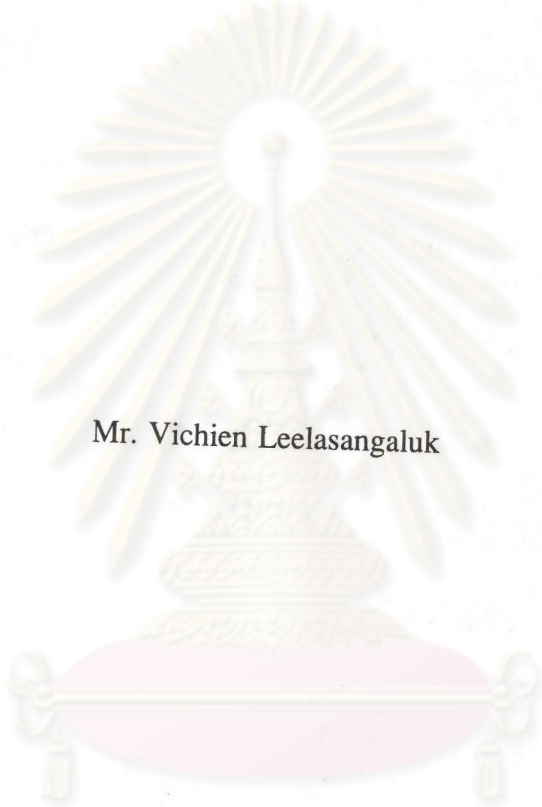
พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-720-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17318592

PHARMACOLOGICAL ACTION OF MITRAGYNE



Mr. Vichien Leelasangkaluk

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy

Program in Biopharmaceutical Sciences

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-633-720-3

Dissertation Title Pharmacological Action of Mitragynine
By Mr. Vichien Leelasangaluk
Program in Biopharmaceutical Sciences
Dissertation Advisor Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.
Dissertation Co-advisor Associate Professor Prasan Dhumma-upakorn, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy.

..... *Santi Thongsuwan* Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thongsuwan, Ph.D.)

Dissertation Committee

..... *S. Jaidee* Chairman

(Assistant Professor Sumlee Jaidee, M.Sc.)

..... *Pavich Tongroach* Dissertation Advisor

(Associate Professor Pavich Tongroach, Ph.D.)

..... *Prasan Dhumma-upakorn* Dissertation Co-advisor

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

..... *Ratree Sudsuang* Member

(Professor Ratree Sudsuang, Ph.D.)

..... *Boonyong Tantisira* Member

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

..... *Piti Trisdikoon* Member

(Assistant Professor Piti Trisdikoon, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

วิเชียร ลีลาสง่าลักษณ์ : ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมิตรากัยนีน (PHARMACOLOGICAL ACTION OF MITRAGYNINE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ภาวิช ทองโรจน์ อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ประสาน ธรรมอุปรณ์ , 126 หน้า. ISBN 974-633-720-3

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นการรายงานผลการวิจัยที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมิตรากัยนีนซึ่งเป็นอินโดอัลคาลอยด์ที่ได้จากใบของต้นกระท่อม

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่ามิตรากัยนีนขนาดตั้งแต่ 30 มก.ต่อน้ำหนัก 1 กก. มีฤทธิ์ในการต้านอาการปวดในการทดสอบ 3 วิธีที่กระทำในหนูถีบจักร 1) การกระตุ้นด้วยแผ่นความร้อน 2) การฉีดสารละลายของกรดน้ำส้ม 0.6 % เข้าทางช่องท้อง และ 3) การฉีดฟอร์มัลลินเข้าที่อุ้งเท้า ฤทธิ์ในการต้านอาการปวดขึ้นกับขนาดของมิตรากัยนีนที่สัตว์ทดลองได้รับ และไม่ถูกหักล้างโดยสารนาออลโซนซึ่งเป็นตัวต้านเฉพาะของสารประกอบของฝิ่น

