ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (*Celastrus paniculatus* Willd.) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัล คอร์เท็กซ์ในหนูแรทเพศผู้

ปุณณ์ณิษา กุลวงษ์ (วท.บ.) ปัณฑิตา แตงพันธ์ (วท.บ.) ศิริประภา บุญมี (วท.บ.) และ
ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์ (ปร.ด.)

สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี ประเทศไทย

บทคัดย่อ

บทนำ มีการรายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และยับยั้งการตาย (apoptosis) ของเซลล์เพาะเลี้ยงได้ แต่ยังไม่มีการรายงานถึงผลต่อเซลล์ประสาทในสมองหนูแรท

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อสมอง รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทผ่านกลไก apoptosis ในหนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Sprague Dawley

วิธีการศึกษา เป็นการศึกษาไปข้างหน้าแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุมในหนูแรทอายุ 4 สัปดาห์ เพศผู้ จำนวน 12 ตัว หนูแรทกลุ่มทดลอง 6 ตัว ได้รับการฉีดสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ขนาด 80 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้องติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และกลุ่มควบคุม 6 ตัว ได้รับการฉีดด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ร้อยละ 0.5 ปริมาตร 0.2 มล. ทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์เช่นกัน พักหนูแรท 5 วันก่อนนำไปศึกษาเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสด้วยวิธีย้อมสี hematoxylin และ eosin ศึกษาการแสดงออกของ anti-apoptotic protein ชนิด BCL-2 ในซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัส ด้วยวิธี immunohistochemistry และศึกษาสัดส่วนการแสดงออกของ anti-apoptotic protein (BCL-2) และ pro-apoptotic protein (BAX) ซึ่งเป็นตัวกำหนดสำคัญในการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท ด้วยวิธี Western blot จากสมองทั้งลูก (whole brain) นอกจากนี้ยังทำการบันทึกปริมาณอาหารและน้ำที่กิน และน้ำหนักหนู ตลอดการทดลอง

ผลการศึกษา หนูแรทที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนักปริมาณน้ำและอาหารที่กินในแต่ละวัน แสดงว่า การได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย หนูแรทกลุ่มทดลองมีลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ประสาทภายในฮิปโปแคมปัสไม่แตกแต่งจากกลุ่มควบคุม เป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท และเมื่อศึกษากลไกการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทผ่านการแสดงออกของ BCL-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein และ BAX ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein พบว่ากลุ่มทดลองมีการแสดงออกของ BCL-2 เพิ่มขึ้นทั้งในซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัส และเมื่อศึกษาสัดส่วนการแสดงออกของ BCL-2 ต่อ BAX พบว่าเพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายควบคุมสัดส่วนการแสดงออกของ BCL-2 ต่อ BAX จึงอาจจะมีบทบาทสำคัญต่อการปกป้องเซลล์ประสาท

สรุป การศึกษานี้บ่งชี้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทและยังส่งเสริมการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการยังยั้งการเกิด apoptosis

คำสำคัญ เมล็ดกระทงลาย ฮิปโปแคมปัส ซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ อะพอพโทซิส

ผู้นิพนธ์ที่รับผิดชอบ ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์
สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี
ประเทศไทย E-mail: siripornc@buu.ac.th

The effect of *Celastrus paniculatus* Willd. seed extract on the neuronal viability of hippocampus and cerebral cortex in male rats

Punnisa Kulwong (B.Sc.), Pantita Tangphan (B.Sc.), Siriprapha Bunmee (B.Sc.) and Siriporn Chamniansawat (Ph.D.)

Division of Medical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand

Abstract

Background: *Celastrus paniculatus* (CP) seed extract has been reported to have neuroprotective and antioxidant activities. However, the direct effect of CP seed extract on promoting neuronal survival is unknown.

Objective: The present study aimed to demonstrate the effects of CP seed extract on neuronal apoptosis and histological change in the brain of male Sprague Dawley rats.

Materials and Methods: This study is a prospective, randomized, controlled study in 4-week-old rats. There were 12 male rats, 6 rats in the experimental group was injected with CP seed extract at the dose of 80 mg/kg body weight intraperitoneally daily for 2 weeks. Six control groups were injected with Dimethylsulfoxide (DMSO) 0.5% 0.2 mL volume daily for 2 weeks as well. Rats were rested for 5 days. The hippocampal structure was observed by hematoxylin and eosin staining technique. The expression of cerebral and hippocampal BCL-2 protein was performed by using immunohistochemistry technique. The expression ratio of BCL-2 to BAX in whole brain protein was studied by Western blot technique. Body weight, food intake, and water intake of control and experimental rats were recorded throughout 14 days of treatment.

Results: Body weight, food intake, and water intake of control and experimental rats were comparable; indicating that CP seed extract has no effect on metabolic aspect of the rats. Hippocampal structure and neurons were also comparable in both groups; suggesting that CP seed extract has nontoxicity effect. However, the cerebral and hippocampal BCL-2 expression were significantly increase in treated group when compared with those of the control group. Whole brain BCL-2/BAX expression ratio was also significantly increased in treated group when compared with the control group. Since it has been suggested that the ratio of BCL-2 to BAX is an important determinant of neuronal survival, CP-regulated BCL-2/BAX expression may play a vital role in neuronal protection beyond their antioxidant activity.

Conclusion: CP seed extract had no neurotoxic effect and enhanced cell survival through inhibition of apoptosis.

