ว กรมวิทย พ 2547; 46 (2) : 72-88

ผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและความปลอดภัยของบอระเพ็ด ในอาสาสมัครคนไทยปกติ

สดุดี รัตนจรัสโรจน์* ธีระวุธ ปิ่นทอง* ไพจิตร์ วราชิต จารีย์ บันสิทธิ์* มาลี บรรจบ* และเย็นจิตร เตชะดำรงสิน***

**สถาบันวิจัยสมุนไพร **สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000*

บทคัดย่อ ผู้วิจัยได้ศึกษาผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและความปลอดภัยของบอระเพ็ดในอาสาสมัครคนไทยโดยการรับประทาน การศึกษาผลของบอระเพ็ดต่อความทนต่อกลูโคส (glucose tolerance) ในอาสาสมัครปกติ 9 ราย พบว่า การรับประทานบอระเพ็ดขนาด 4 กรัม หรือ 6 กรัมครั้งเดียว ไม่ทำให้ glucose tolerance ดีขึ้น การศึกษาผลของบอระเพ็ดต่อระดับกลูโคสและอินซูลินในซีรัมในอาสาสมัครปกติ 6 ราย พบว่า ระดับกลูโคสในซีรัมของอาสาสมัครหลังได้รับบอระเพ็ดขนาด 6 กรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังรับประทานบอระเพ็ด 120 นาที แต่การเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ในช่วงค่าปกติ ในขณะที่ระดับอินซูลินในซีรัมไม่เพิ่มขึ้น ผลของบอระเพ็ดต่อค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีในอาสาสมัครปกติ 12 รายที่ได้รับบอระเพ็ดซึ่งผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขนาด 1 กรัม วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และในอาสาสมัครปกติ 13 รายที่ได้รับบอระเพ็ดซึ่งผลิตโดยโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ขนาด 1.05 กรัม วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีอาสาสมัครที่ได้รับบอระเพ็ดซึ่งผลิตจากทั้ง 2 แห่งเข้าร่วมการวิจัยตลอดการศึกษา 10 และ 7 ราย ตามลำดับ อาสาสมัครมีค่าทางโลหิตวิทยาหลังจากได้รับบอระเพ็ดไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด ส่วนค่าทางชีวเคมี พบว่า ระดับกลูโคสในซีรัมก่อนและหลังได้รับบอระเพ็ดไม่แตกต่างกัน แต่ระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังรับประทานบอระเพ็ดที่ผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การรับประทานบอระเพ็ดที่ผลิตโดยโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศรเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีผลทำให้ระดับเอนไซม์ ALT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับเอนไซม์นี้ยังอยู่ในช่วงค่าปกติ รวมทั้งไม่ปรากฏอาการข้างเคียงหรืออาการผิดปกติใด ๆ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการรับประทานบอระเพ็ดติดต่อกันมีแนวโน้มทำให้ระดับเอนไซม์ AST และ ALT เพิ่มขึ้น ดังนั้น การใช้บอระเพ็ดเป็นระยะเวลานานควรตรวจติดตามค่าทางชีวเคมีเป็นระยะ ๆ และไม่แนะนำการใช้สมุนไพรนี้ในผู้ที่เคยมีประวัติหรือป่วยเป็นโรคตับ หรือการใช้ร่วมกับยาอื่นที่มีผลต่อตับ

บทนำ

บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* Mier ex Hook f. & Thoms) เป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลาย อยู่ในวงศ์ Menispermaceae[1] มีรสขมมาก ตามตำรายาไทยและต่างประเทศกล่าวว่าบอระเพ็ดมีสรรพคุณลดไข้และเป็นยาขมเจริญอาหาร[2,3] ปัจจุบันมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ด้านเภสัชวิทยาที่สนับสนุนฤทธิ์ต่าง ๆ ของบอระเพ็ด เช่น ลดไข้[4] ต้านการอักเสบ[5] และลดน้ำตาลในเลือด[6-8] ในประเทศมาเลเซียมีการนำเถาของบอระเพ็ดไปต้มน้ำดื่มเพื่อรักษาผู้ป่วยเบาหวาน[9-11] จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยให้สารสกัดด้วยน้ำของบอระเพ็ดผสมกับน้ำดื่ม (4 กรัม/ลิตร) แก่

Accepted for publication, 23 April 2004

หนูขาวที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด alloxan เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า สามารถลดระดับน้ำตาลและเพิ่มระดับอินซูลินในเลือดได้[6-7] และเมื่อให้หนูขาวเบาหวานดื่มส่วนสกัดนี้ 2 สัปดาห์ ทำให้ความทนต่อกลูโคส (glucose tolerance) ดีขึ้น[6] นอกจากนี้การให้สารสกัดด้วยน้ำของบอระเพ็ดทางเส้นเลือดดำในหนูขาวปกติสามารถเพิ่มระดับอินซูลินในเลือดด้วย[6] การศึกษาแบบ *in vitro* ของสารสกัดด้วยน้ำของบอระเพ็ดสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินทั้งใน islets of Langerhans ของหนูและคนรวมทั้ง HIT-T15 β-cell[7, 12] ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของบอระเพ็ดน่าจะเกี่ยวข้องกับการหลั่งอินซูลิน[7,12,13] และการเพิ่มการหลั่งอินซูลินน่าจะเกิดผ่านกระบวนการ calcium handling ของ β-cell ของตับอ่อน[14] จากการศึกษาวิจัยในประเทศไทย พบว่าส่วนสกัด 95% เอทานอลของเถาบอระเพ็ดทำให้ oral glucose tolerance ของหนูขาวปกติดีขึ้น และส่วนสกัดด้วยแอลกอฮอล์นี้ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด alloxan ได้ เมื่อนำส่วนสกัดนี้ไปแยกต่อด้วยวิธี solvent fractionation พบว่า ส่วนสกัดที่ละลายในบิวทานอลและในน้ำสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้เช่นกัน[8] ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการวิจัยในต่างประเทศ

การศึกษาพิษของสารสกัดของบอระเพ็ดโดยศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดด้วยเอทานอลของเถาบอระเพ็ดในหนูถีบจักร พบว่า สารสกัด 4 ก/กก หรือเทียบเท่าลำต้นแห้ง 28.95 ก/กก ไม่ทำให้เกิดอาการพิษใด ๆ ส่วนการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วยเอทานอลของเถาบอระเพ็ด พบว่า เมื่อให้สารสกัดนี้ขนาดสูงเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของตับและไตได้[15]

เนื่องจากมีการใช้สมุนไพรบอระเพ็ดรักษาโรคเบาหวานมาตั้งแต่สมัยโบราณโดยแพทย์แผนไทย[16-20] ซึ่งไม่มีรายงานว่ามีผลข้างเคียงใด ๆ และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในหมู่ประชาชนและโรงพยาบาลชุมชนหลายแห่ง และเนื่องจากยารักษาโรคเบาหวานมีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ประกอบกับมีข้อมูลหลักฐานทางวิทยาศาสตร์จากการศึกษาวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศที่สนับสนุนว่าบอระเพ็ดสามารถลดน้ำตาลและเพิ่มการหลั่งอินซูลินในเลือดได้ รวมทั้งมีการศึกษาความเป็นพิษทั้งพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลองทำให้ทราบขนาดที่นำไปใช้ได้อย่างปลอดภัย บอระเพ็ดจึงน่าจะเป็นสมุนไพรที่มีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาลดน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวานได้ อย่างไรก็ตามยังขาดหลักฐานการศึกษาวิจัยในคนเพื่อประเมินความปลอดภัยของการใช้สมุนไพรบอระเพ็ดและเพื่อให้แพทย์มีความมั่นใจในการนำสมุนไพรนี้มารักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ดังนั้น ผู้วิจัยได้ศึกษาผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและความปลอดภัยของบอระเพ็ดในอาสาสมัครคนไทยปกติโดยศึกษาผลของบอระเพ็ดต่อ glucose tolerance และผลบอระเพ็ดต่อระดับน้ำตาลและอินซูลินในเลือด นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการให้บอระเพ็ดติดต่อกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สมุนไพรบอระเพ็ด

1. สมุนไพรบอระเพ็ดที่สำรวจและรวบรวมจากภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำมาตรวจสอบชื่อชนิดตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน (*Tinospora crispa* (L.) Hook f. & Thoms) โดยใช้เอกสารจำแนกพรรณพืชของประเทศไทยและต่างประเทศ[21, 22] และเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชแห้งหมายเลข Maxwell 74-943 ที่จัดเก็บไว้ที่

พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร (BK) กรมวิชาการเกษตร และได้จัดทำตัวอย่างพืชแห้งในการศึกษาหมายเลข Bansiddhi 98-02 เก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการพฤกษ-ศาสตร์ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คัดเลือกส่วนที่ใช้คือ ลำต้นหรือเถา ล้างทำความสะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียสแล้วบดเป็นผง

2. ตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของวัตถุดิบสมุนไพรให้ได้มาตรฐานตาม Thai Herbal Pharmacopoeia[23] รวมทั้งตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของส่วนสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่ละลายในบิวทานอลโดยฝ่ายพฤกษเคมี สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งส่วนสกัดนี้มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดในหนูขาวเบาหวาน[8]

เครื่องมือ

1. เครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติทางโลหิตวิทยา (Automatic hematological analyzer, Cell dyne 3500, Abbott)

2. เครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติทางชีวเคมี (Automatic biochemistry analyzer, Boehringer Mannheim/Hitachi 912)

3. เครื่องมือตรวจวัดระดับอินซูลินในซีรัม (Enzymun® system, ES 300, Boehringer Mannheim)

สารมาตรฐาน น้ำเหลืองควบคุมคุณภาพ และน้ำยา

1. สารมาตรฐาน ได้แก่ CELL-DYN22 Calibrator (Abbott, USA), C.f.a.s., LDL/HDL-C และ Insulin Calibrator (Boehringer Mannheim, Germany)

2. น้ำเหลืองควบคุมคุณภาพ ได้แก่ CELL-DYN22 Tri-level control (Abbott, USA), Precinorm® U, Precipath® U, Precipath® HDL/LDL-C, Precinorm® IM และ Precipath® IM (Boehringer Mannheim, Germany)

3. ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา (Abbott, USA) และตรวจวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมี (Boehringer Mannheim, Germany)

รูปแบบของยา

นำผงบอระเพ็ดผลิตเป็นแคปซูลซึ่งมีขนาดและกระบวนการผลิตที่ต่างกัน 2 แบบ ดังนี้

1. แคปซูลขนาด 500 มิลลิกรัมที่ผ่านกระบวนการฉายรังสีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (ขนาด 10 KGy) ซึ่งผลิตโดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ต่อไปนี้เรียกบอระเพ็ดสถาบันวิจัยสมุนไพร (บอระเพ็ด สวพ.)

2. แคปซูลขนาด 350 มิลลิกรัมที่ไม่ผ่านกระบวนการฉายรังสีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งผลิตโดยโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ต่อไปนี้เรียกบอระเพ็ดโรงพยาบาล (บอระเพ็ด รพ.)

ขนาดรับประทาน

ก) ทดสอบ glucose tolerance

- รับประทานบอระเพ็ด สวพ. ครั้งเดียว ขนาด 4 กรัม และขนาด 6 กรัม

ข) ทดสอบผลของบอระเพ็ดต่อระดับกลูโคสและอินซูลินในซีรัม

- รับประทานบอระเพ็ด สวพ. ครั้งเดียว ขนาด 6 กรัม

ค) ทดสอบผลของบอระเพ็ดต่อค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี

- รับประทานบอระเพ็ด สวพ. ขนาด 1กรัม วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

- รับประทานบอระเพ็ด รพ. ขนาด 1.05 กรัม วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

วิธีการศึกษา*

การศึกษาที่ 1

อาสาสมัคร

ผู้เข้าร่วมการศึกษาวิจัยเป็นอาสาสมัครคนไทยปกติจำนวน 9 ราย ประกอบด้วยชาย 4 ราย หญิง 5 ราย อายุระหว่าง 21-36 ปี (เฉลี่ย 26.89 ± 3.00 ปี) น้ำหนัก 42-76 กิโลกรัม (เฉลี่ย 56.78 ± 3.65 กิโลกรัม) ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกคนปฏิบัติตามวิธีการทดลองดังนี้

วิธีการทดลอง

1. ให้อาสาสมัครงดอาหารอย่างน้อย 10 ชั่วโมง ดื่มได้เฉพาะน้ำเปล่าก่อนทำการทดสอบ glucose tolerance[24, 25]

2. เก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ (antecubital vein) เพื่อตรวจวัดระดับกลูโคสในซีรัมก่อนเริ่มทำการทดลอง (0 นาที ก่อนได้รับสารละลายกลูโคส) หลังจากนั้นเปิดเส้นเลือดไว้สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดครั้งต่อไปโดยคาเข็มไว้ในเส้นเลือดแล้วรักษาเส้นเลือดด้วยการหล่อสารละลายเฮปพารินความเข้มข้น 100 U/ml ในน้ำเกลือ

3. ในการศึกษานี้อาสาสมัครทุกคนเข้าร่วมในการทดลองทั้ง 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 : การทดสอบ glucose tolerance ตามคำแนะนำของ WHO[25] อาสาสมัครได้รับสารละลายกลูโคส 75 กรัม (250 มิลลิลิตร) ดื่มหมดภายใน 5 นาที เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวัดระดับกลูโคสในซีรัมที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากดื่มสารละลายกลูโคส

การทดลองที่ 2 : อาสาสมัครได้รับบอระเพ็ดขนาด 4 กรัม (8 แคปซูล) พร้อมดื่มน้ำ 200 มิลลิลิตร หลังรับประทานบอระเพ็ด 30 นาที อาสาสมัครดื่มสารละลายกลูโคส 75 กรัม (250 มิลลิลิตร) เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวัดระดับกลูโคสในซีรัมที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากดื่มสารละลายกลูโคส

การทดลองที่ 3 : อาสาสมัครได้รับบอระเพ็ดขนาด 6 กรัม (12 แคปซูล) พร้อมดื่มน้ำ 200 มิลลิลิตร หลังรับประทานบอระเพ็ด 30 นาที อาสาสมัครดื่มสารละลายกลูโคส 75 กรัม (250 มิลลิลิตร) เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวัดระดับกลูโคสในซีรัมที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากดื่มสารละลายกลูโคส

4. ระหว่างทำการทดลอง หลังจากอาสาสมัครรับประทานยาแล้ว ผู้วิจัยจัดให้อาสาสมัครอยู่ในห้องพักปรับอากาศ (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) มีเตียงหรือที่พักผ่อนให้อาสาสมัครได้พักผ่อนในขณะที่อยู่ในระหว่างการศึกษา และมีวิดีโอให้อาสาสมัครดูแล้วอยู่ในสภาวะผ่อนคลาย ไม่เครียด หวาดกลัว หรือมีอาการวิตกกังวลใด ๆ รวมทั้งไม่ให้มีการเคลื่อนไหวร่างกายมากเกินไปหรือออกกำลังระหว่างการทดลอง 3 ชั่วโมง อาสาสมัครทุกคนยังคงงดอาหาร ไม่ดื่มชา กาแฟ หรือเครื่องดื่มต่าง ๆ และไม่สูบบุหรี่ในระหว่างการทดสอบ เพื่อควบคุมปัจจัยภายนอกต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อการศึกษาได้

5. ในแต่ละการทดลองมีระยะหยุดพักก่อนเริ่มการทดลองใหม่ (washout period) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าบอระเพ็ดถูกขับออกจากร่างกายจนหมด

*โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาด้านจริยธรรมโดยคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน ของกระทรวงสาธารณสุข (ที่ สธ 0229/172 ลงวันที่ 20 สิงหาคม 2541

การศึกษาที่ 2

อาสาสมัคร

ศึกษาในอาสาสมัครคนไทยปกติจำนวน 6 ราย เป็นชาย 3 ราย หญิง 3 ราย อายุระหว่าง 21-32 ปี (เฉลี่ย 26.33 ± 1.52 ปี) น้ำหนัก 48-75 กิโลกรัม (เฉลี่ย 58.17 ± 4.22 กิโลกรัม)

วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากอาสาสมัครงดอาหาร 8 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ (antecubital vein) เพื่อตรวจวัดระดับน้ำตาลและอินซูลินในซีรัมก่อนทำการทดลอง หลังจากนั้นเปิดเส้นเลือดไว้สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือดครั้งต่อไปเหมือนกับการศึกษาที่ 1 ต่อมาอาสาสมัครทุกคนเข้าร่วมในทั้ง 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 อาสาสมัครไม่ได้รับบอระเพ็ด และการทดลองที่ 2 อาสาสมัครได้รับบอระเพ็ดขนาด 6 กรัม (12 แคปซูล) พร้อมกับน้ำดื่ม 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างสำหรับตรวจวัดระดับกลูโคสและอินซูลินในซีรัมเป็นระยะ ๆ ทุก 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที หลังจากได้หรือไม่ได้รับบอระเพ็ด ข้อปฏิบัติตัวของอาสาสมัครระหว่างทำการทดลองเหมือนการศึกษาที่ 1

การศึกษาที่ 3

อาสาสมัคร

ศึกษาวิจัยในอาสาสมัครคนไทยปกติ 2 กลุ่มการทดลอง โดยอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 จำนวน 12 ราย ประกอบด้วยชาย 6 ราย หญิง 6 ราย อายุระหว่าง 22-40 ปี (เฉลี่ย 27.75 ± 1.76 ปี) น้ำหนัก 42-65 กิโลกรัม (เฉลี่ย 51.04 ± 2.01 กิโลกรัม) ส่วนอาสาสมัครกลุ่มที่ 2 จำนวน 13 ราย ประกอบด้วยชาย 4 ราย หญิง 9 ราย อายุระหว่าง 20-40 ปี (เฉลี่ย 30.61 ± 1.75 ปี) น้ำหนัก 42-65 กิโลกรัม (เฉลี่ย 52.54+2.07 กิโลกรัม)

วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือดหลังจากอาสาสมัครแต่ละกลุ่มการทดลองงดอาหาร 8 ชั่วโมง โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ (median cubital vein) ก่อนได้รับบอระเพ็ด (0 สัปดาห์ ก่อนได้รับบอระเพ็ด) หลังจากนั้นอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 รับประทานบอระเพ็ด สวพ. ขนาด 1 กรัม (2 แคปซูล) วันละ 3 ครั้ง ก่อนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนอาสาสมัครกลุ่มที่ 2 รับประทานบอระเพ็ด รพ. ขนาด 1.05 กรัม (3 แคปซูล) วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเก็บตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มการทดลองหลังจากงดอาหาร 8 ชั่วโมง เป็นระยะ ๆ อีกทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน คือ สัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8 หลังจากได้รับบอระเพ็ด เพื่อตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี บันทึกน้ำหนักของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มการทดลองก่อนได้รับบอระเพ็ดและหลังได้รับบอระเพ็ด 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ระหว่างการทดลอง อาสาสมัครสามารถปฏิบัติกิจวัตรประจำวัน รับประทานอาหาร และทำงานได้ตามปกติ รวมทั้งงดเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ กรณีอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัยเมื่อผลการตรวจค่าทางชีวเคมีสูงมากกว่า 3 เท่าของเกณฑ์ปกติสูงสุด ให้มาเจาะเลือดหลังจากหยุดยาทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งพบว่าผลการตรวจเลือดกลับเป็นปกติ

การเก็บและการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดสำหรับตรวจสอบค่าทางโลหิตวิทยาใส่ในหลอดแก้วที่สะอาดและมีสารกันเลือดแข็งตัว (EDTA 1 มิลลิกรัม/เลือด 1 มิลลิลิตร) ตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยาโดยพารามิเตอร์ที่วัดได้แก่ white blood cell (WBC), neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit, mean

cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelet, mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT) และ platelet distribution width (PDW) สำหรับการตรวจสอบค่าทางชีวเคมีให้เก็บตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดแก้วที่สะอาดตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวแล้วจึงนำไปปั่นแยกซีรัม (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นซีรัมเก็บไว้ในตู้เย็น 2-8 องศาเซลเซียสทันที ตรวจวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีในซีรัมหลังจากเก็บตัวอย่างเลือดจนครบในวันนั้นโดยพารามิเตอร์ที่วัด ได้แก่ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), glucose, cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein (HDL), blood urea nitrogen (BUN), creatinine, albumin, total protein, total bilirubin, uric acid, sodium, potassium, chloride และ bicarbonate ระหว่างการตรวจวิเคราะห์ทำซีรัมควบคุมคุณภาพ (Precinorm® U, Precipath® U, Precipath® HDL/LDL-C, Precinorm® IM และ Precipath® IM) ควบคู่กันไปทุกวันที่ทำการตรวจวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

1. การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลเชิงปริมาณมากกว่า 2 กลุ่มใช้ one way ANOVA และถ้ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้วิธี Sheffe multiple comparisons

- การเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับกลูโคสในซีรัมที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม

2. การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลเชิงปริมาณที่มีการวัดในลักษณะเดิมซ้ำอีกหลายครั้งภายในกลุ่มเดียวกันใช้ repeated measured ANOVA และเปรียบเทียบข้อมูลที่แตกต่างกันใช้ Bonferroni multiple comparisons

- การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสหรืออินซูลินในซีรัมก่อนได้รับบอระเพ็ดกับหลังได้รับบอระเพ็ดที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

- การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาและทางชีวเคมีก่อนได้รับบอระเพ็ดกับหลังได้รับบอระเพ็ดที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ค่า p ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล

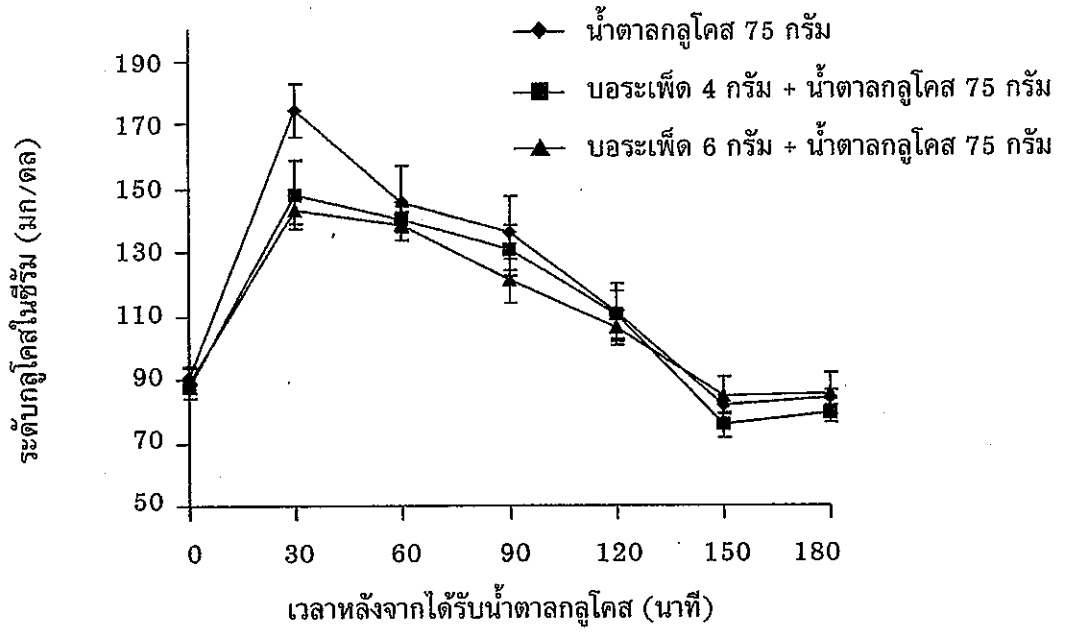
การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีโดยการตรวจ Qualitative ทาง TLC พบว่า ผงของเถาบอระเพ็ดแห้งที่ผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศรมีมาตรฐานตาม Thai Herbal Pharmacopoeia[23] และพบว่าบอระเพ็ดที่ผลิตจากทั้ง 2 แหล่งมีเอกลักษณ์ทางเคมีของส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดเหมือนกัน

การศึกษาที่ 1

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยทั้ง 9 ราย ทุกคนเข้าร่วมการทดลองตลอดการศึกษาวิจัยและไม่พบว่ามีอาการข้างเคียงหรือความผิดปกติใด ๆ ในการทดลองที่ 1 อาสาสมัครมีค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในซีรัมหลังงดอาหาร 90.78 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (มก/ดล) หลังจากดื่มสารละลายกลูโคส 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที พบว่าระดับกลูโคสในซีรัมเฉลี่ย 174.32, 145.39, 135.79, 110.99, 81.58 และ 84.09 มก/ดล ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 ค่าเฉลี่ยของระดับ

กลูโคสในซีรัมหลังงดอาหาร 87.49 มก/ดล หลังจากได้รับบอระเพ็ดขนาด 4 กรัม และดื่มสารละลายกลูโคส 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที พบว่าระดับกลูโคสในซีรัมเฉลี่ย 148.03, 140.32, 130.55, 110.14, 75.55 และ 79.19 มก/ดล ตามลำดับและพบว่าได้ผลคล้าย ๆ กันในการทดลองที่ 3 โดยค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในซีรัมหลังงดอาหาร 88.93 มก/ดล หลังจากได้รับบอระเพ็ดขนาด 6 กรัม และดื่มสารละลายกลูโคส 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที พบว่า ระดับกลูโคสในซีรัมเฉลี่ย 143.00, 138.23, 120.85, 106.27, 84.66 และ 85.11 มก/ดล ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในซีรัมของอาสาสมัครก่อนทำการทดลองในแต่ละการทดลอง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาระดับกลูโคสในซีรัมในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่า ค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในซีรัมในกลุ่มที่ได้รับบอระเพ็ดก่อนดื่มสารละลายกลูโคสต่ำกว่ากลุ่มที่ดื่มสารละลายกลูโคสอย่างเดียวที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที หลังจากดื่มสารละลายกลูโคส แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

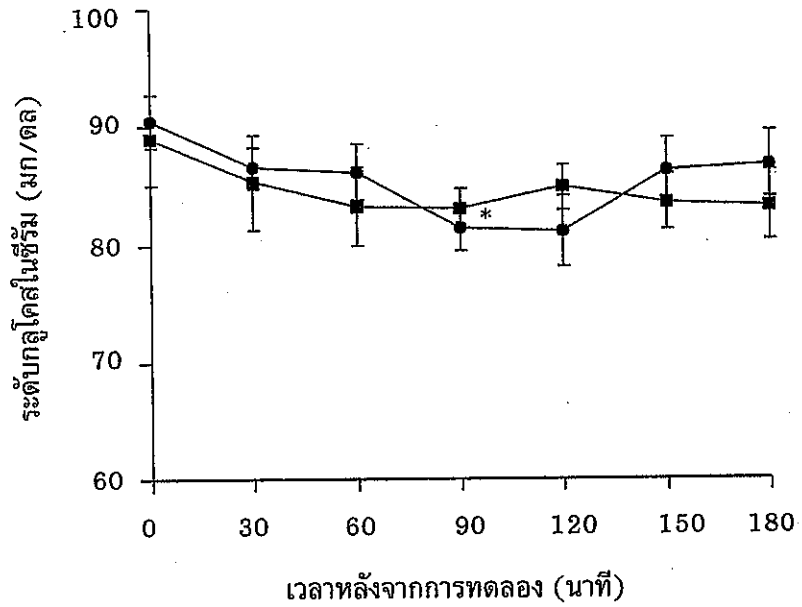


ภาพที่ 1 เปรียบเทียบระดับกลูโคสในซีรัมของกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม (n=9) กับกลุ่มที่ได้รับบอระเพ็ดซึ่งผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขนาด 4 หรือ 6 กรัม ก่อนได้รับน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม (n=9) ในอาสาสมัครคนไทยปกติ ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูป mean ± SEM

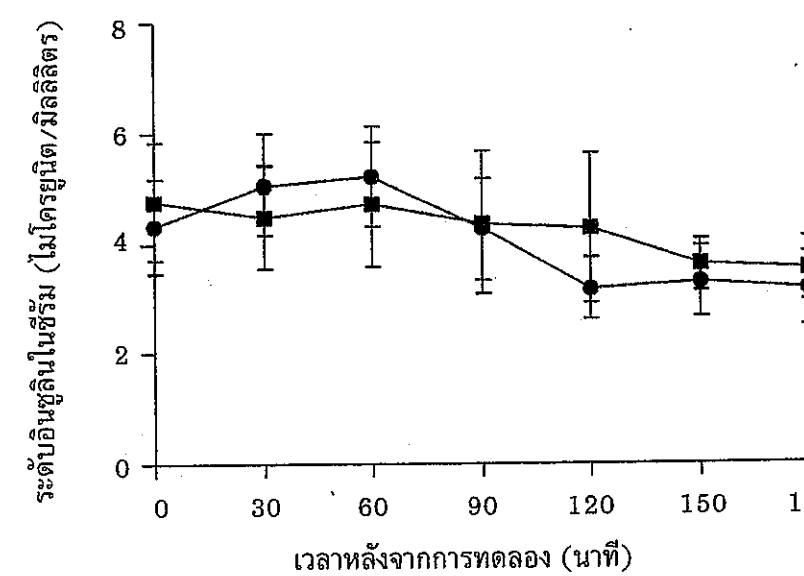
การศึกษาที่ 2

อาสาสมัครทั้ง 6 ราย เข้าร่วมการศึกษาตลอดโครงการ และไม่พบว่ามีอาการข้างเคียงหรือความผิดปกติใด ๆ ในการทดลองที่ 1 อาสาสมัครมีระดับกลูโคสและอินซูลินในซีรัมก่อนทำการทดลองเฉลี่ย 88.91 มก/ดล และ 4.76 ไมโครยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีหลังการทดลอง พบว่า ระดับกลูโคสและอินซูลินในซีรัมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับก่อนทำการทดลอง

(ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) ในการทดลองที่ 2 อาสาสมัครมีระดับกลูโคสและอินซูลินในซีรัมก่อนทำการทดลองเฉลี่ย 90.47 มก/ดล และ 4.30 ไมโครยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที พบว่าระดับกลูโคสในซีรัมลดลงต่ำกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ด (10%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังจากได้รับบอระเพ็ด 120 นาที ในขณะที่ระดับอินซูลินในซีรัมก่อนและหลังจากได้รับบอระเพ็ดไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 ระดับกลูโคสในซีรัมของอาสาสมัครคนไทยปกติที่ไม่ได้รับบอระเพ็ด (■) และที่ได้รับบอระเพ็ด (●) ซึ่งผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขนาด 6 กรัม (n=6) ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูป mean ± SEM
*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับก่อนได้รับบอระเพ็ด ($p<0.05$)



ภาพที่ 3 ระดับอินซูลินในซีรัมของอาสาสมัครคนไทยปกติที่ไม่ได้รับบอระเพ็ด (■) และที่ได้รับบอระเพ็ด (●) ซึ่งผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขนาด 6 กรัม (n=6) ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูป mean ± SEM

การศึกษาที่ 3

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยกลุ่มที่ 1 จำนวนทั้งหมด 12 ราย พบว่ามีอาสาสมัครเข้าร่วมการวิจัยจนครบตลอดโครงการ (8 สัปดาห์) จำนวน 10 ราย (83.33%) ส่วนอาสาสมัครหญิง 2 ราย (16.67%) ถูกคัดออกจากโครงการหลังจากได้รับบอระเพ็ด 4 และ 6 สัปดาห์ เนื่องจากช่วงก่อนมาเจาะเลือด อาสาสมัครทั้ง 2 รายรับประทานยาลดไข้แก้ปวดร่วมด้วย และตรวจพบว่ามีระดับเอนไซม์ AST และ ALT สูงมากกว่า 3 เท่าของเกณฑ์ปกติสูงสุด (โดยคนแรกมีระดับเอนไซม์ AST และ ALT เป็น 192 และ 369 ยูนิต/ลิตร หลังจากได้รับบอระเพ็ด 4 สัปดาห์ และคนที่สองมีระดับเอนไซม์ AST และ ALT เป็น 152 และ 318 ยูนิต/ลิตร หลังจากได้รับบอระเพ็ด 6 สัปดาห์) แต่อาสาสมัครทั้ง 2 รายไม่มีอาการข้างเคียงหรืออาการผิดปกติอื่น ๆ และผลการติดตามระดับเอนไซม์ AST และ ALT พบว่า ระดับเอนไซม์ AST และ ALT ลดลงสู่ระดับปกติหลังจากหยุดรับประทานบอระเพ็ดภายใน 2 เดือน

เนื่องจากอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 เริ่มรับประทานบอระเพ็ดก่อนอาสาสมัครกลุ่มที่ 2 เป็นเวลา 1 เดือน ทำให้ทราบผลการศึกษาของอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 ก่อน ซึ่งพบว่า มีอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย 2 ราย ดังกล่าวข้างต้น จึงปรับระยะเวลาการศึกษาวิจัยในอาสาสมัครกลุ่มที่ 2 เป็น 1 เดือน

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยกลุ่มที่ 2 จำนวนทั้งหมด 13 ราย พบว่ามีอาสาสมัครเข้าร่วมการวิจัยจนครบตลอดโครงการ (4 สัปดาห์) 7 ราย (53.85%) ส่วนอาสาสมัคร 6 ราย (46.15%) ถูกคัดออกจากโครงการวิจัยเนื่องจากมีอาสาสมัคร 3 ราย (ชาย 1 ราย หญิง 2 ราย) หลังจากได้รับบอระเพ็ด 2 สัปดาห์ เป็นไข้หวัดใหญ่จึงหยุดรับประทานบอระเพ็ดแล้วรับประทานยาลดไข้พาราเซตามอล ยาลดน้ำมูกคลอร์เฟนนิรามีน และยาคลายกล้ามเนื้อมัยโดคาล์มแทนเป็นเวลา 3-4 วัน ก่อนมาเจาะเลือด พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ในตับของอาสาสมัครทั้ง 3 ราย ดังนี้ คือ AST 238 ยูนิต/ลิตร, ALT 374 ยูนิต/ลิตร และ ALP 174 ยูนิต/ลิตร ในรายที่ 1 AST 507 ยูนิต/ลิตร, ALT 1014 ยูนิต/ลิตร และ ALP 108 ยูนิต/ลิตร ในรายที่ 2 และ AST 284 ยูนิต/ลิตร, ALT 1155 ยูนิต/ลิตร และ ALP 215 ยูนิต/ลิตร ในรายที่ 3 มีอาสาสมัครหญิง 1 ราย รับประทานยาลดไข้พาราเซตามอลก่อนมาเจาะเลือดสัปดาห์ที่ 2 และตรวจเลือดพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ AST และ ALT เป็น 359 และ 684 ยูนิต/ลิตร และมีอาสาสมัคร 2 ราย (ชาย 1 ราย หญิง 1 ราย) ดื่มเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ก่อนมาเจาะเลือดสัปดาห์ที่ 4 ตรวจเลือดพบระดับเอนไซม์ AST และ ALT ในอาสาสมัครชายและหญิงเปลี่ยนแปลงเป็น 603 และ 933 ยูนิต/ลิตร และเป็น 337 และ 636 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ และพบว่าระดับเอนไซม์ AST และ ALT ของอาสาสมัครทั้ง 6 ราย ค่อย ๆ ลดลงสู่ระดับปกติหลังจากหยุดรับประทานบอระเพ็ดภายใน 2 เดือน

จากการสอบถามอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มที่ร่วมการวิจัยจนครบตลอดโครงการ พบว่า หลังรับประทานบอระเพ็ดได้ 2 สัปดาห์ อาสาสมัคร 6 ราย (60%) ในกลุ่มที่ 1 (n=10) และอาสาสมัคร 4 ราย (57.14%) ในกลุ่มที่ 2 (n=7) มีความอยากอาหารเพิ่มขึ้น รู้สึกหิวบ่อยขึ้น และรับประทานอาหารได้จำนวนมากขึ้น แต่น้ำหนักของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่ม การทดลองหลังจากได้รับบอระเพ็ดไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาในอาสาสมัครที่ได้รับบอระเพ็ด สวพ. ขนาด 3 กรัมต่อวัน เป็น

เวลา 8 สัปดาห์ (n=10) พบว่าค่าเฉลี่ย WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, RBC, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, MCHC, RDW, platelet, MPV, PCT, PDW ของอาสาสมัครหลังจากได้รับบอระเพ็ดไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด ยกเว้นค่าเฉลี่ย WBC ของอาสาสมัครหลังจากได้รับบอระเพ็ด 4 สัปดาห์ สูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนได้รับบอระเพ็ดเป็น 5770 ± 1.03 เซลล์/ไมโครลิตร และหลังได้รับบอระเพ็ด 4 สัปดาห์เป็น 6540 ± 0.71 เซลล์/ไมโครลิตร ($p<0.05$) ส่วนอาสาสมัครที่ได้รับบอระเพ็ด รพ. ขนาด 3.15 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (n=7) พบว่าค่าเฉลี่ยทางโลหิตวิทยาระหว่างก่อนและหลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ดไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 ค่าชีวเคมีในซีรัมของอาสาสมัครคนไทยปกติที่ได้รับบอระเพ็ดซึ่งผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขนาด 3 กรัมต่อวัน (n=10) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

พารามิเตอร์ทางชีวเคมี	เวลาหลังจากได้รับบอระเพ็ด (สัปดาห์)				
	0	2	4	6	8
AST (U/L)	20.00 ± 8.01	22.90 ± 9.49	36.90 ± 49.09	38.40 ± 36.00	29.50 ± 16.17
ALT (U/L)	9.80 ± 3.74	20.20 ± 8.82	27.50 ± 24.94	28.80 ± 20.60	30.50 ± 28.22
ALP (U/L)	61.00 ± 15.64	59.00 ± 13.99	58.70 ± 13.06	58.80 ± 13.84	63.00 ± 14.84
Total bilirubin (mg/dl)	0.91 ± 0.29	0.83 ± 0.34	0.08 ± 0.55	0.78 ± 0.41	0.68 ± 0.56
Glucose (mg/dl)	84.33 ± 7.62	87.30 ± 3.80	87.27 ± 4.93	80.56 ± 5.00	84.56 ± 4.58
Cholesterol (mg/dl)	186.95 ± 31.85	193.60 ± 32.30	192.59 ± 28.22	198.91 ± 31.01	192.45 ± 38.13
Triglyceride (mg/dl)	74.17 ± 15.64	77.76 ± 28.67	83.89 ± 33.56	71.33 ± 27.68	105.89 ± 47.57
HDL (mg/dl)	52.59 ± 11.30	52.97 ± 10.80	56.73 ± 12.40	57.39 ± 10.92	52.38 ± 9.33
Total protein (g/dl)	7.62 ± 0.55	7.69 ± 0.39	7.65 ± 0.52	7.78 ± 0.56	7.79 ± 0.50
Albumin (g/dl)	4.55 ± 0.35	4.79 ± 0.28	4.69 ± 0.33	4.79 ± 0.34	4.79 ± 0.37
BUN (mg/dl)	10.68 ± 3.09	10.36 ± 1.29	10.15 ± 3.24	11.65 ± 2.48	10.58 ± 4.33
Creatinine (mg/dl)	0.98 ± 0.16	0.96 ± 0.18	0.97 ± 0.18	1.13 ± 0.18	1.01 ± 0.26
Uric acid (mg/dl)	5.67 ± 1.77	5.54 ± 1.79	5.75 ± 2.05	5.94 ± 2.08	5.57 ± 1.76
Sodium (mmol/L)	138.50 ± 4.17	138.30 ± 0.67	141.30 ± 1.06	141.20 ± 3.01	141.40 ± 1.07
Potassium (mmol/L)	4.03 ± 0.25	4.09 ± 0.34	4.10 ± 0.19	3.98 ± 0.14	4.00 ± 0.27
Chloride (mmol/L)	102.30 ± 3.43	109.60 ± 1.58*	112.90 ± 2.18*	108.70 ± 2.00*	113.30 ± 1.70*
Bicarbornate (mmol/L)	21.54 ± 1.73	21.62 ± 1.52	22.31 ± 1.55	21.82 ± 0.99	23.75 ± 1.60

ข้อมูลทุกค่าแสดงในรูป mean ± SD

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับก่อนได้รับบอระเพ็ด ($p<0.05$)

ผลการตรวจค่าทางชีวเคมี

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจค่าทางชีวเคมีในอาสาสมัครที่ได้รับบอระเพ็ด สวพ. ขนาด 3 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (n=10) พบว่าค่าเฉลี่ย AST, ALT, ALP, total bilirubin, glucose, cholesterol, triglyceride, HDL, total protein, albumin, BUN, uric acid, sodium, potassium และ bicarbonate ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด ส่วนระดับเอนไซม์ AST และ ALT มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยระดับ AST เริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 แต่ก็ยังสูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ดค่าเฉลี่ยcreatinine หลังจากได้รับบอระเพ็ด 6 สัปดาห์สูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และค่าเฉลี่ย chloride หลังจากได้รับบอระเพ็ด 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์สูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนอาสาสมัครที่ได้รับบอระเพ็ด รพ. ขนาด 3.15 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (n=7) พบว่า ค่าเฉลี่ยทางชีวเคมีหลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ดไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด ยกเว้นค่าเฉลี่ย ALT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก่อนได้รับบอระเพ็ดเป็น 13.43 ± 4.86 ยูนิต/ลิตร และหลังได้รับบอระเพ็ด 4 สัปดาห์ เป็น 22.43 ± 8.56 ยูนิต/ลิตร ($p<0.05$) หลังจากอาสาสมัครรับประทานบอระเพ็ดครบ 4 สัปดาห์

จากการพิจารณาระดับเอนไซม์ในตับ (AST และ ALT) ของอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มที่ร่วมการวิจัยจนตลอดโครงการ พบว่า อาสาสมัครที่ได้รับบอระเพ็ด สวพ. และบอระเพ็ด รพ. จำนวน 5 และ 1 ราย ตามลำดับ มีระดับเอนไซม์ในตับสูงกว่าระดับปกติ (ใช้เกณฑ์สูงสุด) (ตารางที่ 2) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ระดับเอนไซม์ในตับ (สูงกว่าระดับปกติโดยใช้เกณฑ์สูงสุด) หลังจากอาสาสมัครคนไทยปกติได้รับบอระเพ็ดซึ่งผลิตโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (อาสาสมัคร 1-5) ขนาด 3 กรัมต่อวัน (n=10) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และได้รับบอระเพ็ดซึ่งผลิตโดยโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร (อาสาสมัคร 6) ขนาด 3.15 กรัมต่อวัน (n=7) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

อาสาสมัคร	เพศ	อายุ (ปี)	AST ยูนิต/ลิตร (สัปดาห์หลังจากได้รับบอระเพ็ด)	ALT ยูนิต/ลิตร (สัปดาห์หลังจากได้รับบอระเพ็ด)
1	ชาย	40	47[2], 112[4], 100[6], 57[8]	61[4], 64[8]
2	ชาย	25	45[6], 55[8]	84[4], 65[6], 67[8]
3	หญิง	26		40[2]
4	หญิง	34		96[8]
5	ชาย	37	45[6]	
6	หญิง	33		33[4]

ค่าปกติของ AST: หญิง 0-32 ยูนิต/ลิตร, ชาย 0-38 ยูนิต/ลิตร

ค่าปกติของ ALT: หญิง 0-31 ยูนิต/ลิตร, ชาย 0-41 ยูนิต/ลิตร

วิจารณ์

จากการศึกษาผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและความปลอดภัยของบอระเพ็ดในอาสาสมัครปกติ บอระเพ็ดขนาด 4 และ 6 กรัม ไม่ทำให้ oral glucose tolerance ดีขึ้น ซึ่งต่างจากผลการศึกษาในสัตว์ทดลองที่พบว่า เมื่อกรอกส่วนสกัด 95% เอทานอลของเถาบอระเพ็ดแก่หนูขาวปกติ ทำให้ glucose tolerance ดีขึ้น[8] บอระเพ็ดขนาด 6 กรัม มีผลลดระดับกลูโคสในซีรัมของอาสาสมัครอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากรับประทานบอระเพ็ด 120 นาที แต่อาสาสมัครยังคงมีระดับกลูโคสในซีรัมไม่เปลี่ยนแปลงมากนักและอยู่ในช่วงค่าปกติจึงไม่พบอาการจากภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำหรือเกิดอาการผิดปกติใด ๆ ซึ่งถือว่าการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่มีความสำคัญทางคลินิก ในขณะที่ระดับอินซูลินในซีรัมไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าบอระเพ็ดไม่ได้กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจาก β-cell ของตับอ่อน การที่บอระเพ็ดทำให้ระดับกลูโคสในซีรัมลดลงโดยระดับอินซูลินไม่ได้เพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของบอระเพ็ดเกิดผ่านกลไกอื่นมากกว่าที่จะไปเปลี่ยนแปลงระดับอินซูลินแต่การศึกษาในสัตว์ทดลองโดย Anulukanapakorn et al.[8] พบว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของเถาบอระเพ็ดและส่วนสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่ละลายในบิวทานอลและที่ละลายในน้ำไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวปกติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากบอระเพ็ดที่ใช้มีขนาดและรูปแบบแตกต่างกันและอาจเนื่องจากความแตกต่างระหว่างสัตว์ทดลองกับคนทำให้มีความไวในการตอบสนองต่อบอระเพ็ดแตกต่างกัน

ผลของการรับประทานบอระเพ็ด สวพ. และบอระเพ็ด รพ. พบว่า อาสาสมัครที่เข้าร่วมการทดลองจนครบตลอดการศึกษาหลังจากรับประทานบอระเพ็ด สวพ. (60%) และรับประทานบอระเพ็ด รพ. (57.14%) มีความรู้สึกอยากอาหารมีอาการหิวบ่อยขึ้นและรับประทานอาหารได้มากขึ้น อาการเหล่านี้อาจเนื่องมาจากสรรพคุณของบอระเพ็ดซึ่งมีรสขมทำให้เจริญอาหาร[2, 3]

