

การตรวจและหาตำแหน่งที่จับของบาราคอลในสมองหนูแรท



นางสาว สายทิพย์ เฟ่งศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรวิทยาศาสตรการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-691-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17371624

DETECTION AND LOCALIZATION OF BARAKOL BINDING SITES IN RAT BRAINS.

MISS SAITHIP BHENGSRİ

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Medical Science

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-634-691-1

Thesis title : DETECTION AND LOCALIZATION OF BARAKOL BINDING SITES
IN RAT BRAINS.

By : Miss Saithip Bhengsri

Programme : Medical Science

Thesis advisor : Professor Ratre Sudsuang, Ph.D.

Thesis co-advisor : Assistant Professor Weerachai Singhanियom, Ph.D.

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

Santi Thoongsuwan

Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Bungorn Chomdej

Chairman

(Associate Professor Bungorn Chomdej, M.D., Ph.D.)

Ratre Sudsuang

Thesis advisor

(Professor Ratre Sudsuang, Ph.D.)

Weerachai Singhanियom

Thesis co-advisor

(Assistant Professor Weerachai Singhanियom, Ph.D.)

Pongsak Kunluan

Member

(Assistant Professor Pongsak Kunluan)

C. Suthisang

Member

(Assistant Professor Chuthamanee Suthisang, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

สายทิพย์ เฟ่งศรี : การตรวจและหาตำแหน่งที่จับของบาราคอลในสมองหนูแรท (DETECTION AND LOCALIZATION OF BARAKOL BINDING SITES IN RAT BRAINS) อ.ที่ปรึกษา : ศ.ดร.ราตรีสุดทรวง อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.วิระชัย ลิงหนิยม 73 หน้า ISBN 974-634-691-1

บาราคอลเป็นสารสำคัญที่สกัดได้จากใบอ่อนและดอกขี้เหล็ก ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการกวดการทำงาน
ของระบบประสาทส่วนกลาง แต่ยังไม่มียาใดสามารถอธิบายกลไกได้แน่นอน เพื่อศึกษาหาตำแหน่งที่จับของ
ของบาราคอลได้ทำการติดฉลากแอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์ด้วยไอโอดีน-125 เพื่อใช้เป็นเรดิโอ-
ไลแกนสำหรับตรวจและหาตำแหน่งที่จับในสมองหนูโดยใช้เทคนิค อินวิโทร ออโตเรดิโอกราฟฟี พบว่า มีความ
หนาแน่นมากเฉพาะที่บริเวณ คอร์เทกซ์-พูทาเมน, นิวเคลียส แอคคัมเบน, สมองใหญ่ส่วนคอร์เทก,
ฮิปโปแคมปัส, นิวเคลียสของธาลามัส, ชันแกรนูลาของซีรีเบลลัม, อินทิเรียคอลลิคูลัส และ ชับแสดนเซีย
ในกรา ความหนาแน่นของเกลือเงินในบริเวณดังกล่าวมาแล้ว ลดลงถึงระดับของพื้นฟิล์ม เมื่อใส่โคลไลแกน
คู่กับฮอทไลแกน จากผลการศึกษาแสดงว่า แอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์อาจแสดงฤทธิ์โดยผ่าน
ตำแหน่งที่จับโดยเฉพาะในสมองส่วนดังกล่าวซึ่งแตกต่างไปจากรีเซพเตอร์ของโดปามีน ดี-1, ดี-2,
ซีโรโทนิน และกาบา

ภาควิชา.....
สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์.....
ปีการศึกษา.....2539.....

ลายมือชื่อนิสิต *Ratree Pongseang*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Ratree Pongseang*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *วิระชัย ลิงหนิยม*

C 645033: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD: BARAKOL/Cassia siamea Lamk./RECEPTOR AUTORADIOGRAPHY

SAITHIP BHENGSRISRI : DETECTION AND LOCALIZATION OF BARAKOL BINDING
SITES IN RAT BRAINS. THESIS ADVISOR : PROF. RATREE SUDSUANG, Ph.D.
THESIS CO-ADVISOR : ASSIS. PROF. WEERACHAI SINGHANIYOM, Ph.D. 73 pp.
ISBN 974-634-691-1