Keywords: *Celastrus paniculatus* seed, Hippocampus, Cerebral cortex, Apoptosis

Corresponding author Siriporn Chamniansawat
Division of Medical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences,
Burapha University, Chonburi, Thailand
E-mail: siripornc@buu.ac.th

Received: September 14, 2022 Revised: May 31, 2023 Accepted: July 20, 2023

การอ้างอิง

ปุณณ์ณิษา กุลวงษ์ ปัณฑิตา แตงพันธ์ ศิริประภา บุญมี และ ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (*Celastrus paniculatus* Willd.) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ในหนูแรทเพศผู้. บูรพาเวชสาร. 2566; 10(2): 26-39.

Citation

Kulwong P, Tangphan P, Bunmee S and Chamniansawat S. The effect of *Celastrus paniculatus* Willd. seed extract on the neuronal viability of hippocampus and cerebral cortex in male rats. Bu J Med. 2023; 10(2): 26-39.

บทนำ

กระทงลาย (*Celastrus paniculatus* Willd.) จัดอยู่ในวงศ์ CELASTRACEAE ลักษณะเป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่ เมล็ดรูปไข่สีแดงอมน้ำตาล มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ภายในเมล็ดเป็นพืชพื้นบ้านที่พบได้ในประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในอดีตประเทศไทยมีการสกัดน้ำมันจากเมล็ดกระทงลายมาใช้เป็นยานวดคลายกล้ามเนื้อบรรเทาอาการเหน็บชา เคล็ดขัดยอก[1] ข้อมูลจากตำราอายุรเวท (Ayurveda) ซึ่งเป็นตำราการแพทย์แผนโบราณของประเทศอินเดีย รายงานว่ามีการใช้กระทงลายรักษาโรคหลายชนิด อาทิ โรคเรื้อนด่างขาว โรคไขข้อ โรคเกาต์ อัมพาต และ หอบหืด เป็นต้น[2] การศึกษาต่อมาพบว่าน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ยับยั้งไวรัส[3] ยับยั้งแบคทีเรีย[4] ลดปวด และต้านการอักเสบได้[5] นอกจากนี้ยังมีการใช้กระทงลายเป็นสารกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทและเพิ่มการเรียนรู้ (cognitive-enhancing agent) ในกลุ่มคนพื้นเมืองกันอย่างกว้างขวางอีกด้วย มีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า หนูทดลองที่ได้รับน้ำมันกระทงลายมีการเรียนรู้ที่จะหลีกเลี่ยงต่อการถูกช็อคด้วยไฟฟ้าได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแบบทดสอบพฤติกรรมชนิด passive และ active avoidance[6,7] และการให้น้ำมันกระทงลายแบบระยะยาว (chronic) สามารถเพิ่มระดับสติปัญญาและการเรียนรู้ของเด็ก และลดระดับของ catecholamine metabolite ในสมองของกลุ่มเด็กพิการทางสมอง (retarded children) ได้[8] นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า หนูแรทที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีการเรียนรู้และความจำเพิ่มขึ้น มีระดับของ malondialdehyde ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid oxidation ลดลงในขณะเดียวกันก็มีระดับ glutathione และ catalase ในสมองเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ในการเพิ่มการเรียนรู้และยับยั้งกระบวนการ lipid oxidation ในเซลล์ประสาทได้[9] ในปี ค.ศ. 2010 มีการรายงานว่า การให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่สกัดด้วยการต้มในน้ำเดือดแก่หนูแรทยับยั้งการสูญเสียความจำจากการเหนี่ยวนำด้วย sodium nitrite ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และได้ผลใกล้เคียงกับยา piracetam ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาความจำเสื่อมในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมองของหนูแรทได้ใกล้เคียงกับยา piracetam แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายยับยั้งความจำเสื่อมได้โดยออกฤทธิ์ผ่านกลไกการทำงานของ acetylcholinesterase[10] นอกจากนั้น มีการรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) และฤทธิ์ต้านกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (anti-apoptotic) ในหลอดทดลองของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย และสามารถต้านพิษของ tertiary butyl hydroperoxide (t-BHP) ในกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ตามวิถีไมโตคอนเดีย (mitochondria pathway) โดยพบว่า การให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งการตายของเซลล์กล้ามเนื้อชนิด C2C12 ที่เกิดจาก จากการเหนี่ยวนำด้วย t-BHP ได้ โดยสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไปยับยั้งไม่ให้ mitochondria ถูกทำลาย ยังสามารถลดระดับของ malondialdehyde เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) นอกจากนี้ยังลดการแสดงออกของ Cytochrome C และ 70-kDa heat shock proteins (HSP70) ลดการทำลายดีเอนเอของเซลล์กล้ามเนื้อชนิด C2C12 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ t-BHP เพียงอย่างเดียว[11] อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบว่ามีการศึกษาผลของสารสกัดจากกระทงลายต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทในสมอง

เป็นที่ทราบกันดีว่าวิถีการมีชีวิตรอดในเซลล์ประสาทมีความจำเพาะ และเกี่ยวข้องกับสมดุลของ pro-apoptotic protein และ pro-survival protein (anti-apoptotic protein) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญสองชนิดของ B-cell lymphoma 2 family ที่ทำงานตรงข้ามกันอย่างชัดเจน มีการรายงานว่า เมื่อยับยั้ง BCL-2 และ B-cell lymphoma-extra large ซึ่งเป็น pro-survival proteins (anti-apoptotic protein) ทำให้เซลล์ประสาทเกิด apoptosis แบบกระจายทั่วสมองเป็นบริเวณกว้าง[12] ในขณะที่หากมีการยับยั้ง pro-apoptotic proteins ที่สำคัญ ได้แก่ BCL-2 Associated X-Protein จะทำให้เซลล์ประสาทมีชีวิตรอด ลดการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[13] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการแสดงออกของ apoptotic protein ได้แก่ BCL-2 (anti-apoptotic protein) และ BAX (pro-apoptotic proteins) ร่วมกับการศึกษาเนื้อเยื่อของสมองส่วน hippocampus ในหนูแรทเพศผู้

