

เถาเอ็นอ่อนสมุนไพรสู่การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม

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

อดิศักดิ์ ถมุดธา^{1*}, ปริญญา ถมุดธา²

Adisak Thomudtha^{1*}, Pariya Thomudtha²

(Received : 5 March 21 Revised : 27 July 21 Accepted : 17 August 21)

บทคัดย่อ

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อรักษาอาการอักเสบของโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชี้ให้เห็นถึงข้อมูลวิชาการในประเด็นการพัฒนาศูนย์สมุนไพรเถาเอ็นอ่อนแบบครบวงจร โดยทำการสืบค้นจากฐานข้อมูลวิชาการในหัวข้อ พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน พฤกษเคมี การศึกษาทางด้านพรีคลินิกและการทดลองทางคลินิก ผลการศึกษาด้านพรีคลินิกพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนสามารถลดการบิดตัวโดยใช้กรดเซตริกเหนียวในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการอักเสบในโมเดลการใช้สารเอทิล ฟีนิลโพธิโอเนตเหนียว นำการเกิดหูกอักเสบและการใช้สารคาร์วาจีแนนเหนียว นำการเกิดอู้ง่ายอักเสบในหนูทดลอง การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนสามารถลดการปลดปล่อยสารซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคนและไฮยาโรแนนในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เมทิลโลโปรตีเอส-2 โดยไม่มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาทางคลินิกจากยาน้ำมันเถาเอ็นอ่อนในการรักษาข้อเข่าเสื่อมเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่มีภาวะโรคในระดับรุนแรงน้อยถึงปานกลาง พบว่ามีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจาก 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน สรุปลได้ว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ลดปวด ด้านการอักเสบและคอนโดรโพรเทคทีฟ ยาน้ำมันเถาเอ็นอ่อนมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างอินโดเมทาซิน โคลูซัน ในการรักษาข้อเข่าเสื่อม ยาน้ำชนิดรับประทานตำรับโคคลานที่มีส่วนผสมของเถาเอ็นอ่อน พบว่ามีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการลดอาการปวดเข่าในภาวะข้อเข่าเสื่อมชนิดปฐมภูมิ ไม่แตกต่างจากยาเม็ดไโดโคลฟีแนค ในการประเมินด้วย Oxford Knee Score อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : เถาเอ็นอ่อน, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์คอนโดรโพรเทคทีฟ, ข้อเข่าเสื่อม

^{1*} กลุ่มงานการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลมหาสารคาม

² งานคุ้มครองผู้บริโภค กลุ่มงานเวชกรรมสังคม โรงพยาบาลมหาสารคาม



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 the complete development of this herbal medicine. By searching the 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 demonstrates 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 effects, *Crptolepis buchanani* oil was effective as an indomethacin solution for the symptomatic treatment of osteoarthritis of the knee. *Crptolepis buchanani* oral solution in the Koklan Mixture Formula 3 showed efficient and safe for the treatment of primary knee osteoarthritis by Oxford Knee Score evaluation and no differences statistically significant when compared with diclofenac tablet.

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

บทนำ

ในปัจจุบันกระแสความนิยมในการใช้สมุนไพรในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในส่วนภาครัฐได้มีการกำหนดนโยบายที่สำคัญเช่น แผนแม่บทแห่งชาติด้านสมุนไพร โครงการเมืองสมุนไพรเพื่อให้เกิดการพัฒนาสมุนไพรครบวงจร จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีคุณภาพ มีการศึกษาวิจัยถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร เพื่อให้เกิดความมั่นใจของประชาชน รวมถึงบุคลากรทางการแพทย์สมุนไพรจึงถือได้ว่าเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการขับเคลื่อนสู่การพัฒนาให้ได้ยาจากสมุนไพรเพื่อการรักษาโรคต่างๆ ในการพึ่งพาตนเองของประเทศด้านสุขภาพในอนาคต การศึกษาทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านถือได้ว่าเป็นประตูในการค้นพบนำไปสู่การพัฒนาจากสมุนไพรอย่างครบวงจรเถาเอ็นอ่อนคืออีกหนึ่งตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนของการพัฒนา

ยาจากสมุนไพรครบวงจรในประเทศไทยตั้งแต่การค้นพบจนถึงได้ผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรที่ผ่านการวิจัยทางคลินิกและสมุนไพรชนิดนี้ได้ถูกประกาศจากกระทรวงสาธารณสุขในปี พ.ศ. 2556⁽¹⁾ ให้เป็นเป็นยาสามัญประจำบ้าน ในหมวดยากันชักหรือยาบรรเทาอาการปวดเมื่อย (ยาสำหรับใช้ภายนอก)

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) วงศ์ Asclepiadaceae มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงในประเทศไทย ในการรักษาอาการอักเสบของโรกระบบกระดูกและกล้ามเนื้อเป็นส่วนใหญ่⁽²⁾ ล่าสุดมีการศึกษาวิจัยทางคลินิกพบว่าสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนมีประสิทธิภาพในการรักษาอาการข้อเข่าเสื่อม (Knee osteoarthritis) ไม่ได้ด้อยไปกว่าวิธีการรักษาที่เป็นมาตรฐาน⁽³⁾ (Standard treatment) ซึ่ง

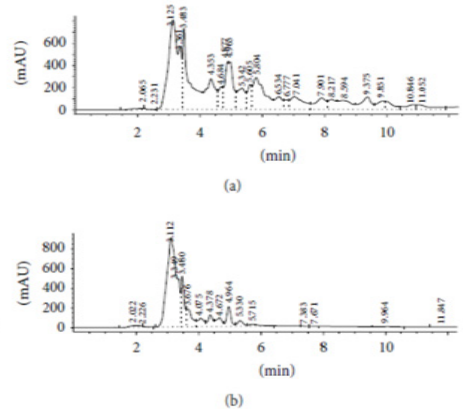
บทความนี้จะได้กล่าวถึงสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนโดยละเอียด ตั้งแต่การค้นพบจากองค์ความรู้ทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnopharmacology) ซึ่งเป็นประตูสำคัญสู่การค้นพบข้อมูลเบื้องต้นสำหรับรักษาอาการปวดกระดูกและกล้ามเนื้อตลอดจนลักษณะโดยทั่วไปของสมุนไพรชนิดนี้ การศึกษาทางด้านพฤกษเคมี (Phytochemistry) จะทำให้ทราบองค์ประกอบของสารชีวเคมีที่มีฤทธิ์ทางยา การศึกษาทางด้านพรีคลินิกในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (In-vitro and In-vivo study) จะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพในการมีฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษทั้งเฉียบพลันและเรื้อรังเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในความเป็นไปได้ของการศึกษาทางคลินิก การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเถาเอ็นอ่อน (Formulation development) ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาตลอดจนเพิ่มความสะดวกและความร่วมมือในการใช้ผลิตภัณฑ์ในผู้ป่วย และทำยาสกัดการวิจัยทางคลินิกในการยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการรักษา (Clinical study) เพื่อให้บุคลากรทางการแพทย์และประชาชนมีความมั่นใจในการใช้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งกระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นทุกข้อถือได้ว่าเป็นหัวใจของการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรให้เกิดความยั่งยืน เป็นไปตามเจตจำนงมุ่งหมายของรัฐบาลที่ต้องการให้สมุนไพรไทยเป็นที่ นิยม ประชาชนรู้จัก เชื่อมั่น ชอบและใช้การแพทย์แผนไทยและสมุนไพรพฤกษศาสตร์พื้นบ้านเถาเอ็นอ่อนประตูสู่การรักษาข้อเข่าเสื่อม

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult) พบในป่าไม้เขตร้อน ในหลายๆ ประเทศ ได้แก่ จีน อินเดีย ไทยและประเทศในแถบอินโดจีน่า ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงในประเทศไทย ในการรักษาอาการอักเสบของโรกระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ เป็นส่วนใหญ่⁽²⁾ ในอายุรเวทอินเดีย ถูกนำมาใช้ในการรักษา กล้ามเนื้ออักเสบ ไอ ท้องเสีย รักษาแผล⁽⁴⁾ และยังเป็นองค์ประกอบในตำรับยารักษาอัมพฤกษ์อัมพาต พบว่าส่วนลำต้น ถูกนำมาใช้ในการคลายกล้ามเนื้อ รักษาเส้นเอ็นตึง และข้ออักเสบ⁽⁵⁾ ส่วนใบนำมาตำพอกประคบบริเวณกล้ามเนื้อ

และข้อที่มีการอักเสบ⁽⁶⁾ โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่สำคัญคือ ลำต้นเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง เลื้อยพัน มีน้ำยางขาว ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปไข่หรือรูปไข่กลับ กว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 5-18 เซนติเมตร ดอกมีลักษณะเป็นช่อ ออกที่ซอกใบ กลีบดอกสีเหลืองอ่อน ผลแห้ง แตกได้ รูปไข่แกมใบหอก เมล็ดมีสีน้ำตาลมีขนสีขาว⁽⁷⁾ พฤกษเคมีเถาเอ็นอ่อนและการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น (Phytochemistry and Bioassays)

การศึกษาทางด้านพฤกษเคมีของสมุนไพรเถาเอ็นอ่อน มีวัตถุประสงค์หลักๆ ในการค้นหาสารชีวเคมีกลุ่มเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นการยืนยันการค้นพบทางด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านที่มีการใช้แบบดั้งเดิมผ่านองค์ความรู้ที่สั่งสมกันมาช้านานของชาวบ้านในการนำสมุนไพรนี้มาใช้รักษาอาการอักเสบของโรกระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ

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

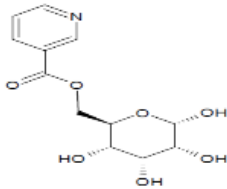


รูปที่ 1 ลายพิมพ์เอชพีแอลซี สารสกัดเถาเอ็นอ่อน ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (a) และ 320 นาโนเมตร (b) ตามลำดับ⁽⁸⁾



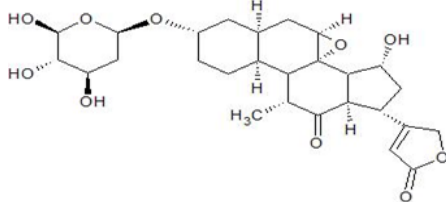
มีการค้นพบสารคลิปีโดเลเพน (Cryptolepain) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากยางของเถาเอ็นอ่อน เป็นสารในกลุ่มไกลโคซิเลตเตด เซอร์รีน โปรตีเอส (Glycosylated serine protease) จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นมีคุณสมบัติ คาสโนไลติก (Caseinolytic activity) ในการยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด⁽⁴⁾ ในอนาคตอาจมีการนำสารนี้ไปพัฒนาเป็นยากลุ่มต้านการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant)

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



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของบูชานานีน จากแก่นเถาเอ็นอ่อน⁽¹⁰⁾

อีกการศึกษาพบสารคลิปีโตซิน (Cryptosin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคาดีโนไลด์ (Cardenolide) มีโครงสร้างเป็นแบบ สเตียรอยด์ไกลโคไซด์ (Steroidal glycoside) สารนี้สกัดได้จากส่วนใบเถาเอ็นอ่อน จากการทดลองในการกระตุ้นหัวใจของสุนัขในโมเดลของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบบเอกซ์วีโว (Ex vivo) พบว่าสารคาดีโนไลด์ (Cardenolide) มีคุณสมบัติเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจได้ดี⁽¹¹⁾ (Potent positive inotropic agent) ซึ่งเป็นไปได้ว่าอนาคตเราอาจได้เห็นสารนี้ถูกพัฒนาเป็นยาสำหรับผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลว (Congestive heart failure)

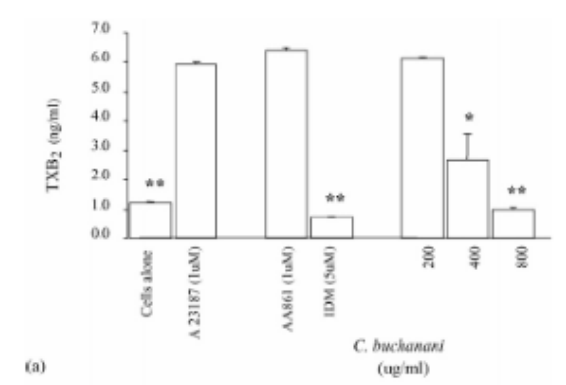


รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของคลิปีโตซิน จากใบเถาเอ็นอ่อน⁽¹²⁾