มิตรากัยนีนทำให้หนูถีบจักรมีการเคลื่อนไหวที่มากขึ้นแสดงว่าสารเป็นสารที่กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง การเคลื่อนที่ที่เพิ่มขึ้นนี้ถูกหักล้างด้วยสารฮาโลเปอริดอลซึ่งเป็นตัวต้านของโดปามีน แต่จากการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวัดพฤติกรรมหมุนวน และการวัดการจับตัวรับของโดปามีน มิตรากัยนีนเองไม่ได้เป็นสารกระตุ้นหรือสารยับยั้งต่อตัวรับเฉพาะของโดปามีน หรือมีผลทำให้มีการหลั่งของโดปามีนเพิ่มมากขึ้นแต่อย่างไรในการทดลองโดยการวัดปริมาณการหลั่งสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างที่เก็บได้จากสมองส่วนไฮโปธาลามัสของหนูขาวมิตรากัยนีนในขนาด 15 และ 30 มก.ต่อน้ำหนักสัตว์ทดลอง 1 กก.ไม่มีผลต่อการหลั่งสารสื่อโดปามีนและเซโรโรโทนิน ในหนูถีบจักรที่ได้รับการกระตุ้นการทำงานของระบบเซโรโรโทนิน มิตรากัยนีนมีผลยับยั้งการกระตุ้นของเซโรโรโทนินแต่ไม่มีผลยับยั้งการสลายของเซโรโรโทนินในสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย 5-เมทอกซี-เอ็น,เอ็น-ไดเมทิลทร립ตามีน ในการทดลองโดยการบันทึกสัญญาณไฟฟ้าจากเซลล์ประสาทและการให้สารเคมีโดยวิธีไอออนโตพอเรซีสมิตรากัยนีนไม่มีผลโดยตรงต่ออัตราการทำงานของเซลล์ประสาทชนิดเปอร์กินเจ และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงผลต่อการกดเซลล์ประสาทชนิดเปอร์กินเจ โดยสารสื่อประสาทแกมมาอะมิโนบิวทริกแอซิดหรือเซโรโรโทนิน มิตรากัยนีนทำให้อุณหภูมิของสัตว์ทดลองลดลง

จากผลของการศึกษาคาดว่ากลไกการออกฤทธิ์ของมิตรากัยนีนเกิดขึ้นในระบบประสาทส่วนกลาง โดยทำหน้าที่เป็นตัวต้านการเข้าจับของเซโรโรโทนินกับตัวรับเฉพาะชนิดที่ 2 หรือต้านการเข้าจับของนอร์เอดีนาลีนกับตัวรับเฉพาะชนิดอัลฟา-2

ภาควิชา
สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ.....
ปีการศึกษา2538.....

ลายมือชื่อนิสิตวิเชียร ลีลาสง่า.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาดร.ภาวิช.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วมรศ.ดร.ประสาน ธรรมอุปรณ์.....

C375412 : MAJOR Biopharmaceutical Sciences

KEY WORD: MITRAGYNINE/ ANALGESIC ACTIVITIES/ LOCOMOTOR ACTIVITY/ MICRODIALYSIS/ HEAD TWITCH

VICHIEEN LEELASANGALUK : PHARMACOLOGICAL ACTION OF MITRAGYNINE. DISSERTATION ADVISOR : ASSO. PROF. PAVICH TONGROACH, Ph.D. DISSERTATION COADVISOR : ASSO. PROF. PRASAN DHUMMA-UPAKORN, Ph.D. 126 pp. ISBN 974-633-720-3

Pharmacological action of mitragynine, an indole alkaloid from the leaves of *Mitragyna speciosa* (Korth.) was studied and reported in this dissertation.

In mice, it was found that mitragynine, 30 mg/kg, produced significant antinociceptive effect using hot plate test, writhing test and formalin test in a dose dependent manner. In contrast to morphine, this antinociceptive effect was not antagonized by naloxone, an opiate antagonist.