วิธีการศึกษา

1. การสกัดสารจากเมล็ดกระทงลาย

นำเมล็ดกระทงลายตากแห้งมาบดอย่างหยาบด้วยโกร่งบดยา ชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน และนำมาแช่ในตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วนกระทงลายต่อเมทานอล 1:4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (methanol extract หรือ crude extract) ทำการละลายสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ร้อยละ 0.5 ให้มีความเข้มข้น 200 มก./มล.

ปริมาตรที่ฉีดเข้าหนูแรทใช้ความเข้มข้น 80 มก./กก. น้ำหนักตัว ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ อ้างอิงจากการทดลองก่อนหน้าของ Bhagya et al ซึ่งได้ทำการศึกษา neuroprotective activity ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายโดยใช้ความเข้มข้น 50, 200, และ 400 มก./กก. เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสามารถยับยั้งความจำเสื่อมจากการเหนี่ยวนำด้วย scopolamine ได้[6] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ใช้ 100 มก./กก. ต้านฤทธิ์ของ 3-nitropropionic acid ต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทถูกทำลายในหนูแรท[14] แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ neuroprotective activity ตั้งแต่ 50 มก./กก. เป็นต้นไป งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ 80 มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งยังอยู่ในช่วงที่มีประสิทธิภาพและอาจจะเป็นการลดขนาดการใช้ยาลงได้อีกด้วย ในขณะที่กลุ่มควบคุมฉีดด้วย DMSO ร้อยละ 0.5 ปริมาตร 0.2 มล. เป็นเวลา 2 สัปดาห์เท่ากัน ซึ่งเป็นปริมาตรที่ไม่มีความเป็นพิษต่อหนูแรท[15]

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 12 ตัว จากบริษัท โนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด โดยนำมาพักและปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 7 วัน หนูแรททุกตัวถูกนำไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (ห้อง MS308) โดยมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 24 (+/-1 °C) ความชื้นที่ควบคุมอยู่ระหว่าง 55 (+/-10) และระยะเวลาการให้แสงสว่าง: ความมืด 12:12 ชั่วโมง หนูแรททุกตัวจะได้รับอาหารเม็ดและน้ำสะอาดอย่างบริบูรณ์ เปลี่ยนวัสดุรองนอนใหม่ทุก 2 วัน หรือเมื่อตรวจสอบพบว่า วัสดุรองนอนมีความชื้น หรือ สกปรก โดยวัสดุรองนอนที่ใช้ คือ ขี้เลื่อยอบแห้งปราศจากเชื้อ

แบ่งหนูแรทออกเป็น 2 กลุ่ม โดยการสุ่มอย่างง่าย (simple random assignment) เข้ากลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมด้วยวิธีจับฉลากแบบไม่คืนที่

จำนวน 2 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว แต่ละกลุ่มถูกขังไว้ในกรง กรงละ 3 ตัว กลุ่มควบควบคุมฉีดด้วย DMSO ร้อยละ 0.5 จำนวน 0.2 มล. ผ่าน intraperitoneal (i.p.) และกลุ่มทดลอง ทำการฉีดสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบบ i.p. ที่ความเข้มข้น 80 มก./กก. น้ำหนักตัว ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สังเกตอาการของหนูแรทตลอดเวลา 2 สัปดาห์ พร้อมทั้งบันทึกปริมาณการกินน้ำและอาหารของหนูแรท โดยการใช้สัตว์เป็นไปตามข้อกำหนดทางจริยธรรมที่ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ตามใบอนุญาตเลขที่ 010/2565

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาท hippocampus ด้วยการย้อมสี hematoxylin และ eosin

หลังจากให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเรียบร้อยแล้วพักหนู 5 วัน (โดยทั่วไปให้พักตั้งแต่ 2 วัน ถึง 1 สัปดาห์) รวมทั้งสิ้น 19 วัน แล้วทำการการุณฆาตด้วย CO_2 จนหนูเข้าสู่ระยะที่ 3 ของการสลบทำการเปิดกะโหลกด้านหลัง แล้วคีบเอาสมองออกมาจุ่มล้างใน phosphate buffer saline และตัดครึ่งแนว midsagittal plane เพื่อแบ่งออกเป็นสองซีกซ้ายขวาแล้วทำการตรึงสภาพด้วย formaldehyde ร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำชิ้นสมองไปผ่านขั้นตอน dehydration clearing infiltration และ embedding เพื่อฝังลงในบล็อกพาราฟิน แล้วนำมาตัดด้วยเครื่อง rotary microtome ที่ความหนา 5 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อมาละลายพาราฟินและทำการ dehydration ด้วย alcohol ก่อนทำการย้อมนิวเคลียสด้วย Mayer's hematoxylin ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำประปาไหลผ่าน และ acid alcohol แล้วจึงย้อมสีไซโตพลาสซึมด้วยสี Eosin Y ล้างสีส่วนเกินด้วยเอทิล แอลกอฮอล์และทำการ dehydration นำสไลด์ mount ด้วย Permount™ Mounting Medium แล้วศึกษา hippocampus ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