Barakol is the bioactive substance purified from the fresh young leaves and flowers of the Cassia siamea Lamk.. This substances has been shown to contain potent depressive effect. Previous reports suggested the substance may exert its effect in the central nervous system but no substantial evidences support on this matter. To determine the binding sites of barakol, this study was done by labeled iodine-125 into anhydrobarakol hydrochloride as radioligand for detection and localization of its binding sites in the rat brain by in vitro autoradiographic technique. High grain density was uniformly observed in the caudate-putamen, accumben nucleus, cerebral cortex, hippocampus, thalamic nuclei, granular cell layer of cerebellum, inferior colliculus and substantia nigra. The observed density in these area was reduced to the level of background density after adding cold ligand into hot ligand. This preliminary study suggested that the anhydrobarakol hydrochloride may exerts its effect through specific binding sites in those brain areas which is different from those of dopamine D1, D2, serotonin and GABA.

ภาควิชา.....

สาขาวิชา MEDICAL SCIENCE.....

ปีการศึกษา 2539.....

ลายมือชื่อผู้จัดทำ..... *Saithip Bhengsr*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Ratree Sudsuang*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *W. Singhaniyom*



ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Professor Dr. Ratee Sudsuang, Department of Physiology, Faculty of medicine, Chulalongkorn University and my co-advisor, Assistant Professor Dr. Weerachai Singhaniyom, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakarinwirot University for their kindness, guidance and encouragement throughout the course of this study, and edition of this dissertation.

I am grateful to Associate Professor Dr. Tararat Supasiri, Faculty of Science, Srinakarinwirot University and Assistant Professor Dr. Chuthamanee Suthisisang, Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University for their valuable technique advices and supports for laboratory work.

I am grateful to Assistant Professor Pongsak Kunluan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for provision of facilities employed in this experiment works.

I would like to extend my sincere thanks to all staff members of the Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakarinwirot University for their helps and mental supports.

Finally, I wish to express my appreciation and grateful to my mother, my uncle and my aunt, for their love, understanding and encouragement and supports throughout my study. I am also indebted to all experimental animals for their sacrifice which make this study possible.

CONTENTS

	Page
Thai abstract.....	IV
English abstract.....	V
Acknowledgment.....	VI
List of table.....	VIII
List of diagram.....	IX
List of figures.....	X
List of abbreviation.....	XIII
Chapter	
1. Introduction.....	1
2. Materials and methods.....	10
3. Results.....	24
4. Discussion and conclusion.....	60
References.....	65
Appendix.....	71
Author biography.....	73

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Example of receptors with their specific ligands obtained from the <i>in vitro</i> receptors binding studies.....	9
2. Spectroscopic characteristics of anhydrobarakol hydrochloride.....	25
3. Spectroscopic characteristics of [I]anhydrobarakol hydrochloride.....	31

LIST OF DIAGRAMS

Diagram	Page
1. Flow-chart diagram demonstrating a step-wise preparations of anhydrobarakol hydrochloride	12
2. Flow-chart diagram demonstrating a step-wise preparations of iodination reaction of anhydrobarakol hydrochloride.....	15
3. Flow-chart diagram demonstrating a step-wise preparations of [¹²⁵ I]anhydrobarakol hydrochloride in macroscale.....	20
4. Flow-chart diagram demonstrating a step-wise preparation of autoradiograms from rat brain section.....	23