Mitragynine increased locomotor activity in mice, suggesting that it was a central nervous system stimulant. The increased locomotor activity was antagonized by haloperidol, a dopamine antagonist. However, mitragynine did not show any dopamine agonist, antagonist or dopamine releasing agent when tested by rotational behavior and dopamine-2 receptor binding assay. Mitragynine, at the dose of 15 and 30 mg/kg body weight, also did not affect the dopamine or serotonin level in striatum in microdialysis study. Head twitch but not head weaving induced by 5-Methoxy-N,N-dimethyl tryptamine was blocked by mitragynine. Mitragynine had no direct effect on firing rate of Purkinje cell in cerebellum, nor did it alter the effects of GABA and serotonin on Purkinje cell. Mitragynine significantly decreased body temperature.

From the results, mechanism of action of mitragynine is proposed as an antagonist on serotonin-2 (5-HT₂) receptor or α -2 adrenoceptor.

ภาควิชา.....

สาขาวิชา..... เภสัชศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา..... 2538

ลายมือชื่อนิติ..... วิชา ส่วรทว

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Prach Tongroach

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... Prasan Dhumma-upakorn

Acknowledgements



I wish to express my sincere gratitude and appreciation to Assoc. Prof. Dr. Pavich Tongroch, my advisor, for his excellent instruction, guidance, encouragement and support which enable me to carry out this study.

I am also deeply grateful to Assoc. Prof Dr. Boonyong Tantisira for his helpful advice, suggestion and supports.

I am indebted to Assoc.Prof Prasan Dhumma-upakorn , Assist Prof. Sumlee Jaidee for their kind, valuable advice and constructive suggestion.

I would like to thank Mr. Tongchai Sooksawate for his assistance and his precious advice about laboratory techniques used in this study.

I also would like to thank Prof. Hiroshi Watanabe and all the staff at Toyama Medical and Pharmaceutical University for their advice while I was working there.

Finally, I am appreciative for the supports and encouragement of all the staffs of Faculty of Pharmacy, Silpakorn University and the others whose names are not mentioned here.

Contents

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Table.....	ix
List of Figures.....	x
List of Abbreviations.....	xii
Chapter	
I Introduction.....	1
Mitragynine.....	1
Pain.....	5
The primary afferent nociceptor.....	6
Spinal transmission of pain.....	8
Central pathways for pain.....	8
The spinal cord and referred pain.....	8
Ascending pathways for pain.....	9
Pain modulator.....	10
Central hyperalgesia.....	11
Peptides.....	11
Excitatory amino acids.....	12
Serotonin and pain.....	13
5-HT modulation of nociception at the level of the.....	15
thalamus.	

	Page
5-HT modulation of nociception at the level of the of.....	21
the somatosensory cortex	
Possible 5-HT modulation of nociception at the level	23
of the reticular formation	
Possible 5-HT modulation of nociception via effects on	25
component of the endogenous pain suppress system	
Differential modulation of nociception by the various.....	29
classes of 5-HT receptors at the spinal level	
Different types of pain.....	38
II Materials and Methods.....	43
Experimental Animals.....	43
Equipment.....	43
Chemicals.....	46
Experimental methods.....	47
III Results.....	65
V Discussion and conclusion.....	100
References.....	104
Curriculum vitae.....	126

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Table

Table	Page
1. Experimental animals used in the experiment.....	44



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figure	Page
1. Drawing of <i>Mitragyna speciosa</i> (Korth.).....	2
2. Schematic diagram illustrating the anatomical organization of..... pain transmission and pain suppression pathways.	14
3. Structures of indole nucleus, serotonin and mitragynine.....	42
4. The extraction procedure of <i>Mitragyna speciosa</i> (Korth.).....	50
5. Isolation process of mitragynine.....	51
6. Schematic drawing of the system for detecting animal movement	56
7. Structure of mitragynine.....	65
8. Infrared spectrum of substance A in KBr disk.....	71
9. Infrared spectrum of mitragynine in KBr disk.....	72
10. ¹ H-NMR spectrum of mitragynine in CDCl ₃	73
11. ¹ H-NMR spectrum of substance A in CDCl ₃	74
12. ¹³ C-NMR spectrum of substance A in CDCl ₃	75
13. Effect of mitragynine on latency of nociceptive response..... in mice using hot plate test.	76
14. % Maximum possible effect of mitragynine..... using hot plate test in mice.	77
15. Effect of naloxone on antinociceptive effects of morphine..... and mitragynine.	78
16. Effect of mitragynine on acetic acid-induced writhing in mice.....	79
17. % Protection of mitragynine on acetic acid induced writhings.....	80
18. Effect of mitragynine on formalin induced nociception in mice.....	81
19. Effect of mitragynine on formalin induced nociception in mice.....	82