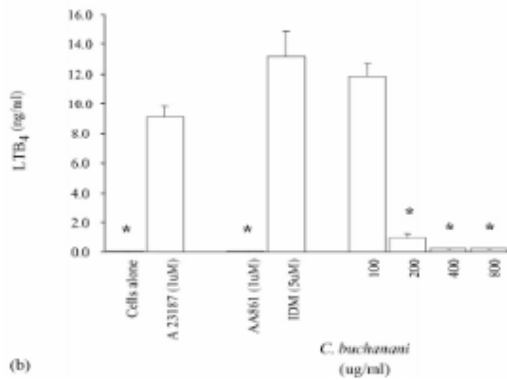
ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเพื่อหาสารที่เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (Biological marker) สำหรับเถาเอ็นอ่อนอันจะทำให้ทราบถึงกลไกในการออกฤทธิ์แก้ปวด (Mechanism of action) รวมถึงการใช้เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Quality control) ที่จะทำการผลิตในอนาคต

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน⁽¹³⁾

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบของเถาเอ็นอ่อนในหลอดทดลอง โดยใช้สารสกัดจากแก่นเถาเอ็นอ่อนในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับรูปแบบการศึกษามาตรฐาน ที่ถูกนำมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ 2 แบบ คือ การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute inflammatory activity) รูปแบบที่ใช้ในการทดสอบคือการใช้แคลเซียม ไอโอโนฟอร์ เอ 23187 กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดลิวโคไซต์ในหนูทดลอง (In vitro calcium ionophore A 23187 stimulated rat leukocyte model) และการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเรื้อรัง (Chronic inflammatory activity) รูปแบบที่ใช้ในการทดสอบคือการใช้สารแอลพีเอสกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ (In vitro LPS-stimulated monocytes) พบว่า สารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ซึ่งสามารถสรุปผลการทดลองดังรูป



(a)

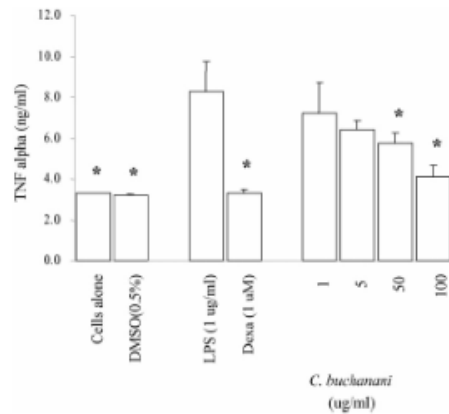


รูปที่ 4 แสดงการยับยั้งสาร thromboxane B₂ และสาร leukotriene B₄ ของสารสกัดเห็ดอ่อน ในขนาดความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบโดยวิธีการใช้แคลเซียม ไอโอโนฟอร์ เอ 23187 กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดลิวโคไซต์ในหลอดทดลอง เป็นรูปแบบที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งกระบวนการอักเสบ โดยทำการฉีดสารออสเตอร์ โกลโคเจน ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (Oyster glycogen) เข้าทางช่องท้องของหนูทดลอง ให้เกิดกระบวนการกระตุ้นเซลล์ลิวโคไซด์ (Leukocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบให้เพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นจะทำการแยกลิวโคไซด์ มาเพาะเลี้ยงและคัดแยกในหลอดทดลองจนได้พอลิมอร์ฟนิวเคลียร์ นิวโทรฟิล ลิวโคไซด์ (Polymorphonuclear Neutrophils Leukocytes, PMNs) ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบโดยการเติมสารแคลเซียม ไอโอโนฟอร์ เอ 23187 ลงในพอลิมอร์ฟนิวเคลียร์ นิวโทรฟิล ลิวโคไซด์ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบจากรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่าสารสกัดเห็ดอ่อนในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสารอ้างอิงมาตรฐาน (Reference standard) ที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไซโครออกซิจีเนส (Cyclooxygenase) คืออินโดเมทาซิน (Indomethacin, IDM) และสารเอเอ 861 (AA861) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ 5-ไลพอกซีจีเนส (5-Lipoxygenase) สามารถยับยั้งสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบทั้งสาร thromboxane B₂ และ leukotriene B₄ ในวิถีไซโคลออกซิจีเนส (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 พบว่าสารสกัดเห็ดอ่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบเรื้อรัง สามารถสรุปผลการทดลองได้ตามภาพ



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

การใช้สารแอลพีเอสกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ เป็นโมเดลที่ใช้ในการศึกษาเพื่อทดสอบการยับยั้งการสร้างสารทีเอ็นเอฟ-แอลฟา จากเซลล์โมโนไซต์ ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจากการทดลองพบว่าสารสกัดเห็ดอ่อนในเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการยับยั้งขบวนการสร้างสารทีเอ็นเอฟ-แอลฟา จากโมโนไซต์เซลล์ไลน์ (Monocyte cell line, THP-1 cell) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดอ่อน 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยทำการเปรียบเทียบกับสารอ้างอิงมาตรฐานเดกซามทาโซนความเข้มข้น 1 ไมโครโมล (Dexamethasone 1 μ M) และสารดีเอ็มเอสโอ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (DMSO) เป็นสารเปรียบเทียบ⁽¹³⁾



การทดสอบฤทธิ์คอนโดโรโปรเทคทีฟ (Chondroprotective activities) ในหลอดทดลองของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน⁽⁸⁾

การทดสอบฤทธิ์คอนโดโรโปรเทคทีฟ ถือได้ว่าเป็นการทดสอบที่น่าสนใจในการนำสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนมาใช้ในการรักษาข้ออักเสบเนื่องจากการบ่งบอกถึงความสามารถ

ในการป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ซึ่งเป็นการยืนยันประสิทธิภาพตามองค์ความรู้วิทยาศาสตร์พื้นฐาน โดยใช้สารสกัดจากแก่นของเถาเอ็นอ่อนในเมทานอล (Methanol extract of *C. buchanani*,(CBE)) สำหรับรูปแบบการทดลองเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์คอนโดโรโปรเทคทีฟสามารถสรุปได้ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทดสอบฤทธิ์คอนโดโรโปรเทคทีฟ ในรูปแบบการศึกษาต่าง ๆ ของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน

รูปแบบการศึกษาในหลอดทดลอง	ผลการศึกษา
การเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cartilage Explant Culture)	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการปลดปล่อยสารซัลเฟต โกลโคซามิโนไกลแคน (sulfated glycosaminoglycan,(s-GaG)) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการกระตุ้นการอักเสบโดยสารรีคอมบิแนน ฮูแมน อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Recombinant human interleukin-1 β) บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 และ P \le 0.01 ตามลำดับ)
การยับยั้งแบบแข่งขัน อีไลซ่า สำหรับสารไฮยาลูโรแนน (A competitive Inhibition-Based ELISA for Hyaluronan,(HA))	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการปลดปล่อยสาร สารไฮยาลูโรแนน(Hyaluronan,(HA)) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการกระตุ้นการอักเสบโดยสารรีคอมบิแนน ฮูแมน อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า(Recombinant human interleukin-1 β) บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 และ P \le 0.001 ตามลำดับ)
การวิเคราะห์กรดยูโรนิก (Uronic Acid Assay)	พบว่า CBE ขนาดความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการกระบวนการสร้างกรดยูโรนิก ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากกระบวนการกระตุ้นการอักเสบโดยสารรีคอมบิแนน ฮูแมน อินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า (Recombinant human interleukin-1 β) บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
การวัดปริมาณคอลลาเจนโดยใช้สารไฮดรอกซีโพรลีน (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)

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์คอนโดโรโปรเทคทีฟ ซึ่ง

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษามีศักยภาพในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปนั่นก็คือการศึกษาในสัตว์ทดลอง ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองสามารถสรุปได้ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง ในรูปแบบการศึกษาต่างๆของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน

รูปแบบการศึกษาในสัตว์ทดลอง	ผลการศึกษา
การใช้กรดอะซิติกเหนี่ยวนำการบิดตัวในหนูทดลอง (Acetic Acid-Induced Writing Response in Mice)	พบว่า การให้ CBE ในขนาด 60 125 และ 250 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลอง สามารถลดจำนวนครั้งของการบิดตัวของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
การใช้สารเอทิล ฟีนิลโพรพิโอเนต เหนี่ยวนำการเกิดหูอักเสบในหนูทดลอง (Ethy Phenylpropiolate- (EEP)- Induced Ear Edema in Rats)	พบว่า การให้ CBE ในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิกรัม หยอดลงในช่องหูและทาที่บริเวณหูส่วนนอก สามารถลดการอักเสบในช่องหูและหูส่วนนอก ที่เกิดจากการกระตุ้นของสาร EEP-ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
การใช้สารคาราจีแนนเหนี่ยวนำการเกิดอุ้งเท้าอักเสบในหนูทดลอง (Carrageenan-Induced Hind Paw Edema in Rats)	การให้ CBE ในขนาด 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูทดลอง ก่อนการฉีดสารกระตุ้นการอักเสบคาราจีแนน (carrageenan) บริเวณอุ้งเท้าของหนูทดลอง 30 นาที ทำการวัดผลการลดการอักเสบที่เวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่า CBE สามารถลดขนาดการอักเสบบริเวณหลังเท้า (hind paw edema) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
การใช้คอตตอนทรีดเหนี่ยวนำการเกิดเนื้อเยื่อแกรนูโลมาตัสในหนูทดลอง (Cotton thread-induced granulation tissue in rats) ⁽¹³⁾	เป็นการศึกษาเพื่อทดสอบการยับยั้งเนื้อเยื่อแกรนูโลมาตัส (Granulomatous tissue) ภายหลังจากฝังคอตตอนทรีด (Cotton tread) บริเวณด้านหลังของหนูทดลอง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า สารสกัด CBE สามารถลดขนาดของเนื้อเยื่อแกรนูโลมาตัส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ทางารับประทาน และ 300 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้อง ($P \leq 0.05$ และ $P \leq 0.001$ ตามลำดับ)

การทดสอบพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ในสัตว์ทดลองของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน

การทดสอบพิษเฉียบพลัน ของสารสกัดจากเถาเอ็นอ่อนใน 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอล โดยให้หนูทดลองได้รับสารสกัดเถาเอ็นอ่อนในขนาดถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม (สมมูลกับผงแห้งเถาเอ็นอ่อน 12 กรัมต่อ กิโลกรัม) ผลการทดลองพบว่า ไม่มีหนูทดลองตัวใดมีพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้นภายหลังให้สารสกัดเป็นเวลา 7 วัน และไม่มีหนูตัวใดเสียชีวิตเลย ในทางตรงข้ามการให้สารสกัดเถาเอ็นอ่อน ฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่าหนูทดลองมีอาการแพ้ทุกตัวภายหลัง 2 ชั่วโมงของการได้รับสารสกัด และมีหนูทดลองเสียชีวิต 2 และ 6 ตัว จากการได้รับสารสกัดในขนาด 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ฉีดเข้าทางช่องท้องตามลำดับ ทำให้ประมาณค่า LD50 เท่ากับ 900 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม โดยสมมูลกับผงแห้งเถาเอ็นอ่อน 12 กรัมต่อ กิโลกรัม จากการเปรียบเทียบกับแผนภูมิระดับความสามารถของความเป็นพิษ (Toxicity-rating chart) สารสกัดนี้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มไม่เป็นพิษสำหรับรับประทาน (Non-toxic substance)⁽¹³⁾

เถาเอ็นอ่อนกับการทดสอบทางคลินิก (Clinical study)

โรคข้อเข่าเสื่อม (Osteoarthritis of knee) คือโรคที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเสื่อมของข้อเข่า ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในโรคนี้ คือที่กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular cartilage) ในข้อชนิดที่มีเยื่อ (Diarthrodial joint) โดยพบการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ อย่างต่อเนื่องตามเวลาที่ผ่านไป กระดูกอ่อนผิวข้อมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (Biochemical) ชีวกลศาสตร์ (Biomechanical) และโครงสร้าง (Biomorphology)⁽⁴⁾ ได้มีการพัฒนาสูตรตำรับในรูปแบบน้ำมันสำหรับใช้ภายนอกจากเถาเอ็นอ่อน (C. buchmanani oil formulation, CBO) และได้มีการทดลองทางคลินิกในการวัดประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยา CBO ในผู้ป่วยข้อเข่าอักเสบ (Osteoarthritis of the knee) เมื่อเทียบกับการรักษามาตรฐานด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โซลูชัน (indomethacin solution) โดยทำการศึกษาการทดลองแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุม (Randomized double-blind active-controlled trial) เพื่อยืนยันการมี



ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ประสิทธิภาพในการรักษาอาการเข้า
เข้าเสื่อม และความปลอดภัย จากข้อมูลทางด้าน
พฤกษศาสตร์พื้นบ้านและพฤกษเคมีรวมถึงการศึกษาใน
หลอดทดลองและในสัตว์ทดลองก่อนหน้า โดยทำการ
ศึกษาเพื่อวัดและประเมินประสิทธิภาพของ CBO ในด้าน
วิช่วลอนาล็อกสเกลสำหรับวัดระดับอาการปวด (Visual
analogue scale of pain (VAS of Pain)) วิช่วลอนาล็อก
สเกลสำหรับวัดระดับความแข็งเกร็งของข้อเข่า (Visual
analogue scale of stiffness, (VAS of stiffness) ค่า
คะแนนดัชนีฟังก์ชันกิลีเคนส์ (Lequesne's functional
index, (scores)) และระยะเวลาในการขึ้นบันได 10 ขั้น
(วินาที) (Time taken to climb up 10 steps, (s)) ทำการ
ศึกษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2
กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้รับ 1 เเปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โซลูชัน
จำนวน 83 คน กลุ่มที่ 2 ได้รับยา CBO จำนวน 86 คน
จากการศึกษาพบว่า CBO มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจาก
1 เเปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โซลูชัน อย่างมีนัยสำคัญทาง
สถิติจากการประเมินข้างต้นทั้ง 4 ด้าน⁽³⁾ ($P \leq 0.05$)

นอกจากนั้นยังพบว่ามีการลดลงของค่าเฉลี่ยวิช่วล
อนาล็อกสเกลสำหรับวัดระดับความแข็งเกร็งของข้อเข่า
เมื่อเทียบกับค่าตั้งต้น (Base line) สัปดาห์ที่ 0 ของกลุ่ม
ที่ได้รับ 1 เเปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน โซลูชัน ไม่แตกต่าง
กับกลุ่มที่ได้รับ CBO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽³⁾ ($P \leq 0.05$)

ในด้านความปลอดภัยพบว่าการใช้ CBO มีอัตราการ
เกิดผลข้างเคียงที่พบบ่อยได้แก่อาการคัน (Pruritus) ผื่น
แดง (Rash Reddening) และ อาการแสบร้อน (Burning)
ภายหลังจากการใช้ต่ำกว่ายา 1 เเปอร์เซ็นต์ อินโดเมทาซิน
โซลูชัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽³⁾ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาในรูปแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุมเพื่อเปรียบเทียบ
ประสิทธิภาพและความปลอดภัยระหว่างตำรับยาน้ำ
โคคลาน สูตร 3 ที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเถาเอ็นอ่อน
และยาไคโคลฟีแนคชนิดรับประทานขนาด 25 มิลลิกรัม
ต่อเม็ด ในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมชนิดปฐมภูมิ (primary knee
osteoarthritis) ที่มีช่วงอายุ 50 – 70 ปี ผู้เข้าร่วมการ
ศึกษากลุ่มละ 34 คน กลุ่มที่ 1ได้รับตำรับยาน้ำโคคลาน

สูตร 3 ในขนาด 30 มิลลิกรัม ก่อนอาหาร 3 เวลาและยา
หลอกที่มีลักษณะคล้ายไคโคลฟีแนค รับประทาน 1 เม็ด
หลังอาหาร 3 เวลา เป็นเวลา 14 วัน กลุ่มที่ 2 ได้รับยา
เม็ดไคโคลฟีแนค 25 มิลลิกรัม 1 เม็ด หลังอาหาร 3 เวลา
และยาหลอกที่มีลักษณะคล้ายตำรับยาน้ำโคคลานสูตร 3
ในขนาด 30 มิลลิกรัม ก่อนอาหาร 3 เวลา เป็นระยะเวลา
14 วัน ผลการศึกษาด้านประสิทธิภาพพบว่าตำรับยาน้ำ
โคคลานสูตร 3 สามารถลดระดับความปวดในผู้ป่วยข้อเข่า
เสื่อมโดยใช้มาตรวัด Oxford Knee Score ไม่แตกต่าง
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้
รับยาเม็ดไคโคลฟีแนค และผลการศึกษาด้านความ
ปลอดภัยทำการติดตามค่าเคมีของเลือดก่อนและหลังการ
ให้ยาพบว่าค่าเคมีของเลือดในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มอยู่ในระดับ
ที่ไม่เปลี่ยนแปลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการ
ติดตามอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาพบว่าผู้ป่วย ร้อย
ละ 49.68 ที่ได้รับตำรับยาน้ำโคคลานสูตร 3 มีอาการไม่
พึงประสงค์ที่เล็กน้อยไม่ต้องหยุดการให้ยาขณะทำการ
ศึกษาและไม่จำเป็นต้องได้รับการรักษาอาการไม่พึง
ประสงค์ที่เกิดขึ้น⁽¹⁵⁾

สรุปและวิจารณ์

เถาเอ็นอ่อน (*Cryptolepis buchanani* Roem. &
Schult) วงศ์ Asclepiadaceae มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยถูก
นำมาใช้อย่างแพร่หลายในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษา
อาการอักเสบของโรคระบบกระดูกและกล้ามเนื้อเป็นส่วน
ใหญ่ ถือได้ว่าสมุนไพรชนิดนี้มีศักยภาพในการพัฒนาวิจัย
ต่อยอดเนื่องจากมีข้อมูลจากองค์ความรู้ทางด้านพฤกษศาสตร์
พื้นบ้าน รวมถึงมีงานวิจัยทางด้านพฤกษเคมีและการ
ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นที่ยืนยันผลการรักษา
ทางด้านอาการปวดเมื่อยระบบกระดูกและกล้ามเนื้อจาก
องค์ความรู้ดั้งเดิม รวมถึงการสกัดและแยกสารสำคัญจาก
สมุนไพรเถาเอ็นอ่อน เช่น คลิปโตเลเพน (*Cryptolepain*)
ที่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด คลิปโตซิน
(*Cryptosin*) ที่มีฤทธิ์กระตุ้นเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจ
นอกจากนั้นยังมีการทำสายพิมพ์เอชพีแอลซี เพื่อเป็นการ
ทำสัญลักษณ์(Marker)ในการเป็นมาตรฐานในการตรวจ

พิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification) ของสารสกัดเถาเอ็นอ่อน แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีช่องว่างของการศึกษาเพื่อหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในการเป็นดัชนีวัดทางชีวภาพ (Biological marker) อันจะทำให้ทราบถึงกลไกในการออกฤทธิ์แก้ปวดของเถาเอ็นอ่อน รวมถึงการใช้เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่จะทำการผลิตในอนาคต ผลการศึกษาทางพรีคลินิกพบว่าสารสกัดเถาเอ็นอ่อนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านโคโรนาไวรัสที่พบบ่อยในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง การศึกษาทางคลินิกชี้ให้เห็นว่าเถาเอ็นอ่อนมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการใช้กับผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมทั้งชนิดมารับประทานและยาใช้ภายนอก และควรขยายขอบเขตของการวิจัยทางคลินิกในโรคที่อยู่ในระบบกระดูกและกล้ามเนื้ออื่น ๆ เช่น อาการปวดหลังส่วนล่างเรื้อรัง (Chronic low back pain) อาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (Muscle pain) เป็นต้น ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อย การส่งเสริมการใช้สมุนไพรในระบบสุขภาพถือได้ว่าเป็นสิ่งที่สำคัญในการพึ่งพาตนเองด้านสุขภาพของประเทศ ซึ่งการวิจัยและพัฒนาแบบครบวงจรของสมุนไพรเถาเอ็นอ่อนถือได้ว่าเป็นข้อมูลที่สำคัญในการสร้างความเชื่อมั่น ขอบและใช้สมุนไพร อันจะช่วยส่งเสริมนโยบายประเทศไทย 4.0 เพื่อสร้างความมั่นคง มั่งคั่งและยั่งยืน ในมิติสุขภาพของประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Drug Act B.E. 2510 (A.D.1967).2013. Rajakijja-Nubegsa. 130, 21D (Feb 14th): 30-49.
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; 63(2): 74-7.
5. Mikawlawng K, Rani R, Kumar S, Bhardwaj AR, Prakash G. Anti-paralytic medicinal plants – Review. J Tradit Complement Med 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 [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> (cited 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> (cited 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. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. *Kelley's Textbook of Rheumatology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2012.
15. Pongsaree R, Vajaradul Y, Fakkham S, Kamoltham T. Comparison in Efficacy and Safety of Koklan Mixture Formula 3 and Diclofenac for Pain Relieving in Primary Knee Osteoarthritis. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020; 11(11): 1457-65.