

Thao-en On(*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) the herbal medicine for osteoarthritis

Adisak Thomudtha^{*}, Pariya Thomudtha,

Maharakham Hospital, Mueang District, Maha Sarakham 44000, Thailand.

*Corresponding author: adisakrx15@hotmail.com

Abstract

Thao-en On (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) is widely used in folk medicine in Southeast Asia for treating muscle tension and arthritis. This study aims to inform academic information in the case of complete development this herbal medicine. By searching academic database in the term of Ethnopharmacology, Phytochemistry, Preclinical and Clinical study. A preclinical study demonstrates that *Crptolepis buchanani* extract significantly reduced acetic acid-induced writhing response. It also inhibited edema formation in both EPP-induced ear edema and carrageenan-induced paw edema models. In cartilage explant culture, *Crptolepis buchanani* extract significantly reduced the sulfated glycosaminoglycan and hyaluronan released into culture media while it reserved the uronic acid and collagen within the cartilage tissues. It also suppressed the matrix metalloproteinase-2 activity with no effect on cell viability. A clinical study *Crptolepis buchanani* oil demonstrate comparable to 1% indomethacin solution in a four-week treatment of patients with mild to moderate osteoarthritis of the knee. In conclusion, *Crptolepis buchanani* extract shows analgesic, anti-inflammatory, and chondroprotective effect, *Crptolepis buchanani* oil was effective as indomethacin solution for the symptomatic treatment of osteoarthritis of the knee.

Keywords: *Crptolepis buchanani*, Anti-inflammatory, Chondroprotective effect, Osteoarthritis

เถาเอ็นอ่อนสมุนไพรสู่การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม

อดิศักดิ์ ฤมอดุทา*, ปริญา ฤมอดุทา

โรงพยาบาลมหาสารคาม ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

*ผู้ประสานงานหลัก: adisakrx15@hotmail.com

Abstract

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อรักษาอาการอักเสบของโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชี้ให้เห็นถึงข้อมูลวิชาการในประเด็นการพัฒนาสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนแบบครบวงจร โดยทำการสืบค้นจากฐานข้อมูลวิชาการในหัวข้อ พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน พฤกษเคมี การศึกษาทางด้านพรีคลินิกและการทดลองทางคลินิก ผลการศึกษาทางด้านพรีคลินิกพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนสามารถลดการบิดตัวโดยใช้กรดเซติกเหนียวในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการอักเสบในโมเดลการใช้สารเอทิล ฟีนิลโพรพิโอเนตเหนียวในการเกิดหูกอักเสบและการใช้สารคาราจีแนนเหนียวในการเกิดอุ้งเท้าอักเสบในหนูทดลอง การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนสามารถลดการปลดปล่อยสารซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคนและไฮยาโรแนนในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เมทิลโลโปรตีเอส-2 โดยไม่มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาทางคลินิกจากยาน้ำมันเถาเอ็นอ่อนในการรักษาข้อเข่าเสื่อมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่มีภาวะโรคในระดับรุนแรงน้อยถึงปานกลาง พบว่ามีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจาก 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน สรุปได้ว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ลดปวด ต้านการอักเสบและคอนโทรลโรคที่ฟ ยาน้ำมันเถาเอ็นอ่อนมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างอินโดเมทาซิน โขลุขุ่น ในการรักษาข้อเข่าเสื่อม

คำสำคัญ: เถาเอ็นอ่อน, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์คอนโทรลโรคที่ฟ, ข้อเข่าเสื่อม

บทนำ

ในปัจจุบันกระแสความนิยมในการใช้สมุนไพรในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในสวน ภาครัฐได้มีการกำหนดนโยบายที่สำคัญเช่น แผนแม่บทแห่งชาติด้านสมุนไพร โครงการเมืองสมุนไพร เพื่อให้เกิดการพัฒนาสมุนไพรครบวงจร จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีคุณภาพ มีการศึกษาวิจัย ถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร เพื่อให้เกิดความมั่นใจของประชาชน รวมถึงบุคลากรทางการแพทย์ สมุนไพรจึงถือได้ว่าเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการขับเคลื่อนสู่การพัฒนาให้ได้ ยาจากสมุนไพรเพื่อการรักษาโรคต่างๆ ในการพึ่งพาตนเองของประเทศด้านสุขภาพในอนาคต การศึกษา ทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านถือได้ว่าเป็นประตูในการค้นพบนำไปสู่การพัฒนาจากสมุนไพรอย่างครบ วงจร เถาเอ็นอ่อนคืออีกหนึ่งตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนของการพัฒนาจากสมุนไพรครบวงจรในประเทศไทย ตั้งแต่การค้นพบจนถึงได้ผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรที่ผ่านการวิจัยทางคลินิก และสมุนไพรชนิดนี้ได้ถูก ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2556⁽¹⁾ ให้เป็นเป็นยาสามัญประจำบ้าน ในหมวดยากษัย เส้นหรือยาบรรเทาอาการปวดเมื่อย (ยาสำหรับใช้ภายนอก)

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) วงศ์ Asclepiadaceae มีลักษณะเป็น ไม้เลื้อยถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงใน ประเทศไทย ในการรักษาอาการอักเสบของโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อเป็นส่วนใหญ่⁽²⁾ ล่าสุดมีการ ศึกษาวิจัยทางคลินิกพบว่าสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนมีประสิทธิภาพในการรักษาอาการข้อเข่าเสื่อม (Knee osteoarthritis) ไม่ได้ด้อยไปกว่าวิธีการรักษาที่เป็นมาตรฐาน⁽³⁾(Standard treatment) ซึ่งบทความนี้จะได้ กล่าวถึงสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนโดยละเอียด ตั้งแต่การค้นพบจากองค์ความรู้ทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnopharmacology) ซึ่งเป็นประตูสำคัญสู่การค้นพบข้อมูลเบื้องต้นสำหรับรักษาอาการปวดกระดูก และกล้ามเนื้อตลอดจนลักษณะโดยทั่วไปของสมุนไพรชนิดนี้ การศึกษาทางด้านพฤกษเคมี (Phytochemistry) จะทำให้ทราบองค์ประกอบของสารชีวเคมีที่มีฤทธิ์ทางยา การศึกษาทางด้านพรีคลินิก ในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (In-vitro and In-vivo study) จะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพในการมี ฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษทั้งเฉียบพลันและเรื้อรังเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในความเป็นไปได้ ของการศึกษาทางคลินิก การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเถาเอ็นอ่อน (Formulation development) ให้ ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาตลอดจนเพิ่มความสะดวกและความร่วมมือในการใช้ผลิตภัณฑ์ ในผู้ป่วย และทำการศึกษาวิจัยทางคลินิกในการยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการรักษา (Clinical study) เพื่อให้บุคลากรทางการแพทย์และประชาชนมีความมั่นใจในการใช้ผลิตภัณฑ์ ซึ่ง กระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นทุกข้อถือได้ว่าเป็นหัวใจของการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรให้ เกิดความยั่งยืน เป็นไปตามเจตจำนงมุ่งหมายของรัฐบาลที่ต้องการให้สมุนไพรไทยเป็นที่ นิยม ประชาชน รู้จัก เชื่อมั่น ชอบและใช้การแพทย์แผนไทยและสมุนไพร

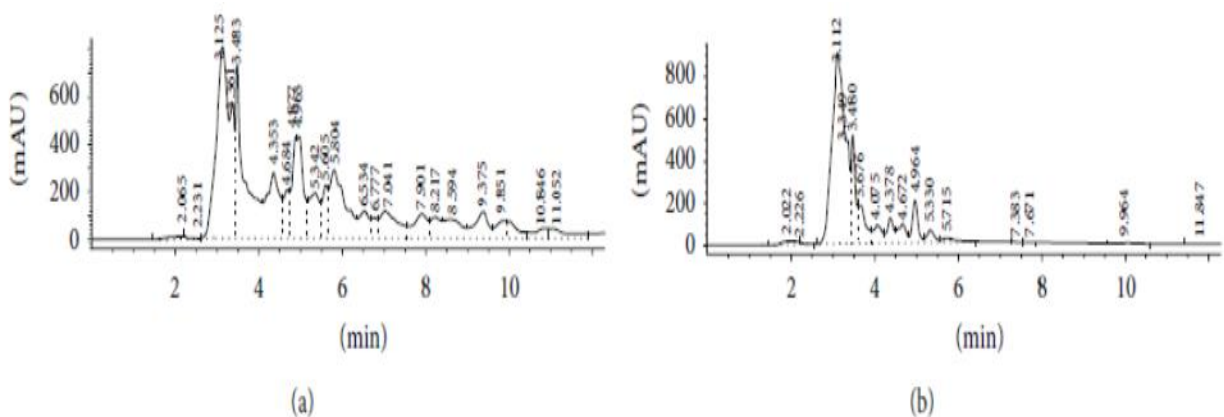
พฤกษศาสตร์พื้นบ้านเถาเอ็นอ่อนประตุสู่การรักษาข้อเข่าเสื่อม