Figure	Page
20. Effect of mitragynine on locomotor activity.....	83
21. Effect of haloperidol on locomotor activity.....	84
22. Effect of haloperidol on mitragynine induced increase in..... locomotor activity.	85
23. Effect of mitragynine on core body temperature.....	86
24. Effect of mitragynine on 6-OHDA induced lesion.....	87
25. Chromatogram of biogenic amines and their metabolites..... detected by HPLC.	88
26. Chromatogram of brain dialysate detected by HPLC.....	89
27. Standard curve of DOPAC.....	90
28. Standard curve of HVA.....	91
29. Standard curve of HIAA.....	92
30. Level of DOPAC in brain dialysate at various time.....	93
31. Level of HVA in brain dialysate at various time.....	94
32. Level of HIAA in brain dialysate at various time.....	95
33. Effect of mitragynine and other substance on the binding..... of spiperone with dopamine (D2) receptor.	96
34. Effect of mitragynine on no. of 5-MeO-DMT induced head..... weaving in mice.	97
35. Effect of mitragynine on no. of 5-MeO-DMT induced head..... twitch in mice.	98
36. Effect of iontophoretic administration of mitragynine on..... spontaneous firing rate of Purkinje cell.	99

List of Abbreviations

%	=	percentage
α	=	alpha
λ	=	lamda
°	=	degree
°C	=	degree Celsius
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
μm	=	micrometer
2-Me-5-HT	=	2-methyl-5-hydroxytryptamine
5,7-DHT	=	5,7-dihydroxytryptamine
5-HIAA	=	5-hydroxy indole acetic acid
5-HT	=	5-hydroxytryptamine (serotonin)
5-MeO-DMT	=	5-methoxy-N,N-(dimethyl)-tryptamine
6-OHDA	=	6-hydroxydopamine
8-OH-DPAT	=	8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin
a.m.	=	ante meridiem
B.E.	=	Buddhist Era
B ₂	=	bradykinin type 2
CGRP	=	calcitonin gene-related peptide
cm	=	centrimeter
cm ³	=	cubic centrimeter
CMC	=	sodium carboxy methylcellulose
CNS	=	central nervous system
CSF	=	cerebrospinal fluid

D ₂	=	dopamine type 2
DOI	=	1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-amino-propane
DOPAC	=	dihydroxy acetic acid
e.g	=	exempli gratia
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetate
et al.	=	et alii
etc.	=	et cetera (and so on)
g	=	gram
g	=	gravity
GABA	=	gamma aminobutylic acid
Gi	=	gigantocellular reticularnucleus
HPLC	=	high performance liquid chromatography
HVA	=	homovanillic acid
i.e.	=	id est
i.p.	=	intraperitonium
IR	=	infrared
kg	=	kilogram
M	=	molarity
m-CPP	=	m-chlorophenylpiperazine
MELM	=	Met-enkephalin-like material
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
mm	=	millimeter
ms	=	millisecond
mV	=	millivolt
N-di-Me-tryptamine	=	N-dimethyl-tryptamine

NA	=	noradrenaline
nm	=	nanometer
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
NMR	=	nuclear magnetic resonance
NSS	=	normal saline
p.m.	=	post meridiem
PAG	=	periaqueductal gray
PMPE	=	percent maximum possible effect
rpm	=	round per minute
s.c.	=	subcutaneous
sec	=	second
SP	=	substance P
SPLM	=	substance P-like material
TFMPP	=	trifluoromethylphenylpiperazine
TLC	=	thin layer chromatography
V	=	vocalization
VA	=	vocalization after-discharge
vol	=	volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย