

สำนักหอสมุด



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเคลื่อนไหวและการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในลำไส้เล็กของหนูที่ได้รับการ
ป้อนสารสกัดขิงหรือสารสำคัญ (6-gingerol)

Small intestinal motility and glucose absorption in rat fed with
ginger extract or 6-gingerol

โดย

รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน 15 ต.ย. 2564

เลขทะเบียน 1099542

เลขเรียกหนังสือ 2 0K

495

-265

ก 1858

2561

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

Abstract

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), is commonly known as a food spice and has long been used as herbal medicine. Its rhizome contains several active constituents, of which [6]-gingerol is the most common substance. The medicinal properties of ginger and [6]-gingerol include treating conditions, inter-alia, obesity, diabetes, nausea and vomiting and diarrhea reflecting their action on many diseases. The present study therefore aims to investigate the effect of oral administration of ginger extract and [6]-gingerol on contraction, glucose absorption and histological changes of rats isolated duodenum, jejunum and ileum. The rats were orally administered with the ginger extract (10, 20 and 100 mg/kg/d) or [6]-gingerol (2 mg/kg/d) for 7 days, followed by determining the contractile responses to Acetylcholine (ACh) of rat isolated duodenum, jejunum and ileum and their glucose absorptions in the model of everted intestinal sacs and histology (H&E) were assessed. ACh-induced contractions were reduced in all parts of the small intestine isolated from rats orally treated with the ginger extract (20 and 100 mg/kg/d) or [6]-gingerol (2 mg/kg/d). The E_{max} decreased 15-30%, while EC_{50} increased 1-3 folds compared to the control. Glucose absorption and the microscopic structures of all segments of the small intestine were not altered when compared to the control. The findings indicated that ginger extract and [6]-gingerol could inhibit the contraction of all segments of the small intestine but had no effect on their glucose absorption and histology. Thus, our results support the use of ginger for gastrointestinal disorders and ginger can be used safely.

Keywords: Ginger, [6]-Gingerol, Small intestine, Motility, Glucose absorption

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
ขอบเขตของโครงการวิจัย	5
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	6
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	
การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง	10
การเตรียมสารสกัดขิง	10
การศึกษาผลของสารสำคัญในขิงที่มีต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก	11
การศึกษาการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Everted gut sac	12
การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์	13
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	
ผลของการให้กินสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol ต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก	15
ผลของการให้กินสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol ต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส	17
ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้เล็กหนูที่ได้กินสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol	19
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	20
บรรณานุกรม	21

บทที่ 1 บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ขิง (*Zingiber officinale* Rosc) เป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ส่วนของรากหรือเหง้า (rhizome) มีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง อาทิเช่น ขับลม แก้อาเจียน แก้ไอ ขับเสมหะ ขับเหงื่อ ขับลม แก้ไข้ แก้นอนไม่หลับ และแก้คลื่นไส้อาเจียน ขิงมีสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ที่สำคัญ คือ gingerols ซึ่งประกอบไปด้วย 4, 6, 8, 10 และ 12-gingerol โดย 6-gingerol พบมากที่สุด มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์พอสมควรที่สนับสนุนสรรพคุณทางยาของขิงและสารสำคัญ เช่นฤทธิ์ลดความดันเลือด ฤทธิ์ด้านการคลื่นไส้อาเจียน ฤทธิ์ลดการสะสมของไขมัน และฤทธิ์ในการต้านเบาหวาน เป็นต้น

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของขิง พบว่ามีรายงานอยู่บ้างโดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหาร แต่ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง คือ การแยกลำไส้ออกมา และหยดสารสกัดขิงหรือสารสำคัญ เพื่อศึกษาผลของการออกฤทธิ์โดยตรงของสารสกัดขิงและสารสำคัญที่มีต่อการหดตัวของลำไส้ แต่ยังคงขาดการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีการให้กินสารสกัดขิงหรือสารสำคัญอย่างต่อเนื่อง เพื่อดูผลว่า การกินสารสกัดขิงมีผลอย่างไรต่อการทำงานของลำไส้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเราต้องการให้กินขิงเพื่อหวังผลการออกฤทธิ์ในการป้องกัน งานวิจัยนี้จึงออกแบบโดยให้สัตว์ทดลองกินสารสกัดขิงหรือสารสำคัญที่พบมากที่สุดในการขิง คือ 6-gingerol ในขนาดที่มีการเทียบเคียงกับขนาดที่ให้คนกิน โดยกินต่อเนื่องกันเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ จากนั้นจึงศึกษาการทำงานของลำไส้โดยวัดการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก การดูดซึมน้ำตาลกลูโคส รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้ควบคู่กันไปด้วย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดขิงและ [6]-gingerol ที่มีต่อการหดตัวของลำไส้เล็กของหนู
- 2.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดขิงและ [6]-gingerol ที่มีต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสในลำไส้เล็กของหนู
- 2.3 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดขิงและ [6]-gingerol ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลำไส้เล็กส่วนต่าง ๆ

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ศึกษาผลของสารสกัดขิงและสารสำคัญ คือ 6-gingerol ที่มีต่อการทำงานในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ การเคลื่อนไหวและการดูดซึมน้ำตาล รวมถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็กในหนูทดลองที่ได้รับสารทางปากเป็นเวลา 7 วัน

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากการทบทวนวรรณกรรมมีรายงานว่า การศึกษาในหลอดทดลองโดยการแยกลำไส้เล็กของสัตว์ทดลอง เช่น หนูแรท ออกมา แล้วหยดสารสกัดขิงหรือสารสำคัญลงบนลำไส้ มีผลยับยั้ง muscarinic

receptor และ 5-HT receptor ทำให้การหดตัวของลำไส้เล็กลดลง ดังนั้นในการวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าการหดตัวของลำไส้เล็กที่มีต่อ Ach ก็น่าจะลดลงในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขิงหรือสารสำคัญโดยการกินอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนฤทธิ์ของขิงต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสนั้นยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าสารสกัดขิงหรือสารสำคัญมีผลอย่างไร แต่มีรายงานว่าสารสกัดขิงมีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฉะนั้นจึงเป็นไปได้ว่าขิงอาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้กลไกการออกฤทธิ์ของขิงและสารสำคัญ รวมทั้งเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการออกแบบการศึกษาต่อยอดในระดับคลินิกเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเบาหวานของขิงหรือต้านเบาหวาน ในกรณีต่าง ๆ โดยเฉพาะการให้กินขิงเพื่อลดผลข้างเคียงจากการได้รับเคมีบำบัดต่อไป