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Detailed drawing of several parts of <i>Cassia siamea</i> Lamk.....	2
2. Transformation reaction of 5-acetonyl-7-hydroxy-2-methylchromone to barakol.....	4
3. Conversion reaction among barakol, anhydrobarakol, and anhydrobarakol hydrochloride	6
4. Iodination reaction of anhydrobarakol hydrochloride.....	7
5. UV absorption spectrum of anhydrobarakol hydrochloride, in ethanol.....	26
6. IR absorption spectrum of anhydrobarakol hydrochloride, in KBr.....	27
7. ¹ H NMR spectrum of anhydrobarakol hydrochloride, in D ₂ O(at 200 MHz).....	28
8. Mass spectrum of anhydrobarakol hydrochloride.....	29
9. UV absorption spectrum of [I]anhydrobarakol hydrochloride, in ethanol.....	32
10. IR absorption spectrum of [I]anhydrobarakol hydrochloride , in KBr.....	33
11. ¹ H NMR spectrum of [I]anhydrobarakol hydrochloride, in CDCl ₃ (at200 MHz).....	34
12. Mass spectrum of [I]anhydrobarakol hydrochloride.....	35
13. Representative HPLC profiles of chloramine-T standard.....	36
14. Representative HPLC profiles of sodium iodide standard.....	37
15. Representative HPLC profiles of [I]anhydrobarakol hydrochloride.....	38
16. Representative HPLC profiles of anhydrobarakol hydrochloride.....	39
17. Representative HPLC profiles after injection of solution obtained from iodination reaction	41
18. Representative HPLC profiles of [I]anhydrobarakol hydrochloride after adding with [I]anhydrobarakol hydrochloride complex.....	42

19. Representative HPLC profiles of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride43
20. Total binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in caudate-putamen (CPu), accumbens nucleus (Acb), frontoparietal cortex-motor area (FrPaM), and frontoparietal cortex-somatosensory area (FrPaSS) in rat brain.....46
21. Non-specific binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in caudate-putamen (CPu), accumbens nucleus (Acb), frontoparietal cortex-motor area (FrPaM), and frontoparietal cortex-somatosensory area (FrPaSS) in adjacent section of rat brain.....47
22. Total binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in caudate-putamen (CPu), frontoparietal cortex-motor area (FrPaM), and frontoparietal cortex-somatosensory area (FrPaSS) of rat brain.....48
23. Non-specific binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in caudate-putamen (CPu), frontoparietal cortex-motor area (FrPaM), and frontoparietal cortex-somatosensory area (FrPaSS) in adjacent section of rat brain.....49
24. Total binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in frontoparietal cortex-somatosensory area (FrPaSS) and thalamic nucleus (Tha) of rat brain.....50
25. Non-specific binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in frontoparietal cortex-somatosensory area (FrPaSS), thalamic nucleus (Tha) in adjacent sections of rat brain.....51
26. Total binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in substantia nigra (SN) including pars compacta (SNC) and pars reticulata (SNR), in ventral hippocampus including field CA 1, CA 2, CA 3, and CA 4 of rat brain..... 52
27. Non-specific binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in substantia nigra (SN) including pars compacta (SNC) and pars reticulata (SNR), in ventral hippocampus in adjacent sections of rat brain.....53

28. Total binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in striate cortex (Str), subiculum (S) and entorhinal cortex (Ent) of rat brain.....	54
29. Non-specific binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in striate cortex (Str), subiculum (S) and entorhinal cortex (Ent) in adjacent section of rat brain.....	55
30. Total binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in inferior colliculus (IC), granular cell layer of cerebellum (G) and entorhinal cortex (Ent) of rat brain.....	56
31. Non-specific binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in inferior colliculus (IC), granular cell layer of cerebellum (G) and entorhinal cortex (Ent) in adjacent section of rat brain.....	57
32. Total binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in granular cell layer of cerebellum (G) of rat brain.....	58
33. Non-specific binding sites of [125 I]anhydrobarakol hydrochloride in granular cell layer of cerebellum (G), in adjacent section of rat brain.....	59

LIST OF ABBREVIATION

CPu	Caudate-putamen
Acb	Accumben nucleus
alv	alvious hippocampus
CA 1	Field CA 1 of Ammon's horn
CA 2	Field CA 2 of Ammon's horn
CA 3	Field CA 3 of Ammon's horn
CA 4	Field CA 4 of Ammon's horn
S	Subiculum
FrPaM	Frontoparietal cortex, motor area
FrPaSS	Frontoparietal cortex, somatosensory area
Str	Striate cortex
Ent	Entorhinal cortex
SNR	Substantia nigra pars reticulata
SNC	Substantia nigra pars compacta
IC	Inferia colliculus
Tha	Thalamic nucleus
°C	Degree Celsius
Ci	Curie
mg	Milligram
ml	Millilitre
μl	Microlitre
μg	Micrigram

μm	Micrometre
mmole	Millimole
kg	Kilogram
mm	Millimetre
M	Molar