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) พบในป่าไม้เขตร้อน ในหลายๆ ประเทศ ได้แก่ จีน อินเดีย ไทยและประเทศในแถบอินโดจีน่า ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงในประเทศไทย ในการรักษาอาการอักเสบของโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อเป็นส่วนใหญ่⁽²⁾ ในอายุรเวทอินเดีย ถูกนำมาใช้ในการรักษากล้ามเนื้ออักเสบ ไอ ท้องเสีย รักษาแผล⁽⁴⁾ และยังเป็นองค์ประกอบในตำรับยารักษาอัมพฤกอัมพาต พบว่าส่วนลำต้นถูกนำมาใช้ในการคลายกล้ามเนื้อ รักษาเส้นเอ็นตึง และข้ออักเสบ⁽⁵⁾ ส่วนใบนำมาตำพอกประคบบริเวณกล้ามเนื้อและข้อที่มีการอักเสบ⁽⁶⁾ โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่สำคัญคือ ลำต้นเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง เลื้อยพัน มีน้ำยางขาว ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่หรือรูปไข่กลับ กว้าง 3 - 8 เซนติเมตร ยาว 5 - 18 เซนติเมตร ดอกมีลักษณะเป็นช่อ ออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีเหลืองอ่อน ผลแห้ง แตกได้ รูปไข่กลมใบหอก เมล็ดมีสีน้ำตาลมีขนสีขาว⁽⁷⁾

พฤกษเคมีเถาเอ็นอ่อนและการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น (Phytochemistry and Bioassays)

การศึกษาทางด้านพฤกษเคมีของสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนมีวัตถุประสงค์หลักๆ ในการค้นหาสารชีวเคมีกลุ่มเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นการยืนยันการค้นพบทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านที่มีการใช้แบบดั้งเดิมผ่านองค์ความรู้ที่สั่งสมกันมา ชำนาญของชาวบ้านในการนำสมุนไพรนี้มาใช้รักษาอาการอักเสบของโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ

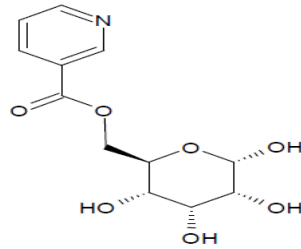
ผงแห้งส่วน Stem ของเถาเอ็นอ่อนถูกนำมาสกัดโดยกระบวนการไหลผ่าน (Percolated) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย หลังจากนั้นจะนำมากรองและทำให้แห้งโดยวิธีฟรีซดราย (Freeze dried) จนได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) จากนั้นนำเข้ากระบวนการเพื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์เอชพีแอลซี (HPLC fingerprint) ในการทำเป็นสัญลักษณ์(Marker) เพื่อเป็นมาตรฐานการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification) ของสารสกัดเถาเอ็นอ่อนต่อไป⁽⁸⁾



รูปที่ 1 ลายพิมพ์เอชพีแอลซี สารสกัดเถาเอ็นอ่อน ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (a) และ 320 นาโนเมตร (b) ตามลำดับ⁽⁸⁾

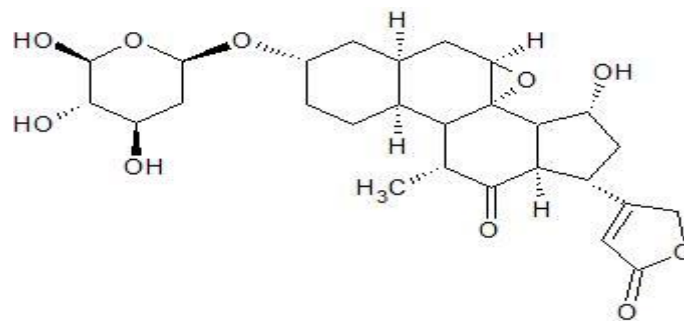
มีการค้นพบสารคลิโปโตเลเปน (Cryptolepin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากยางของเถาเอ็นอ่อน เป็นสารในกลุ่มไกลโคซิเลตเตด เซอร์รีน โปรตีเอส (Glycosylated serine protease) จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นมีคุณสมบัติ คาสิโนไลติก (Caseinolytic activity) ในการยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด⁽⁴⁾ ในอนาคตอาจมีการนำสารนี้ไปพัฒนาเป็นยากลุ่มต้านการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant)

มีการค้นพบสารบูชานานีน (Buchananine) ซึ่งแยกสกัดได้จากส่วนแก่นของเถาเอ็นอ่อน เป็นสารประเภทไพรีดีนอัลคาลอยด์⁽⁹⁾ (Pyridine Alkaloid) ซึ่งต้องทำการศึกษาเพื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อไป



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของบูชานานีน จากแก่นเถาเอ็นอ่อน⁽¹⁰⁾

อีกการศึกษาพบสารคลิโปโตซิน (Cryptosin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคาร์ดิโนไลด์ (Cardenolide) มีโครงสร้างเป็นแบบ สเตียรอยด์ไกลโคไซด์ (Steroidal glycoside) สารนี้สกัดได้จากส่วนใบเถาเอ็นอ่อน จากการทดลองในการกระตุ้นหัวใจของสุนัขในโมเดลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบบเอกซ์ วิโว (Ex vivo) พบว่าสารคาร์ดิโนไลด์ (Cardenolide) มีคุณสมบัติเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจได้ดี⁽¹¹⁾ (Potent positive inotropic agent) ซึ่งเป็นไปได้ว่าอนาคตเราอาจจะได้เห็นสารนี้ถูกพัฒนาเป็นยาสำหรับผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลว (Congestive heart failure)

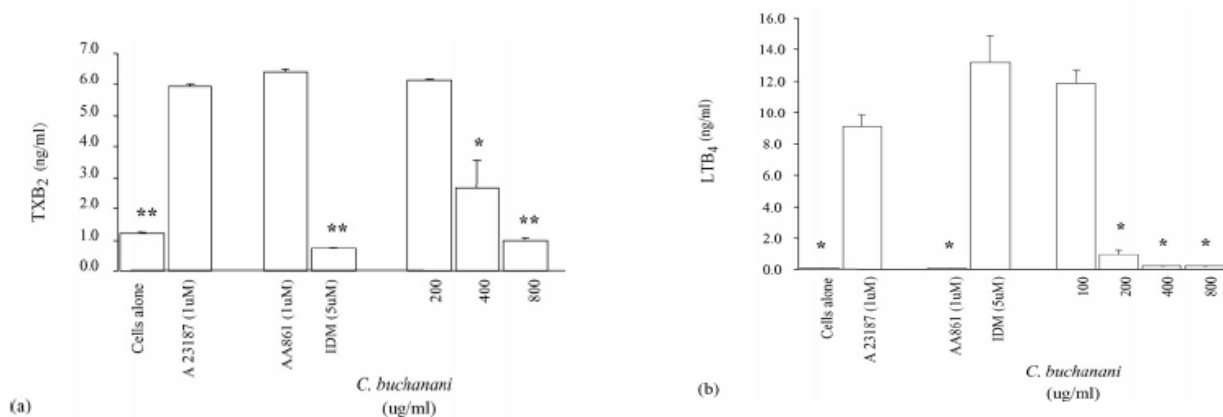


รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของคลิโปโตซิน จากใบเถาเอ็นอ่อน⁽¹²⁾

ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเพื่อหาสารที่เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (Biological marker) สำหรับเถาเอ็นอ่อนอันจะทำให้ทราบถึงกลไกในการออกฤทธิ์แก้ปวด (Mechanism of action) รวมถึงการใช้เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Quality control) ที่จะทำการผลิตในอนาคต

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน⁽¹³⁾

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบของเถาเอ็นอ่อนในหลอดทดลอง โดยใช้สารสกัดจากแก่นเถาเอ็นอ่อนในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับรูปแบบการศึกษามาตรฐาน ที่ถูกนำมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ 2 แบบ คือ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute inflammatory activity) รูปแบบที่ใช้ในการทดสอบคือการใช้แคลเซียม ไอโอโนฟอร์ เอ 23187 กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดลิวโคไซต์ในหลอดทดลอง (In vitro calcium ionophore A 23187 stimulated rat leukocyte model) และการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเรื้อรัง (Chronic inflammatory activity) รูปแบบที่ใช้ในการทดสอบคือการใช้สารแอลพีเอสกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (In vitro LPS-stimulated monocytes) พบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองดังภาพข้างล่าง