4. ศึกษาการแสดงออกของ BCL-2 ใน cerebral cortex และ hippocampus ด้วยเทคนิค immunoperoxidase

หลังจากนำสไลด์เนื้อเยื่อมาละลายพาราฟินออกเรียบร้อยแล้ว ดำเนินการทำ antigen-retrieve โดยใช้ citrate buffer ใส่ในไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที บ่มด้วย hydrogen peroxide ร้อยละ 3 ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที บ่มด้วย glycine buffer ร้อยละ 1 นาน 30 นาที เพื่อยับยั้ง nonspecific binding แล้วล้างด้วย PBST ร้อยละ 0.1 ต่อมา Blocking อีกครั้งด้วย bovine serum albumin (BSA) ร้อยละ 4 ใน PBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเททิ้งเซ็ดสไลด์ให้แห้งสนิทแล้วบ่มด้วย anti-BCL-2 mouse polyclonal antibody (1:200; abcam, USA) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST ร้อยละ 0.1 นำไปบ่มใน HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000; abcam, USA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBST ก่อนนำไปย้อมสไลด์ด้วยสี 3, 3 Diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB) 13 นาที ในที่มืดแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นย้อมสไลด์ในสารละลาย Mayer's hematoxylin 30 วินาที แล้วทำการดึงน้ำออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ นำสไลด์เนื้อเยื่อไปแช่ในสาร xylene แล้วทำการ mount ด้วย Permount™ Mounting Medium เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและนำภาพที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความเข้มของการติดสีด้วยโปรแกรม image J

5. ศึกษาการแสดงออกของ BCL-2 และ BAX ด้วยวิธี Western blot

ทำการสกัดโปรตีนโดยใช้ protease inhibitor cocktail ผสมกับ RIPA buffer อัตราส่วน 1:100 ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่มีชิ้นของ hippocampus อยู่ จากนั้นทำการย่อยโดยใช้เครื่อง homogenizer และ sonicator แล้วนำไป centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วน supernatant และทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford protein assay จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยให้ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นย้ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยเครื่อง wet blot transfer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 105 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 °C เมื่อครบเวลานำแผ่น nitrocellulose membrane มาย้อมด้วย Ponceau S ร้อยละ 0.1 เพื่อติดตามผลการย้ายโปรตีน และล้างด้วย Tris-buffer saline-tween (TBS-T) 3 ครั้ง จากนั้นทำการยับยั้ง non-specific protein บนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วย skimmed milk ร้อยละ 5 ใน TBS-T เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ก่อนที่จะนำมาบ่มด้วย anti-BCL-2 (หรือ BAX หรือ actin) mouse polyclonal antibody (1:1000; abcam, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นบ่มด้วย HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000; abcam, USA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ enhance chemiluminescent detection substrate (ECL) ลงบนแผ่น membrane แล้วปิดด้วยแผ่นพลาสติกใส เป็นเวลา 5 นาที ในที่มืด นำ x-ray film มาปะกบเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำไปจุ่มในน้ำยาล้างฟิล์ม น้ำสะอาด และหยุดปฏิกิริยาบนฟิล์มด้วย fixer ตามลำดับ ตากฟิล์มให้แห้งแล้วทำการ scan ฟิล์มที่ได้ นำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Image J

วิธีการประเมินผล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means ± SE ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลสองชุดจะถูกทดสอบด้วย t test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า $p \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA)

ผลการศึกษา

1. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการบริโภคอาหารและน้ำ และ น้ำหนักตัวของหนูแรท

จากการชั่งน้ำหนักหนูแรทด้วยเครื่องชั่ง และวัดปริมาณอาหารและน้ำที่หนูแรทกินด้วย metabolic case ที่วันที่ 1, 3, 5, 7, 9, 13, 16, และ วันที่ 19 พบว่าน้ำหนักหนูแรท ปริมาณอาหาร ปริมาณน้ำ ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ที่ปริมาณ 80 มล./กก. (ตารางที่ 1) และไม่พบการเสียชีวิตของสัตว์ทดลองตัวใดเลย แสดงให้เห็นว่าหนูแรทมีภาวะปกติตลอดการทดลอง และเป็นไปตามอัตราการเจริญเติบโตปกติของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague Dawley

ตารางที่ 1 การบริโภคอาหารและน้ำ และ น้ำหนักตัวของของหนูแรทของกลุ่มควบคุม (n = 6) และ กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (n = 6)