5. การทบทวนวรรณกรรม) สารสนเทศ/information) ที่เกี่ยวข้อง

ขิง (ginger) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber officinale* Rosc. อยู่ในวงศ์ ZINGIBERACEAE และชื่อเรียกอื่น ๆ ตามท้องถิ่นของประเทศไทยว่า ขิงแกลง ขิงแดง ขิงเผือก สะเอ เป็นต้น มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ เป็นพืชไม้ล้มลุกมีลำต้นอยู่ใต้ดิน (Rhizome) ที่เรียกว่า เหง้า มีลักษณะกลมและแบน มีสีเหลือง ลำต้นแท้สูงประมาณ 50-100 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นข้อ ๆ เนื้อในมีสีขาวหรือเหลืองอ่อน ส่วนลำต้นเทียมจะมีขนาดเท่าแห่งดินสอ มีกาบหรือโคนใบหุ้ม ใบมีสีเขียวมีลักษณะเป็นรูปหอก เป็นใบชนิดใบเดี่ยวออกสลับกันเป็นสองแถว ฐานใบเรียวยาวแหลม มีความกว้างและความยาว 2 และ 20 เซนติเมตร ตามลำต้น ก้านใบจะยาวห่อหุ้มลำต้น ดอกมีลักษณะเป็นช่อออกจากลำต้นใต้ดินและแทงขึ้นมาจากเหง้า ก้านช่อดอกยาว 20 เซนติเมตร แต่ละดอกจะมีกาบสีเขียวปนแดง เมล็ดหรือผลมีลักษณะกลมโตและแข็ง แบ่งออกเป็น 3 พู ภายในจะมีเมล็ดสีดำ

เหง้า (rhizome) มีความเผ็ดร้อน ซึ่งจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุของขิง มีสรรพคุณในการขับลม แก้ อาเจียน แก้ไอ ขับเสมหะ ขับเหงื่อ ขับลม แก้ไข้ แก้นอนไม่หลับ และแก้คลื่นไส้อาเจียน (นันทวัน, 2539) สารสกัดจากเหง้าขิงมีฤทธิ์การลดคอเลสเตอรอลในเลือดและลดความดันโลหิตสูง เนื่องจากไปยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ arginase และ ACE (angiotensin I converting enzyme) (Ayodele Jacob Akinyemi et al, 2015 and Akinyemi et al, 2013) สารสกัดจากขิงสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน ไข้หวัด การอักเสบ โรคกระเพาะ และป้องกันโรคอ้วน (Ruchi Badoni Semwal et al, 2015) นอกจากนี้ การศึกษาของ Arablou และคณะในปี 2014 พบว่าการได้รับขิงในขนาด 1600 มก สามารถลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือดได้ โดยการเพิ่มความไวต่ออินซูลินในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 2

มีการศึกษาจำนวนมากที่รายงานฤทธิ์การต้านเบาหวานของขิงทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาในคนมีรายงานว่าขิงสามารถป้องกันการอาเจียนซึ่งเป็นผลข้างเคียงที่เกิดขึ้น หลังการผ่าตัดได้ (Chaiyakunapruk, et al., 2006) และช่วยลดอาการคลื่นไส้อาเจียนในหญิงตั้งครรภ์ (Vijoen et al., 2014) อย่างไรก็ตามผลทางคลินิกของขิงก็ยังมีข้อมูลบางส่วนที่ขัดแย้งกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์การต้านเบาหวานที่เกิดจากการได้รับเคมีบำบัด และ motion sickness พบว่าบางกรณี ได้ผลแต่บางกรณีก็ไม่ได้ผล (Marx et al., 2013; Palatty et al., 2013)

ซึ่งมีสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ที่สำคัญ คือ gingerols ซึ่งประกอบไปด้วย 4, 6, 8, 10 และ 12-gingerol โดย 6-gingerol พบมากที่สุด และเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้เหง้าขิงสดมีรสชาติที่ฉุน และมีรายงานว่า เมื่อเหง้าขิงได้รับอนุมูลอิสระสูงขึ้น เช่น การผ่านการขั้วเพื่อให้ขิงคายน้ำ จะพบว่า 6-GN จะเปลี่ยนไปเป็น 6-shogaol ซึ่งมีกลิ่นหอมฉุนและเผ็ดหวาน (Wohlmuth et al, 2005 and Zhang et al, 2012)

จากรายงานการวิจัย มีการรายงานว่า 6-gingerol และ 6-shogaol ช่วยรักษาโรคมะเร็ง เช่น 6-gingerol and 6-paradol ช่วยหยุดการแพร่กระจายของการตายของเซลล์ (apoptotic cell death) ในหนูที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) และ 6-gingerol ช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเป็นต้น (Park et al, 1998, Jeong et al, 2009 and Lv et al, 2012)

ในการศึกษาโดยการฉีด 6-gingerol เข้าไปในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นไข้หวัด พบว่า อนุมูลอิสระในร่างกายของหนูลดลง โดยพฤติกรรมทางกายของหนูยังคงเป็นปกติ (Ueki et al, 2008) และมีรายงานว่า 10-gingerol, 6-shogaol และ 8-shogaol มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) โดยการไปยับยั้งความสัมพันธ์ระหว่าง intercellular adhesion molecule-1 และ lymphocyte (Lee et al, 2011)

การให้ 6-gingerol สามารถลดการเกิด oxidative stress ได้เนื่องจากการกระตุ้นการทำงานของ antioxidant enzyme ได้แก่ superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase และ GSH (Chakraborty et al, 2012) จากการศึกษาของ Isa และคณะ (2008) โดยการให้ 6-gingerol และ 6-shogaol ที่ความเข้มข้น 50 μ M ในเซลล์ 3T3-L1 adipocytes โดยพบว่า 6-gingerol และ 6-shogaol สามารถยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α และ PPAR γ จาก adipocyte ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า 6-gingerol และ 6-shogaol สามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบได้ นอกจากนี้มีรายงานว่า 6-gingerol มีผลต่อการควบคุมน้ำหนักของร่างกายน้ำหนักและช่วยลดการสะสมของไขมันในหนู (Okamoto et al, 2011)

การศึกษาของ Li และคณะในปี 2014 พบว่าการให้ 6-gingerol ที่ความเข้มข้น 50-150 μ M ในหลอดทดลอง ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ PGC1 α gene expression ซึ่งมีผลต่อการสร้าง mitochondria ในเซลล์กล้ามเนื้อแสดงให้เห็นว่า 6-gingerol กระตุ้นให้กล้ามเนื้อมีการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อระดับน้ำตาลกลูโคส อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงผลของ 6-gingerol ต่อการดูดซึมน้ำตาลในลำไส้ ซึ่งอาจจะเป็นกลไกที่สำคัญประการหนึ่งในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้