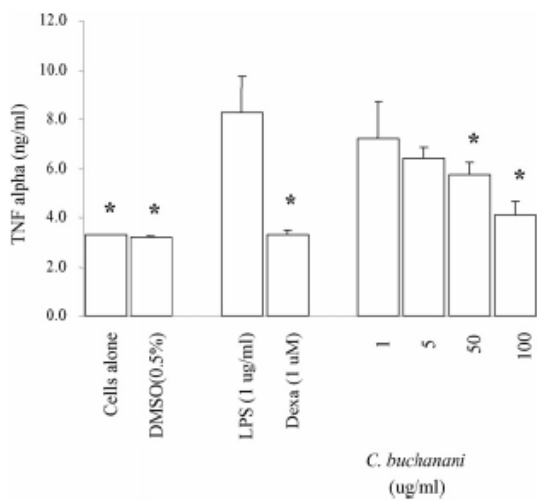
รูปที่ 4 แสดงการยับยั้งสาร thromboxane B₂ และ leukotriene B₄ ของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน ในขนาดความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบโดยวิธีการใช้แคลเซียม ไอโอโนฟอร์ เอ 23187 กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดลิวโคไซต์ในหลอดทดลอง เป็นรูปแบบที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งกระบวนการอักเสบ โดยทำการฉีดสารออสเตอร์ ไกลโคเจน ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (Oyster glycogen) เข้าทางช่องท้องของหลอดทดลอง ให้เกิดกระบวนการกระตุ้นเซลล์ลิวโคไซต์ (Leukocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบให้เพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นจะทำการแยกลิวโคไซต์ มาเพาะเลี้ยงและคัดแยกในหลอดทดลองจนได้พอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ นิวโทรฟิล ลิวโคไซต์ (Polymorphonuclear Neutrophils Leukocytes, (PMNs)) ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบโดยการเติมสารแคลเซียม ไอโอโนฟอร์ เอ 23187 ลงในพอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ นิวโทรฟิล ลิวโคไซต์ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบ จากรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสารอ้างอิงมาตรฐาน (Reference standard) ที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (Cyclooxygenase) คืออินโดเมทาซิน (Indomethacin, (IDM))

และสารเอเอ 861 (AA861) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ 5-ไลพอกซีจีเนส (5-Lipoxygenase) สามารถยับยั้งสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบทั้งสารทรมอบรอกเซน บี 2 และ ลิวโคไตรอีน บี 4 ในวิถีไซโคลออกซีจีเนส (Cyclooxygenase pathway) และวิถี 5-ไลพอกซีจีเนส (5-Lipoxygenase pathway) ตามลำดับ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$ และ $P \leq 0.001$ ตามลำดับ) โดยการยับยั้งจะแปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (Dose dependent)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเรื้อรัง (Chronic inflammatory activity) โดยการใช้สารแอลพีเอสกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบเรื้อรัง สามารถสรุปผลการทดลองได้ตามภาพข้างล่าง

รูปที่ 5 ผลของสารสกัดเถาเอ็นอ่อนในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์จากการทดสอบการสร้างสารทีเอ็นเอฟ -แอลฟา (TNF- α production)



การใช้สารแอลพีเอสกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ เป็นโมเดลที่ใช้ในการศึกษาเพื่อทดสอบการยับยั้งการสร้างสารทีเอ็นเอฟ-แอลฟา จากเซลล์โมโนไซต์ ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ จากการทดลองพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการยับยั้งขบวนการสร้างสารทีเอ็นเอฟ-แอลฟา จากโมโนไซต์เซลล์ไลน์ (Monocyte cell line, (THP-1 cell)) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่

ความเข้มข้นของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยทำการเปรียบเทียบกับสารอ้างอิงมาตรฐานเดกซาเมทาโซนความเข้มข้น 1 ไมโครโมล (Dexamethasone 1 μ M) และสารดีเอ็มเอสโอ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (DMSO) เป็นสารเปรียบเทียบ⁽¹³⁾

การทดสอบฤทธิ์คอนโดโรโพรเทคทีฟ (Chondroprotective activities) ในหลอดทดลองของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน⁽⁸⁾

การทดสอบฤทธิ์คอนโดโรโพรเทคทีฟ ถือได้ว่าเป็นการทดสอบที่น่าสนใจในการนำสมุนไพเถาเอ็นอ่อนมาใช้ในการรักษาข้ออักเสบเนื่องจากการบ่งบอกถึงความสามารถในการป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งเป็นการยืนยันประสิทธิภาพตามองค์ความรู้พิษวิทยาพื้นบ้าน โดยใช้สารสกัดจากแก่นของเถาเอ็นอ่อนในเมทานอล (Methanol extract of *C. buchanani*, (CBE)) สำหรับรูปแบบการทดลองเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์คอนโดโรโพรเทคทีฟ สามารถสรุปได้ตามตาราง

ตารางที่ 1 การทดสอบฤทธิ์คอนโทรลโพรเทคทีฟ ในรูปแบบการศึกษาต่างๆของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน

รูปแบบการศึกษาในหลอดทดลอง	ผลการศึกษา
การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cartilage Explant Culture)	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการปลดปล่อยสารซัลเฟต ไกลโคซามิโนไกลแคน (sulfated glycosaminoglycan,(s-GaG)) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการกระตุ้นการอักเสบโดยสารรีคอมบิแนน ฮูแมน อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Recombinant human interleukin-1 β) บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ และ $P\leq 0.01$ ตามลำดับ)
การยับยั้งแบบแข่งขัน อิไลซ่า สำหรับสารไฮยาลูโรแนน (A competitive Inhibition-Based ELISA for Hyaluronan,(HA))	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการปลดปล่อยสาร ไฮยาลูโรแนน (Hyaluronan,(HA)) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการกระตุ้นการอักเสบโดยสารรีคอมบิแนน ฮูแมน อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า(Recombinant human interleukin-1 β) บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ และ $P\leq 0.001$ ตามลำดับ)
การวิเคราะห์กรดยูโรนิค (Uronic Acid Assay)	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการกระบวนการสร้างกรดยูโรนิค ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการกระตุ้นการอักเสบโดยสารรีคอมบิแนน ฮูแมน อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Recombinant human interleukin-1 β) บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
การวัดปริมาณคอลลาเจนโดยใช้สาร ไฮดรอกซีโพรลีน (Collagen Content Measured by Hydroxyproline, (HPR))	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำลายคอลลาเจน ที่เกิดจากกระบวนการกระตุ้นการอักเสบโดยสารรีคอมบิแนน ฮูแมน อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Recombinant human interleukin-1 β) บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
เจลาติน ไซโมกราฟี (Gelatin Zymography)	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์เอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส-2 (Matrix metalloproteinase-2, (MMP-2)) เอนไซม์นี้สามารถย่อยทำลายเจลาติน (Gelatin) และ คอลลาเจนชนิดที่ 4 (Collagen type IV) ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในกระดูกอ่อน (Cartilage) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน^(8,13)

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์คอนโดโรโพรเทคทิฟ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษามีศักยภาพในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปนั่นก็คือการศึกษาในสัตว์ทดลอง ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองสามารถสรุปได้ตามตารางตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง ในรูปแบบการศึกษาต่างๆของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน

รูปแบบการศึกษาในสัตว์ทดลอง	ผลการศึกษา
การใช้กรดอะซิติกเหนี่ยวนำการบิตัวในหนูทดลอง(Acetic Acid-Induced Writing Response in Mice)	พบว่าการใช้ CBE ในขนาด 60 125 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลองสามารถลดจำนวนครั้งของการบิตัวของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
การใช้สารเอทิล ฟีนิลโพรพิโอเนต เหนี่ยวนำการเกิดหูอักเสบในหนูทดลอง (Ethy Phenylpropiolate- (EEP-) Induced Ear Edema in Rats)	พบว่าการใช้ CBE ในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหยอดลงในช่องหูและทาที่บริเวณหูส่วนนอก สามารถลดการอักเสบในช่องหูและหูส่วนนอก ที่เกิดจากการกระตุ้นของสาร EEP-ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
การใช้สารคาราจีแนนเหนี่ยวนำการเกิดอุ้งเท้าอักเสบในหนูทดลอง (Carrageenan-Induced Hind Paw Edema in Rats)	การใช้ CBE ในขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลอง ก่อนการฉีดสารกระตุ้นการอักเสบคาราจีแนน (carrageenan) บริเวณอุ้งเท้าของหนูทดลอง 30 นาที ทำการวัดผลการลดการอักเสบที่เวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่า CBE สามารถลดขนาดการอักเสบบริเวณหลังเท้า (hind paw edema) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
การใช้คอตตอนทริดเหนี่ยวนำการเกิดเนื้อเยื่อแกรนูโลมาตัสในหนูทดลอง (Cotton thread-induced granulation tissue in rats) ⁽¹³⁾	เป็นการศึกษาเพื่อทดสอบการยับยั้งเนื้อเยื่อแกรนูโลมาตัส (Granulomatous tissue) ภายหลังการฝังคอตตอนทริด (Cotton tread) บริเวณด้านหลังของหนูทดลอง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า สารสกัด CBE สามารถลดขนาดของเนื้อเยื่อแกรนูโลมาตัส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมทางการรับประทาน และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้อง ($P \leq 0.05$ และ $P \leq 0.001$ ตามลำดับ)

การทดสอบพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ในสัตว์ทดลองของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน

การทดสอบพิษเฉียบพลัน ของสารสกัดจากแก่นเถาเอ็นอ่อนใน 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอล โดยให้หนูทดลองได้รับสารสกัดเถาเอ็นอ่อนในขนาดถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สมมูลกับผงแห้งเถาเอ็นอ่อน 12 กรัมต่อกิโลกรัม) ผลการทดลองพบว่าไม่มีหนูทดลองตัวใดมีพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้นภายหลังให้สารสกัดเป็นเวลา 7 วัน และไม่มีหนูตัวใดเสียชีวิตเลย ในทางตรงข้ามการให้สารสกัดเถาเอ็นอ่อน ฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่าหนูทดลองมีอาการแพ้ทุกตัวภายหลัง 2 ชั่วโมงของการได้รับสารสกัดและมีหนูทดลองเสียชีวิต 2 และ 6 ตัว จากการได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าทางช่องท้องตามลำดับ ทำให้ประมาณค่า LD₅₀ เท่ากับ 900 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสมมูลกับผงแห้งเถาเอ็นอ่อน 12 กรัมต่อกิโลกรัม จากการเปรียบเทียบกับแผนภูมิระดับความสามารถของความเป็นพิษ (Toxicity-rating chart) สารสกัดนี้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มไม่เป็นพิษสำหรับรับประทาน⁽¹³⁾ (Non-toxic substance)