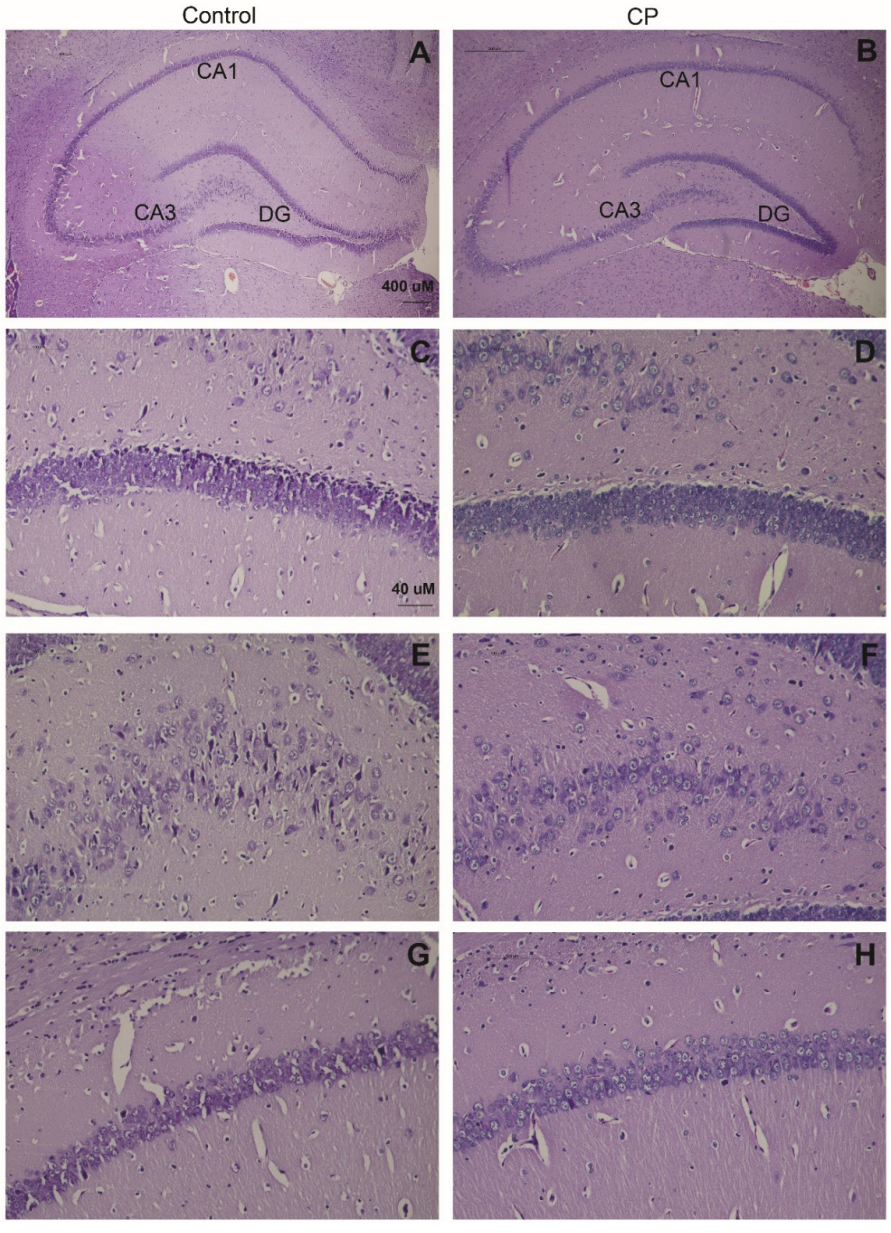
		วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9	วันที่ 13	วันที่ 16	วันที่ 19
กลุ่มควบคุม	น้ำหนัก (ก.)	92.42±2.46	109.2+3.83	118.3+1.13	132.8+1.66	154.4+2.15	171.5+2.13	197.9+2.30	237.3+2.20
	ปริมาณอาหาร (ก./วัน)	33.17±0.75	32.00±0.89	37.5±0.22	53.29±0.77	54.17±0.37	61.00±0.45	62.00±0.77	76.00±0.45
	ปริมาณน้ำ (มล./วัน)	30.00±1.49	31.67±0.74	53.34±1.49	89.7±3.73	121.2±1.86	136.7±3.73	134.2±1.86	147.5±0.37
กลุ่มที่ได้รับกระทงลาย	น้ำหนัก (ก.)	93.67±1.21	108.8±1.41	120.7±1.31	136.8±1.68	156.3±2.42	174.3±2.74	202.3±2.74	240.2±3.55
	ปริมาณอาหาร (ก./วัน)	32.17±0.75	32.00±0.89	35.5±0.44	55.59±0.77	56.17±0.37	60.00±0.45	62.00±0.77	76.00±0.45
	ปริมาณน้ำ (มล./วัน)	31.00±0.49	31.47±2.74	50.34±1.35	84.7±2.23	124.2±0.46	131.7±2.21	134.2±1.86	149.5±1.65

2. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อของ hippocampus

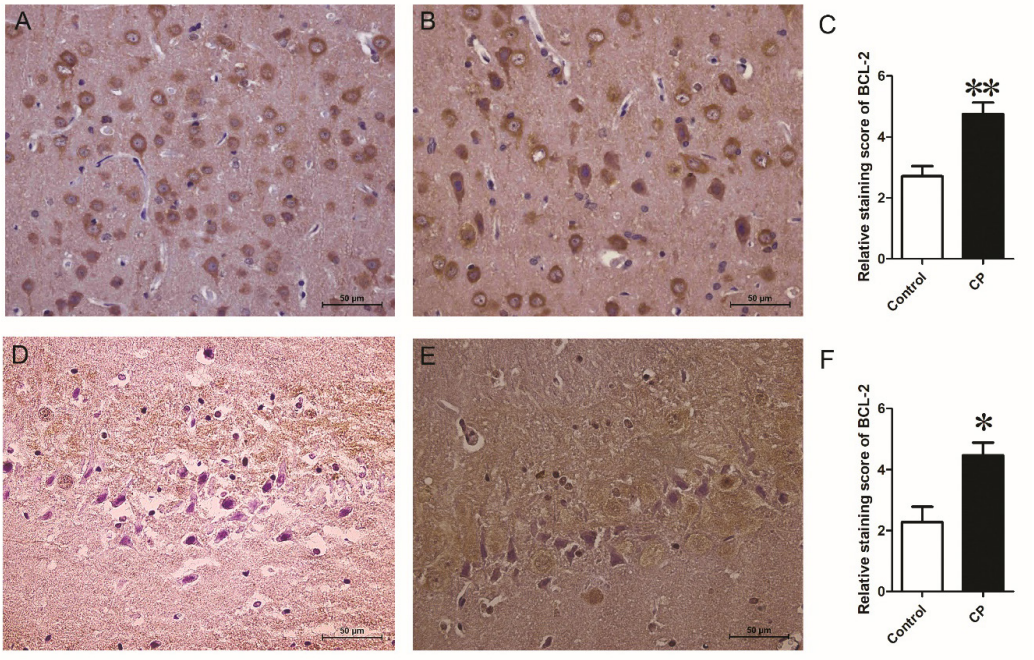
ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อของ hippocampus ได้แก่ จำนวนเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ หลังจากได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายติดต่อกัน 2 สัปดาห์ ด้วยการย้อมด้วยสี H&E ผลการทดลองพบว่ากลุ่มทดลองมีขนาดของ hippocampus จำนวนหรือปริมาณเซลล์ประสาท hippocampus การจัดเรียงตัวของเซลล์ประสาทภายใน hippocampus ทั้ง pyramidal cell ใน Cornu Ammonis 1 (CA1) และ CA3 และ granule cell ใน dentate gyrus (DG) ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมทุกบริเวณ อย่างไรก็ตามพบว่าการจัดตัวของ cell body ใน pyramidal cell ที่บริเวณ CA3 ในกลุ่มทดลองมีการวางตัวอยู่ในระนาบเดียวกัน ทำให้เป็นระเบียบมากกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มควบคุม cell body วางตัวเหลื่อมกันทำให้ไม่เป็นระเบียบ (รูปที่ 1) เป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ได้ ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

3. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 ใน cerebral cortex และ CA1 ของ hippocampus

หลังจากฉีดสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 80 มก./กก. น้ำหนักตัว ให้แก่หนูแรทเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิสในสมองส่วน cerebral cortex (A, B) และ hippocampus (C, D) ด้วยวิธี immunoperoxidase ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการติดสีของ DAB เป็นสีน้ำตาลเข้มกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งใน cerebral cortex และ hippocampus (รูปที่ 2) บ่งชี้ว่ามีการแสดงออกของ BCL-2 เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับกระทงลาย จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายส่งเสริมการมีชีวิตของเซลล์ประสาทและอาจจะยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากสารพิษได้ด้วย



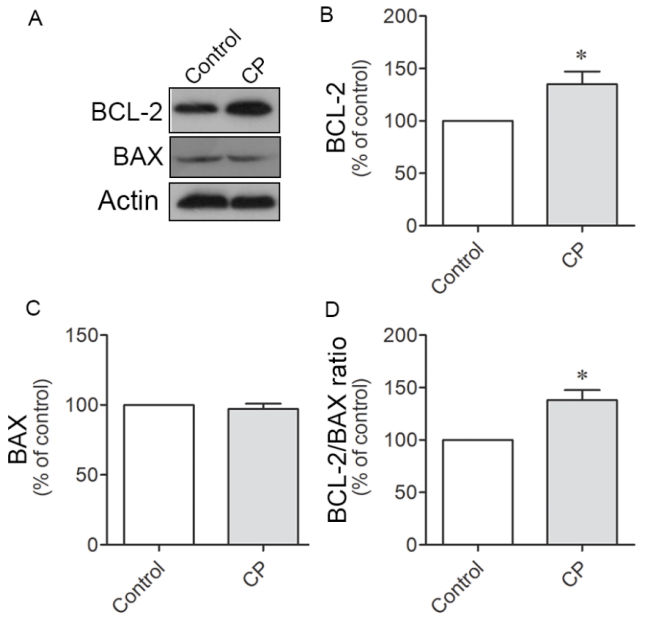
รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของสมองส่วน hippocampus จากการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ประกอบด้วยภาพกำลังขยายต่ำ (4x) ของ hippocampus ส่วนประกอบย่อยภายใน hippocampus ได้แก่ dentate gyrus (C, D) CA3 (E, F) และ CA1 (G, H) ของกลุ่มควบคุม (Control) (A, C, E, G) และกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (CP) (B, D, F, H) A-B ภาพกำลังขยาย 4 เท่า; C-H ภาพกำลังขยาย 10 เท่า



รูปที่ 2 แสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ BCL-2 ด้วยวิธี immunohistochemistry ใน cerebral cortex (A, B) และ CA1 ของ hippocampus (D, E) ของกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 80 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (B, E) และกลุ่มควบคุม (A, D) กราฟแสดงค่าความเข้มของการติดสี DAB ส่วน cerebral cortex (C) และ ส่วน hippocampus (F), ภาพกำลังขยาย 20 เท่า, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ (n = 6)

4. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อสัดส่วนการแสดงออกของ BCL-2/BAX ratio ในสมองหนูแรท

ทำการศึกษาสัดส่วนการแสดงออกของ BCL-2/BAX ratio เนื่องจาก BCL-2/BAX ratio เป็นตัวกำหนดความไว (susceptibility) ต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์ ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มทดลองมีการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มว่าการแสดงออกของโปรตีน BAX ลดลงอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทำการคำนวนสัดส่วน (ratio) ของการแสดงออกระหว่าง BCL-2 และ BAX พบว่าค่าสัดส่วนของ BCL-2/BAX ในกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) (รูปที่ 3) ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์สนับสนุนการมีชีวิตของเซลล์ประสาทจากการยับยั้งการเกิด apoptosis ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 3 แสดงการแสดงออกของโปรตีน BCL-2, BAX และ สัดส่วนของ BCL-2/BAX ด้วยวิธี Western blot ในสมองของหนูแรทกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (CP) เทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) โดยแสดงลักษณะของแถบสี (band) ของ BCL-2 BAX และ Actin (A) กราฟแสดงร้อยละของความเข้มของแถบแบน BCL-2 (B) กราฟแสดงร้อยละของความเข้มของแถบแบน BAX (C) และกราฟแสดงร้อยละของสัดส่วนความเข้มระหว่าง BCL-2 และ BAX, * $p < 0.05$, (n = 6)

วิจารณ์

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท โดยการจัดเรียงตัวของเซลล์ประสาท hippocampus ยังคงมีรูปแบบตามปกติกล่าวคือ มี cell body ของ pyramidal neuron เรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายยังมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทได้ โดยการเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม anti-apoptotic ที่สำคัญ ได้แก่ BCL-2 ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการเกิด apoptosis โดยไปยับยั้งการหลั่ง cytochrome c ออกสู่ cytosol ของเซลล์[16] ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ mitochondria outer membrane permeability มีงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า BCL-2 ยับยั้งการหลั่งของ cytochrome c ได้โดย BCL-2 ไปจับกับโปรตีน BAX เป็นการขัดขวางไม่ให้จับกับ BH3-only protein ซึ่งถ้าหากมีการจับกันจะทำให้เกิดรูหรือรูพรุนที่เซลล์เมมเบรนชั้นนอกหรือชั้นในของไมโตคอนเดรีย (pore) ของ outer mitochondrial membrane ทำให้ cytochrome c ไหลออกมาได้[17, 18] จึงเป็นที่มาของการศึกษา ratio ของ BCL-2/BAX เพื่อการบ่งชี้การยับยั้งกระบวนการ apoptosis ในสมอง[19,20] นอกจากนี้ยังพบว่า BCL-2 ช่วยเพิ่มการขับโปรตอนออกจาก mitochondria เพื่อลดการเปลี่ยนแปลง membrane potential โดยการทำงานของ BCL-2 จะถูกกระตุ้นด้วย pro-apoptotic proteins หรือการแตกตัวของโปรตีนที่เกิดจาก caspase cascade และเกิดการ phosphorylation ที่ตำแหน่ง serine หรือ threonine ของโปรตีน BCL-2 โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง Ser-70[21, 22] งานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ระบุว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายสามารถยับยั้งการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยง C2C12 murine

muscle cells โดยมีการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งยังมีปริมาณ cytochrome C ลดลง[11] อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis แบบ intrinsic pathway เช่น cytochrome C ที่บ่งชี้ถึงระยะก่อนเกิด apoptosis และโปรตีน caspase-9 และ caspase-3 ที่บ่งชี้ถึงระยะหลังเกิด apoptosis ก็ควรต้องมีการศึกษาให้ละเอียดต่อไป

ถึงแม้ว่าจะมีข้อมูลรายงานการใช้เมล็ดกระทงลายมาเป็นเวลานานแต่การศึกษาเชิงลึกถึงสารออกฤทธิ์ยังมีไม่มาก ในปี ค.ศ. 2014 มีการศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่าในสารสกัดเมล็ดกระทงลายมีสารประเภท phenolic ประกอบมากถึงร้อยละ 99.2 ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ทั่วไปในพืช มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระและลดการสร้าง reactive oxygen species (ROS)[23] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาบ่งชี้ว่าสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายน่าจะเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มแอลคาลอยด์ ได้แก่ Celastrine และ Paniculatin กลุ่มเทอพินอยด์ ได้แก่ phytol และ linalool กรดไขมัน กรดอะซิติก กรดเบนโซอิก สเตอรอล และเตตระโคซานอล ตามลักษณะทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันหอมระเหย[23,24] ต่อมาในปี ค.ศ. 2017 Borbone et al พบว่าเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters ได้แก่ dihydro-beta-agarofuran เป็นต้น[25] จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2020 มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ของเมล็ดกระทงลายด้วยวิธี column chromatography และ high-performance liquid chromatography (HPLC) ร่วมกับการยืนยันด้วย spectroscopic techniques รายงานว่าสารออกฤทธิ์ในเมล็ดกระทงลายนั้นเป็นสารใหม่ ชื่อว่า “3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one” และทำการทดสอบฤทธิ์ในการป้องป้องเซลล์ประสาท พบว่าสารนี้สามารถปกป้องเซลล์ประสาท ต้านต่อการเหนี่ยวนำความเป็นพิษด้วย ketamine ในหลอดทดลอง[26]

สรุป

ข้อมูลจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท โดยเฉพาะในลักษณะของรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ส่งเสริมการมีชีวิตของเซลล์ประสาท ต้านต่อการเกิด apoptosis ผ่านการเพิ่มสัดส่วนการแสดงออกของโปรตีน BCL-2/BAX ดังนั้นสารสะกัดจากเมล็ดกระทงลายจึงน่าจะเป็นหนึ่งในสมุนไพรที่มีโอกาสก้าวหน้า ที่ใช้บำรุงประสาทได้โดยไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์

Competing interest ผู้เขียนทุกท่านไม่มีทัศนติหรือความเห็นที่ขัดแย้งกันในงานวิจัยชิ้นนี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2562 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา16/2562 และ ววน. 47/2565 ประจำปีงบประมาณ 2565 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และเงินอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ส่วนงานคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา AHS04/2565

เอกสารอ้างอิง

1. นิจศิริ เรืองรังษี, ธวัชชัย มังคละคุปต์ “กระทงลาย (Krathong Lai)” หนังสือสมุนไพรไทย เล่ม 1. หน้า 27.
2. Vaidyaratnam PSV. Indian Medicinal Plants: a compendium of 500 species, Orient Longman Ltd., Anna Salai, Madras, India, 1994; 2: 47–51.
3. Bhakuni DS, Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Mehrotra BN. Screening of Indian plants for biological activity. II Indian J Exp Biol. 1969; 7: 250–62.
4. Patel RP, Trivedi BM. The *in vitro* antibacterial activity of some medicinal oils. Indian J Med Res. 1962; 50: 218–22.
5. Ahmad F, Khan RA, Rasheed S. Preliminary screening of methanolic extracts of *Celastrus paniculatus* and *Tecomella undulata* for analgesic and anti-inflammatory activities. J Ethnopharmacol. 1994; 42: 193–8.
6. Bhagya V, Christofer T, Rao BSS. Neuroprotective effect of *Celastrus pani*culatus on chronic stress-induced cognitive impairment. Indian J Pharmacol. 2016; 48: 687–93.
7. Karanth KS, Padma TK, Gunasundari MN. Influence of Celastrus oil on learning and memory. Arogya (Manipal). 1981; 7: 83-6.
8. Nalini K, Aroor AR, Kumar Rao A. Studies on biogenic amines and their metabolites in mentally retarded children on Celastrus oil therapy. Alternat Med. 1986; 1: 355–60.
9. Kumar MHV, Gupta YK. Antioxidant property of *Celastrus paniculatus* willd.: a possible mechanism in enhancing cognition. Phytomedicine. 2002; 9: 302–11.
10. Bhanumathy M, Harish MS, Shivaprasad HN, Sushma G. Nootropic activity of *Celastrus paniculatus* seed. Pharm Biol. 2010; 48: 324–7.
11. Kumar KH, Venuprasad MP, Jayashree GV, Rachitha P, Krupashree K, Pal A, Khanum F. *Celastrus paniculatus* Willd. mitigates t-BHP induced oxidative and apoptotic damage in C2C12 murine muscle cells. Cytotechnology. 2015; 67: 955–67.
12. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. Science. 1995; 267: 1506–10.
13. Shindler KS, Latham CB, Roth KA. Bax deficiency prevents the increased cell death of immature neurons in bcl-x-deficient mice. J Neurosci. 1997; 17: 3112–9.
14. Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 6939–42.
15. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. FEBS J. 2018; 285: 416–31.

16. Gautier F, Guillemin Y, Cartron PF, Gallenne T, Cauquil N, Le Diguarher T, Casara P, Vallette FM, Manon S, Hickman JA, Geneste O, Juin P. Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. Mol Cell Biol. 2011; 31: 832–44.
17. Mao W, Yi X, Qin J, Tian M, Jin G. CXCL12 inhibits cortical neuron apoptosis by increasing the ratio of Bcl-2/Bax after traumatic brain injury. Int J Neurosci. 2014; 124: 281–90.
18. Bang S, Baek JY, Kim GJ, Kim J, Kim S, Deyrup ST, Choi H, Kang KS, Shim SH. Azaphilones from an Endophytic Penicillium sp. Prevent Neuronal Cell Death via Inhibition of MAPKs and Reduction of Bax/Bcl-2 Ratio. J Nat Prod. 2021; 84: 2226–37.
19. Ke D, Yu Y, Li C, Han J, Xu J. Phosphorylation of BCL2 at the Ser70 site mediates RANKL-induced osteoclast precursor autophagy and osteoclastogenesis. Mol Med. 2022; 28: 22.
20. Cheung ZH, Gong K, Ip NY. Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2. J Neurosci. 2008; 28: 4872–7.
21. Arora N, Pandey-Rai S. GC–MS analysis of the essential oil of *Celastrus paniculatus* Willd. seeds and antioxidant, anti-inflammatory study of its various solvent extracts. Industrial crops and products. 2014; 61: 345–51.
22. Arya A, Kaushik D, Almeer R, Bungau SG, Sayed AA, Abdel-Daim MM, Bhatia S, Mittal V. Application of Green Technologies in Design-Based Extraction of *Celastrus paniculatus* (Jyotishmati) Seeds, SEM, GC-MS Analysis, and Evaluation for Memory Enhancing Potential. Front Nutr. 2022; 9: 871183.
23. Borbone N, Borrelli F, Montesano D, Izzo AA, Marino SD, Capasso R, Zollo F. Identification of a new sesquiterpene polyol ester from *Celastrus paniculatus*. Planta Med. 2007; 73: 792–4.
24. Malik J, Karan M, Dogra R. Ameliorating effect of *Celastrus paniculatus* standardized extract and its fractions on 3-nitropropionic acid induced neuronal damage in rats: possible antioxidant mechanism. Pharm Biol. 2017; 55: 980-90.
25. Kelava T, Avar I, Clulo F. Biological actions of drug solvents. Periodicum Biologorum. 2011; 3: 311–20.
26. Chintha V, Wudayagiri R. Isolation and neuroprotective prospective of novel bioactive compound "3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one" against ketamine-induced cognitive deficits in schizophrenia: an experimental study. Natural Product Research. 2021; 36: 1-6.