การศึกษาในสัตว์ทดลองมีรายงานว่า ขิงสามารถต้านการอาเจียนที่เกิดจากการเหนี่ยวนำอย่างเฉียบพลันด้วยยา (acute cytotoxic drug-induced emesis) (Sharma et al., 1997; Yamahara et al., 1989a) และมีฤทธิ์ชะลอ gastric emptying time ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยยา cisplatin (Sharma and Gupta, 1998) โดยสารสำคัญของขิงที่เป็นตัวออกฤทธิ์น่าจะเป็น gingerol และ shogaol (Kawai et al., 1994; Yang et al., 2002) กลไกการออกฤทธิ์ของขิงในการต้านการอาเจียนนั้นยังไม่เป็นที่ประจักษ์นัก ทั้งนี้มีรายงาน ในสัตว์ทดลองพบว่าขิงออกฤทธิ์โดยผ่านทางระบบประสาทส่วนกลาง (Kawai et al, 1994) บางรายงานพบว่าขิงออกฤทธิ์แบบเฉพาะที่ โดยยับยั้ง serotonergic 5-HT $_3$ receptor (Sharma 1997) และ

การศึกษาในหลอดทดลองยืนยันพ้องกันว่าสารสกัดขิงและสารสำคัญคือ gingerol และ shogaol ออกฤทธิ์ยับยั้ง muscarinic M₃ และ serotonergic 5-HT₃ receptor ในลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูตะเภา (Yamahara et al., 1989b; Abdel-Aziz et al., 2006; Pertz et al., 2011) ตลอดจนยับยั้งการหดตัวที่ถูกเหนี่ยวนำโดยกระแสไฟฟ้าและ acetylcholine (ACh) ของลำไส้เล็กส่วน ileum ของหนูแรท (Borrelili et al., 2004)

นอกจากนี้ยังมีสมมติฐานที่น่าสนใจเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของขิงกรณีใช้ด้านการอาเจียนที่เกิดจากการให้เคมีบำบัด กล่าวคือ เมื่อให้เคมีบำบัด ยาจะมีผลเพิ่มระดับ serotonin ในลำไส้และส่งผลกระทบต่อ 5HT₃ receptor ที่อยู่บน vagal visceral neuron ทำให้เพิ่มทำงานของ visceral afferent vagus nerve (Schwörer et al., 1991; Horn et al., 2004) เพิ่มการหลั่ง ACh ส่งผลเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของทางเดินอาหารและเกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียนตามลำดับ ดังนั้นการยับยั้ง 5HT₃ receptor ซึ่งอยู่ในบริเวณ vagal afferent neuron ของลำไส้รวมทั้งการยับยั้ง muscarinic receptor จึงเป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญของขิง ในการยับยั้งการอาเจียนที่เกิดจากการให้เคมีบำบัด (Jin et al., 2014)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าขิงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง และงานวิจัยนี้ให้ความสำคัญกับฤทธิ์ของขิงที่มีต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กซึ่งสัมพันธ์กับฤทธิ์ด้านการอาเจียน รวมทั้งฤทธิ์ในการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของขิง พบว่าส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในหลอดทดลองที่มีการแยกลำไส้เล็กออกมาจากสัตว์ทดลอง และ หยอดสารสกัดขิงหรือสารสำคัญ เพื่อศึกษาฤทธิ์โดยตรงของขิงที่มีต่อลำไส้ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาว่าการให้สัตว์ทดลองกินขิงติดต่อกันจะมีผลต่อการทำงานของลำไส้หรือไม่อย่างไร

งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาผลของการให้สัตว์ทดลองกินสารสกัดขิง หรือ 6-gingerol ติดต่อกันนานหนึ่งสัปดาห์เพราะการให้กินขิงนั้นจะเป็นรูปแบบการให้ที่เหมือนกับการให้คนกิน จากนั้นจึงทดสอบผลการทำงานของลำไส้โดยมีสมมติฐานว่าถ้าขิงมีผลยับยั้ง muscarinic receptor และ serotonin receptor ตามที่มีรายงานดังกล่าวข้างต้น การหดตัวของลำไส้เล็กที่มีต่อ ACh ก็น่าจะลดลงในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขิงหรือ 6-gingerol เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจจะเป็นประโยชน์ต่อการออกแบบการศึกษาต่อยอดในระดับคลินิกเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอาเจียนของขิง ในกรณีต่าง ๆ โดยเฉพาะ การให้กินขิงเพื่อป้องกันผลข้างเคียงที่เกิดจากการได้รับเคมีบำบัดต่อไป ส่วนกรณีของผลต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส รวมทั้งลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลำไส้เล็กในส่วนต่าง ๆ ในหนูที่ได้สาร 6-gingerol นานติดต่อกันจากการป้อนทางปาก ยังไม่พบว่ามีรายงาน ทำให้นักวิจัยสนใจศึกษาผลของสารสำคัญจากขิงที่มีต่อการดูดซึมน้ำตาลควบคู่กันไปด้วยซึ่งจะนำไปสู่การอธิบายฤทธิ์ของขิงที่มีต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ของขิงที่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่เป็นเบาหวาน รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็กในส่วนต่าง ๆ ผลการศึกษาที่ได้จะทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ทางวิทยาศาสตร์ ในการนำสารสกัดขิงไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องได้ต่อไป เนื่องจากขิงเป็นพืชเศรษฐกิจที่หาได้ง่ายตามท้องถิ่นต่างๆ ในประเทศไทย

บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

1. การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

โครงการนี้ได้รับอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลข NU-AE590715

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนู Wistar rat เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 200-250 กรัม โดยสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม หนูทั้งหมดทุกตัวจะถูกนำมาเลี้ยงอย่าง น้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 10 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง โดยการเลี้ยงสัตว์ทดลองเป็นไปตามมาตรฐานของสถานสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีการป้อนสารเป็นเวลา 7 วันดังนี้

1. กลุ่มควบคุมได้รับ vehicle คือ propylene glycol
2. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขิงขนาด 10 mg/kg BW
3. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขิงขนาด 20 mg/kg BW
4. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขิงขนาด 100 mg/kg BW
5. กลุ่มที่ได้รับสารสำคัญ 6-gingerol ขนาด 2 mg/kg BW

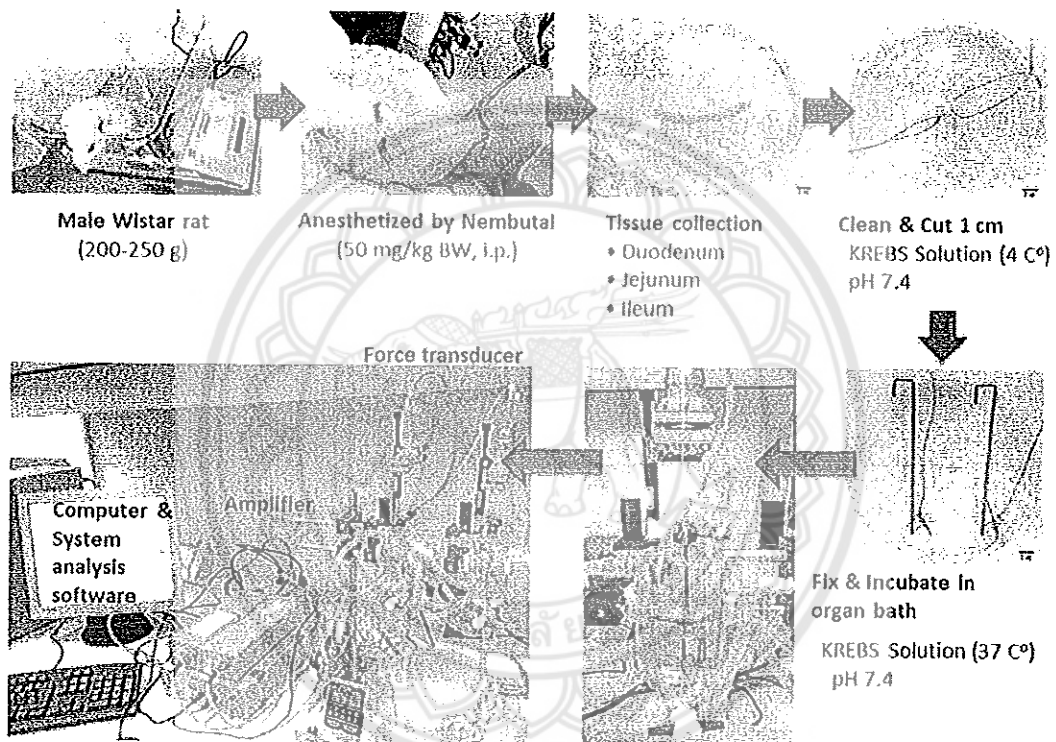
หลังจากได้รับการป้อนสารสกัดหรือ vehicle เป็นเวลา 7 วัน ในวันที่ 8 สัตว์ทดลองจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยการฉีดยาสลบ Nembutal ขนาด 70 mg/kg เข้าทางช่องท้อง หลังจากสัตว์ทดลองสลบแล้วจึงเจาะเลือดจากหัวใจเพื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับน้ำตาลในเลือด จากนั้นเปิดช่องท้องแล้วผ่าตัดนำส่วนของลำไส้เล็กออกมาเพื่อใช้ในการศึกษาการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก การดูดัชนีกล้ามเนื้อและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางโครงสร้างทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้ต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดขิง

สารสกัดขิงได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยเป็นสารสกัดหยาบขั้นเหนียว (semi-solid) มีการเตรียมสาร กัดโดยใช้สารละลายเอทานอล ควบคุมคุณภาพโดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ 6-gingerol, 6-shogaol โดย HPLC

3. การศึกษาผลของสารสำคัญในขิงที่มีต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็ก

สัตว์ทดลองถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบโดยการฉีดยาสลบ Nembutal ขนาด 70 mg/kg เข้าทางช่องท้อง หลังจากสัตว์ทดลองสลบแล้วจึงเปิดช่องท้องแล้วผ่าตัดแยกลำไส้เล็กส่วน ileum ออกมาตัดเป็นชิ้นละประมาณ 2 ซม. แช่เย็นใน KREBS Solution ที่มีส่วนประกอบ คือ NaCl 122 mM; KCl 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES) 10 mM; KH_2PO_4 0.5 mM; NaH_2PO_4 0.5 mM; MgCl_2 1 mM; glucose 11 mM and CaCl_2 1.8 mM และ ปรับ pH = 7.4 ด้วย NaOH และนำไปแขวนในหลอดทดลองที่มีสารละลาย KREBS Solution ดังภาพ 1 ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส และให้อากาศตลอดเวลา

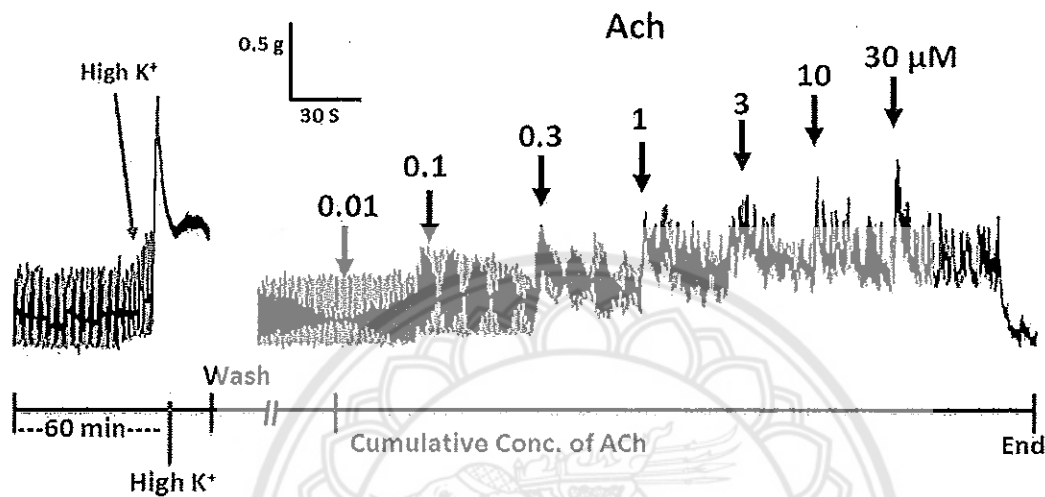


ภาพ 1 ขั้นตอนการเตรียมลำไส้เล็กและชุดอุปกรณ์ศึกษาการทำงานของลำไส้เล็ก

ลำไส้ที่แยกได้แล้วจะถูกแขวนด้วยแรงตึงที่ระดับ Optimal tension (1 กรัม) และ ทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลอย่างน้อย 40-60 นาที ก่อนทำการทดลอง โดยเปลี่ยน solution ทุก ๆ 10-15 นาที การตอบสนองของลำไส้ถูกวัดในรูปการเปลี่ยนแปลงของความถี่ (frequency) แอมพลิจูด (amplitude) และแรงหดตัว (tension) ของลำไส้ที่เกิดขึ้น ซึ่งถูกแปลงสัญญาณโดยตัวแปลงสัญญาณความแรง (Force transducer) และ กราฟการตอบสนองที่ได้จะถูกบันทึกโดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney,

Australia) ซากสัตว์ทดลองที่เสียชีวิตแล้วถูกเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ -20°C จนกว่าจะนำไปทำลายโดยสถาน สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย

เนื่องจากการหดตัวของลำไส้เล็กเกิดจากการทำงานของ muscarinic receptor เป็นหลักการทดลอง นี้จึงออกแบบให้มีการศึกษาการหดตัวของลำไส้เล็กหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย muscarinic receptor agonist คือ ACh โดยมีรูปแบบการทดลองดังนี้ (ภาพ 2)

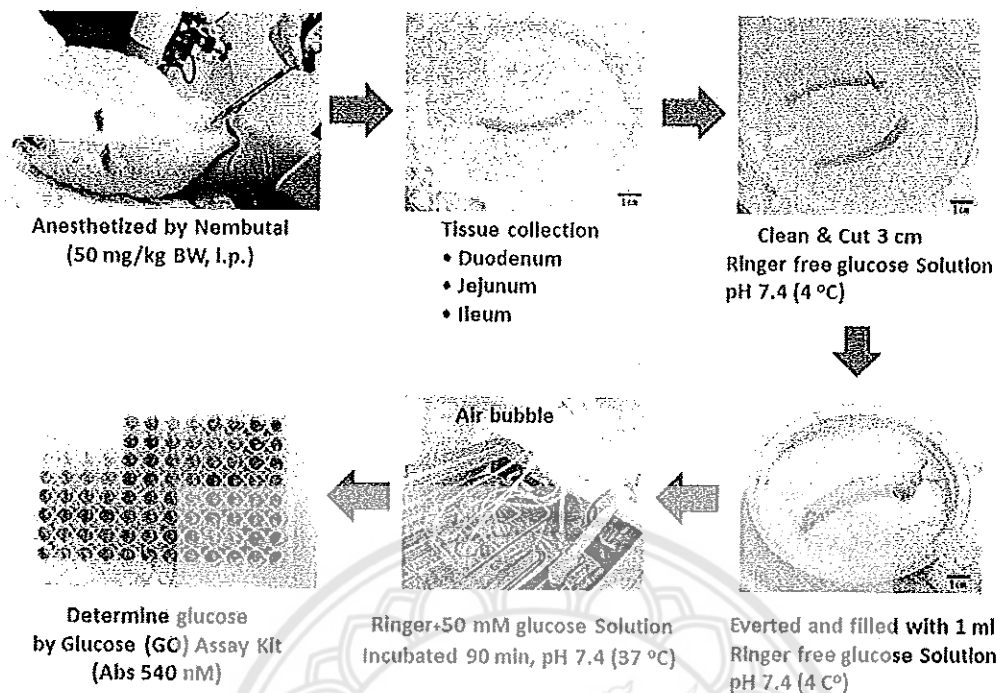


ภาพ 2 Protocol ศึกษาการหดตัวของลำไส้เล็ก

ศึกษาการหดตัวของลำไส้เล็กหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย ACh ลำไส้หนูที่ถูกแขวนใน organ bath ถูก เหนี่ยวนำให้หดตัวด้วย 80 mM K^+ solution จากนั้นจึงล้างออก แล้วศึกษาการหดตัวของลำไส้ที่มีต่อ $0.01, 0.1, 1, 3, 10\ \mu\text{M ACh}$ โดยการให้ ACh เป็นแบบ cumulative response และล้างออกเมื่อถึงความเข้มข้น สุดท้าย จนการหดตัวกลับสู่ baseline โดยค่าการหดตัวที่วัดได้ถูกเปรียบเทียบ (normalize) เป็นร้อยละกับการหดตัวที่ถูกเหนี่ยวนำโดย 80 mM K^+ solution ในลำไส้ชิ้นเดียวกัน จากนั้นร้อยละการหดตัวที่มีต่อ ACh ของลำไส้หนูกลุ่มควบคุมถูกนำไปเปรียบเทียบเชิงสถิติกับหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดขิงหรือสารสำคัญ 6-gingerol ตามลำดับ

4. การศึกษาการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี everted gut sac

ศึกษาการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีของ Hamilton and Butt (2013) โดยแยกลำไส้เล็กส่วน jejunum ความยาว 6 ซม. นำลำไส้มาผูกด้านหนึ่งไว้กับ Teflon rod หลังจากนั้นกลับลำไส้เอาด้าน mucosal side ออกมา เมื่อกลับลำไส้ด้านในออกมาแล้ว ตัดให้เหลือความยาว 3 ซม. ผูกเชือกไว้ที่ปลายข้างหนึ่ง และใช้ syringe ฉีดสารดังต่อไปนี้เข้าไปในถุงลำไส้ (serosal solution) 1) NaCl Ringer solution + 10 mM glucose หรือ 2) Ringer solution + 10 mM glucose (ภาพ 3)



ภาพ 3 ขั้นตอนการเตรียมลำไส้เพื่อศึกษาการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส

หลังจากนั้น มัดปลายอีกด้านของถุงลำไส้ให้แน่น และนำไปแช่ใน mucosal solution 1) NaCl Ringer solution (50 ml) หรือ 2) Ringer solution (50ml) ที่มีส่วนประกอบของ 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES-Tris, and 10 glucose mM (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 37°C และจับเวลา 90 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ดูดสารละลาย 1 ml จาก mucosal solution เพื่อไปวัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ glucose oxidase assay kit (Theresa et al, 2014)

5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้เล็ก

นำลำไส้เล็กส่วน duodenum, jejunum, ileum ไปแช่ใน Natural formalin buffer แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อไปทำบล็อกชิ้นเนื้อใน paraffin นำเอาชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการ embedded ลงใน paraffin บล็อกเรียบร้อยแล้ว มาตัดออกเป็นเนื้อเยื่อแผ่นบางๆ (paraffin section) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับในหนูกลุ่มต่าง ๆ (Gu et al, 2012)

6. วิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยเป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (Mean) และความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความ

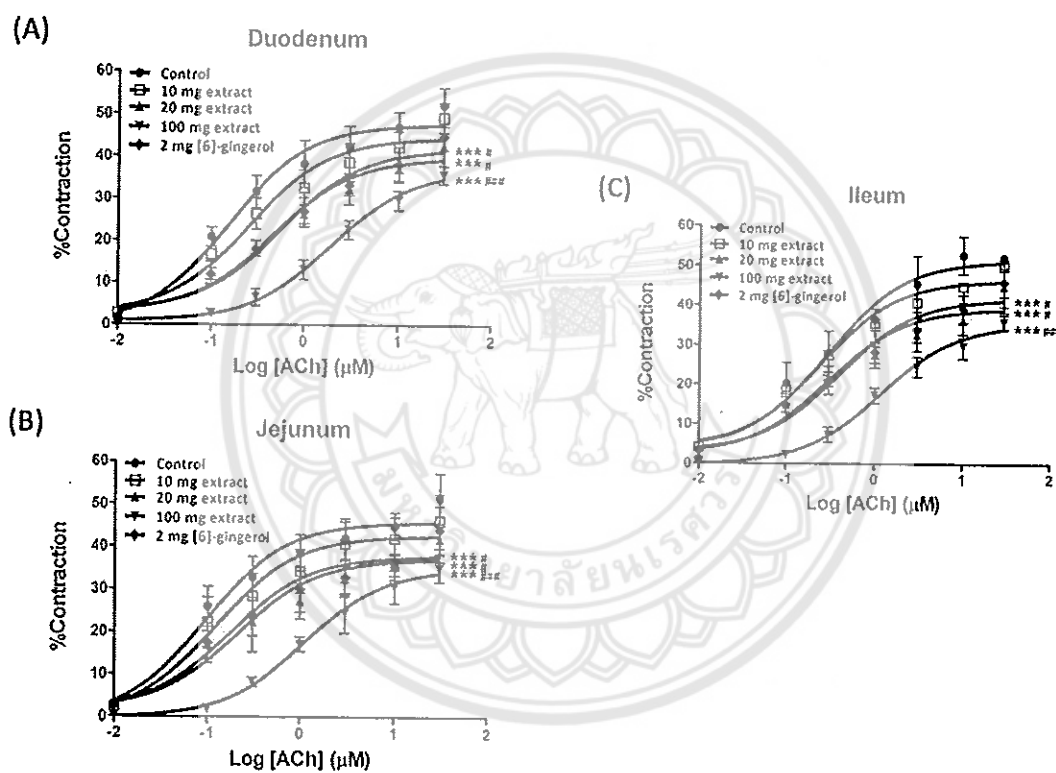
แตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหรือสารสำคัญ ทำโดยวิธี Student t-test และ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวนกลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบ ความแตกต่าง และค่า p value < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ผลของการให้กินสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol ต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก

จากผลการทดลอง หลังจากที่ย้อนสารสกัดขิงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าร้อยละการหดตัวของลำไส้ที่เหนี่ยวนำโดย ACh ทั้งในส่วนที่เป็น duodenum, jejunum และ ileum ในหนูกลุ่มที่ย้อนสารสกัดขิงขนาด 10 mg/kg BW ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ในหนูกลุ่มที่ย้อนสารสกัดขิงขนาด 20 mg/kg BW และ 100 mg/kg พบว่าการหดตัวของลำไส้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ดังรูปที่ 1a, b, c) และตาราง 1



ภาพ 4 กราฟแสดงร้อยละการหดตัวของลำไส้เล็กส่วน a) duodenum, b) jejunum และ c) ileum
 (***) p <0.001 vs the control; # p <0.05, ### p <0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 10 mg/kg).

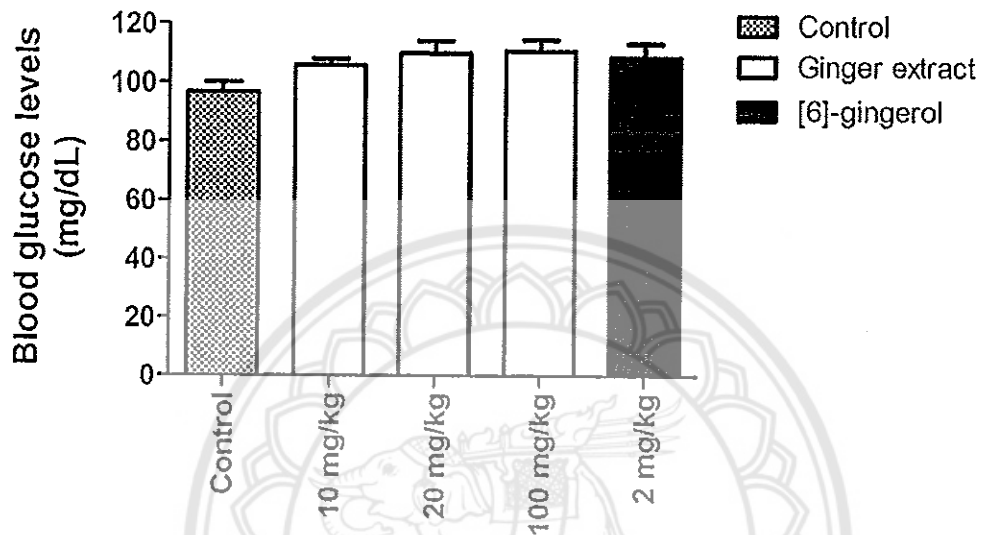
ตาราง 1 EC₅₀ และ E_{max} ของการหดตัวของลำไส้เล็กที่ชักนำโดย ACh โดยแยกลำไส้ส่วน duodenum, jejunum and ileum มาจากหนูที่ได้รับการป้อน PG (control), 10-100 mg/kg/d สารสกัดขิง (ginger extract) หรือ 2 mg/kg/d [6]-gingerol เป็นเวลา 7 วัน

Group	Duodenum		Jejunum		Ileum		n
	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (%)	
Control	0.57±0.23	50.25±3.43	0.58±0.50	51.12±6.10	0.59±0.20	56.29±4.05	6
Ginger extract							
10 mg/kg	0.60±0.25	45.93±3.29	0.61±0.30	46.01±6.39	0.61±0.27	51.19±6.48	6
20 mg/kg	0.83±0.17 ^{***}	40.21±4.11 ^{**}	0.84±0.23 ^{***}	41.29±5.56 ^{**}	0.82±0.22 ^{***}	40.10±5.29 ^{**}	6
100 mg/kg	1.86±0.36 ^{***}	38.87±3.42 ^{***}	1.74±0.62 ^{***}	36.22±3.89 ^{***}	1.62±0.51 ^{***}	35.93±1.91 ^{***}	6
[6]-gingerol							
2 mg/kg	0.79±0.23 [*]	42.38±3.91 ^{**}	0.78±0.47 [*]	43.92±5.04 ^{**}	0.78±0.22 [*]	41.52±3.46 ^{**}	6

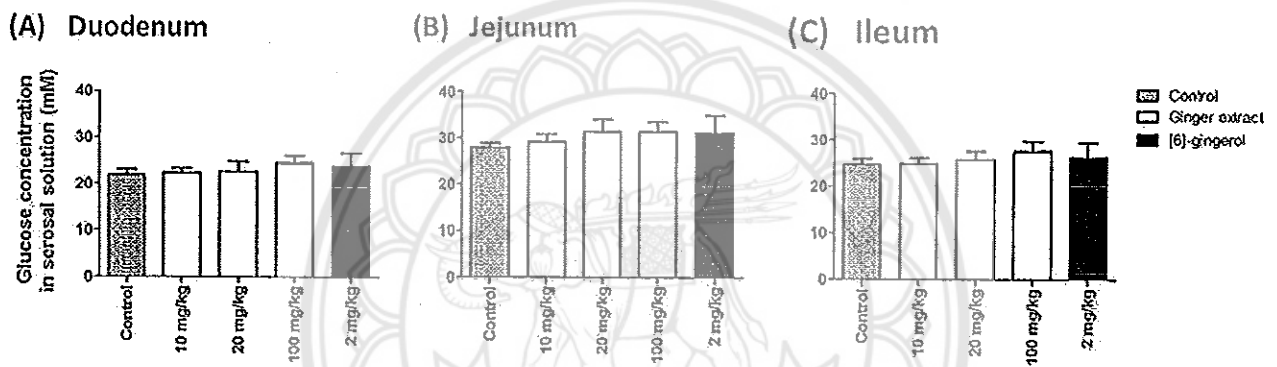
^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ EC₅₀ or E_{max} ของกลุ่มควบคุม; ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ EC₅₀ or E_{max} ของกลุ่ม 10 mg/kg group.

2. ผลของการให้กินสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol ต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส

จากผลการทดลอง หลังจากที่ย้อนสารสกัดขิง หรือ [6]-gingerol เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเลือดมาวัดระดับน้ำตาลกลูโคส (ภาพ 5) และนำลำไส้เล็กมาศึกษาการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส ไม่พบความแตกต่างทางนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งในลำไส้เล็กส่วน duodenum, jejunum และ ileum (ภาพ 6)



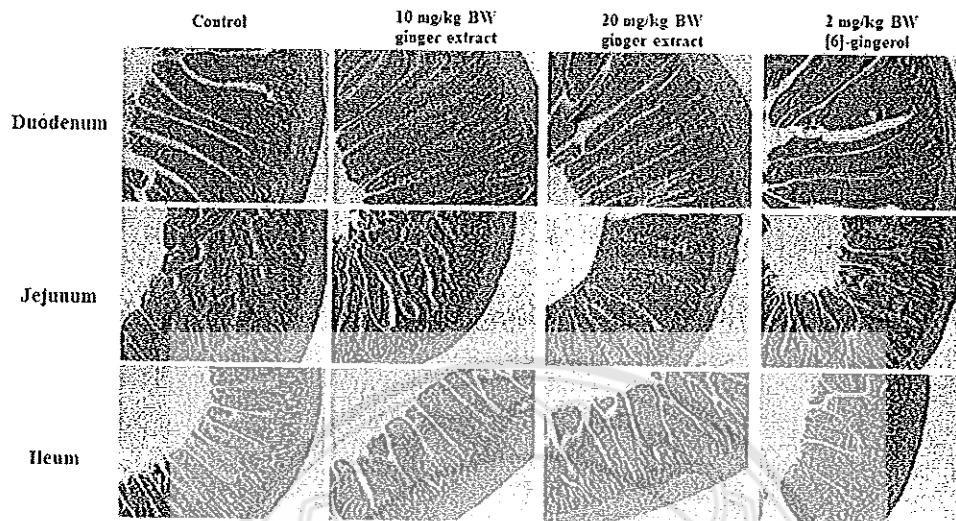
ภาพ 5 กราฟแท่งแสดงความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 6 กราฟแท่งแสดงความเข้มข้นของกลูโคสใน serosal solution ของลำไส้เล็กส่วน a) duodenum, b) jejunum และ c) ileum ของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol เป็นเวลา 7 วัน

3. ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้เล็กหนูที่ได้กินสารสกัดขิงหรือ [6]-Gingerol

จากผลการวิเคราะห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างของลักษณะทาง histology ทั้งในลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย ดังภาพ 7



ภาพ 7 Histology ของลำไส้เล็กส่วน a) duodenum, b) jejunum และ c) ileum ของหนูแรท



บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสรุปประเด็นสำคัญได้ดังนี้

1. การให้กินสารสกัดขิงและสารสำคัญ [6]-Gingerol ติดต่อกัน 7 วันมีผลลด motility ของลำไส้เล็กทุกส่วน
2. การให้กินสารสกัดขิงและสารสำคัญ [6]-Gingerol ติดต่อกัน 7 วันไม่มีผลต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสผ่านลำไส้เล็ก และไม่มีผลต่อ histology ของลำไส้
3. การศึกษานี้สนับสนุนการใช้ขิงเพื่อรักษาความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร อาทิ ท้องเสีย และคลื่นไส้อาเจียน โดยไม่มีผลต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสและมีความปลอดภัยเพราะไม่ส่งผลใด ๆ ต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของลำไส้เล็ก



บรรณานุกรม

นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรุณช โขกชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน.สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร, 2539.

A.J. Akinyemi, A.O. Ademiluyi and G. Oboh. (2013). Aqueous extracts of two varieties of ginger (*Zingiber officinale*) inhibit angiotensin I-converting enzyme, iron(II), and sodium nitroprusside-induced lipid peroxidation in the rat heart in vitro. *Journal of Medicinal Food*. 16, 641–646.

Abdel-Aziz, H., Windeck, T., Ploch, M., Eugen, J. Verspohl EJ. 2006. Mode of action of gingerols and shogaols on 5-HT₃ receptors: Binding studies, cation uptake by the receptor channel and contraction of isolated guinea-pig ileum. *European Journal of Pharmacology* 530:136–143.

Ayodele Jacob Akinyemi, Gustavo Roberto Thome, Vera Maria Morsch, Naiara Stefanello, Jeferson Ferraz Goularte and Adriane Belló-Klein et al. (2015). Effect of dietary supplementation of ginger and turmeric rhizomes on angiotensin-1 converting enzyme (ACE) and arginase activities in L-NAME induced hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*. 17, 792–801.

Borrelli, F., Capasso, R., Pinto, A., Izzo, A.A. 2004. Inhibitory effect of ginger (*Zingiber officinale*) on rat ileal motility in vitro. *Life Sciences* 74: 2889–2896

Chaiyakunapruk, N., Kitikannakorn, N., Nathisuwan, S., Leepakoboon, K., Leelasattagool, C. 2006. The efficacy of ginger for the prevention of postoperative nausea and vomiting: A meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 194, 95–9.

Chakraborty D., Mukherjee A., Sikdar S., Paul A., Ghosh S. and Khuda-Bukhsh A.R., (2012). [6]-Gingerol isolated from ginger attenuates sodium arsenite induced oxidative stress and plays a corrective role in improving insulin signaling in mice. *Toxicol. Lett.* 210, 34–43.

Gu X, Zhao HL, Sui Y, Guan J, Chan JCN, Tog PCY. White rice vinegar improves pancreatic beta- cell function and fatty liver in streptozotocin-induced diabetic rat. *Acta Diabetol*, 2012;49:185-91.

Hamilton KL, Butt AG. (2014). Glucose transport into everted gut sacs of the small intestine of mice. *Adv Physiol Educ*. 37, 415-426.

Horn, C.C., Richardson, E.J., Andrews, P.L., Friedman, M.I. 2004. Differential effects on gastrointestinal and hepatic vagal afferent fibers in the rat by the anti-cancer agent cisplatin. *Auton Neurosci.* 115:74-81

Jeong C.H., Bode A.M., Pugliese A., Cho Y.Y., Kim H.G., Shim J.H., et al. (2009). [6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A 4 hydrolase. *Cancer Res.* 69, 5584–5591.

Jin, Z., Lee, G., Kim, S., Park, C.S., Park, Y.S., Jin, Y.H. 2014. Ginger and its pungent constituents non-competitively inhibit serotonin currents on visceral afferent neurons. *Korean J Physiol Pharmacol.* 18(2):149-53. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.2.149.

Kawai, T., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., 1994. Anti-emetic principles of *Magnolia obovata* bark and *Zingiber officinale* rhizome. *Planta Med.* 60, 17–20.

Lee S.W., Lim J.H., Kim M.S., Jeong J.H. Song, G.Y. and Lee, W.S et al. (2011). Phenolic compounds isolated from *Zingiber officinale* roots inhibit cell adhesion. *Food Chem.* 128, 778–782.

Li Y, Tran VH, Kota BP, Nammi S, Duke CC, Roufogalis BD. Preventative effect of *Zingiber officinale* on insulin resistance in a high-fat high-carbohydrate diet-fed rat model and its mechanism of action. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014 Aug;115(2):209-15.

Lv L, Chen H., Soroka D., Chen X., Leung T. and Sang S. (2012). 6-Gingerdiols as the major metabolites of 6-gingerol in cancer cells and in mice and their cytotoxic effects on human cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11372–11377.

Marx, W.M, Teleni, L., McCarthy, A.L., Vitetta L, McKavanagh, D., Thomson, D., Isenring, E. 2013. Ginger (*Zingiber officinale*) and chemotherapy-induced nausea and vomiting: a systematic literature review. *Nutr Rev.* 71(4):245-54. doi: 10.1111/nure.12016.

Okamoto M., Irii H., Tahara Y., Ishii H., Hirao A. and Udagawa, et al. (2011). Synthesis of a new [6]-gingerol analogue and its protective effect with respect to the development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet. *J. Med. Chem.* 54, 6295–6304.

Palatty, P.L., Haniadka, R., Valder, B., Arora, R., Baliga, M.S. 2013. Ginger in the prevention of nausea and vomiting: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(7):659-69. doi: 10.1080/10408398.2011.553751.

Park K.K., Chun K.S., Lee J.M., Lee S.S. and Surh Y.J., (1998). Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Lett.* 129, 139–144.

Pertz, H.H., Lehmann, J., Roth-Ehrang, R., Elz, S. 2011. Effects of ginger constituents on the gastrointestinal tract: role of cholinergic M3 and serotonergic 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors. *Planta Med.* 77(10):973-8. doi: 10.1055/s-0030-1270747.

Ruchi Badoni Semwal, Deepak Kumar Semwal, Sandra Combrinck and Alvaro M. Viljoen. (2015). Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry.* 117, 554–568.

Schwörer, H., Racké, K., Kilbinger, H. 1991. Cisplatin increases the release of 5-hydroxytryptamine (5-HT) from the isolated vascularly perfused small intestine of the guinea-pig: involvement of 5-HT₃ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 344:143-149

Sharma, S.S., Gupta, Y.K., 1998. Reversal of cisplatin-induced delay in gastric emptying in rats by ginger (*Zingiber officinale*). *Journal of Ethnopharmacology* 62 (1), 49–55.

Sharma, S.S., Kochupillai, V., Gupta, S.K., Seth, S.D., Gupta, Y.K., 1997. Antiemetic efficacy of ginger (*Zingiber officinale*) against cisplatin-induced emesis in dogs. *J. Ethnopharmacol.* 57, 93–96.

Theresa SV, Thirumalai T, Tamilsevan L, David E. (2014). In vivo and ex vivo inhibition of intestinal glucose uptake: a scope for antihyperglycemia. *J Acute Dis.* 36-40.

Ueki S., Miyoshi M., Shido O., Hasegawa J. and Watanabe T., (2008). Systemic administration of [6]-gingerol, a pungent constituent of ginger, induces hypothermia in rats via an inhibitory effect on metabolic rate. *Eur. J. Pharmacol.* 584, 87–92.

Viljoen, E., Visser, J., Koen, N., Musekiwa, A. 2014. A systematic review and meta-analysis of the effect and safety of ginger in the treatment of pregnancy-associated nausea and vomiting. *Nutr J.* 19;13:20. doi: 10.1186/1475-2891-13-20.

Yamahara, J., Huang, Q.R., Iwamoto, U., Kobayashi, G., Matsuda, H., Fujimura, H., 1989b. Active components of ginger exhibiting antiserotonergic action. *Phytother. Res.* 3, 70–71.

Yamahara, J., Rong, H.Q., Naitoh, Y., Kitani, T., Fujimura, H., 1989a. Inhibition of cytotoxic drug-induced vomiting in suncus by a ginger constituent. *J. Ethnopharmacol.* 27, 353–355.

Yang, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, S., Watanabe, K., 2002. Structure–antiemetic activity of some diarylheptanoids and their analogues. *Phytomedicine*