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาหลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด สวพ. ขนาด 3 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และการรับประทานบอระเพ็ด รพ. ขนาด 3.15 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า บอระเพ็ดไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา แม้ว่าค่าเฉลี่ย WBC หลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด สวพ. 4 สัปดาห์สูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ยังอยู่ในช่วงค่าปกติและเกิดขึ้นเพียงช่วงเวลาเดียวและหลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด 6 และ 8 สัปดาห์ค่าเฉลี่ย WBC ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด ดังนั้น บอระเพ็ดไม่น่าจะมีผลเพิ่ม WBC พบผลเช่นเดียวกันกับการศึกษาพิษเรื้อรังในหนูขาวโดยกรอกสารสกัดด้วยเอทานอลของบอระเพ็ด เป็นเวลา 6 เดือน ไม่พบความแตกต่างที่แปรผันตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับในหนูทั้ง 2 เพศ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม[15]

ผลการตรวจค่าทางชีวเคมีหลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด สวพ. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และหลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด รพ. เป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า ค่าเฉลี่ย ALP, total bilirubin, glucose, cholesterol, triglyceride, HDL, total protein, albumin, BUN, และ uric acid ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด และค่าของแต่ละพารามิเตอร์อยู่ในช่วงค่าปกติ การที่ระดับกลูโคสในซีรัมของอาสาสมัครก่อนและหลังจากได้รับบอระเพ็ดไม่เปลี่ยนแปลง อาจเนื่องมาจากคนปกติมีระบบควบคุมสภาวะสมดุล (homeostatic regulatory system) เช่น ระบบประสาท ระบบต่อมไร้ท่อ ฯลฯ ทำงานเชื่อมโยงกันอย่างเป็นระบบเพื่อปรับหรือให้

คงอยู่ในสภาวะสมดุลอยู่เสมอ ซึ่งกลไกควบคุมสภาวะสมดุลของระดับกลูโคสในซีรัมนี้ (glucose homeostatic mechanism) ทำงานได้อย่างสมบูรณ์เต็มที่ในคนปกติแต่บกพร่องในคนเป็นโรคเบาหวาน[26] การทำงานได้อย่างเต็มที่ของกลไกนี้อาจไปบดบังฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของบอระเพ็ดในอาสาสมัครปกติได้ เช่นเดียวกันกับการศึกษาพิษเรื้อรังโดยการกรอกสารสกัดด้วยเอทานอล ของเถาบอระเพ็ดแก่หนูขาวปกติเป็นเวลา 6 เดือน ไม่ทำให้ระดับกลูโคสในซีรัมเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อกรอกสารสกัดนี้ขนาดสูงกว่าขนาดที่ใช้ในคน (64 เท่า) พบว่าสามารถลดระดับกลูโคสในซีรัมได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม[15] แต่ระดับกลูโคสในซีรัมที่ลดลงนี้อาจจะไม่ได้เกิดจากฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของบอระเพ็ดโดยตรง เนื่องจากพบว่าสารสกัดที่ใช้ในขนาดสูงนี้ทำให้ระดับเอนไซม์ในตับสูง (ALT และ ALP) และพบว่ามีพยาธิสภาพที่ตับ (focal liver cell hyperplasia) ด้วย[15] เป็นไปได้ที่เซลล์ตับบางส่วนถูกทำลายจากการใช้บอระเพ็ดขนาดสูงมาก ๆ ทำให้กระบวนการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) ซึ่งเกิดขึ้นที่ตับลดน้อยลง เป็นผลทำให้ระดับกลูโคสในซีรัมลดลง

การตรวจระดับเอนไซม์ในตับของอาสาสมัครที่ได้รับบอระเพ็ด สวพ. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ย AST และ ALT มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดย AST เริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 แต่ก็ยังสูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ด อย่างไรก็ตาม ระดับเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงนี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับก่อนได้รับบอระเพ็ดและยังอยู่ในช่วงค่าปกติในขณะที่ค่าเฉลี่ย ALT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด รพ. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แสดงว่าบอระเพ็ดอาจมีผลทำให้ระดับเอนไซม์ในตับเพิ่มขึ้น

ค่าเฉลี่ย creatinine หลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด สวพ. ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด แม้ว่าค่าเฉลี่ย creatinine หลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด สวพ. เป็นเวลา 6 สัปดาห์สูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ก็ตาม แต่การเปลี่ยนแปลงค่า creatinine ในอาสาสมัครยังอยู่ในช่วงค่าปกติและในสัปดาห์ที่ 8 ค่าเฉลี่ย creatinine ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด แสดงว่าบอระเพ็ดไม่น่าจะมีผลทำให้เพิ่มค่า creatinine เนื่องจากพารามิเตอร์ที่เปลี่ยนแปลงนี้เกิดเพียงช่วงเวลาเดียว เช่นเดียวกับการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วยเอทานอลของเถาบอระเพ็ดในหนูขาว[15]

ผลการตรวจอิเล็กโทรไลต์ พบค่าเฉลี่ย sodium, potassium, chloride และ bicarbonate หลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด รพ. ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด ส่วนค่าเฉลี่ย chloride หลังจากอาสาสมัครได้รับบอระเพ็ด สวพ. เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ สูงกว่าก่อนได้รับบอระเพ็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ sodium, potassium และ bicarbonate ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับบอระเพ็ด การเพิ่ม chloride นี้อาจเป็นผลมาจากบอระเพ็ด หรืออาจเกิดจากปัจจัยอื่นที่ควบคุมไม่ได้ เช่น การรับประทานอาหาร อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติหรือสูงกว่าค่าปกติเพียงเล็กน้อยในบางช่วงเวลา และไม่มีความสัมพันธ์กับอิเล็กโทรไลต์ตัวอื่น อาจถือว่าไม่มีความสำคัญทางคลินิก

จากผลการศึกษาวิจัยในอาสาสมัครปกตินี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้บอระเพ็ดอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานมีแนวโน้มทำให้ระดับเอนไซม์ในตับบางตัวเพิ่มขึ้น ดังนั้น ถ้านำสมุนไพรนี้ไปรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานเป็นระยะเวลานาน ควรเพิ่มความระมัดระวังและต้องติดตามผลการตรวจทางชีวเคมีเป็นระยะ ๆ โดยเฉพาะระดับเอนไซม์ในตับ เพราะความไวต่อการตอบสนองต่อบอระเพ็ดในแต่ละคนแตกต่างกัน ถ้าพบว่าระดับเอนไซม์ในตับสูงผิดปกติ

ควรหยุดรับประทานบอระเพ็ดทันทีและหลีกเลี่ยงการใช้สมุนไพรในผู้ที่เคยมีประวัติหรือป่วยเป็นโรคตับและการใช้ร่วมกับยาอื่นที่มีผลต่อการทำงานของตับ

สรุป

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและความปลอดภัยของบอระเพ็ดในอาสาสมัครคนไทยปกติ จากผลการศึกษาพบว่า การรับประทานบอระเพ็ดขนาด 4 กรัม หรือ 6 กรัมครั้งเดียวไม่ทำให้ glucose tolerance ดีขึ้น และการรับประทานบอระเพ็ดขนาด 6 กรัมครั้งเดียวไม่เพิ่มระดับอินซูลิน ส่วนการรับประทานบอระเพ็ด สวพ. ขนาด 3 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ามีอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย 2 ราย (16.67%) เนื่องจากรับประทานบอระเพ็ดร่วมกับยาอื่น และตรวจพบว่ามีระดับเอนไซม์ AST และ ALT สูงกว่า 3 เท่าของเกณฑ์ปกติสูงสุด และมีอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยจนครบตลอดโครงการที่เหลืออีก จำนวน 10 ราย (83.33%) ในขณะที่การรับประทานบอระเพ็ด รพ. ขนาด 3.15 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีอาสาสมัครออก จากโครงการวิจัย 6 ราย (46.15%) ในจำนวนนี้ มีอาสาสมัคร 1 รายที่ออกจากโครงการวิจัยเนื่องจากรับประทานบอระเพ็ดร่วมกับยาอื่น และตรวจพบว่ามีระดับเอนไซม์ AST และ ALT สูงกว่า 3 เท่าของเกณฑ์ปกติสูงสุดและมีอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยจนครบตลอดโครงการที่เหลืออีกจำนวน 7 ราย (53.85%) อาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยตลอดการศึกษาหลังจากได้รับบอระเพ็ด สวพ. 6 ราย (60%) และบอระเพ็ด รพ. 4 ราย (50.14%) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ รู้สึกหิวบ่อยขึ้นและรับประทานอาหารได้จำนวนมากขึ้น ในขณะที่น้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงตลอดการศึกษาและพบว่าบอระเพ็ดไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา แต่การรับประทานบอระเพ็ด สวพ. จนครบตลอดโครงการมีแนวโน้มทำให้ระดับเอนไซม์ในตับโดยเฉพาะ AST และ ALT เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การรับประทานบอระเพ็ด รพ. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีผลทำให้ระดับเอนไซม์ ALT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ระดับเอนไซม์นี้ยังอยู่ในช่วงค่าปกติ แสดงให้เห็นว่าบอระเพ็ดอาจมีผลทำให้ระดับเอนไซม์ในตับเพิ่มขึ้น ดังนั้น การใช้บอระเพ็ดเป็นระยะเวลานานในผู้ป่วยโรคเบาหวานควรต้องมีการติดตามค่าทางชีวเคมีเป็นระยะ ๆ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์วิษณุ ธรรมลิขิตกุล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โรงพยาบาลศิริราช ที่ให้คำปรึกษาแนะนำด้านการวิจัยทางคลินิก เภสัชกรหญิง สุภาภรณ์ ปิติพร โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ที่ได้เตรียมเถาบอระเพ็ดแห้งบรรจุแคปซูล นางนัยนา วัฒนศรี ฝ่ายไวรัสตับอักเสบ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจไวรัสตับอักเสบ นายสมเกียรติ ปัญญามั่ง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจทางโลหิตวิทยา นายสุทธิพล อุดมพันธุรัก สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โรงพยาบาลศิริราช ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นางปราณี ชวลิตธำรง ดร.อัญชลี จูฑะพุทธิ และ ดร.กัลยา อนุลักขณาปกรณ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการเขียนรายงานนี้และตรวจแก้ไข และนายอัมพร คุณเอนก อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้การสนับสนุนในการศึกษาวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการศึกษาวิจัยและปฏิบัติตามคำแนะนำเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. Smitinand T. Thai plant Names, Botanical Names Vernacular Names. Bangkok : Funny Publishing, 1980 : p.331-2.
2. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. Manual for Cultivation Production and Utilization of Herbal Medicines in Primary Health Care. Bangkok : The War Veterans Organization Press; 1990 : 121.
3. ASEAN Countries. Standard of Asean Herbal Medicine vol.1. Jargata : Aksara Buana Printing, 1993 : p.421-43.
4. Kongsaktrakoon B, Temsiririrkkul R, Nakornchai S, Suvitayavat W, Wongkrajang Y. The antipyretic effects of *Tinospora crispa* Mier ex Hook F.&Thoms. Mahidol J Pharm Sci 1994; 21 : 1-6.
5. Higashino H, Suzuki A, Tanaka Y, Pootakham K. Inhibitory effects of Siamese *Tinospora crispa* extracts on the carrageenin-induced foot pad edema in rats. Nippon Yakurigaku Zasshi 1992; 100 : 339-44.
6. Noor H, Ashcroft SJH. Antidiabetic effects of *Tinospora crispa* in rats. J Ethnopharmacol 1989; 27 : 149-61.
7. Noor H, Hammonds P, Sutton R, Ashcroft SJH. The hypoglycemic and insulinotropic activity of *Tinospora crispa* : studies with human and rat islets and HIT-T15 B cells. Diabetologia 1989; 32 : p.354-9.
8. Anulukanapakorn K, Pancharoen O, Bansiddhi J. Hypoglycemic Effect of *Tinospora Crispa* (Linn.) Mier ex Hook f. & Thoms (Menispermaceae) in Rats. Bull Dep Med Sci 1999; 41 : 231-43.
9. Gimlette JD, Burrkill LH, Ismail M. The medicinal book of Malayan Medicine. Gard Bull Str Settle 1930; 6 : 323-474.
10. Burkill LH. A diction of the economic products of the Malay Penisula : Vol II. Guala Lumpur : Ministry of Agriculture and Corperations, 1966 : p.2202-5.
11. Hirsohhorn HH. Botanical remedies of the former Dutch East Indies (Indonesia) Part II: Dicotyledons up to and including Legummosae. J Ethnopharmacol 1983; 8 : p.65-96.
12. Noor H, Hammonds P, Ashcroft SJH. An aqueous extract from *Tinospora Crispa* (Linn.) Mier ex Hook f. & Thoms lowers blood glucose levels in alloxan-diabetic rats and stimulates insulin release in rat islets and man. Diabetologia 1988; 31: 526A-27A.
13. Noor H, Aschroft SJH. The mechanism of insulinotropic activity of *Tinospora Crispa* extract. Abstr First International Congress on Ethnopharmacology, Strasbourg France 1990 : p.106.
14. Noor H, Aschroft SJH. Pharmacological characterisation of the antihyperglycaemic properties of *Tinospora crispa* extract. J Ethnopharmacol 1998; 62 : 7-13.
15. Chavalittumrong P, Attawish A, Chuthaputti A, *et al.* Toxicological Study of Crude Extract of *Tinospora Crispa* (Linn.) Mier ex Hook f. & Thoms. Thai J Pharm Sci 1997; 21 : 199-210.
16. พูนพัฒน์ ส, เพ็งคล้าย จ. ก้าวไปกับสมุนไพร. กรุงเทพฯ : ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2530 : หน้า 93-103.
17. เที่ยงบูรณธรรม ว. พจนานุกรมโรคและสมุนไพร. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์, 2533 : หน้า 118-20.

18. ศรลัมพ์ พ. สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ = medicinal plants in siri ruckhachati garden. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ฟ, 2535 : หน้า 204.
19. เพ็ชรพลาย ด. สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม). กรุงเทพฯ : รุ่งเรืองสาส์น การพิมพ์, 2541: 70-1.
20. บรรจบ ม, ไชยราช ส. สมุนไพรพื้นบ้านนครราชสีมา. นนทบุรี : เอส อาร์ พริ้นติ้ง แมสโปรดักส์, 2541 : หน้า 4.
21. Forman LL. Flora of Thailand 1991; 5(3): 300-65.
22. Backer CA, Bakhuizen van den Brink RC. Flora of Java 1963; 1(85) : 151-8.
23. Thai Herbal Pharmacopeia. Vol 1. Nonthaburi : Department of Medical Sciences, 1995 : p. 9-16.
24. Bennett PH. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. In : Kahn CR and Weir GC, editors Joslin's Diabetes Mellitus. 13th ed. USA : Lea & Febiger, 1995 : 193-200.
25. Diabetes mellitus. Report of WHO study group. Tech Rep Ser 1985; 727 : 1-113.
26. Cryer PE. Glucose counterregulatory mechanisms in normal and diabetic man. In : Nattras M and Santiago, editors Recent Advances in Diabetes. London : Churchill Livingstone, 1984 : p.73-90.