เถาเอ็นอ่อนกับการทดสอบทางคลินิก (Clinical study)

โรคข้อเข่าเสื่อม (Osteoarthritis of knee) คือโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเสื่อมของข้อเข่าตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในโรคนี้ คือที่กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular cartilage) ในข้อชนิดที่มีเยื่อหุ้ม (Diarthrodial joint) โดยพบการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งเกิดขึ้นอย่างช้าๆ อย่างต่อเนื่องตามเวลาที่ผ่านไป กระดูกอ่อนผิวข้อมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (Biochemical) ชีวกลศาสตร์ (Biomechanical) และโครงสร้าง (Biomorphology)⁽¹⁴⁾ ได้มีการพัฒนาสูตรตำรับในรูปแบบน้ำมันสำหรับใช้ภายนอกจากเถาเอ็นอ่อน (*C. buchanani* oil formulation, CBO) และได้มีการทดลองทางคลินิกในการวัดประสิทธิผลและความปลอดภัยของยา CBO ในผู้ป่วยข้อเข่าอักเสบ (Osteoarthritis of the knee) เมื่อเทียบกับการรักษามาตรฐานด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โซลูชัน (indomethacin solution) โดยทำการศึกษารandomized double-blind active-controlled trial) เพื่อยืนยันการมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ประสิทธิภาพในการรักษาอาการข้อเข่าเสื่อม และความปลอดภัย จากข้อมูลทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านและพฤกษเคมีรวมถึงการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองก่อนหน้า โดยทำการศึกษาเพื่อวัดและประเมินประสิทธิภาพของ CBO ในด้าน วิชวลอนาล็อกสเกลสำหรับวัดระดับอาการปวด (Visual analogue scale of pain (VAS of Pain)) วิชวลอนาล็อกสเกลสำหรับวัดระดับความแข็งเกร็งของข้อเข่า (Visual analogue scale of stiffness, (VAS of stiffness)) ค่าคะแนนดัชนีฟังก์ชันลีเคนส์ (Lequesne's functional index, (scores)) และระยะเวลาในการขึ้นบันได 10 ขั้น (วินาที) (Time taken to climb up 10 steps, (s)) ทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้รับ 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โซลูชัน จำนวน 83 คน กลุ่มที่ 2 ได้รับยา CBO จำนวน 86 คน จากการศึกษพบว่า CBO มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจาก 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โซลูชัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการประเมินข้างต้นทั้ง 4 ด้าน⁽³⁾ ($P \leq 0.05$)

นอกจากนี้ยังพบว่ามี การลดลงของค่าเฉลี่ยวิซวลอนาล็อกสเกลสำหรับวัดระดับความแข็งแรงของข้อเข่า เมื่อเทียบกับค่าตั้งต้น (Base line) สัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่มที่ได้รับ 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โขลุขุ่น ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับ CBO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽³⁾ ($P \leq 0.05$)

ในด้านความปลอดภัยพบว่าการใช้ CBO มีอัตราการเกิดผลข้างเคียงที่พบบ่อยได้แก่อาการคัน (Pruritus) ผื่นแดง (Rash Reddening) และ อาการแสบร้อน (Burning) ภายหลังจากการใช้ต่ำกว่ายา 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โขลุขุ่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽³⁾ ($P \leq 0.05$)

สรุปและวิจารณ์

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) วงศ์ Asclepiadaceae มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาอาการอักเสบของโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อเป็นส่วนใหญ่ ถือได้ว่าสมุนไพรชนิดนี้มีศักยภาพในการพัฒนาวิจัยต่อยอดเนื่องจากมีข้อมูลจากองค์ความรู้ทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน รวมถึงมีงานวิจัยทางด้านพฤกษเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นที่ยืนยันผลการรักษาทางด้านอาการปวดเมื่อยระบบกระดูกและกล้ามเนื้อจากองค์ความรู้ดั้งเดิม รวมถึงการสกัดและแยกสารสำคัญจากสมุนไพรเถาเอ็นอ่อน เช่น คลิปโตเลเพน (Cryptolepain) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด คลิปโตซิน (Cryptosin) ที่มีฤทธิ์กระตุ้นเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจ นอกจากนี้ยังมีการทำลายพิมพ์เอชพีแอลซี เพื่อเป็นการทำสัญลักษณ์(Marker)ในการเป็นมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification) ของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีช่องว่างของการศึกษาเพื่อหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในการเป็นดัชนีวัดทางชีวภาพ (Biological marker) อันจะทำให้ทราบถึงกลไกในการออกฤทธิ์แก้ปวดของเถาเอ็นอ่อน รวมถึงการใช้เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่จะทำการผลิตในอนาคต ผลการศึกษาทางพรีคลินิกพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์คอนโดโรโพรเทคทีฟทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง การศึกษาทางคลินิกชี้ให้เห็นว่าเถาเอ็นอ่อนมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการใช้กับผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม และควรขยายขอบเขตของการวิจัยทางคลินิกในโรคที่อยู่ในระบบกระดูกและกล้ามเนื้ออื่นๆเช่น อาการปวดหลังส่วนล่างเรื้อรัง (Chronic low back pain) อาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (Muscle pain) เป็นต้น ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อย การส่งเสริมการใช้สมุนไพรในระบบสุขภาพถือได้ว่าเป็นสิ่งสำคัญในการพึ่งพาตนเองด้านสุขภาพของประเทศ ซึ่งการวิจัยและพัฒนาแบบครบวงจรของสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนถือได้ว่าเป็นข้อมูลที่สำคัญในการสร้างความเชื่อมั่น ขอบและใช้สมุนไพร อันจะช่วยส่งเสริมนโยบายประเทศไทย 4.0 เพื่อสร้างความมั่นคง มั่งคั่งและยั่งยืน ในมิติสุขภาพของประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 3 (พ.ศ.2522) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 21 ง (ลงวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2556).
2. Laupattarakasem P, Wangsrimongkol T, Surarit R, Hahnvajanawong C. In vitro and in vivo anti-inflammatory potential of *Cryptolepis buchanani*. Journal of ethnopharmacology. 2006;108(3):349-54.
3. Hanprasertpong N, Pantong A, Sangdee C, Kunanusorn P, Kasitanon N, Lhieochaiphant S, et al. *Cryptolepis buchanani* oil formulation versus indomethacin solution in topical therapy for osteoarthritis of the knee: A randomized controlled trial. Journal of Herbal Medicine. 2017;7:18-26.
4. Pande M, Dubey VK, Jagannadham M V. Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptolepain, a novel glycosylated serine protease from *Cryptolepis buchanani*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2007 Feb;63(Pt 2):74–7.
5. Mikawlawng K, Rani R, Kumar S, Bhardwaj AR, Prakash G. Anti-paralytic medicinal plants – Review. J Tradit Complement Med [Internet]. 2018;8(1):4–10.
6. W. Wuthithammaw et, Encyclopedia of Herbal Medicine. Collection of Thai Pharmaceutical Principles, Samnakphim Odian Sato, Krung Thep MahaNakhon, Bangkok, 1997.
7. BGO plant Databases[Internet].Bangkok.The Botanical Organization; c2011-2017[update 2016 Aug 01 cited 2018 March18].Available form. <http://www.qsbg.org/Database/plantdb/mdp/medicinal-specimen.asp?id=366>.
8. Hanprasertpong N, Teekachunhatean S, Chaiwongsa R, Ongchai S, Kunanusorn P, Sangdee C, et al. Analgesic, anti-inflammatory, and chondroprotective activities of *Cryptolepis buchanani* extract: in vitro and in vivo studies. Biomed Res Int. 2014;2014:978582.
9. Dutta SK, Sharma BN, Sharma P V. Buchananine, a novel pyridine alkaloid from *Cryptolepis buchanani*. Phytochemistry [Internet]. 1978;17(11):2047–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200887725>
10. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=442629, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442629> (accessed Mar. 19, 2018).
11. Venkateswara R, Narendra N, Viswamitra MA, Vaidyanathan CS. Cryptosin, a cardenolide from the leaves of *Cryptolepis buchanani*. Phytochemistry [Internet]. 1989;28(4):1203–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942289802092>
12. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=21126533, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21126533> (accessed Mar. 19, 2018).
13. Laupattarakasem P, Wangsrimongkol T, Surarit R, Hahnvajanawong C. In vitro and in vivo anti-inflammatory potential of *Cryptolepis buchanani*. Journal of Ethnopharmacology. 2006;108(3):349-54.
14. Di Cesare, P.E., Abramson, S.B., Samuels, J., 2013. Pathogenesis of osteoarthritis, In:Firestein, G.S., Budd, R.C., Gabriel, S.E., McInnes, I.B., O’Dell, J.R. (Eds.), Kelley’sTextbook of Rheumatology. 9th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia.