

**EFFECTS OF *BACOPA MONNIERI* ON MEMORY, BLOOD FLOW  
AND VASORELAXATION**



**NATAKORN KAMKAEW**

**A Thesis Submitted to the Graduate School of Naresuan University  
in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Doctor of Philosophy Degree in Physiology**

**March 2021**

**Copyright 2021 by Naresuan University**

Thesis entitled “Effects of *Bacopa monnieri* on memory, blood flow and vasorelaxation”

By Mr.Natakorn Kamkaew

has been approved by the Graduate School as partial fulfillment of the requirements for the Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor of Philosophy Degree in Physiology of Naresuan University

**Oral Defense Committee**

*Chaweewan Jansakul* ..... Chair  
(Professor Chaweewan Jansakul, Ph.D.)

*Krongkarn Chootip* ..... Advisor  
(Associate Professor Krongkarn Chootip, Ph.D.)

*K. Ingkaninan* ..... Co – Advisor  
(Associate Professor Kornkanok Ingkaninan, Ph.D.)

*Neti Waranuch* ..... Co – Advisor  
(Associate Professor Neti Waranuch, Ph.D.)

*Peeraphong Thiarawat* ..... Internal Examiner  
(Assistant Professor Peeraphong Thiarawat, MD.)

*Onrawee Khongsombat* ..... Internal Examiner  
(Assistant Professor Onrawee Khongsombat, Ph.D.)

Approved

*Paisarn Muneesawang* .....

(Professor Paisarn Muneesawang, Ph.D.)

Dean of the Graduate School

19 MAR 2021

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor: Associate Professor Dr. Krongkarn Chootip and my co-advisor: Associate Professor Dr. Kornkanok Ingkaninan and Associate Professor Dr. Neti Waranuch for their invaluable advices, guidances, kindnesses and encouragements throughout the experimental work and make of the thesis.

I also would like to thank my thesis committee members and my clinical trial members: Professor Dr. Chaweewan Jansakul, Assistant Professor Dr. Peeraphong Thiarawat, Assistant Professor Dr. Onrawee Khongsombat, Assistant Professor Dr. Chanchira Wasuntarawat, Lecturer Watchara Kaewmahanin, Dr. Duangnapa Roongpiboonsopit, Professor Dr. Jintanaporn Wattanathorn, for their worth comments and suggestions.

I would like to acknowledge Dr. C. Norman Scholfield for his constructive criticism of my work. I also thank to all cardiovascular unit students as well as all staff and officers of the Department of Physiology, Faculty of Medical science, Naresuan University, for their precious helps and kindnesses.

Finally, I do extremely appreciate and deeply thank to my parents and my family for their love, understanding and encouragement throughout my life.

This work was supported by Thailand Center of Excellence for Life Sciences Public Organization (TCELS), grant No. TC14/61, National Research Council of Thailand (NRCT), grant No. R2561B032, and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the International Research Network (IRN61W0005).

Natakorn Kamkaew

**Title** EFFECTS OF *BACOPA MONNIERI* ON MEMORY, BLOOD FLOW AND VASORELAXATION

**Author** Natakorn Kamkaew

**Advisor** Associate Professor Krongkarn Chootip, Ph.D.

**Co-Advisor** Associate Professor Kornkanok Ingkaninan, Ph.D.  
Associate Professor Neti Waranuch, Ph.D.

**Academic Paper** Thesis Doctor of Philosophy in Physiology,  
Naresuan University, 2020

**Keywords** *Bacopa monnieri*, memory, blood flow, vasorelaxation

### ABSTRACT

*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. or 'Brahmi', an Ayurvedic medicine, has traditionally been used as a memory enhancer. Brahmi clearly has a memory improving and neuroprotective properties. However, there has been no clinical study focusing on human carotid and peripheral blood flow and resulting cognitive improvement using the formulation of an essence of Brahmi mixed with mulberries (EBM). This present clinical study aims to examine the efficacy of the chronic consumption of EBM compared with a placebo in participants on memory, peripheral blood flow in reactive hyperaemia and carotid blood flow. The clinical study has been elucidated to compare the effectiveness of EBM with placebo in participants between 55 and 80 years of age. All participants were without mental or physical health problems. It was designed as a 12-week double-blind and placebo-controlled randomized trial. The current results were innovatively reported significantly improved the speed of working memory and the post-occlusive blood flow in the peripheral vascular system during daily consumption of EBM for 12 weeks. By contrast, the placebo had no significant effect. EBM did not alter blood pressure and blood biochemistries, thus the chronic consumption of EBM was safe. Moreover, the animal study aims to clarify the effective Brahmi components for vasorelaxation. Its flavonoids i.e., luteolin and apigenin have a more potent vasodilator but saponins have a greater effect because of their greater contents. Accordingly, the clinical benefits on enhanced blood flow and cognitive function may arise from a combination of flavonoids and particularly the saponins. Future study should concern specific clinical study on patients with dementia.

# LIST OF CONTENTS

Chapter	Page
<b>I INTRODUCTION</b> .....	1
Rationale for the study .....	1
Objectives of the study .....	4
Scope of the study.....	4
Hypothesis .....	5
<b>II REVIEW OF RELATED LITERATURE AND RESEARCH</b> ....	7
<i>Bacopa monnieri</i> (BM).....	7
Chemical constituents of BM .....	9
Neuropharmacological effects of BM .....	15
Cardiovascular effects of BM .....	26
Safety studies of BM .....	27
Efficacy and safety of mulberry .....	28
Vascular structure .....	28
Regulation of vascular tone .....	33
Vascular dementia .....	34
Learning and memory .....	35
Short-term memory and working memory .....	36
Working memory assessment .....	38
Association of cognition and vascular function.....	42
<b>III RESEARCH METHODOLOGY</b> .....	44
PART I Preclinical animal study .....	44
Vasorelaxant study of rat isolated mesenteric arteries.....	44
Vasorelaxant effects of BM active compounds on endothelial intact arteries .....	45

## LIST OF CONTENTS (CONT.)

Chapter	Page
Vasorelaxant effects of BM active compounds on endothelial denuded arteries .....	46
Vasorelaxant mechanism of BM active compounds via eNOS pathway .....	46
Vasorelaxant mechanism of BM active compounds on extracellular Ca <sup>2+</sup> influx.....	47
Vasorelaxant mechanism of BM active compounds on intracellular Ca <sup>2+</sup> release.....	47
Statistical analysis .....	47
PART II Clinical trial study.....	48
Investigational product.....	48
Human ethical approval .....	49
Participants.....	51
Study design.....	52
At each visit, the participants were operated with the following procedures .....	54
Cognitive assessment.....	55
Word Presentation.....	57
Picture presentation.....	58
Simple Reaction Time.....	58
Choice Reaction Time.....	58
Spatial Working Memory .....	58
Numeric Working Memory.....	59
Reactive Hyperaemia Blood Flow Assessment .....	60
Carotid blood flow velocity assessment .....	63
Endothelial marker assessment .....	65
Sample size calculation.....	67
Statistical analysis .....	67

## LIST OF CONTENTS (CONT.)

Chapter	Page
<b>IV RESULTS</b> .....	68
Preclinical animal study.....	68
Vasorelaxant effects of the BM active compound .....	68
Mechanisms of vasorelaxation by BM active compounds.....	70
Effect of BM active compounds on Ca <sup>2+</sup> influx.....	74
Effect of BM active compounds on intracellular Ca <sup>2+</sup> release .....	75
The clinical trial study .....	76
Participant demographics .....	76
Safety of EBM .....	80
Cognitive effect of EBM.....	83
Effects of EBM on the speed of memory .....	85
Effects of EBM on attention .....	88
Reactive hyperaemia blood flow enhancing effect of EBM ..	89
Carotid blood flow velocity effect of EBM .....	91
<b>V CONCLUSION</b> .....	92
Discussion of the preclinical study.....	92
Discussion of the clinical trial study .....	94
Conclusions .....	97
<b>REFERENCES</b> .....	99
<b>APPENDIX</b> .....	122
<b>BIOGRAPHY</b> .....	272

## LIST OF TABLES

Table	Page
1 Chemical formula, Molecular weight and Structures of BM compounds.....	9
2 Amount of each compound in 95% ethanolic BM extract analyzed by HPLC. The values are expressed as averages from triplicate experiments $\pm$ SD.....	15
3 Summarise of clinical study on neuropharmacological effects of BM.	20
4 Types of memory.....	36
5 Tasks for cognitive assessment.....	39
6 The EC <sub>50</sub> and E <sub>max</sub> of Brahmi active compounds on relaxation of endothelial intact rat mesenteric arteries.....	58
7 The EC <sub>50</sub> and E <sub>max</sub> of Brahmi compounds on relaxations of endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings or +EC with 100 $\mu$ M L-NAME. Comparison of EC <sub>50</sub> or E <sub>max</sub> of each compound in -EC or +EC plus L-NAME vs +EC was shown as † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$ using unpaired Student's <i>t</i> -test.....	73
8 Participant demographic recorded at the baseline.....	77
9 Blood biochemistry data of the participants. Values are mean $\pm$ SD.....	81



## LIST OF FIGURES

Figures		Page
1	<i>Bacopa monnieri</i> (A) and Brahmi tablet supplement of GPO (B) ....	8
2	The chemical structure of (A) jujubogenin and (B) pseudojujubogenin glycosides.....	13
3	Representative HPLC-UV chromatogram of mixed seven standards at 20 µg/ml for 1 and 2 and 100 µg/ml for 3–7 (A) and BM extract (2 mg/ml) (B); luteolin (1), apigenin (2), bacoside A3 (3), bacoside II (4), bacoside X (5), bacopasaponin C (6) and bacoside I (7).....	14
4	Vessel structure (A) and histology of the normal vessel, vascular aging and atherosclerosis (B) .....	30
5	Endothelial cells metabolism deregulation in atherosclerosis .....	31
6	Mechanical or pharmacological activation increases the intracellular calcium concentration .....	32
7	Regulation of vascular tone by nitric oxide.....	33
8	NO inhibits the release of ET-1, while ET-1 inhibits NO-mediated vasodilation.....	34
9	The model of memory .....	37
10	Gyrus and region of brain .....	38
11	Framework of animal study .....	45
12	Organ bath technique for vasorelaxant study .....	46
13	Essence of Brahmi mix mulberry .....	49
14	Human ethic protocol approval.....	50
15	Timeline for all parameter assessments of the clinical trial study.....	53
16	Framework of the clinical trial study.....	54
17	Participating of participants in the cognitive computerized battery test.....	56

## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figures		Page
18	The 4 tasks, including the word recognition, the picture recognition, the spatial working memory and the numeric working memory, of the cognitive computerized battery test for quality of working memory and speed of memory (A) and The tasks for the power of attention and the continuity of attention, including the simple and the choice reaction time (B).....	57
19	Measurement of reactive hyperaemia blood flow, using Peri-Med...	61
20	The region of interest for detecting PORH blood flow: 1) Whole hand, 2) Fingers, 3) Palm .....	62
21	Timeline and tracing for PORH of the whole hand (blue line), the fingers (red line) and the palm (green line) .....	62
22	Carotid blood flow velocity assessment, using vascular Doppler ultrasound for blood flow in the carotid artery (A), and the early detection of ischemic stroke device (B) .....	64
23	The determination of ICAM-1 and VCAM-1 using the Sandwich ELISA (A), and the ADMA measurement using the competitive ELISA (B).....	65
24	The example of original tracing showing the vasorelaxation of the 0.1-100 $\mu$ M active compound (apigenin) on endothelial intact rat mesenteric arteries (+EC) in a concentration-dependent manner .....	69

## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figures		Page
25	Relaxations induced by luteolin, apigenin, and bacopaside I (0.1-100 $\mu$ M) and vehicle (DMSO) in endothelial intact mesenteric arteries precontracted with phenylephrine (10 $\mu$ M). Values are mean $\pm$ SEM of 6-9 individual arterial rings. The significant p-values were indicated as * $p$ <0.01 comparing relaxation for each compound with the control (DMSO) using two-way ANOVA (n=6-9). Lines were fitted by non-linear regression.....	69
26	The original tracing showing the vasorelaxant effect of 0.1-100 $\mu$ M apigenin via endothelium and smooth muscle cells tracing .....	70
27	Cumulative concentration-response curves of (A) luteolin and (B) apigenin in concentrations (0.1-100 $\mu$ M) in endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings and endothelial intact vessels pre-incubated in L-NAME (100 $\mu$ M). The graphs are expressed as %relaxation of vessel pre-contracted with 10 $\mu$ M PE. Values are mean $\pm$ SEM of 6-9 individual arteries. ** $p$ <0.001 each compound compared with intact vessels (+EC) using two-way ANOVA (n=6-9) .....	71

## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figures		Page
28	Cumulative concentration-response curves of (A) bacopaside (0.1-100 $\mu$ M) and (B) bacoside A (0.1-100 $\mu$ g/ml) in endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings and endothelial intact vessels pre-incubated in L-NAME (100 $\mu$ M). The graphs are expressed as %relaxation of vessel pre-contracted with 10 $\mu$ M PE. Values are mean $\pm$ SEM of 6-9 individual arteries. * $p$ <0.01, ** $p$ <0.001 each compound compared with intact vessels (+EC) using two-way ANOVA (n=6-9).....	72
29	CaCl <sub>2</sub> -induced contractions of denuded mesenteric arteries pre-incubated in high K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> -free media in the conditions of pre-incubation with DMSO (negative control), 10 $\mu$ M bacopaside I, 10 $\mu$ M luteolin, 10 $\mu$ M apigenin, and 1 $\mu$ M nicardipine (positive control). Y-axis, % contraction compared to the contraction achieved with the highest CaCl <sub>2</sub> concentration during the initial run without a Brahmi compound in the same vessel. Values are mean $\pm$ SEM of 4-6 individual arteries. ** $p$ <0.01 each of the active compounds compared to DMSO using two-way ANOVA (n=4-6) .....	74

## LIST OF FIGURES (CONT.)

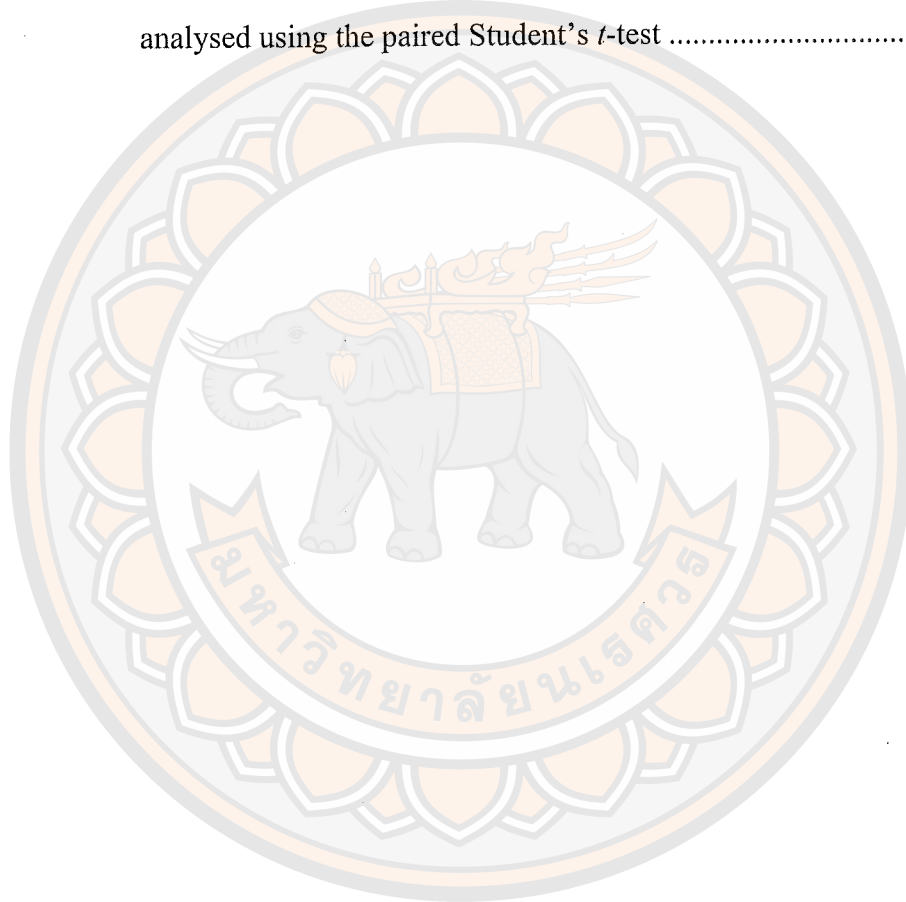
Figures	Page
<p>30 PE-induced contraction induced by Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum of endothelial denuded mesenteric arteries in the presence of DMSO (control), 10 μM of bacopaside I, luteolin and apigenin. The data is % contraction to 10 μM PE induced contraction compared to contractions produced by the initial protocol without test compound. Values are mean±SEM of 5-6 individual arteries. *<i>p</i>&lt;0.01, **<i>p</i>&lt;0.001 each of the active compounds compared with control using unpaired Student's <i>t</i>-test (n=5-6) .....</p>	75
<p>31 Participant flow diagram in the study based on the CONSORT flow diagram.....</p>	79
<p>32 The cognitive effects of chronic EBM consumption were shown as: (a) The sum of response times of tasks for the speed of memory; (b) The sum of % accuracy of tasks for the quality of working memory; (c) The sum of reaction times of tasks for the power of attention; (d) The % accuracy of a task for the continuity of attention. The data were shown as mean±SEM. The statistically significant differences between groups was analysed by Two-way ANOVA .....</p>	84
<p>33 The % change of response time from baseline for the speed of memory of participants in the EBM group and the placebo group. The data were shown as mean±SEM. The statistically significant differences from the two groups (##<i>p</i>&lt;0.01) were analysed in a whole graph comparison of Two-way ANOVA and the difference between week 0 and another week within each group (*<i>p</i>&lt;0.05, **<i>p</i>&lt;0.01) was analysed using paired Student's <i>t</i>-test.....</p>	85

## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figures		Page
34	Sub-group analysis of speed of memory on (a) 4 years of education, (b) more than 4 years of education, (c) 65-80 years of age, (d) 55-65 years of age, (e) farmer, (f) seller, (g) employee, and (h) unemployed. The data were shown as mean±SEM. The statistically significant differences from the two groups ( $^{##}p<0.01$ ) were analysed in a whole graph comparison of Two-way ANOVA and the difference between week 0 and another week within each group ( $*p<0.05$ , $**p<0.01$ ) was analysed using paired Student's <i>t</i> -test.....	87
35	The % change of reaction time from baseline for the power of attention of participants in the EBM group and the placebo group (A) and the % change of accuracy from baseline for the continuity of attention (B). The data were shown as mean±SEM. The statistically significant differences from the two groups were analysed in a whole graph comparison of Two-way ANOVA and the difference between week 0 and another week within each group was analysed using paired Student's <i>t</i> -test.....	88
36	Post-occlusive reactive hyperaemia (PORH) blood flow was presented as the PORH response in the whole hand (A), the finger (B), and the palm (C). Data represent mean±SEM. The difference between week 0 and another week within each group ( $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ ) was analysed using the paired Student's <i>t</i> -test.....	90

## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figures		Page
37	The blood flow velocity in the average of the right and left common carotid arteries. The data were shown as means±SEM. The difference between baseline (week 0) and another week within each group (* $p$ <0.05, ** $p$ <0.01) was analysed using the paired Student's $t$ -test .....	91



## ABBREVIATIONS



ACh	=	acetylcholine
AChE	=	acetylcholinesterase
AD	=	Alzheimer's disease
ADMA	=	asymmetric dimethylarginine
ALP	=	alkaline phosphatase
ALT	=	alanine transaminase
AlCl <sub>3</sub>	=	aluminium chloride
AST	=	aspartate aminotransferase
BBB	=	blood-brain barrier
BM	=	Brahmi
BUN	=	blood urea nitrogen
BW	=	body weight
CAT	=	catalase
Ca <sup>2+</sup>	=	calcium ion
CAM	=	calmodulin
CCA	=	common carotid arteries
cGMP, cAMP	=	cyclic guanosine (adenosine) monophosphate
cIMP	=	cyclic inosine-3': 5'-monophosphate
cm	=	centimeter
CosNat	=	Cosmetics and Natural Products Research Centre
CVD	=	cardiovascular disease
DAG	=	diacylglycerol
EBM	=	Essence of Brahmi mix mulberry
EDHF	=	endothelium-derived hyperpolarizing factor
eGFR	=	estimated glomerular filtration rate
EGTA	=	ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N,N-tetraacetic acid
eNOS	=	endothelial nitric oxide synthase
ER	=	endoplasmic reticulum



## ABBREVIATIONS (CONT.)

ET-1	=	endothelin
FBG	=	fasting blood glucose
GC	=	guanylate cyclase
GCLC	=	glutamate cysteine ligase catalytic subunit
GPO	=	government pharmaceutical organization
GSH	=	reduced glutathione
GST	=	glutathione-S-transferase
GPx	=	glutathione peroxidase
HbA <sub>1c</sub>	=	glycated haemoglobin
HEPES	=	[N-(2-Hydroxyethyl) piperazine N'-(2-ethanesulfonic acid)] heme oxygenase-1 (HO-1)
HR	=	heart rate
I-CAM1	=	intercellular adhesion molecule 1
IP <sub>3</sub>	=	1, 4, 5-inositol triphosphate
K <sup>+</sup>	=	potassium ion
kg	=	kilogram
LASCA	=	laser speckle contrast analysis
LFT	=	liver function test
L-NAME	=	NG-nitro-L-arginine methyl ester
M	=	molar
MCI	=	mild cognitive impairment
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
MLCK	=	myosin light chain kinase
MLCP	=	myosin light chain phosphatase
MMSE	=	mini-mental state examination-Thai 2002
NE	=	norepinephrine
NO	=	nitric oxide
NOS	=	nitric oxide synthase

## ABBREVIATIONS (CONT.)

Nrf2	=	NF-E2-related factor 2
NUACUC	=	Naresuan University Animal Care and Use Committee
NUCAR	=	Naresuan University Center for Animal Research
NU-IRB	=	Naresuan University Ethical Committee for Human Research
PE	=	phenylephrine
peak CVC PORH	=	peak cutaneous vascular conductance PORH
Perimed (Peri-Med)	=	real-time microcirculation imaging peri-cam PSI system
PGI <sub>2</sub>	=	prostacyclin
PIP <sub>2</sub>	=	phosphatidylinositol 1,4-bisphosphate
PKA	=	protein kinase A
PKC	=	protein kinase C
PLC	=	phospholipase C
PMCA	=	plasma membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase
PORH	=	post occlusive reactive hyperaemia
Ps	=	systolic pressure
PU	=	perfusion units
RHBF	=	reactive hyperaemia blood flow
ROCK	=	Rho-associated protein kinase
RyR	=	ryanodine receptor
ROC	=	receptor-operated channel
SAE	=	serious adverse event
SERCA	=	smooth endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
S-NO	=	S-nitrosylation
SOCs	=	store-operated channels
SOD	=	superoxide dismutase
SR	=	sarcoplasmic reticulum
TGDS	=	Thai geriatric depression scale
VaD	=	vascular dementia
V-CAM1	=	vascular cell adhesion molecule 1

## ABBREVIATIONS (CONT.)

VDCC	=	voltage-dependent Ca <sup>2+</sup> channel
VOCC	=	voltage-operated Ca <sup>2+</sup> channel
WHR	=	waist-hip ratio
w/w	=	weight/weight
µg	=	microgram
µM	=	micromolar
5-HT	=	5-hydroxytryptamine



# CHAPTER I

## INTRODUCTION

### **Rationale for the study**

Dementia is a term for several diseases that are mostly progressive, affecting memory, thinking, behaviour and emotion. Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia (VaD) are the most prevalent dementias among the elderly. VaD is explained by vascular causes (Kalaria, 2016). The most important causes of VaD include aging and vascular disease. In vascular disease, blood supply to the brain is obstructed by plaque in the blood vessels, a process called atherosclerosis. Carotid plaques and intima media thickness in midlife was associated with an increased hazard ratio of all-cause dementia and vascular dementia (Gustavsson et al., 2020). Dementia is normally diagnosed when the cognitive impairment has become severe enough. Mild cognitive impairment (MCI) is a state intermediate between normal cognition and dementia. The cognitive functioning of the elderly shows progressive cognitive impairment or decline with age (Pelegri et al., 2019). The development of cognitive impairment was also correlated to lifestyle-related risk factors. The risk factors include physical inactivity, obesity, unbalanced diets, tobacco use and harmful use of alcohol as well as diabetes mellitus and hypertension (Zhao et al., 2015). The dementia cases would actually increase in future years, due to more individuals living to older ages when dementia risk is high (Zissimopoulos et al., 2018).

The dementia affected 47 million people worldwide or 5% of the world's elderly population in 2015. In 2019, Alzheimer's Disease International estimates that there are over 50 million people living with dementia globally. The nearly 9.9 million people globally develop dementia each year. Nearly 60% of people with dementia currently live in low- and middle-income countries and most new cases (71%) are expected to occur in those countries. The current annual cost of dementia is estimated at US \$1trillion (Alzheimer's-Disease-International, 2019; World-Health-Organization, 2017). The cost of care for dementia's patients is expected to increase intensely due to the increasing number of patients due to the aging society (Raju et al., 2020).

The use of dietary herbs has increased rapidly. The representing 80% of people worldwide rely on herbal medicinal products as a primary source of healthcare. Nutraceuticals are alternative to modern medicine, in that herbals and dietary supplements are major constituents to maintain health, act against various diseases and thus promote the quality of life (Dureja et al., 2003; Zhao et al., 2015). However, there were some problems for aging, including a swallowing problem for tablet drug and product safety (Abdel-Rahman et al., 2011; Sunata et al., 2020). Thus, the developed nutraceuticals could provide an economical and possible option for the aging with good taste, easy to take combined with potential health benefits and safety. The clinical studies on the effects of the herbals are consequently important prelude for prevention and treatment of dementia.

Among the herbals, *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. or Brahmi (BM) has been an important component of Ayurvedic medicine and it has traditionally been used as a memory enhancer. BM contains an abundance of bioactive compounds, including saponins and flavonoids. The saponins are predominantly bacopaside I and bacoside A, a mixture of bacoside A<sub>3</sub>, bacopaside II, jujubogenin isomer of bacopasaponin C, and bacopasaponin C. The flavonoids, essentially luteolin and apigenin are also present in BM (Nuengchamnong et al., 2016; Saesong et al., 2019). BM has been used to promote mental health in general as a neurotonic and clearly has a memory improving and neuroprotective properties (Abdul Manap et al., 2019; Charoenphon et al., 2016; Chaudhari et al., 2017; Le et al., 2015; Mathur et al., 2016; Sukumaran et al., 2019). Recently, BM was clarified the neuroprotective effect on the neuroblastoma cells and the anti-apoptosis on the human astrocytes (Saha et al., 2020; Yamchuen et al., 2017). BM increases the working memory by promoting hippocampal neurogenesis (Pham et al., 2020) and it also reversed the neurodegeneration in the hippocampus (S. S. Kumar et al., 2015). BM prevents the dementia via anti-inflammatory action (Saini et al., 2019) and prevents the alterations pro-inflammatory cytokines (Micheli et al., 2020). BM has been shown antioxidant properties in the brain and exhibits antioxidant properties through the elimination of dysfunctional mitochondria (Saha et al., 2020). BM also modulates an anxiety by regulating of plasma corticosterone level (Murugaiyan, & Bhargavan, 2020) and GABAA receptor (Gupta, & Sharma, 2019). BM appears to exhibit no toxicity in haematological and blood biochemistry parameters

(Sireeratawong et al., 2016). Moreover, BM possess other pharmacological actions such as anti-depressant (Mannan et al., 2015), anti-anhedonia (Micheli et al., 2020), anti-cholinesterase (Dhanasekaran et al., 2007), anti-hyperglycaemic (Udhaya Lavinya, & Sabina, 2015) and anti-hyperlipidaemia (Kamesh, & Sumathi, 2012). BM shows an improved coronary blood flow and cerebral blood flow which it acts as a vasodilator (Kamkaew et al., 2013; Kamkaew et al., 2019; Srimachai et al., 2017). This implies that the effect possibly results from cerebrovascular dilatation. However, it still needs supporting evidence from clinical trials to clarify the effects of BM on memory and blood flow.

The clinical studies have shown that acute and chronic daily oral administration of BM improved memory in healthy adults (Benson et al., 2014; N. Kumar et al., 2016). There was a similar effect on the healthy elderly, where consuming BM for 8-12 weeks improved memory (Cicero et al., 2017; Peth-Nui et al., 2012). In addition, BM provided enhancing cognitive performance in patients with the AD or the MCI (Dimpfel et al., 2016; Goswami et al., 2011). However, there has been no clinical study focusing on the effect of BM on human carotid and peripheral blood flow and resulting in cognitive improvement, therefore it has not been suggested for pharmacological treatment of vascular dementia.

In Thailand, BM extract recently was developed as a dietary supplement product (GPO Brahmi®). The product was formulated in tablet form, containing a standardized BM extract (300 mg) with a recommended dose of one tablet daily. However, the tablet form could be difficult to swallow for the elderly (Sunata et al., 2020), so formulation of a BM concentrated essence mixed with fruit such as mulberries could be an alternative. Therefore, the present study aimed (i) to examine the efficacy of the chronic consumption of the BM concentrated essence compared with a placebo in participants by assessing memory, carotid blood flow and blood flow in reactive hyperaemia, and (ii) to study the safety of chronic consumption of the BM concentrated essence by evaluating the fasting blood glucose, glycated haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), liver enzyme, kidney function, lipid profile and calcium levels, blood pressure and heart rate. Blood biochemistry for endothelial function markers, including intercellular adhesion molecule 1 (I-CAM1), vascular cell adhesion molecule 1 (V-CAM1) and asymmetric dimethylarginine (ADMA), were also measured for safety evaluation. The clinical trial

study provided the efficacy of the BM concentrated essence in an innovation form, which is better than the original tablet form. The clinical findings would prove the efficacy and the safety of BM extract in its chronic consumption in healthy elderly. This would be beneficial for supporting BM use as a memory enhancer in terms of its mechanisms of action which might involve the effect on carotid blood flow, peripheral blood flow, and vascular and endothelial function. In addition, this study provides evidence of *ex vivo* vasorelaxant effectiveness of BM components, which could underly the mechanism of improvement of blood flow leading to memory enhancement evaluated in the clinical trial study.

### **Objectives of the study**

#### **Aim of the preclinical study**

To investigate the vasorelaxant effect and mechanisms of action of BM extract active compounds, both saponins and flavonoids, on isolated rat mesenteric arteries.

#### **Aims of the clinical trial study**

1. To examine the efficacy of the chronic consumption of BM concentrated essence compared with a placebo in participants. The parameters included memory, carotid blood flow and blood flow in reactive hyperemia.

2. To study the safety of chronic consumption of BM concentrated essence by evaluating the following parameters; fasting blood glucose, glycated hemoglobin, liver enzyme, kidney function, lipid profile and calcium levels, blood pressure and heart rate. Blood biochemistry for endothelial function markers, including intercellular adhesion molecule 1 (I-CAM1), vascular cell adhesion molecule 1 (V-CAM1) and asymmetric dimethylarginine (ADMA), were also measured for safety evaluation.

### **Scope of the study**

#### **Scope of the preclinical study**

*In vitro* study of vasorelaxant effects of BM extract active compounds on the isolated mesenteric arteries of Wistar rats were carried out using organ bath technique. Saponins (bacoside A and bacopaside I) and flavonoids (luteolin and apigenin) were tested and their effects were compared. The vasorelaxant mechanisms of the active

compounds, including endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway and calcium flux were examined.

### **Scope of the clinical trial study**

This is a clinical trial study which provides the efficacy and the safety of the chronic consumption of BM concentrated essence compared with those of placebo in healthy elderly participants, aged between 55 to 80 years old, without clinical signs of dementia or complaint of memory impairment and not suffering from any diseases, such as schizophrenia, dementia, depression, liver disease, kidney disease, diabetes, cancer, stroke, hypertension and hyperlipidaemia treated with therapeutic anti-hyperlipidaemia drugs. The study was designed as a 12-week double-blind and placebo-controlled randomized trial. Participants were divided into two groups; a BM essence group and a placebo group. Each participant daily consumed a treatment product (concentrated BM essence containing BM extract plus mulberry juice) or a placebo (mulberry juice) once a day for the 12 weeks of the treatment period. During each visit, the participants were required to come to Faculty of Medical Science and the Cosmetics and Natural Products Research Centre (CosNat), Naresuan University. They were asked to attend 6 times, including once for an orientation before the 2-week run-in period, four treatment visits (week 0, 4, 8 and 12), and a final follow up visit. The measured parameters were memory, carotid blood flow, reactive hyperaemic blood flow, blood pressure, and blood biochemistry parameters. The 15 ml blood from a subject was drawn for analysis according to the parameters of blood biochemistry, i.e., I-CAM1, V-CAM1, ADMA, glucose, HbA<sub>1c</sub>, insulin, lipid profile and calcium, as well as liver function test (LFT), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine. The subjects were asked about adverse events at week 0, 4, 8, 12 and 16 follow-up visits.

## **Hypothesis**

### **Hypothesis of the preclinical study**

Active compounds of BM extract may produce vasorelaxation of rat mesenteric artery through some mechanisms involving: the activation of eNOS pathway and/or the reduction of Ca<sup>2+</sup> influx and/or Ca<sup>2+</sup> release. The vasorexant effect of BM flavonoids may be greater than BM saponins.



### **Hypothesis of the clinical trial study**

Primary outcome: BM concentrated essence consumption may improve working memory in healthy elderly participants.

Secondary outcome: BM concentrated essence may enhance the blood flow, including carotid blood flow and reactive hyperaemic blood flow. The chronic consumption of BM concentrated essence is safe. No significant changes in the tested parameters of blood biochemistry were observed.



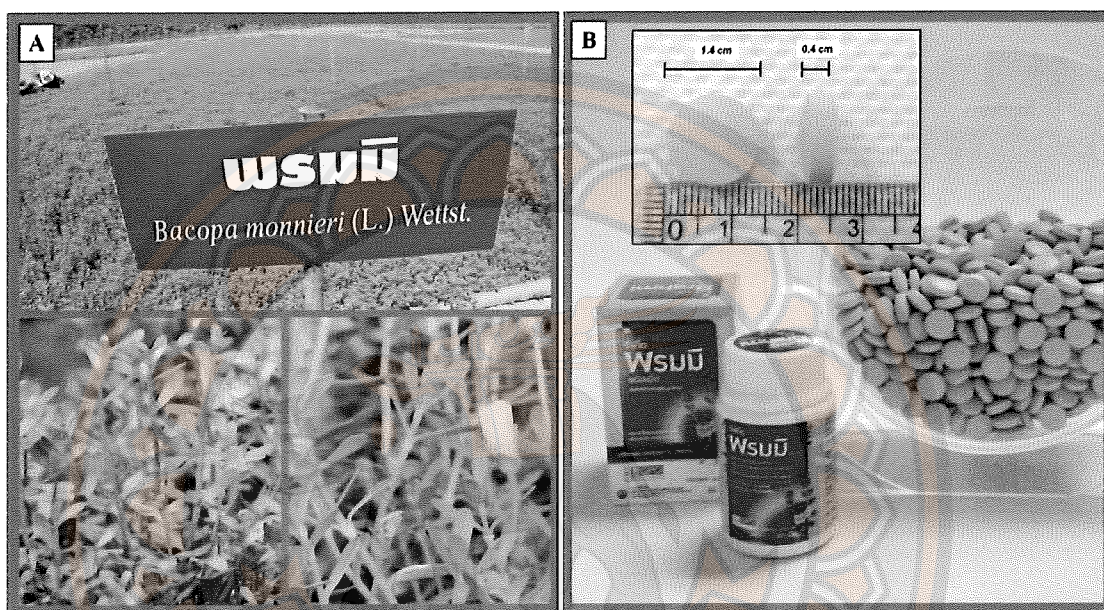
## CHAPTER II

### REVIEW OF RELATED LITERATURE AND RESEARCH

#### *Bacopa monnieri* (BM)

*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. or *Bacopa monniera* (L.) Wettst. is an Ayurvedic medicinal plant, locally known as 'Brahmi'. Its genus *Bacopa* is from the Scrophulariaceae family. Its synonyms are Brahmi (L.) Pennell yes, *Graticola monnieri* L., *Herpestis monniera* L. Kunth., *Lysimachia monnieri* L. Cent., and *Monniera cunefolia* Michaux (Abdul Manap et al., 2019; Russo and Borrelli, 2005). The BM is a small creeping herb with numerous branches. Leaves were simple, sessile, glabrous, opposite and decussate, obovate-oblong to spatulate in shape, green in colour. Flowers were white or pinkish with violet (Figure 1A) (Anju et al., 2017). It grows naturally in wet, sandy areas near streams in tropical regions. Bioactive compounds were observed in BM grown in soil culture rather than by hydroponics (Maneeply et al., 2018). The BM for the study was collected from Phetchaburi province, Thailand. It was identified by Associate Professor Wongsatit Chuakul, from the Faculty of Pharmacy, Mahidol University. The voucher specimen (Phrompittayarat001) was kept at the Pharmaceutical Botany Mahidol Herbarium, Mahidol University. The ethanoic BM extraction was undertaken by Assoc. Prof. Dr. Kornkanok Ingkaninan, from the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University. The total recovered mass was 10% of the starting dried material and of this extract, 6.25% (w/w) was total saponins comprising bacoside A<sub>3</sub> (0.87%), bacoside I (1.03%), bacoside II (1.82%) bacoside X (0.80%), and bacosaponin C (1.73%) (Kamkaew et al., 2011; Nuengchamnonng et al., 2016; Saesong et al., 2019). In Thailand, the government pharmaceutical organization (GPO) has recently developed BM as a food supplement. The product was formulated in tablet form containing 300 mg of standardized BM extract which a recommend dose is one tablet daily (Figure 1B).

This standardized BM extract were licensed and launched into the market. BM traditional used as a memory enhancer, it is known to promote mental health, as a neurotonic and cardiogenic agent. BM extract clearly has a cognitive enhancing potential and neuroprotective effects (Joshi et al., 2021; Kongkeaw et al., 2014; Mathur et al., 2016; Purusothaman et al., 2021; Rajan et al., 2015).



**Figure 1** *Bacopa monnieri* (A) and Brahmi tablet supplement of GPO (B)

### Chemical constituents of BM

The chemical constituents of BM are alkaloids, saponins and sterols. BM contains dammarane-type triterpenoid saponins, which are classified as jujubogenin and pseudojujubogenin glycosides (Phrompittayarat et al., 2007a; Phrompittayarat et al., 2007b; Phrompittayarat et al., 2007c). The constituents responsible for its cognitive effects are bacoside A, which is a mixture of saponins including bacoside A<sub>3</sub>, bacopaside II, a jujubogenin isomer of bacopasaponin C and bacopasaponin C, and bacoside B, which is also a mixture of saponins (Abdul Manap et al., 2019). A chemical structure of all BM compounds were appeared in Table 1 and Figure 2 (Blazquez-Sanchez et al., 2017; Yeshanew and Ingkaninan, 2020). The dammarane steroidal saponin glycosides were differed in the nature of the sugar unit attached to the aglycone as well as the position of the olefinic side chain on the aglycone (Saesong et al., 2019; Sookying et al.,

2017). The flavonoids luteolin and apigenin have been found in BM extract (Limpeanchob et al., 2008; Nuengchamnonng et al., 2016; Phrompittayarat et al., 2007a; Phrompittayarat et al., 2007b; Phrompittayarat et al., 2007c; Saesong et al., 2019). The representative HPLC-UV chromatogram of BM extract was shown in Figure 3, which the HPLC method followed the previous report (Saesong et al., 2019). Amount of each compound in 95% ethanolic BM extract analyzed by HPLC was shown in Table 2 which BM extract contained the total flavonoids ~2.1 mg/g and total saponins ~51 mg/g of dried extract.

**Table 1 Chemical formula, molecular weight and structures of BM compounds**

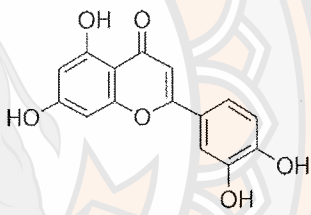
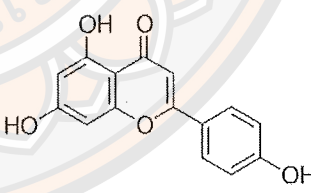
<i>Bacopa monieri</i> compounds		Chemical structure
<b>Flavonoids</b>	<b>Luteolin</b>	 <p>Chemical formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> Molecular Weight: 286.24</p> <p style="text-align: center;"><b>Luteolin</b></p>
<b>Flavonoids</b>	<b>Apigenin</b>	 <p>Chemical formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> Molecular Weight: 270.24</p> <p style="text-align: center;"><b>Apigenin</b></p>

Table 1 (cont.)

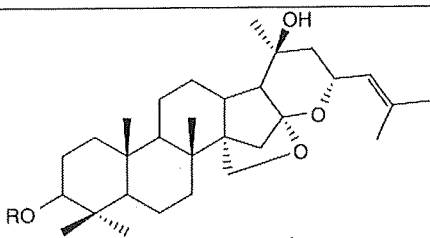
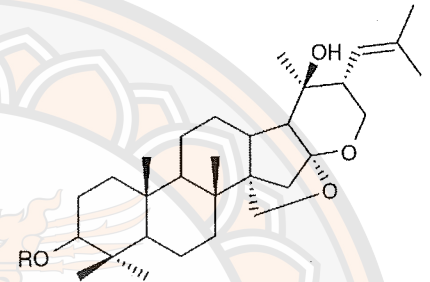
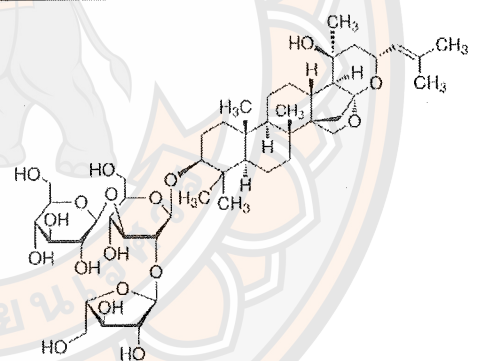
<i>Bacopa monieri</i> compounds		Chemical structure
Saponin glycosides	<b>Bacoside A</b>  (Mixture of Bacoside A <sub>3</sub> , Bacopaside II, Bacopaside X and Bacopasaponin C)	 <b>Jujubogenin</b>
	Chemical formula: NA Molecular Weight: NA	 <b>Pseudojujubogenin</b>
Saponin glycosides	<b>Bacoside A<sub>3</sub></b>  Chemical formula: C <sub>47</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub> Molecular Weight: 929.10	 <b>Bacoside A<sub>3</sub>, Jujubogenin</b> <b>R:</b> α-L-arabinofuranosyl(1 2)-[β-D-glucopyranosyl-(1 3)]-β-D-glucopyranosyl

Table 1 (cont.)

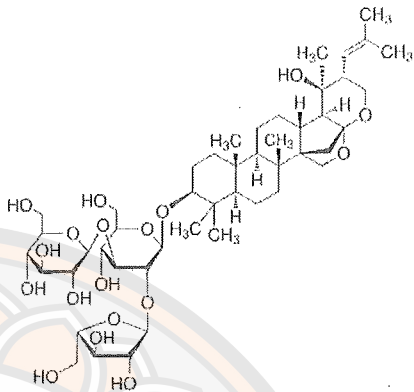
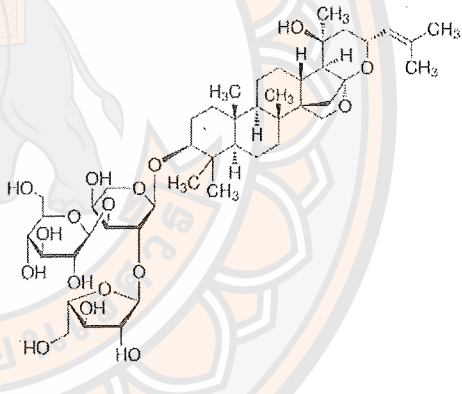
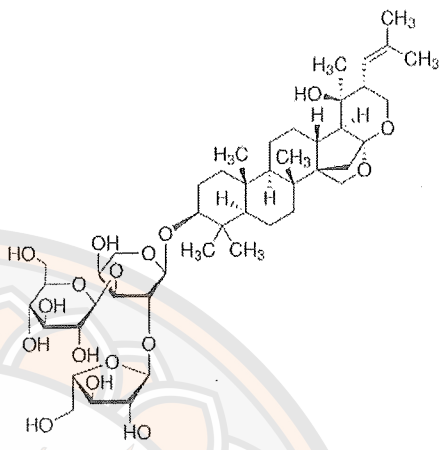
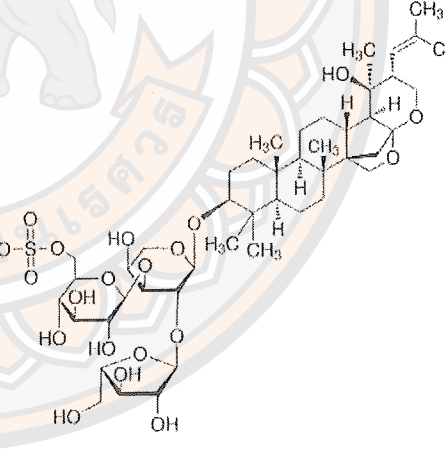
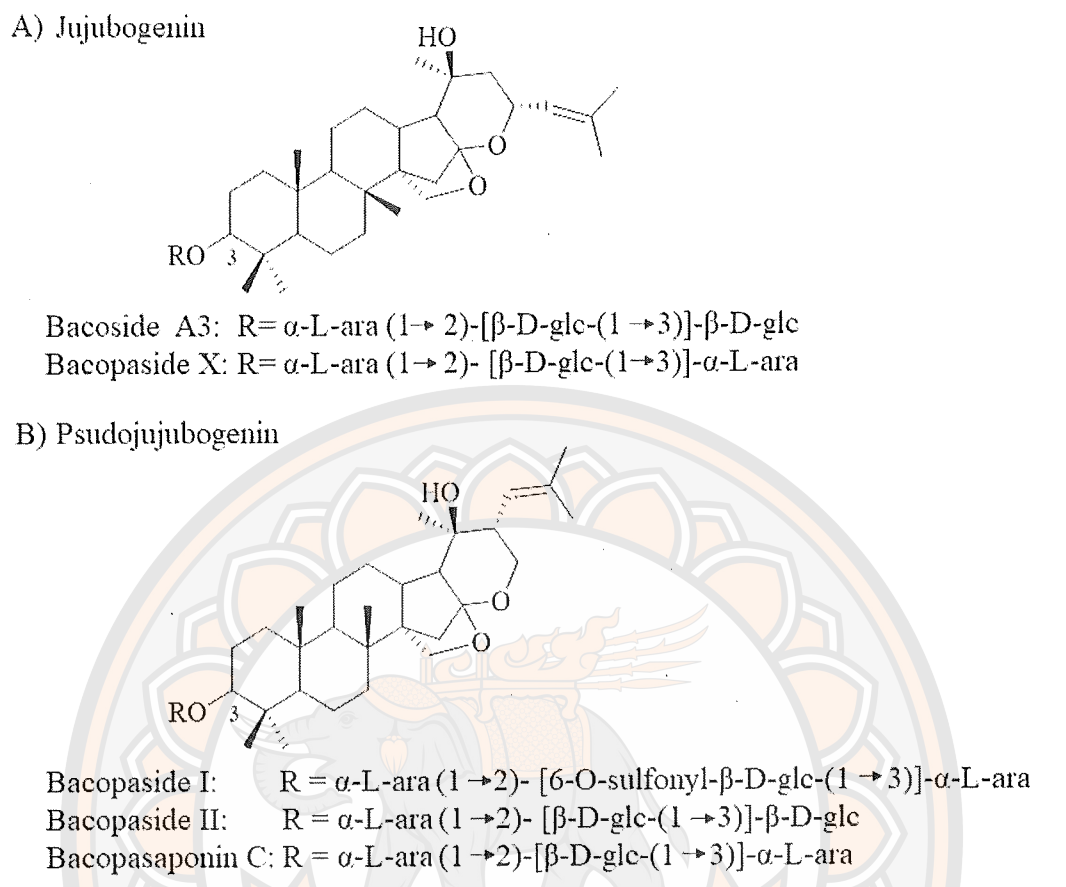
<i>Bacopa monieri</i> compounds	Chemical structure
Saponin glycosides	<p data-bbox="485 450 675 483"><b>Bacopaside II</b></p> <p data-bbox="485 562 727 595">Chemical formula:</p> <p data-bbox="485 618 619 651"><math>C_{47}H_{76}O_{18}</math></p> <p data-bbox="485 674 727 707">Molecular Weight:</p> <p data-bbox="485 730 576 763">929.10</p>  <p data-bbox="839 846 1310 880"><b>Bacopaside II, Pseudojубogenin</b></p> <p data-bbox="785 902 1337 992">R: <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosyl(1 2)-[<math>\beta</math>-D-glucopyranosyl-(1 3)]-<math>\beta</math>-D-glucopyranosyl</p>
Saponin glycosides	<p data-bbox="485 1014 675 1048"><b>Bacopaside X</b></p> <p data-bbox="485 1126 727 1160">Chemical formula:</p> <p data-bbox="485 1182 619 1216"><math>C_{46}H_{74}O_{17}</math></p> <p data-bbox="485 1238 727 1272">Molecular Weight:</p> <p data-bbox="485 1294 576 1328">899.07</p>  <p data-bbox="887 1435 1262 1469"><b>Bacopaside X, Jубogenin</b></p> <p data-bbox="785 1491 1358 1581">R: <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosyl(1 2)-[<math>\beta</math>-D-glucopyranosyl-(1 3)]-<math>\alpha</math>-L-arabinopyranosyl</p>

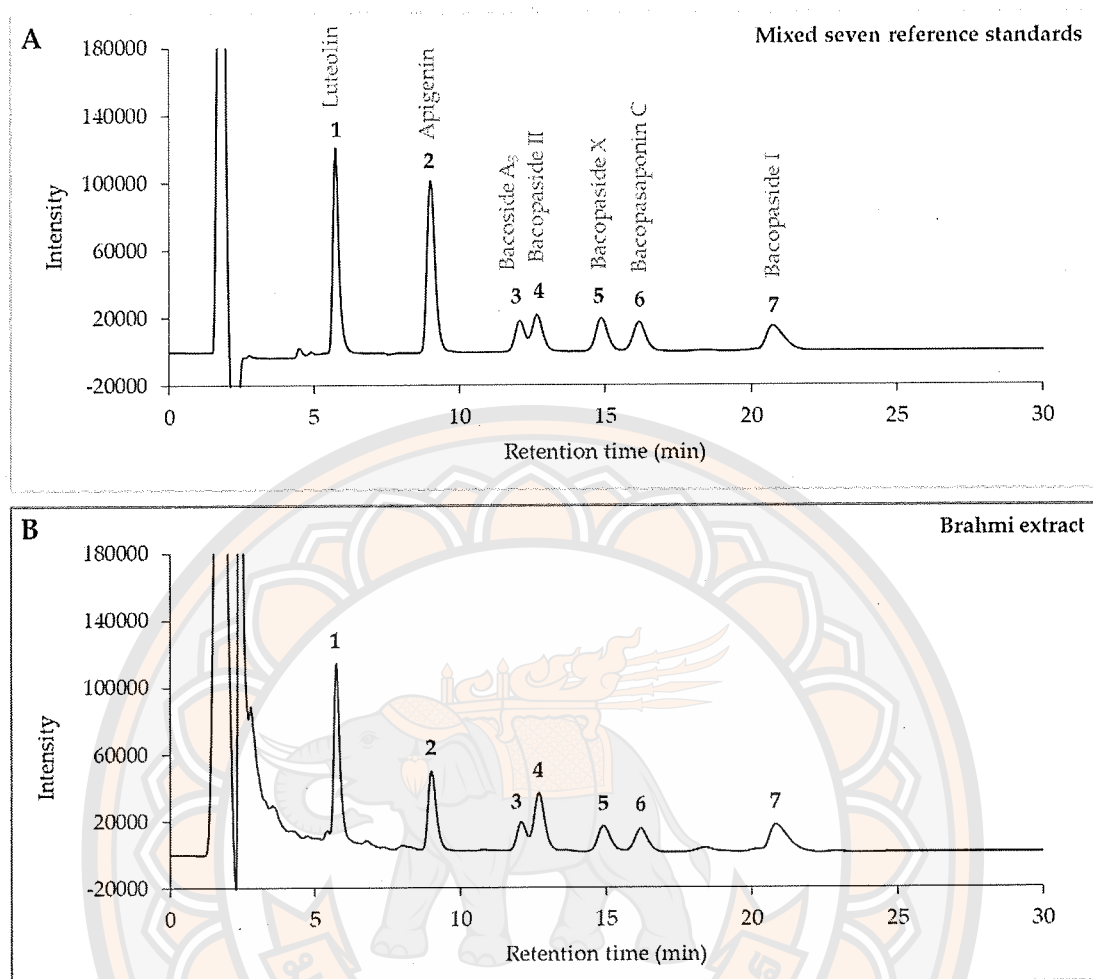
Table 1 (cont.)

<i>Bacopa monieri</i> compounds		Chemical structure
Saponin glycosides	<b>Bacopasaponin C</b>  Chemical formula: $C_{46}H_{74}O_{17}$ Molecular Weight: 899.07	
		<b>Bacopasaponin C, Pseudojубogenin</b> <b>R:</b> $\alpha$ -L-arabinofuranosyl(1 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 3)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl
Saponin glycosides	<b>Bacopaside I</b>  Chemical formula: $C_{46}H_{74}O_{20}S$ Molecular Weight: 979.13	
		<b>Bacopaside I, Pseudojубogenin</b> <b>R:</b> $\alpha$ -L-arabinofuranosyl(1 2)-[6-O-sulfonyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 3)]- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl



**Figure 2** The chemical structure of jujubogenin (A) and pseudojujubogenin glycosides (B)





**Figure 3** Representative HPLC-UV chromatogram of mixed seven standards at 20 $\mu$ g/ml for 1 and 2 and 100 $\mu$ g/ml for 3–7 (A) and BM extract (2mg/ml) (B); luteolin (1), apigenin (2), bacoside A<sub>3</sub> (3), bacopaside II (4), bacopaside X (5), bacopasaponin C (6) and bacopaside I (7)

**Table 2 Amount of each compound in 95% ethanolic BM extract analyzed by HPLC. The values are expressed as averages from triplicate experiments $\pm$ SD**

<b>Compounds of BM extract</b>	<b>Amount (mg/g of dried extract)</b>
Luteolin	1.39 $\pm$ 0.07
Apigenin	0.77 $\pm$ 0.06
Bacoside A <sub>3</sub>	9.16 $\pm$ 0.13
Bacopaside II	15.63 $\pm$ 0.53
Bacopaside X	7.07 $\pm$ 0.36
Bacopasaponin C	8.19 $\pm$ 0.38
Bacopaside I	10.69 $\pm$ 0.19

### **Neuropharmacological effects of BM**

Several preclinical studies have shown the cognitive and neuroprotective effects of BM and its bioactive components. Reviews of previous literature papers from Abdul Manap et al. (2019; Aguiar, & Borowski, 2013; Chaudhari et al., 2017; Sukumaran et al., 2019) suggested the neuropharmacological cognitive enhancing actions of BM and its bioactive components by the mainly mechanisms involved:

1. Antioxidant neuroprotection, or neuronal oxidative stress suppression, or reducing lipoxygenase activity, increasing glutathione peroxidase and chelates iron.
2. Acetylcholinesterase (AChE) inhibition and/or choline acetyltransferase activation, or modulation of neurotransmitters, i.e. acetylcholine (ACh), 5-hydroxytryptamine and dopamine.
3.  $\beta$ -amyloid reduction or prevention of  $\beta$ -amyloid aggregation and formation of fibrils as well as protect neurons against  $\beta$ -amyloid-induced toxicity.
4. Increased cerebral blood flow, or nitric oxide-mediated cerebral vasodilation.
5. Synergic combination of antioxidant, calcium channel blocking activity.
6. Its nonpolar glycosides enable to cross the blood-brain barrier (BBB) via simple lipid-mediated passive diffusion

Recently, Le et al. (2015) clarified the protective effects on ischemia-induced cognitive deficits in mice, dementia model from transient vessels occlusion-induced cognitive deficits was prevented by BM (50 mg/kg) administration for 10 days. The latency and path length of rats administered with bacosides and exposed to hypobaric hypoxia were lower than those of hypoxic rats without bacoside administration, thus BM improved rat memory function in hypobaric conditions (Hota et al., 2009). The *in vitro* study of bacopaside I (25  $\mu$ M) exhibited potent neuroprotective effects against oxygen- and glucose-deprivation -induced neuronal cell damage (Le et al., 2015).

Neuroprotection of BM extract, bacoside A, bacopaside I, bacopaside II, bacoside A<sub>3</sub>, and luteolin has been shown in oxidized LDL-induced toxicity of neuroblastoma cells, by suppression of cellular oxidative stress. This effect is possibly a combined result of its constituents (Yamchuen et al., 2017).

Vollala et al. (2010; 2011a; 2011b; 2011c; 2011d) reported that, after oral administration of BM extract (40 and 80 mg/kg) for 2, 4 and 6 weeks, adult rats showed improvement in their learning behaviour and memory retention using spatial learning (T-maze) tests and retention performance tests and that BM ( $\geq 20$  mg/kg) for  $\geq 4$  weeks also improved memory retention, including the enhancement of learning and memory in neonatal rats. This researchers' group also reported the orally administered BM extract in adult rats caused the enhanced dendritic arborization of amygdala neurons during growth spurt periods, the enhanced dendritic arborization of hippocampal CA<sub>3</sub> neurons, and the enhancement of basolateral amygdaloid neuronal dendritic arborization.

Dwivedi et al. (2013) demonstrated that BM extract (40 and 80 mg/kg) treated enhanced the memory dysfunction in Alzheimer's disease rats as appeared by a reduction in path length and latency time. BM extract (100 mg/kg) also lessened the NaNO<sub>2</sub> and d-Gal levels, which improved the body weight, memory, learning skills, and normalized the ATPase system in Alzheimer's disease-induced mice (Kunte, & Kuna, 2013). Uabundit et al. (2010) showed that oral administration of BM extract (20, 40 and 80 mg/kg) improved the escape latency time in a Morris water maze test and relieved the reduction of neurons and cholinergic neuron densities in a rat model of

Alzheimer's disease induced by the ethylcholine aziridinium ion, thus providing evidence that BM is a potential cognitive enhancer and neuroprotectant against AD.

Saini et al. (2019) recently demonstrated that gavage administration of BM extract (50 mg/kg) for 15 days prevented colchicine-induced inflammation and  $\beta$ -amyloid production. Dhanasekaran et al. (2007) demonstrated mechanisms of action relevant to the treatment of AD, whereby BM extract dose-dependently reduced divalent metals and scavenged reactive oxygen species, decreased the formation of lipid peroxides, inhibited lipoxygenase activity and showed a reduction in  $\beta$ -amyloid levels in the brain of an AD doubly transgenic mouse model. BM extract (40 and 160 mg/kg) reversed both Y-maze and open-field hyperlocomotion behavioral changes in PSAPP mice, model for spontaneous amyloid plaque formation, suggested that BM extract reduced  $\beta$ -amyloid 1-40 and 1-42 levels in the cortex (Holcomb et al., 2006). There was an *in vitro* study demonstrating that BM extract protected rat neurons from  $\beta$ -amyloid-induced cell death, which was possibly due to its ability to suppress cellular AChE activity (Limpeanchob et al., 2008).

The oral administration of BM extract (30 mg/kg) for 7 days enhanced learning ability in rats and the extracts showed a dose (10-1000 mg/kg)-dependent inhibitory effect on AChE activity, which was replicated by *Ginkgo biloba* (Das et al., 2002). Oral administration of BM extract (40 mg/kg) for 7 days reversed a phenytoin-induced cognitive deficit in mice (Vohora et al., 2000). The BM extract (40 mg/kg) feeding for 3 months inhibits AChE on aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) induced rats (Tripathi et al., 2011). Bacosides (200 mg/kg) present in BM extract prevented the lipofuscin aggregation in the middle-aged and aged rat brain cortex, as well as enhanced the synthesis of cholinergic neurotransmitter ACh, modulated the metabolism of monoaminergic neurotransmitters and inhibited lipid peroxidation in the aged brain rats (Rastogi et al., 2012). Bacosides are commonly nonpolar glycosides, which enable it to cross the BBB via simple lipid-mediated passive diffusion (Chakravarty et al., 2001; Pardridge, 1999). Another neurotransmitter, serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and its receptors are involved therapeutic aspects of learning and memory, the investigation of BM in pilocarpine-induced temporal lobe epileptic rats showed upregulation of 5-HT(2C) receptors, and increase in 5-HT(2C) gene expression in the epileptic hippocampus (Krishnakumar et al., 2009). Likewise, BM has neuroprotective

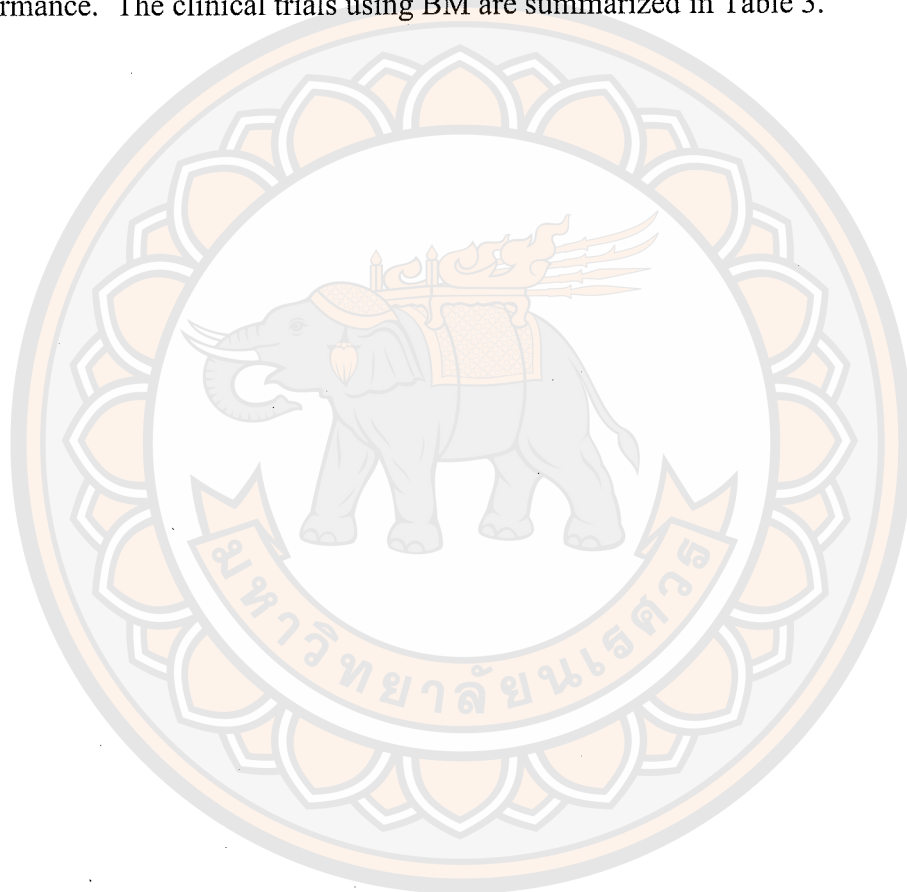
capability in reversing the modified dopamine D1 receptor function and gene expressions in the cerebral cortex of neonatal hypoglycaemic rats (Thomas et al., 2013).

Khan et al. (2015) recently clarified that gavage administration of BM extract (30 mg/kg) for 2 weeks improved the memory and learning capability in intracerebroventricular-streptozotocin rats. This study also examined that the extract reduced thiobarbituric acid reactive substances (a marker of lipid peroxidation levels), increase the reduced glutathione (GSH) contents and increase the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in the hippocampus infused by ICV-streptozotocin model. BM extract (40 and 50 mg/kg) treated prevented the reduction in SOD activity and decreased the lipid peroxides and protein oxidation on  $AlCl_3$ -induced rats (Jyoti et al., 2007). Similarly, BM has prevented free radicals in the brain (Anbarasi et al., 2006; Jyoti, & Sharma, 2006). The scopolamine-induced memory impairment in mice were associated with elevated brain lipid peroxides and reduced brain stores of antioxidants, nootropic actions of triterpenoid saponins (50 mg/kg) from BM were observed to attenuated the memory impairment induced by scopolamine in the Morris water maze test and the step-down test in mice. (Y. Zhou et al., 2009). BM also exhibits the antioxidant effect by the increased rat brain frontal cortical, striatal and hippocampal SOD, CAT and GPx activities, which was after 14 and 21 days of BM extract (5 and 10 mg/kg) administration (Bhattacharya et al., 2000). BM has protected human lymphocytes against various clastogens due to its high antioxidant activity, which may have been responsible for the observed protective effects against the clastogens (Deb et al., 2008). Transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) is important for cell protection against chemical-induced oxidative stress. Activation of Nrf2 was associated with activation of its downstream targets, such as heme oxygenase-1 (HO-1) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) (Li et al., 2013). BM also restored GCLC, HO1, and Nrf2 as well reduced the neuronal loss, oxidative stress and neuroinflammation (Dwivedi et al., 2013).

The recent study, Gupta, & Sharma (2019) revealed the protective influence of BM extract (100, 200, 500 mg/kg) by gavage for 3 consecutive days in alcohol abstinence-induced anxiety-like behavior rats. On a rat model of depression where learned helplessness is created by forcing them to swim, BM extract (20 and 40 mg/kg)

treated for 5 days and its constituents, bacopaside I, bacopaside II, and bacopasaponin C alleviated this (Sairam et al., 2002; Yun Zhou et al., 2007)

Various clinical studies of BM revealed mainly neuropharmacological effects, including (i) cognitive improvement, (ii) enhancement of learning capability, (iii) retention of new information, (iv) improvement of performance in a restraint recall, (v) improvement in oral learning, memory attainment, and suppressed recall, (vi) preserve of cognitive ability, (vii) enhancement in prompt memory and response performance. The clinical trials using BM are summarized in Table 3.



**Table 3 Summarise of clinical study on neuropharmacological effects of BM**

Author	Participants/study design	Intervention	Clinical outcome
Micheli et al. (2020)	# 42 patients with significant degree of anhedonia	# Clinically test against anhedonia a standardized BM extract (20% bacosides) # Patients were treated with citalopram or citalopram associated with BM (300 mg bid) for 4 weeks.	↑ Relevant scales (Hamilton depression rating scale, SHAPS, and strength and difficulties questionnaire) in the extract-treated group # BM extract was effective for the management of anhedonia
Simpson et al. (2019)	# The Australian Research Council Longevity Intervention was designed to investigate the effects of Pycnogenol and BM (CDRI08) on cognitive performance in a cohort of 80 eligible elderly participants.	# A randomised, placebo controlled, double-blind, now 4-arm clinical trial including neuroimaging and gut microflora sub-studies at baseline, 3 months and 12 months.	The clinical outcome has not been reported yet
Cicero et al. (2017)	# Mean 66 yrs healthy participants # In Italy # Double-blind, cross-over designed trial versus placebo group study	# Nutraceuticals containing BM extract (320mg), L-theanine, <i>Crocus sativus</i> , copper, folate and vitamin B and D # 2 months treatment	↑ MMSE score ↓ Perceived Stress Questionnaire Index score ↓ Self-Rating Depression Scale score

**Table 3 (cont.)**

Author	Participants/study design	Intervention	Clinical outcome
Dimpfel et al. (2016)	# Mean 61.88 yrs participants with mild cognitive impairment # In Germany	# BM extract (160mg and 320mg) combined with <i>Sideritis</i> extract (500mg)	↑ Spectral power (160mg BM) and attenuation of all waves except for delta (320mg BM) of EEG assessment in fronto-temporal brain areas
(Kumar et al., 2016)	# 19-22yrs healthy participants # In India # Double-blind, placebo-controlled cross-over design	# BM extract (150mg) (Bacognize®) twice daily # Daily for 6wks	↑ Digit span backwards and logical memory test ↑ Serum calcium levels (still within normal range)
Benson et al. (2014)	# Mean 25.23 healthy participants # In Australia # Double-blind, placebo-controlled cross-over design	# BM extract (320mg or 640mg) # Daily for 1 hour and 2 hours	↑ Positive cognitive effects at first- and second-hour post consumption on the Stroop tasks as well Letter Search ↑ Positive mod effects ↓ Cortisol levels (physiological stress response)
Downey et al. (2013)	# 18-56 year-old healthy volunteers # Acute, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Study	# BM extract (320mg and 640mg) (KeenMind) # Six repetition of cognitive battery test after 2 hours of treatment	↑ Performance at the first, second, and fourth repetition post-dosing on the CDB with the 320 mg BM extract treatments



**Table 3 (cont.)**

<b>Author</b>	<b>Participants/study design</b>	<b>Intervention</b>	<b>Clinical outcome</b>
Sathyanarayanan et al. (2013)	# 35-60 year-old healthy adults # Double-blind randomized, placebo control study	# BM extract (450mg daily) # 12wks consumption of two capsules	Trend to ↓ state anxiety No effect on the cognitive measurement
Peth-Nui et al. (2012)	# Mean 62.6 healthy participants # In Thailand # Double-blind, randomized design	# BM extract (300mg or 600mg) # Daily for 12wks	↑ Working memory and attention ↓ P300 and N100 latencies. ↑ Plasma AChE activity suppression
C. K. Stough et al. (2012)	# 60-75 year-old Healthy elderly participants # Randomized, double-blind, placebo-controlled, 3-arm parallel-groups	# BM extract (300mg) (KeenMind) or Pycnogenol (150mg) # At 3, 6, 12months cognitive test, mood and health test, cardiovascular test, biochemical test	No result (publication of research protocols)
Goswami et al. (2011)	# 60-65 years of age of Alzheimer's disease patients # Open label, prospective, uncontrolled, non-randomized trial	# BM extract (300mg) (Bacognize®) # Twice a day for 6 months	↑ MMSE score including, orientation of time, place & person, attention, reading, writing & comprehension

**Table 3 (cont.)**

<b>Author</b>	<b>Participants/study design</b>	<b>Intervention</b>	<b>Clinical outcome</b>
Morgan, & Stevens (2010)	# ≥ 55yrs healthy participants # In Australia # Double-blind, randomized placebo-controlled parallel trial design	# BM extract (300mg) # Daily for 12wks	↑ Memory acquisition, verbal learning, and delayed recall measure ↑ Total learning and retroactive interference
Usha et al. (2008)	# Mean 10.5yrs healthy participants # In India	# BM extract (225mg) # Daily for 16wks	↑ Working memory and short-term verbal memory ↑ Logical memory, memory related to personal life ↑ Visual and auditory memory
C. Stough et al. (2008)	# 18-60yrs healthy participants # In Australia # Double-blind, randomized placebo-controlled parallel trial design	# BM extract (300mg) (1.50 mg per capsule x 2) # Daily for 12wks	↑ Working memory, spatial working memory ↓ Amount of false alarms
Calabrese et al. (2008)	# >65 years (Mean 73.5yrs) healthy participants # In USA # Double-blind, randomized placebo-controlled parallel trial design	# BM extract (300mg) # Daily for 12wks treatment # 6wks placebo run-in	↑ Delayed word recall memory scores ↑ Stroop results ↓ Depression scores ↓ Combined state plus trait anxiety scores

Table 3 (cont.)

Author	Participants/study design	Intervention	Clinical outcome
Barbhaiya et al. (2008)	# 50-75 years healthy volunteers with complaint of memory impairment # Double-blind randomized, placebo control study	# BM extract (450mg) (BacoMind®) daily # Duration of 24wks Test medication (12wks) and withdrawal period (12wks)	↑ Cognitive functions such as attention and verbal memory ↑ Auditory registration of information & immediate attention skill
Raghav et al. (2006)	# 55-60 years healthy elderly volunteers # Double-blind randomized, placebo control study	# BM extract (125mg) (Keenmind®) twice a day # 16wks duration, 12wks for treatment, followed by the placebo for 4wks to both groups	↑ Mental control, logical memory and paired associated learning during the 12-week drug therapy
Roodenrys et al. (2002)	# 40-65yrs healthy participants # Australia # Double-blind, randomized placebo-controlled parallel trial design	# BM extract (300mg) (<90kg subject) # 450mg BM extract (>90 kg subject)	↑ Retention of new information
C. Stough et al. (2001)	# 18-60yrs healthy participants # Australia # Double-blind, randomized placebo-controlled parallel trial design	# 300mg BM extract # Daily for 12wks	↑ Speed of visual information ↑ Learning rate and memory consolidation ↓ Forgetting rate

Table 3 (cont.)

Author	Participants/study design	Intervention	Clinical outcome
Sharma, R. et al. (1987)	# 6-8yrs healthy participants # India # Double-blind, randomized placebo-controlled parallel trial design	# 350mg of BM extract # 3 times daily for 12wks	↑ Exploratory drive ↑ Perceptual images of patterns ↑ Perceptual organization and reasoning ability

### Cardiovascular effects of BM

BM extract has relaxed isolated guinea-pig and rabbit pulmonary arteries and rabbit aorta, after the relaxation had been reduced by cyclooxygenase inhibitor and indomethacin (Dar, & Channa, 1997). Calcium chloride-induced contraction in rabbit pulmonary arteries and aorta has been attenuated by BM extract (100-700 µg/ml), implying its direct inhibitory effect on the influx of calcium ions into smooth muscle cells. However, BM extract caused no effect on the mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Dar, & Channa, 1999). Various fractions and sub-fractions isolated from BM extract have produced the inhibition of carbachol-induced hypotension and bradycardia in anaesthetized rats (Channa et al., 2003). BM has also had a relaxant effect on other types of smooth muscle. An ethanolic extract of BM induced relaxation in ring segments of guinea-pig trachea, which had been blocked by propranolol ( $\beta$ -adrenoceptor antagonist) and indomethacin (general cyclooxygenase blocker) (Dar, & Channa, 1997). This response may have involved  $\beta$ -adrenoceptors and the cyclooxygenase pathway (Dar, & Channa, 1997). A methanolic fraction and  $CHCl_3/MeOH$  sub-fraction of BM caused a reduction in calcium chloride-induced contraction on guinea-pig ileum, which implied an interference with  $Ca^{2+}$  movement (Channa et al., 2003).

We, (Kamkaew et al., 2011), recently demonstrated that BM acted as a vasodilator by releasing nitric oxide from endothelium, inhibiting calcium influx into intracellular fluid and inhibiting the release of calcium from sarcoplasmic reticulum. These mechanisms caused an acute decrease in blood pressure. It also had an antihypertensive action in rats chronically treated with L-NAME (Onsa-ard et al., 2012). Our previous study demonstrated the effect of daily oral BM (40 mg/kg) on cerebral blood flow in rats. In an 8-week trial, rats treated with Brahmi clearly showed a significant increase in cerebral blood flow (Kamkaew et al., 2013). Since systemic blood pressure was unchanged, this implied that the effect resulted from cerebrovascular dilatation.

There have been studies of BM extract cardioprotective activity. Oral administration of hydro-alcoholic BM extract (100-200 mg/kg) for 30 days produced cardioprotection against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats (Nandave et al., 2007). Recently, Srimachai et al. (2017) found that BM improved myocardial function following ischemia/reperfusion injury through recovery of coronary blood

flow, contractile force and a decrease in infarct size. Thus this may lead to a novel cardioprotectant strategy.

### **Safety studies of BM**

There have been some toxicity studies in animals. A single oral administration of BM extract at a large dose of 5,000 mg/kg for 2 weeks in rats did not cause mortality or any serious undesirable effects. No histopathological change in internal organs, including the liver and the kidney, were observed (Sireeratawong et al., 2016). A subchronic oral toxicity study for 3 months in rats at doses of 85, 210 and 500 mg/kg of standardized BM extract did not reveal any evidence of toxicity with respect to clinical signs, neurological examination, food consumption, body weight gain, hematological or blood biochemistry parameters. The absolute and relative organ weight of vital organs did not differ significantly from that of the control. Necropsy and histopathological examination did not reveal any remarkable or treatment related changes a level of 500 mg/kg bodyweight was established in rats as having no adverse effects (Joshua Allan et al., 2007). Chronic oral administration at doses of 30, 60, 300 and 1,500 mg/kg for 9 months in rats did not produce toxicity. However, the blood chemistry parameters, glucose and aspartate aminotransferase, underwent minor alteration but remained within the normal range in rats treated with 60, 300 and 1,500 mg/kg of BM extract. This data suggested that BM extract did not alter the function of the pancreas, liver or kidney (Sireeratawong et al., 2016). The LD<sub>50</sub> of BM extract administered orally to rats was 5 g/kg for aqueous extracts and 17 g/kg for the alcohol extract (Al-Snafi, 2013).

A safety study of BM in humans showed that oral administration of BacoMind<sup>®</sup>, an enriched phytochemical composition of BM (300 mg for the first 15 days and 450 mg for the next 15 days), in healthy adults did not cause any serious or abnormal physiological, biochemical or electrocardiographic effects. Mild adverse gastrointestinal events were observed in the trial, which subsided spontaneously. BacoMind<sup>®</sup> therefore met the safety criteria at the dose administered for the given duration of trial period in healthy adult volunteers (Pravina et al., 2007).

### **Efficacy and safety of mulberry**

Mulberry or *Morus alba* Linn. abundantly contain active anthocyanin compounds. Oral treatment with mulberry fruit extract in streptozotocin-induced diabetic mice for 2 weeks caused a decrease in fasting blood glucose (FBG) and glycosylated serum protein (GSP), and an increase in antioxidant enzymatic activity (SOD, CAT, GSH-Px), thus mulberry fruit extract produced antidiabetic and antioxidant activities (Wang et al., 2013). Seven week administration of mulberry fruit extract polysaccharides on high-fat diet-induced and streptozotocin-induced diabetic rats has shown antidiabetic effects (Jiao et al., 2017). Oral mulberry fruit extract treatment (210 mg/kg) in atherosclerotic rats for 6-week has shown reduced total cholesterol, triglyceride, and LDL-cholesterol levels, as well as the atherogenic index. Furthermore, this treatment enhanced anti-oxidative enzyme activity. Histopathological examination has shown that mulberry fruit extract attenuated hepatic steatosis and reduced intima-media thickness and arterial atherosclerotic lesions in atherosclerotic rats (Jiang et al., 2017). Rats fed with high fat diet supplemented with mulberry fruit powder had decrease in the serum liver triglyceride, total cholesterol and serum LDL cholesterol and increase in the serum HDL cholesterol, suggested that mulberry fruits might have a hypolipidemic effect because mulberry fruits have high content of dietary fiber and linoleic acid (Yang et al., 2010). Chen et al. (2005) also reported that rabbits fed with high cholesterol diet plus mulberry fruit extract for 10 weeks had lower levels of total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides, and reduced severe atherosclerosis in the aorta. They found no adverse effects on the changes of liver or renal functions were reported (Chen et al., 2005). Moreover, no significant changes of serum blood urea nitrogen, creatinine, potassium and sodium ions were found in the hamsters fed with mulberry fruit water extract for 12 weeks (Peng et al., 2011). However, there is insufficient clinical study of the mulberry fruit for the safety of mulberry fruit consumption (Zhang et al., 2018)

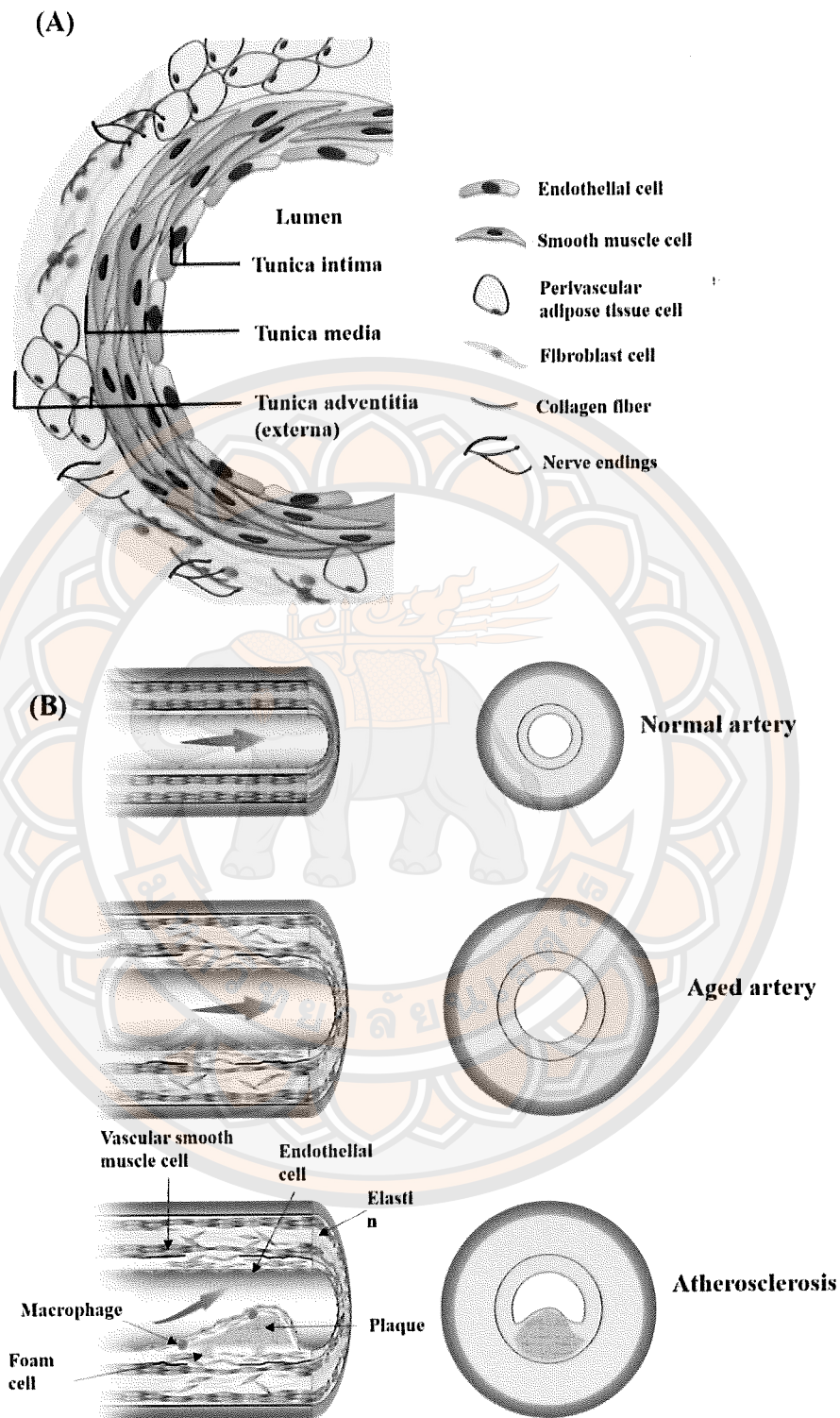
### **Vascular structure**

The walls of blood vessels are composed of three layers. The tunica intima (endothelial cells and internal elastic membrane) which lines the lumen or interior of vessels, is the thin layer of endothelium (squamous epithelial cells) resting on the

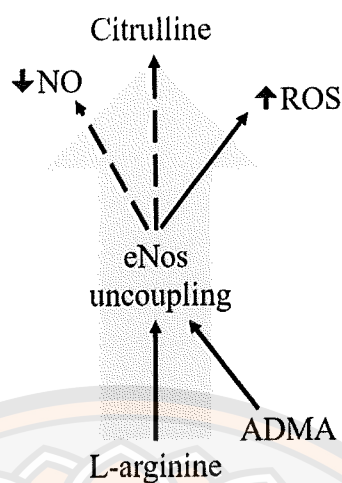
basement membrane. The tunica media (vascular smooth muscle cells and external elastic membrane) making up most of the mass is mostly smooth muscle and elastic tissue. The tunica adventitia is the outermost tunic; it is composed largely of fibrous connective tissue. The tunica adventitia contains perivascular adipose tissue cells, fibroblast cells, collagen fibers and nerve endings. Its function is basically to support and protect the vessels (Zhao et al., 2015) (Figure 4A). A histology of the normal vessel and histological alterations of vascular aging and atherosclerosis was illustrated as cross sectional view of the arterial wall (Figure 4B). Aged artery is characterized by a thickened vessel wall, thickened subendothelial layer, elastin fragments, vascular smooth muscle cells migration and invasion. Atherosclerosis is characterized by the accumulation of plaque and the invasion of macrophages and foam cells (Xu et al., 2017). The vascular structural changes can cause vascular stiffness, impaired endothelial function and increased blood-brain barrier permeability. Vascular aging induces vascular remodeling, causing vascular dysfunction, cerebrovascular and cardiovascular diseases. The vascular effects of aging were noted from atherosclerosis, which is distinguished by a variety of structural alterations in the vascular wall including an accumulation of lipids in plaques (Figure 4B) (Xu et al., 2017).

The metabolism of endothelial cells was a potential target in atherosclerosis. The L-arginine competes with the asymmetric dimethylarginine (ADMA) and increased production of nitric oxide (NO). The atherosclerotic patients were evidenced with high plasma ADMA levels and leads to reduced eNOS activity (Figure 5) (Pircher et al., 2016).





**Figure 4 Vessel structure (A) and histology of the normal vessel, vascular aging and atherosclerosis (B)**

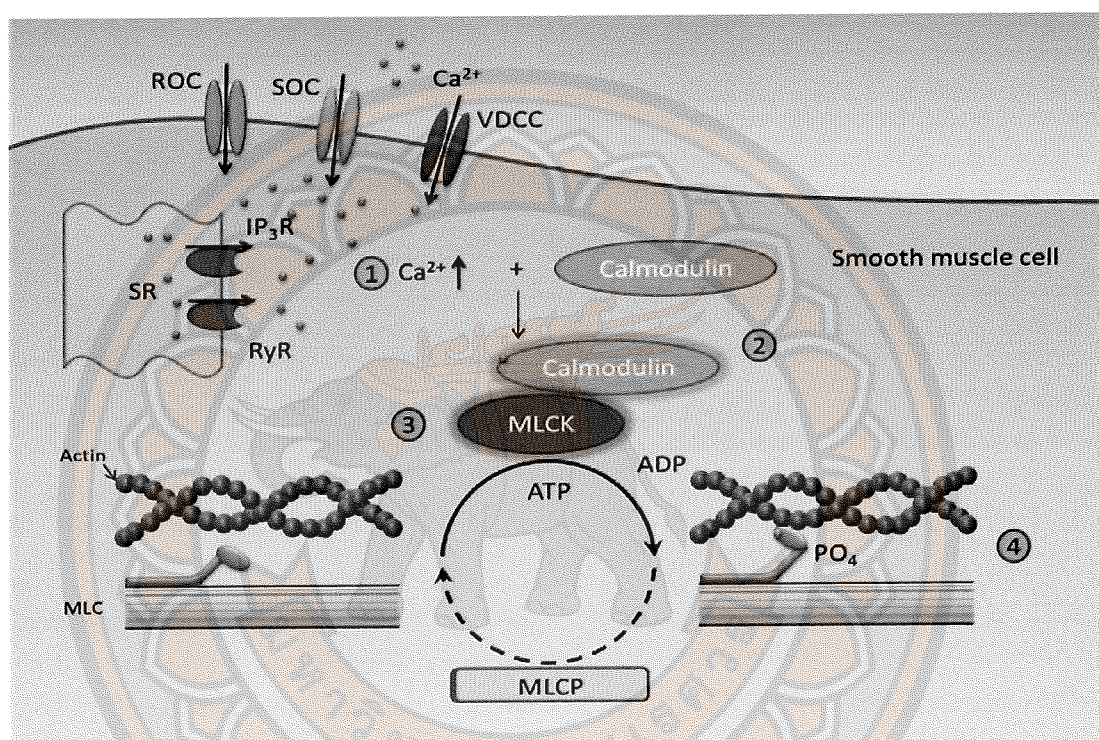


**Figure 5 Endothelial cells metabolism deregulation in atherosclerosis**

### Regulation of vascular tone

The increase in  $[Ca^{2+}]_i$  leads to the activation of contractile machinery in vascular smooth muscle in that, firstly,  $Ca^{2+}$  forms a complex with the calcium binding protein, calmodulin (CAM). Secondly, the  $Ca^{2+}$ -calmodulin complex activates a phosphorylating enzyme called myosin light chain kinase (MLCK), which causes phosphorylation by ATP of the light chain protein that is a portion of the cross-bridge head of myosin. Finally, myosin light chain phosphorylation enables cross-bridge formation and cycling during which energy from ATP is utilized for tension development and shortening of myofilament. Figure 6 was shown the mechanical or pharmacological activation increases the intracellular calcium concentration by influx into the cell following opening of calcium channels in the plasma membrane via receptor-operated channel (ROC), store-operated channel (SOC) and voltage-dependent calcium channel (VDCC). The calcium ion from internal stores (sarcoplasmic reticulum) was released via inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) receptor ( $P_3R$ )-mediated calcium release and: ryanodine receptor (RyR)-mediated calcium release. The intracellular free calcium ions bind to calmodulin and the calcium calmodulin complex activates MLCK. Activated MLCK phosphorylates the myosin light chain (MLC), which leads to cross-bridge formation between the myosin heads and the actin filaments. Cross-bridge formation results in contraction of the smooth muscle cell.

Receptor-operated channel (ROC) and store-operated channel (SOC); voltage-dependent calcium channel (VDCC). Vasoconstrictors also promote contraction by  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization is caused by the inhibition of myosin phosphatase (MLCP) which normally permits relaxation. This increases myosin light-chain phosphorylation (Zhao et al., 2015).

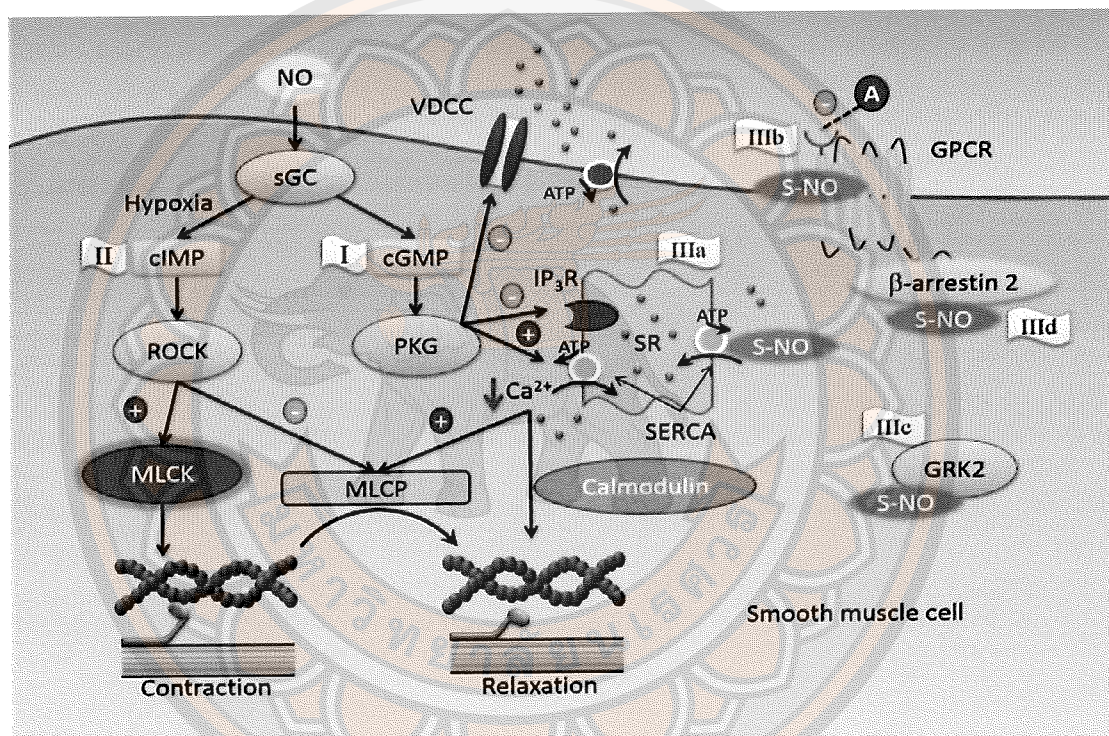


**Figure 6 Mechanical or pharmacological activation increases the intracellular calcium concentration**

Regulation of vascular tone by nitric oxide (NO). NO regulates vascular tone by stimulation of soluble guanylyl cyclase (sGC) in the vascular smooth muscle cells to induce formation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). The cGMP activates protein kinase G (PKG), which prevents the calcium influx from VDCC and calcium release mediated by IP<sub>3</sub>R. PKG also acts on sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) to promote the reuptake of cytosolic calcium into the SR. The intracellular calcium concentration was decreased and calmodulin is inactivated which

no longer able to activate MLCK. Calcium depletion also increases the activity of MLCP. The actin-myosin cross-bridge is broken and caused smooth muscle relaxation

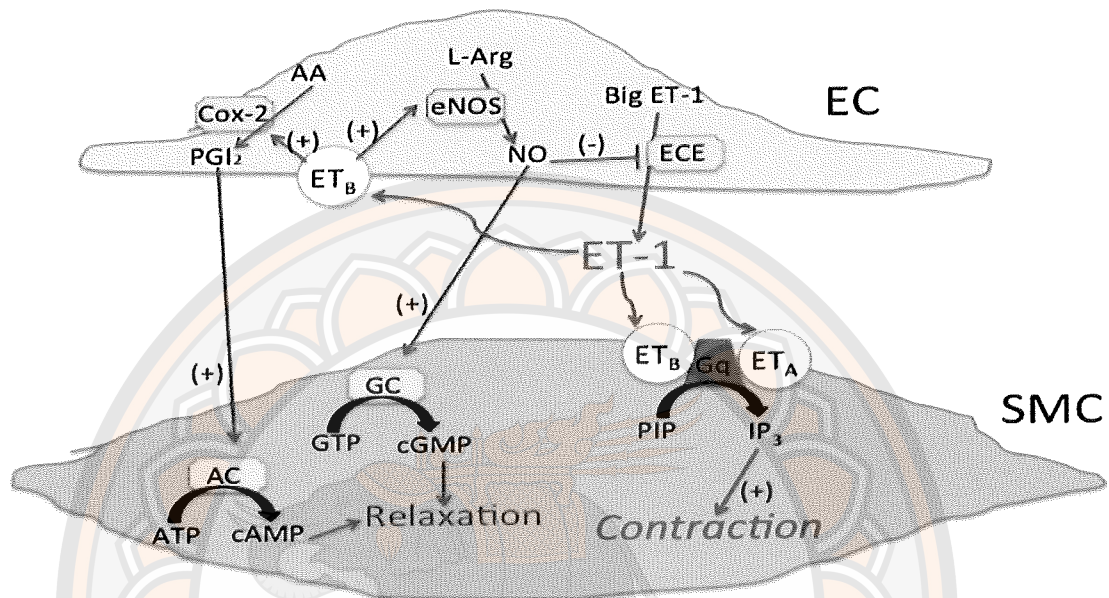
Under hypoxic condition, sGC produces inosine cyclic 30,5'-monophosphate (cIMP) instead of cGMP, which activates Rho-associated protein kinase (ROCK) and inhibits MLCP, resulting in contraction. S-nitrosylation (S-NO) increases the activity of SERCA which accelerates calcium depletion and induces relaxation (Figure 7) (Zhao et al., 2015).



**Figure 7 Regulation of vascular tone by nitric oxide**

NO strongly inhibits the release of a potent vasoconstrictor, endothelin-1 (ET-1) from the endothelium and ET-1 strongly inhibits NO-mediated vasodilation. ET-1 most relevant in the vasculature and in contributing to the maintenance of vascular tone. At elevated concentrations, associated with pathological conditions, ET-1 is pro-inflammatory and promotes smooth muscle proliferation, in addition to atherosclerosis. The effects of ET-1 are mediated through activation of two receptors, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>. The ET<sub>B</sub> receptor is also found on endothelial cells, where its activation results in

vasodilation mediated by the vasodilator prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) and NO release. The relaxation was occurred.  $\text{ET}_B$  also plays a role in the clearance of circulating ET-1 (Figure 8) (Cahill and Redmond, 2016)



**Figure 8 NO inhibits the release of ET-1, while ET-1 inhibits NO-mediated vasodilation**

### Vascular dementia

There are over 50 million people living with dementia globally in 2019 (Alzheimer's-Disease-International, 2019). The people with dementia currently live in low- and middle-income countries and most new cases (71%) are expected to occur in those countries. The current annual cost of care for dementia's patients is estimated at US \$1trillion (World-Health-Organization, 2017), which was increased intensely due to the increasing number of patients with the aging society (Raju et al., 2020). Vascular dementia (VaD) is the second most common cause of dementia worldwide, after Alzheimer's disease (AD) in the elderly (Román, 2002). VaD is a neurocognitive disorder, which is explained by vascular causes (Kalaria, 2016). The most important causes of VaD include normal aging and vascular disease. In vascular disease, blood supply to the brain is obstructed by plaque in the blood vessels, a process called atherosclerosis. Carotid arteries become narrow as part of cerebrovascular disease. This

leads to a decrease in cerebral blood flow to capillary beds within the brain and causes insufficient oxygen and nutrients to reach the brain. The consequences include brain cell death, also known as hypoxic neuronal death, leading to cortical atrophy. The end result is vascular dementia (de La Torre, 2012). Major risk factors for VaD include hypertension, cardiac disease, diabetes and hyperlipidemia. Currently, there is a lack of effective pharmacological treatment options for VaD (Baskys and Hou, 2007). Current treatment approaches for VaD are mostly limited to simply controlling the major risk factors.

### **Learning and memory**

Learning is the process of acquiring new information, the outcome of which is memory. That is, a memory is created when something is learned, and this learning may occur either by a single exposure to the information, or by repetition of the information. Memory is necessarily something that persists over time.

Learning and memory can be subdivided into three major hypothetical stages:

1. Encoding is the processing of incoming information to be stored and has two separate steps: acquisition and consolidation. Acquisition registers inputs in sensory buffers and sensory analysis stages; consolidation creates a stronger representation over time.

2. Storage, the result of acquisition and consolidation, represents the permanent record of the information.

3. Retrieval utilizes stored information to create a conscious representation or to execute a learned behaviour such as a motor act.

Models of memory include distinctions among sensory memory, short-term memory, and long-term memory, which are based on how long information is retained. Sensory memory has a lifetime measurable in milliseconds to seconds, as when we recover what someone said to us a moment ago even though we were not paying close attention at the time. Short-term memory is associated with retention over seconds to minutes. This category may include remembering a phone number provided by a telephone operator as we frantically try to dial it. Long-term memory is measured in days or years - an event from childhood or from last week, for example. The various

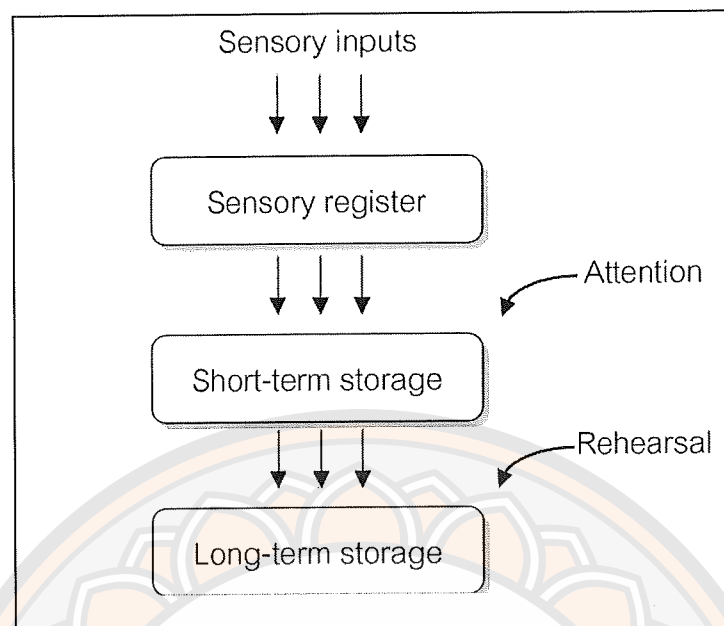
types of short-term and long-term memory are discussed in detail in the sections that follow and summarized in Table 4 (Gazzaniga et al., 2009).

**Table 4 Types of memory**

TYPE OF MEMORY	CHARACTERISTIC OF MEMORY			
	Time Course	Capacity	Conscious Awareness?	Mechanism of Loss
Sensory	Milliseconds to seconds	High	No	Primarily Decay
Short-Term and Working	Seconds to minutes	Limited (7±2 items)	Yes	Primarily Decay
Long-Term Nondeclarative	Days to years	High	No	Primarily interference
Long-Term Declarative	Days to years	High	Yes	Primarily interference

### Short-term memory and working memory

Short-term memory has a time course - seconds to minutes - and a much more limited capacity. Cognitive psychologists elaborated the details of the model. Sensory information enters the information-processing system and is first stored in a sensory register. Items that are selected by attentional processes are then moved to short-term storage. With rehearsal, the item can move from short-term to long-term storage (Figure 9).



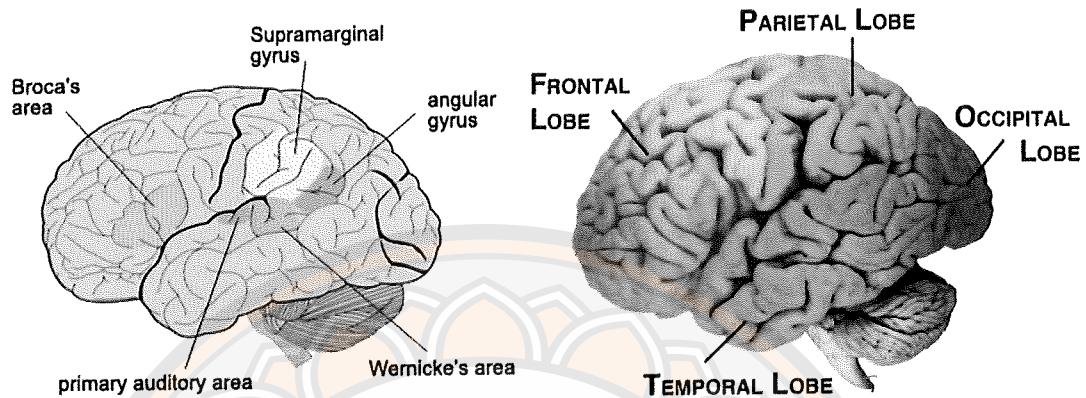
**Figure 9 The model of memory**

The concept of working memory was developed to extend the concept of short-term memory and elaborate the kinds of mental processes that are involved when information is retained over a period of seconds to minutes. Working memory represents a limited-capacity store for retaining information over the short term (maintenance) and for performing mental operations on the contents of this store (manipulation). The contents of working memory could either originate from sensory inputs by way of sensory memory or could be retrieved from long-term memory. In each, working memory contains information that can be acted on and processed, not just maintained by rehearsal, although such maintenance is one aspect of working memory.

Deficits in short-term memory abilities, such as remembering items on a digit span test, can be correlated with damage to subcomponents of the working memory system. Each system can be damaged selectively by different brain lesions. Lesions of the left supramarginal gyrus lead to deficits in phonological working memory. Patients with lesions to this area have reduced auditory-verbal memory spans. The visuospatial sketch pad is compromised by damage to parieto-occipital region of both hemispheres,



but damage to the right hemisphere produces more severe deficits in visuospatial short-term memory (Gazzaniga and Miller, 2009) (Figure 10).



**Figure 10 Gyrus and region of brain**

### **Working memory assessment**

This study assessed the memory and the attention, in order to study the working memory in volunteers after treated with Brahmi concentrated essence. Four domains of working memory comprising power of attention, continuity of attention, quality of memory, and speed of memory were assessed via computerized battery test (Peth-Nui et al., 2012). Four domains included:

- Domain 1: Power of attention,
- Domain 2: Continuity of attention
- Domain 3: Quality of memory
- Domain 4: Speed of memory

A selection of computer-controlled tasks from the system was administered. Task presentation was performed via touch-screen monitors, and all responses were recorded via YES/NO response boxes on the screen. The entire selection of tasks presented took approximately 20 minutes. Tests was administered in the following order (Table 5).

**Table 5 Tasks for cognitive assessment**

<b>Tasks</b>	<b>Methods</b>	<b>Assessments</b>	<b>Interpretations</b>
Word recognition	Fifteen words, matched for frequency and concreteness, were presented in sequence on the monitor for the participant to remember. The stimulus duration will be 1 s, as was the interstimulus interval.	1) accuracy 2) response time	1) quality of memory 2) speed of memory
Picture recognition	A series of 20 photographic images was presented on the monitor at the rate of 1 every 3 s, with stimulus duration of 1 s, for the participant to remember.	1) % accuracy 2) response time	1) quality of memory 2) speed of memory
Simple reaction time	The participant was instructed to press the “yes” response button as quickly as possible every time the word “yes” present on the monitor. Fifty stimuli were presented with an interstimulus interval that varied randomly between 1 and 3.5 sec. Reaction times were recorded in milliseconds.	1) reaction time	1) power of attention
Digit vigilance task	A target digit was randomly selected and constantly displayed to the right of the monitor screen. A series of digits was presented in the centre of the screen at the rate of $80 \text{ min}^{-1}$ , and the participant was required to press the “yes” button as quickly as possible every time the digit in the series matched the target digit. The task was last 1 min and there were 15 stimulus-target matches.	1) % accuracy 2) reaction time	1) power of attention 2) continuity of attention

Table 5 (cont.)

Tasks	Methods	Assessments	Interpretations
Choice reaction time	Either the word “no” or the word “yes” will be presented on the monitor, and the participant will be required to press the corresponding button as quickly as possible. There will be 50 trials, in which the stimulus word will be chosen randomly with equal probability, with a randomly varying interstimulus interval of between 1 and 3.5 s.	1) % accuracy 2) reaction time	1) power of attention 2) continuity of attention
Spatial working memory	A pictorial representation of a house will be presented on the screen with four of its nine windows lit. The participant was instructed to memorize the position of the illuminated windows. In 36 subsequent presentations of the house, one of the windows will be illuminated and the participant will decide whether or not this matched one of the lighted windows in the original presentation. The participant will make their response by pressing the “yes” or “no” response button as quickly as possible. Mean response times will be measured in milliseconds, and the accuracy of responses to both original and novel (distracter) stimuli will be recorded as percentages that will be used to derive a “percentage greater than chance performance” score.	1) % accuracy 2) response time	1) quality of memory 2) speed of memory

Table 5 (cont.)

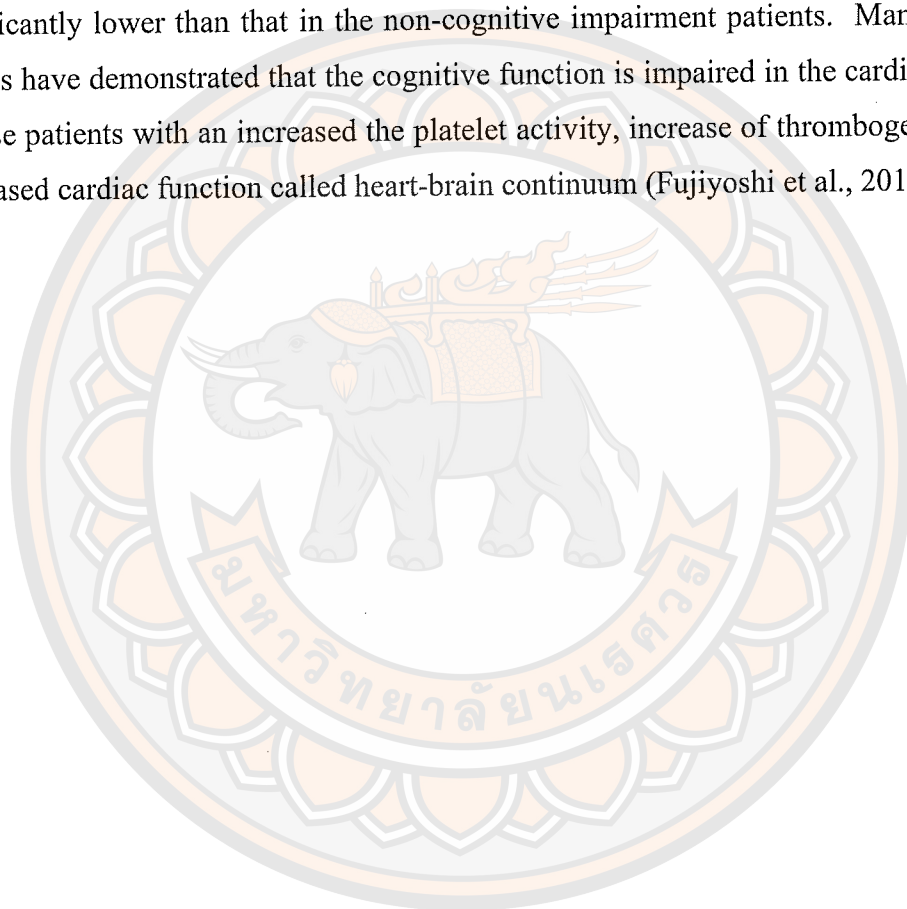
Tasks	Methods	Assessments	Interpretations
Numeric working memory	<p>Five digits will be presented sequentially for the participant to hold in memory. This will be followed by a series of 30 probe digits for each of which the participant will decide whether or not it had been in the original series and will press the “yes” or “no” response button as appropriate as quickly as possible. This will be repeated two further times with different stimuli and probe digits. Mean response times were measured in milliseconds and the accuracy of responses to both original and novel (distracter) stimuli were recorded as percentages that were used to derive a “percentage greater than chance performance” score.</p>	<p>1) % accuracy 2) response time</p>	<p>1) quality of memory 2) speed of memory</p>

### **Association of cognition and vascular function**

Cognitive impairment can cause problems with a thinking, communication, understanding or memory. This might be a short-term or a permanent condition. Symptoms might involve difficulty recognizing people, places or things. Lifestyle factors and physiological risks have been linked to augmented risk of cognitive change including diabetes, smoking, elevated cholesterol, obesity, depression, inflammation and hypertension (Gorelick et al., 2011). Both of physiological risks and lifestyle factors can damage cells and organs including nerve cells and the vessels. The causes of dementia can be varied depending on types of brain changes. Alzheimer's disease is the most common cause of dementia in older people. Moreover, the other dementias include Lewy body dementia, frontotemporal disorders, and vascular dementia. It is a common for patients to have a combination of two or more types of dementia for example, some patients have both Alzheimer's disease and vascular dementia (Weller, & Budson, 2018). Cerebrovascular disease and Alzheimer disease lesions are common in aging populations and cerebrovascular lesions can diminish cognitive status. Several research found that vascular dementia is the second most common cause of clinical dementia after Alzheimer disease. Additionally, cerebrovascular lesions worsen the impact of Alzheimer disease and other dementia pathologies and it may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. This reflected the concept of vascular contributions to cognitive impairment and dementia (Madigan et al., 2016). Vascular cognitive impairments arise on sequence ranging from mild deficits among the patients with vascular risk factors such as cardiovascular disease to the severe cognitive dysfunction characteristic of vascular dementia. Cardiovascular disease was once thought to carry slight risk to the brain given its capacity for vascular autoregulation and continued cerebral perfusion under adverse hemodynamic conditions. Brain dysfunction associated to cardiovascular disease is usually attributed to acute stroke during the cardiac surgery or in response to cardiac incidence such as arrhythmia (Gorelick et al., 2011).

Ronald A found that systemic vascular functions are associated with cognitive performance and structural brain abnormalities on MRI in elderly patients with cardiovascular disease aged 56-85 years old (Cohen et al., 2009). Moreover, many studies have proposed the association between vascular endothelial dysfunction and

cognitive impairment. Especially, the value of the reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry has been indicated to represent the status of systemic atherosclerosis including microvascular disease, vasospastic artery disease, peripheral arterial disease and thrombus formation. Fujiyoshi et al. (2018) reported that 36% of elderly male patients with cardiovascular disease had normal cognitive function and 64% patients had cognitive impairment. Furthermore, the values of the reactive hyperaemia-peripheral arterial tonometry indexes in cognitive impairment patients were significantly lower than that in the non-cognitive impairment patients. Many current studies have demonstrated that the cognitive function is impaired in the cardiovascular disease patients with an increased the platelet activity, increase of thrombogenicity, or decreased cardiac function called heart-brain continuum (Fujiyoshi et al., 2018).



## CHAPTER III

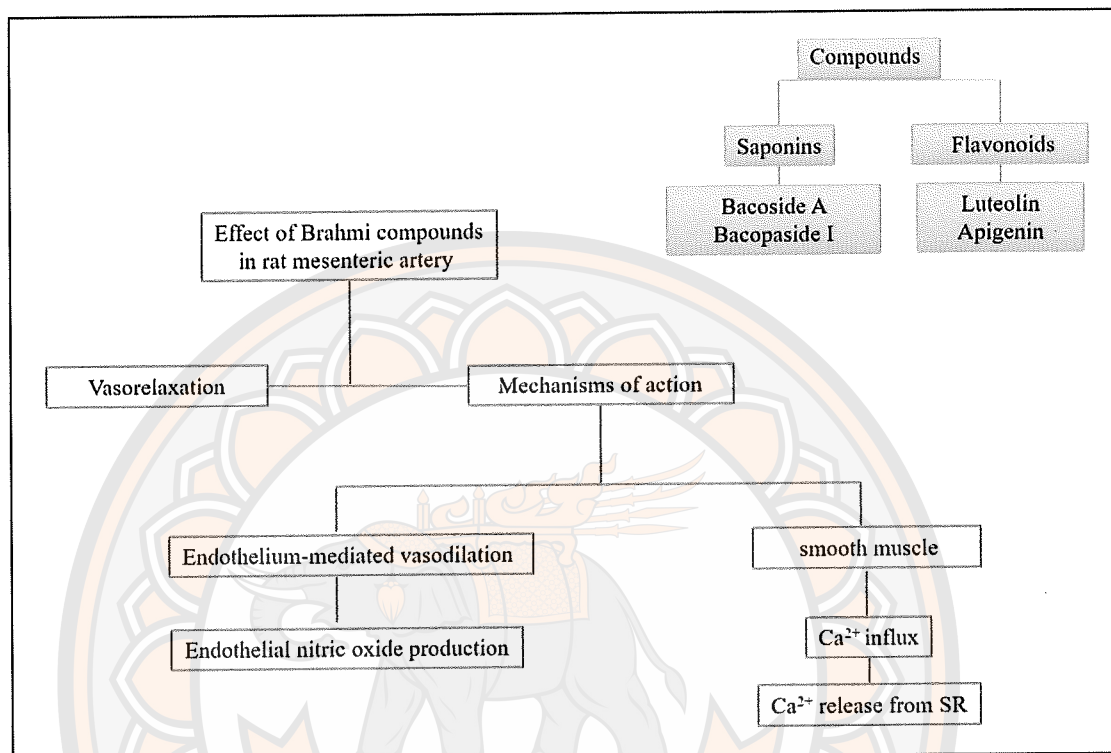
### RESEARCH METHODOLOGY

#### PART I Preclinical animal study

##### 1. Vasorelaxant study of rat isolated mesenteric arteries

Tissues were isolated from male Wistar rats (200-300 g) purchased from Nomura Siam International Co Ltd, Bangkok, Thailand. Experiments were approved by Naresuan University Animal Care and Use Committee (NUACUC), protocol number NU-AE 600710. The rats were housed under the environmental conditions at  $22\pm 1$  °C, 12-hour light and dark cycle, fed with standard rodent diet and tap water in Naresuan University Center for Animal Research (NUCAR) according to the guide for care and use of laboratory animals, the eighth edition (Institute of laboratory animal research, 2011). Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of thiopental sodium (100 mg/kg BW) and killed. The mesenteric arteries were excised, cleaned of surrounding loose connective tissue and cut into rings of 3-5 mm width. In some experiments, endothelial cells were mechanically removed by gently rubbing the lumen with a stainless steel wire. The mesenteric rings were mounted on a pair of intraluminal wires in organ chambers containing physiological Krebs' solution (mM): NaCl, 122; KCl, 5; [N-(2-Hydroxyethyl) piperazine N'-(2-ethanesulfonic acid)] HEPES, 10;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{MgCl}_2$ , 1; glucose, 11; and  $\text{CaCl}_2$ , 1.8 (pH 7.3), at 37 °C and aerated (Kamkaew et al., 2011; Wisutthathum et al., 2018a; Wisutthathum et al., 2018b; Wisutthathum et al., 2018c). The vessel segments were allowed to equilibrate for 1-hour at a resting tension of 1-1.3 g during which the solution was replaced every 15 min. Changes in isometric tension were measured using force transducer lever (CB Sciences Inc., Milford, USA) connected to a MacLab A/D converter (Chart V7; A.D. Instruments, Castle Hill, Australia), stored and displayed on a personal computer. Following stabilization, the arterial rings were tested for viability by the application of 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine (PE). Upon development of a steady contraction, the endothelium status was tested with 10  $\mu\text{M}$  acetylcholine (ACh). The vessel was considered endothelial intact when the ACh induced  $>70\%$  relaxation. After establishing the status of the

endothelium, the rings were then rinsed with Krebs' solution for 30 min and one of the following protocols was initiated (Figure 11).



**Figure 11 Framework of animal study**

## 2. Vasorelaxant effects of BM active compounds on endothelial intact arteries

Following stabilization, endothelial intact rings of mesenteric arteries were pre-contracted with 10  $\mu\text{M}$  PE. After the contraction had become constant, the Brahmi active compounds (0.1-100  $\mu\text{M}$ ), including luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I was cumulatively added (Figure 12). Luteolin (lot 126M4061V) and apigenin (lot WE445301/1) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bacoside A (lot 00002005-003) and bacopaside I (lot 00002002-T17H) were purchased from ChromaDex, Inc. (Irvine, CA, USA).



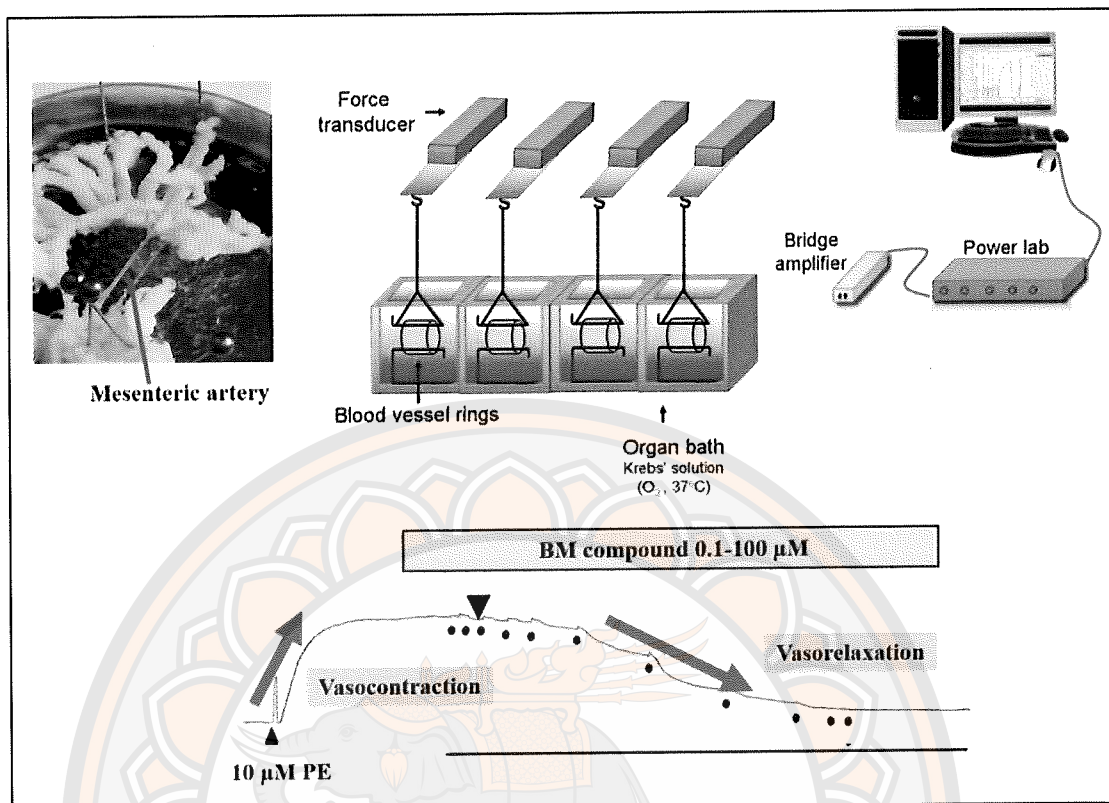


Figure 12 Organ bath technique for vasorelaxant study

### 3. Vasorelaxant effects of BM active compounds on endothelial denuded arteries

Successful endothelial denudation was confirmed by the absence of relaxation upon addition of 10 μM ACh. To investigate the role of endothelium in vasorelaxation induced by luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I, the endothelial denuded arteries were used. Then the responses presented as % relaxation were compared with those of endothelial intact arteries.

### 4. Vasorelaxant mechanism of BM active compounds via eNOS pathway

The role of the endothelial relaxing factor, NO, in vasorelaxation induced by luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I was evaluated in endothelial intact ring pre-treated with the eNOS inhibitor, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μM), for 30 min prior to 10 μM PE pre-contraction.

## 5. Vasorelaxant mechanism of BM active compounds on extracellular $\text{Ca}^{2+}$ influx

Endothelial denuded mesenteric arteries were equilibrated in  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution (containing (mM): ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N,N tetra acetic acid (EGTA), 0.01; NaCl, 122; KCl, 5; HEPES, 10;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{MgCl}_2$ , 1 and glucose, 11 (pH 7.3)) for 30 min followed by replacing with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution containing 80 mM  $\text{K}^+$  for 10 min which depolarizes the vascular smooth muscle cells, thus opening voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VOCCs). Various concentrations (0.01-10 mM) of  $\text{CaCl}_2$  were then added in a logarithmic progression. After obtaining the maximum response, the baths were washed out and replenished with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution for 30 min. The  $\text{Ca}^{2+}$ -free 80 mM  $\text{K}^+$  solution was then re-applied following pre-incubation for 10 min with either: 10  $\mu\text{M}$  active compounds or 1  $\mu\text{M}$  nifedipine (antagonist of VOCCs). Concentration-response curves to cumulative addition of  $\text{CaCl}_2$  were then repeated and compared with maximum contraction evoked by previous control  $\text{CaCl}_2$  challenges.

## 6. Vasorelaxant mechanism of BM active compounds on intracellular $\text{Ca}^{2+}$ release

To stimulate initial  $\text{Ca}^{2+}$  loading of the SR  $\text{Ca}^{2+}$  stores, endothelial denuded mesenteric arteries were exposed to 80 mM  $\text{K}^+$  solution for 5 min, and then washed out with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution containing 1 mM EGTA for 10 min. The arterial rings were then challenged with 10  $\mu\text{M}$  PE (acting through phospholipase C/ $\text{IP}_3$  signaling) which release  $\text{Ca}^{2+}$  from the SR thereby eliciting a transient contraction (Kamkaew et al., 2011). The same protocol was then repeated to ensure that similar transient contractions to PE could be obtained. Then, the arterial rings were challenged again with 80 mM  $\text{K}^+$  solution for 5 min, and washed out with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution containing 1 mM EGTA and 10  $\mu\text{M}$  active compounds for 15 min. The arterial rings were again challenged with 10  $\mu\text{M}$  PE. The PE-induced contractions were compared in the presence or absence of active compounds.

## 7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, (La Jolla, CA). Data from each concentration-response curve was analysed using non-repeated two-way ANOVA. Curve fitting in the figures was generated by the

same software using non-linear regression. The  $EC_{50}$  and  $E_{max}$  were compared using unpaired Student's *t* test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. A *p*-value < 0.05 was considered significant. 'n' is the number of vascular rings used, each ring originating from a different animal.

## **PART II Clinical trial study**

### **1. Investigational Product**

The aerial part of Brahmi was collected from Phetchaburi province, Thailand, and identified by Associate Professor Wongsatit Chuakul, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Thailand. The voucher specimen (Phrompittayarat 001) was kept at the Pharmaceutical Botany Mahidol Herbarium, Mahidol University, Thailand. Brahmi was extracted using 95% ethanol and its total saponin content 16.03% (w/w) comprising bacoside A<sub>3</sub> (2.22%), bacopaside I (3.54%), bacopaside II (4.68%), bacopaside X (3.25%), and bacopasaponin C (2.34%), was determined by high pressure liquid chromatography as previously reported (Phrompittayarat et al., 2007a; Phrompittayarat et al., 2007b). Frozen mulberries were purchased from Queen Sirikit Sericulture Center, Nan, Thailand. The investigational products were produced as 2 formulations: (i) Placebo: The placebo (40 ml/bottle) was prepared with mulberry solution (39.6 ml) and sucralose solution (0.4 ml). (ii) EBM: The Brahmi essence mix mulberry preparation was the same as the placebo, but added with Brahmi (194 mg Brahmi extract containing 16.03% of total saponin) (Figure 13). The EBM had the same colour, texture, volume and smell as the placebo. All essence products were pasteurized by boiling at 75°C for 15 min and kept refrigerated (4°C) for this clinical study.




**Figure 13 Essence of Brahmi mix mulberry**

## **2. Human Ethical Approval**

The study protocol was approved by the Naresuan University Ethical Committee for Human Research (NU-IRB) with IRB No. 0898/60 and the research protocol approved certificate COA No. 197/2018 (Figure 14). All supporting and approval documents were attached in the appendix section of this thesis.

COA No. 197/2018  
 IBB No. 0898/60



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 NARESUAN UNIVERSITY INSTITUTIONAL REVIEW BOARD  
 99 หมู่ 9 ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65009 เบอร์โทรศัพท์ 05596 8642

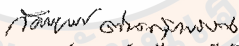
**เอกสารรับรองโครงการวิจัย**

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยความแนวทางการหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

<b>ชื่อโครงการ</b>	: ผลของน้ำมันสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดสมองและหลอดเลือดส่วนปลายของผู้สูงอายุสุขภาพดี										
<b>Study Title</b>	: Effects of Brahmi concentrated essence on memory, cerebral and peripheral blood flows in the healthy elderly .										
<b>ผู้วิจัยหลัก</b>	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรรณกาญจน์ ชูทิพย์										
<b>Principal investigator</b>	: Assistant professor Dr. Krongkarn Chootip										
<b>สังกัดหน่วยงาน</b>	: คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์										
<b>ผู้ร่วมวิจัย</b>	: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td>รศ.ดร.กรรณภัก อธิกนันทน์</td> <td>รศ.ดร.เบญจมาภรณ์</td> </tr> <tr> <td>รศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัดหนอง</td> <td>ผศ.ดร.อรรณี คงสมบัติ</td> </tr> <tr> <td>ผศ.ดร.ฉันทวีรจิรา วสุนธราวัฒน์</td> <td>นายแพทย์ธีระพงษ์ เตียรวิวัฒน์</td> </tr> <tr> <td>อาจารย์วิภา แก้วมหารณี</td> <td>พญ.ดวงภา ฟูงพิบูลโสภิษฐ์</td> </tr> <tr> <td>พญ.พรธมลีย์ ศัตรูวงศ์สกุล</td> <td>นายณัฐกร คำแก้ว</td> </tr> </table>	รศ.ดร.กรรณภัก อธิกนันทน์	รศ.ดร.เบญจมาภรณ์	รศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัดหนอง	ผศ.ดร.อรรณี คงสมบัติ	ผศ.ดร.ฉันทวีรจิรา วสุนธราวัฒน์	นายแพทย์ธีระพงษ์ เตียรวิวัฒน์	อาจารย์วิภา แก้วมหารณี	พญ.ดวงภา ฟูงพิบูลโสภิษฐ์	พญ.พรธมลีย์ ศัตรูวงศ์สกุล	นายณัฐกร คำแก้ว
รศ.ดร.กรรณภัก อธิกนันทน์	รศ.ดร.เบญจมาภรณ์										
รศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัดหนอง	ผศ.ดร.อรรณี คงสมบัติ										
ผศ.ดร.ฉันทวีรจิรา วสุนธราวัฒน์	นายแพทย์ธีระพงษ์ เตียรวิวัฒน์										
อาจารย์วิภา แก้วมหารณี	พญ.ดวงภา ฟูงพิบูลโสภิษฐ์										
พญ.พรธมลีย์ ศัตรูวงศ์สกุล	นายณัฐกร คำแก้ว										
<b>วิธีหอบทวน</b>	: คณะกรรมการเต็มชุด (Full Board Review)										
<b>รายงานความก้าวหน้า</b>	: ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี										

**เอกสารรับรอง**

- AF 01-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 25 ตุลาคม 2560
- AF 02-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 19 ตุลาคม 2560
- AF 03-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 25 ตุลาคม 2560
- AF 04-10 เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 21 มกราคม 2561
- AF 05-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 19 ตุลาคม 2560
- สรุปโครงการเพื่อการพิจารณาทางจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 22 มกราคม 2561
- แบบข้อเสนอโครงการ เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
- ประวัติผู้วิจัย เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
- งบประมาณขอโครงการวิจัย เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
- เอกสารเชิญชวนอาสาสมัคร เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
- แบบบันทึกประจำวัน เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
- แบบฟอร์ม บันทึกข้อมูล เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 22 มกราคม 2561
- แบบฟอร์มการคัดกรองอาสาสมัคร เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 22 มกราคม 2561

ลงนาม   
 (นายแพทย์สมบูรณ์ ดันสุกสวัสดิ์กุล)  
 ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์  
 มหาวิทยาลัยนเรศวร

**วันที่รับรอง** : 16 พฤษภาคม 2561  
**Date of Approval** : May 16, 2018  
**วันหมดอายุ** : 16 พฤษภาคม 2562  
**Approval Expire Date** : May 16, 2019

ทั้งนี้ การรับรองนี้ใช้จนถึงวันครบปีไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

Figure 14 Human ethic protocol approval

### 3. Participants

This clinical trial project enrolled participants from 55-80 years of age. The populations for this project was “A person, aged 55-80 years, who was not suffering from any diseases, as schizophrenia, dementia, depression, liver disease, kidney disease, diabetes, cancer, stroke, hypertension and hyperlipidaemia treated with therapeutic anti-hyperlipidaemia drugs”. The criteria considerations to enrol the participants in this study were inclusion criteria, exclusion criteria, withdrawal of participant criteria, and termination criteria.

*Inclusion criteria:* Participants were included according to the following criteria: 55-80 years of age, Thai ethnicity, able to listen, speak and write in the Thai language, education at least the 4<sup>th</sup>-year of primary school and voluntarily signed the consent form.

*Exclusion criteria:* They were excluded, if they had at least one of the following conditions i.e., liver disease, kidney disease, diabetes, cancer, stroke, hypertension, hyperlipidaemia treated with therapeutic anti-hyperlipidaemia drugs, schizophrenia or psychotic disorders, dementia or Alzheimer’s disease, depressant (as diagnosed by a physician), pregnant or plan to become pregnant, taking herbal supplements or drugs which may interfere with the nervous system or clinical study outcomes, smoking (>10 cigarettes per a day), and trying to lose weight.

*Criteria for the withdrawal of participants:* They were withdrawn, if they met some of the following criteria during the study period: Receiving drugs or herbal supplements that may interfere with the nervous system or clinical study outcomes during the study, diagnosed with schizophrenia or another psychotic disorder, dementia, Alzheimer’s disease or depression by a physician during the study period, pregnant during the study, not participating in consumption of the investigational product, missing the appointment or the physical examination, experiencing over normal values of liver enzyme, blood urea nitrogen (BUN), creatinine and estimated glomerular filtration rate (eGFR), having an accident that renders them unable to continue the study, voluntarily leaving the study or experiencing a serious adverse event (SAE) where the situation may be acute and/or life-threatening and requires inpatient hospitalisation. The SAE may result in disability and have congenital causes.

*Termination criteria:* The participants were asked to terminate the study where SAE was found from the EBM or the placebo consumption.

The participants were sought by using advertisements around Naresuan University and health-promoting hospitals and direct contacting with people in the villages in Phitsanulok province. Informed consent was processed before the screening. Firstly, the researcher explained the purposes of the project to the participants. The explanation included aims, duration, visit times, procedures, potential harm or risks, and let them feel free to ask any relevant questions. After that, participants were required to voluntarily sign the informed consent form. The next step, screening was performed by a physician and/or a researcher from the project. As the exclusion criteria, if the participants did not pass any criteria (screening failure), they were excluded from the study. The screening tools consisted of a personal and general information questionnaire, medical health questionnaire, Mini-mental state examination-Thai 2002 (MMSE) and Thai geriatric depression scale (TGDS).

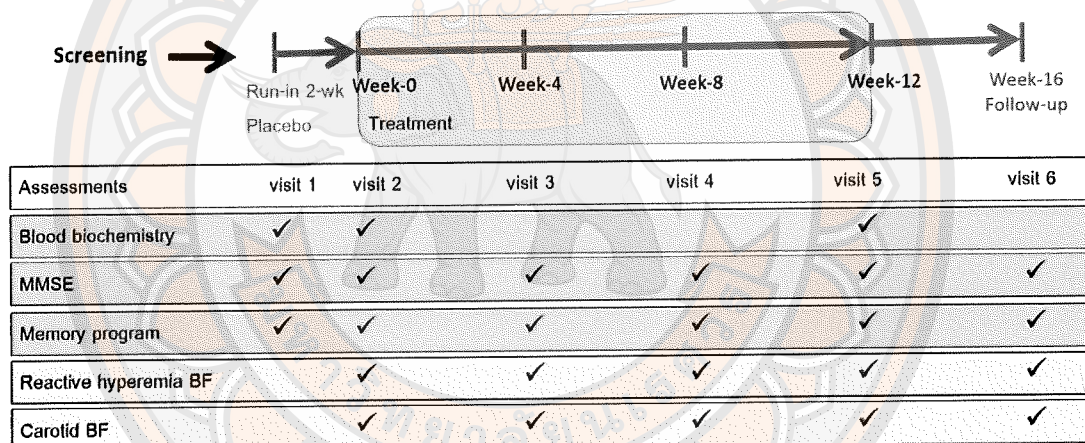
#### **4. Study design**

This study was conducted as a 12-week double-blind and placebo-controlled randomized trial. Participants were divided into two groups; a placebo group and an EBM group. Each participant received one bottle of placebo or EBM once daily. EBM had the same colour, texture, volume and smell as the placebo. The code used was the randomized double-blind coding using a block of four randomization (Kim, & Shin, 2014; Srivilai et al., 2018), and these were blinded for both researchers and participants.

After the participants passed the screening, they came to the site, i.e. (i) the Faculty of Medical Science, Naresuan University and (ii) Cosmetics and Natural Products Research Center (CosNat), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University. They were asked to attend 6 visits as shown in figure 15 i.e., the first visit (visit 1) for an orientation period, so called placebo run-in (a period of 2 weeks that all participants consumed placebo only), four treatment visits (visit 2-5: week 0, 4, 8 and 12), and another visit (visit 6) at week 16 for follow up. The measured parameters were memory, carotid blood flow, reactive hyperaemic blood flow on hand area, blood pressure, heart rate, body mass index, waist hip ratio, and blood biochemistry parameters. The blood (15 ml) from a participant was drawn for analysis according to the parameters of blood biochemistry, i.e. glycated haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), lipid profile,

calcium, liver function test i.e. aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP), and kidney function test i.e. BUN, creatinine and eGFR were assessed from serum. The ICAM-1, VCAM-1 and ADMA were assessed from plasma (Figure 16). The participants were asked about adverse events at week 0, 4, 8, 12 and 16 follow-up visits.

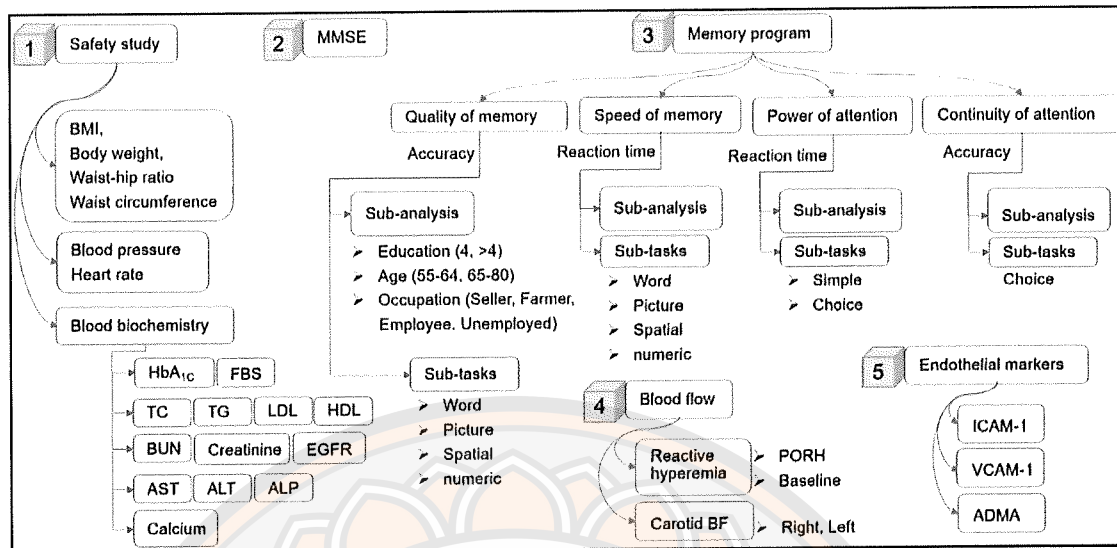
For participant protection, the adverse events were assessed at treatment period of week 0, 4, 8, 12, and 16 (follow-up). The researcher asked the participants about any adverse events and reported any adverse events in a case report form and also in the diary provided to the participants. In their diaries, participants recorded symptoms, frequencies, symptom details, and the management of occurring adverse events to participants. The researcher provided preventive ways to protect participants.



**Figure 15 Timeline for all parameter assessments of the clinical trial study**

**Abbreviations:** MMSE = Mini-Mental State Examination, BF = Blood flow





**Figure 16 Framework of the clinical trial study**

## 5. Procedures of each visit

### 5.1 Placebo run-in period (Visit 1)

The participants were asked to fast for 10-12 hours before the visit. At the visit site, they were operated, as follow: (i) Blood drawing (15 ml) by a medical technician for the measurement of fasting blood glucose (FBG), lipid profile, HbA<sub>1c</sub>, calcium, liver function test, BUN and creatinine, (ii) Memory assessment using the computerised cognitive battery test, and (iii) Body weight (BW), waist-hip ratio (WHR) and blood pressure assessment. Each participant received 14 bottles of placebo to take over the following two weeks, so called “placebo run-in period”. They had to take 1 bottle of placebo per day at the same time thirty minutes after breakfast and recorded their experiences of placebo consuming every day in a diary. In addition, they had to keep the empty bottles and returned them at the next visit appointment. The advantages of the placebo run-in were (i) screening participants that can actually take the product for the time periods of the study, (ii) studying the safety of placebo or adverse events, and (iii) to provide twice baselines of blood biochemistry values.

### 5.2 Treatment period at week 0 (Visit 2)

The participants were asked to fast for 10-12 hours before the visit. At the visit site in week 0 of the treatment period, the participants were operated as follow: (i) Questioned for adverse events. (ii) Blood drawing (15 ml) for blood biochemistry

analysis by a medical technician. (iii) Memory assessment using the computerised cognitive battery test. (iv) Carotid blood flow velocity measurement using vascular Doppler ultrasound for blood flow in the carotid artery by a vascular Doppler ultrasound technician. (v) Reactive hyperaemia blood flow measurement on hand area using the real-time microcirculation imaging peri-cam PSI system or Perimed (Sweden). (v) BW, WHR and blood pressure assessment. The participants were divided into two groups, the EBM treatment and placebo control groups. The code used was the randomised double-blind coding using block of four randomisation, and these were blinded for both researchers and participants. Each participant received either 28 bottles of EBM or placebo to take over the following four weeks. They were asked to record the consumption of EBM or placebo each day in the diary provided. They returned the empty bottles and their diaries at the next visit appointment.

### **5.3 Treatment period at weeks 4 and 8 (Visit 3-4)**

At the visit site, the participants were operated in the same way as visit 2, but without blood drawing.

### **5.4 Treatment period at week 12 (Visit 5)**

The participants were asked to fast for 10-12 hours before the visit. At the visit site, they were operated the same way as visit 2. The participants returned the empty bottles and their diaries. This was the end of treatment period, thus the participants no longer received neither EBM nor placebo.

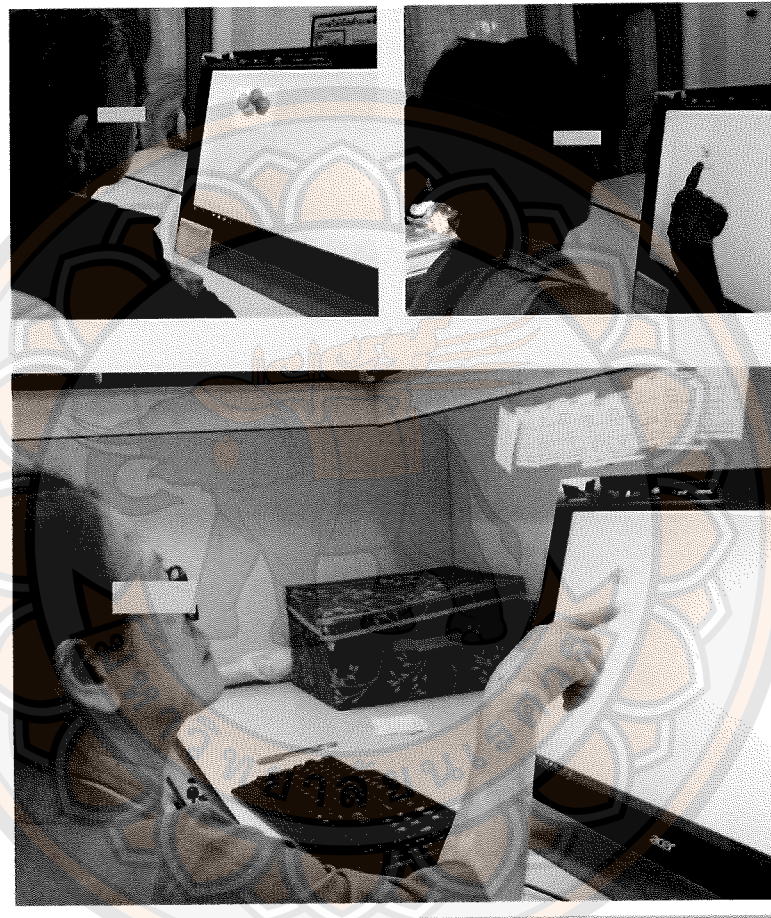
### **5.5 Follow up period at week 16 (Visit 6)**

Four weeks after the end of the treatment period, at the visit site, the participants were operated the same way as visit 3-4. After that, the participant code was broken and data of each participant group (EBM and placebo) were entitled as A or B. This was blinded to the researcher until all the data analysis were completed.

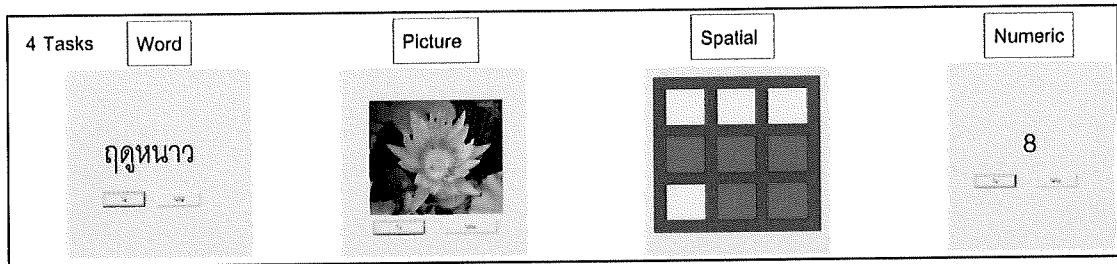
## **6. Cognitive Assessment**

The present study investigated the effect of EBM compared with placebo on cognitive function by assessing the four domains of working memory comprising 1) quality of memory, 2) speed of memory, 3) power of attention, and 4) continuity of attention using computerised battery test, developed by Assoc.Prof.Dr. Jintanaporn Wattanathorn, Khon-Kaen University, Thailand. A selection of computer-controlled tasks was presented to the participants at the site visit 1-6 for cognitive assessment. Task

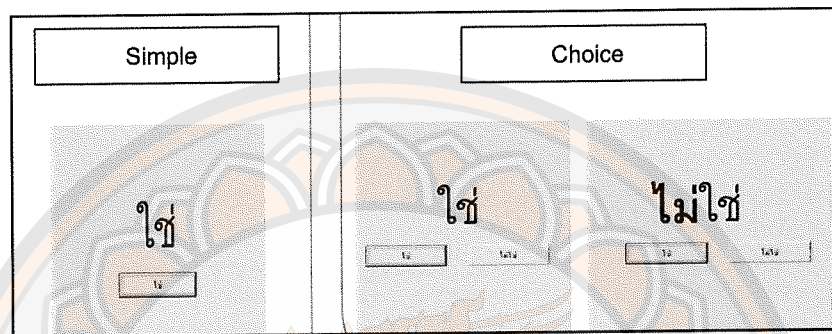
presentation was conducted via touch-screen monitors, and all responses i.e., accuracy and reaction times of the participants were recorded via YES/NO response boxes on the computer screen (Figure 17). The assessment took approximately 20 minutes and the tasks were presented in the following order (Figure 18).



**Figure 17 Participating of participants in the cognitive computerized battery test**



(A) The 4 tasks of the cognitive computerized battery test



(B) The tasks for the attention and the continuity of attention

**Figure 18** The 4 tasks, including the word recognition, the picture recognition, the spatial working memory and the numeric working memory, of the cognitive computerized battery test for quality of working memory and speed of memory (A) and The tasks for the power of attention and the continuity of attention, including the simple and the choice reaction time (B)

### 6.1 Word presentation

Participants sat in front of a laptop in a quiet room throughout the duration of the experiment. Fifteen Thai words were presented in sequence on the monitor for the participant to remember. The participants were presented with a list of words in order of word number 1 to word number 15 and asked to memorise them. Immediately after the presentation of the last remembered word, participants were presented with a sequence of 15 test words consequently, consisting of the remembered words and new words. If the participants press “Yes” on the screen with the remembered words that had already been presented, this means the correcting answers. If the participants press “No” on the screen with the new words that had not yet been exposed, this means the correcting answers. In contrast of these, it means incorrecting answers.

duration was 1 s, as was the interstimulus interval. After that, the results were shown on the screen consisting of the number correcting and incorrecting answers, the % accuracy and the average of response time of correcting answers.

### **8. Picture Presentation**

A series of 20 photographic images was presented on the monitor at the rate of 1 every 3 sec, with stimulus duration of 1 sec, for the participant to remember. The procedure of this task was similar to the word presentation, but there were the pictures instead.

### **9. Simple Reaction Time**

The participant was instructed to press the “yes” response button as quickly as possible every time the word “yes” was presented on the monitor. Fifty stimuli were presented with an interstimulus interval that varied randomly between 1 and 3.5 sec. Reaction times were recorded in milliseconds.

### **10. Choice Reaction Time**

Either the word “yes” or the word “no” was presented on the monitor, and the participant was required to press the corresponding button either “yes” or “no” as quickly as possible. There were 50 trials, in which the stimulus word was chosen randomly with equal probability, with a randomly varying interstimulus interval between 1 and 3.5 sec. Reaction time (millisecond) and accuracy (%) were recorded.

### **11. Spatial Working Memory**

A pictorial representation of a house was presented on the screen with four of its nine window lits (Figure 18). The participant was instructed to memorize the position of the illuminated windows. In 36 subsequent presentations of the house, one of the windows was illuminated and the participant decided whether or not this matched one of the lighted windows in the original presentation. The participant made their response by pressing the “yes” or “no” response button as quickly as possible. Mean reaction times were measured in milliseconds, and the accuracy of responses to both original and novel (distracter) stimuli was recorded as percentages that were used to derive a “percentage greater than chance performance” score.

## 12. Numeric Working Memory

Five digits were presented sequentially for the participant to hold in memory. This was followed by a series of 30 probe digits for each of which the participant decided whether or not it had been in the original series and pressed the “yes” or “no” response button as quickly as possible. This was repeated two times with different stimuli and probe digits. Mean reaction times were measured in milliseconds and the accuracy of responses to both original and novel (distracter) stimuli were recorded as percentages that were used to derive a “percentage greater than chance performance” score.

The cognitive function was assessed from the above task performance of the participants and presented in terms of the following parameters:

**12.1 Quality of memory:** This is a measure of working memory quality assessed by summing accuracy scores of 4 tasks including: 1) picture recognition, 2) word recognition, 3) spatial working memory, and 4) numeric working memory. The score of quality of memory was expressed as percentage of maximum score of 400 (100 points for each task). The higher of scores the participants obtained, the better the quality of memory.

**12.2 Speed of memory:** This is a measure of complex information processing speed, derived from summing reaction times (milliseconds) of 4 tasks as mentioned earlier i.e., picture recognition, word recognition, spatial working memory, and numeric working memory. The less reaction times the participants spent, the better speed of memory.

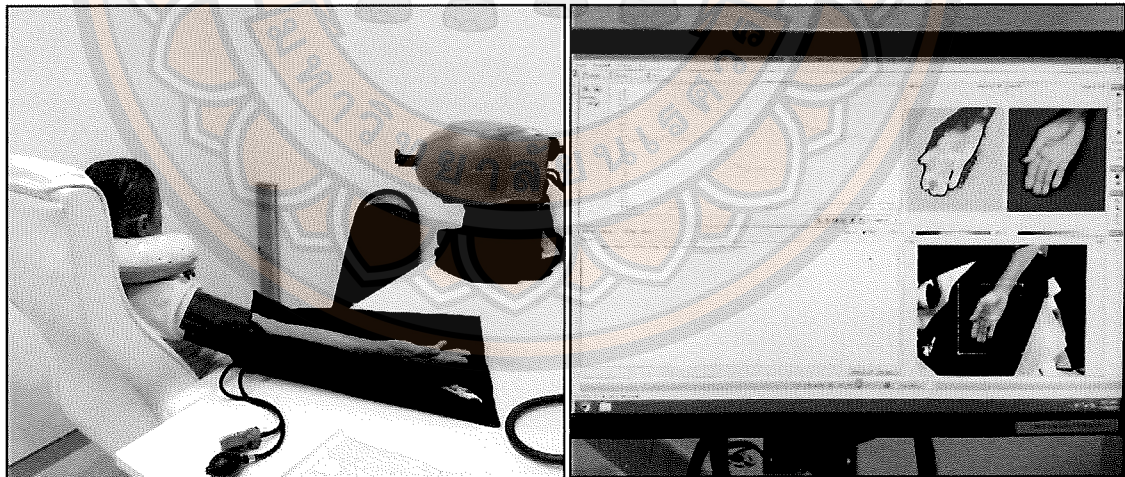
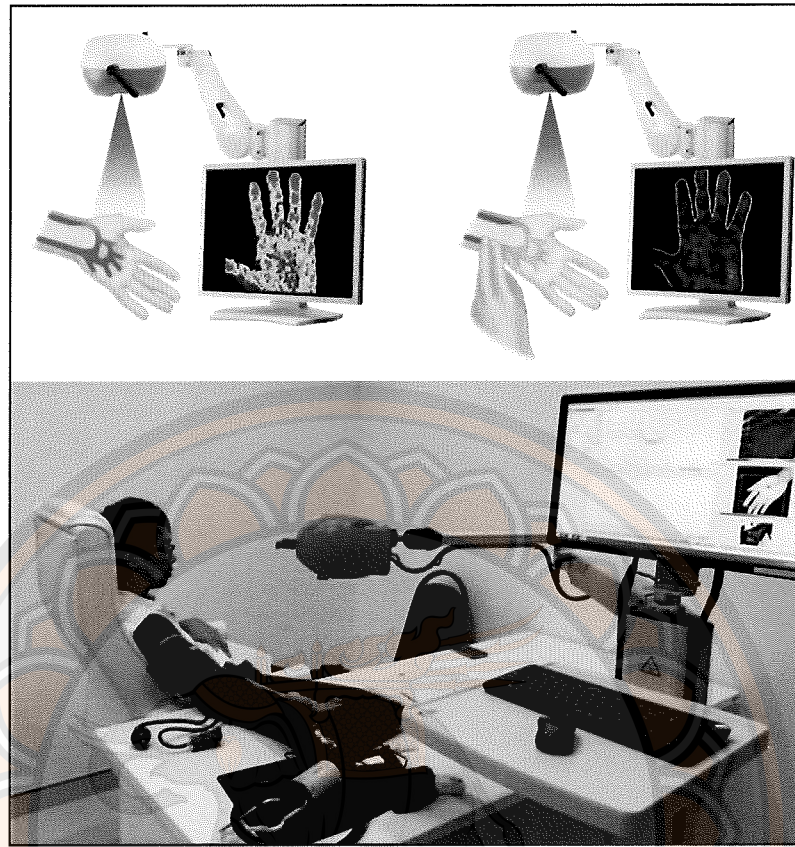
**12.3 Power of attention:** This is a measure of attention and psychomotor/ information processing speed, derived by combining reaction times (milliseconds) of attentional tasks including simple reaction time and choice reaction time:

**12.4 Continuity of attention:** This is a measure of attention obtained by summing accuracy score of attention, derived by calculating the combined percentage to the maximum full score of 100 from the choice reaction time.

## 13. Reactive Hyperaemia Blood Flow Assessment

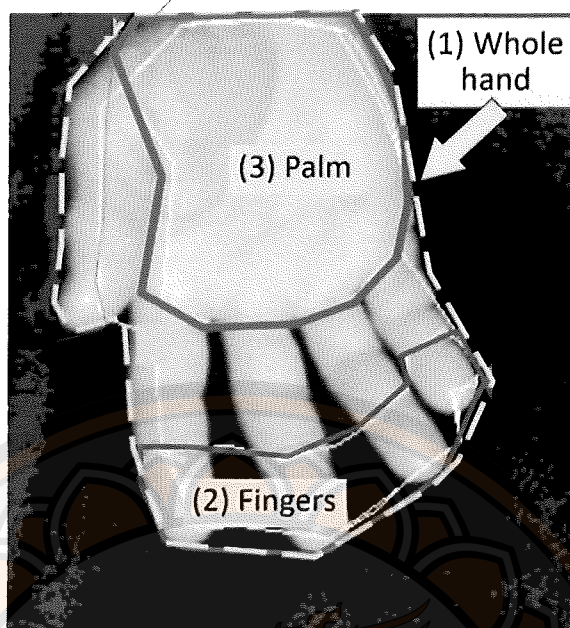
Reactive hyperaemia blood flow (RHBF), refers to the increase in skin blood flow above baseline levels, following the release of an arterial occlusion (de Mul et al., 2009). The skin blood flow or microvascular blood flow evaluation was performed

on the participants in fowler's position in a quiet and temperature-controlled room at  $23\pm 2$  °C ( $50\pm 5\%$  relative humidity). No subjects had any medication, alcohol and/or drinks containing caffeine 12 h prior to the blood flow measurement. RHBF was recorded using a laser Doppler perfusion monitoring apparatus (a real-time microcirculation imaging peri-cam PSI system, Perimed, Stockholm, Sweden) and a blood perfusion imager based on the laser speckle contrast analysis (LASCA) technology with the following characteristics: 785 nm wavelength, 1388 x 1038-pixel CCD camera and tissue blood perfusion is visualized in real time with a resolution of up to 100  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . Working distance between the laser head and the skin surface was fixed at 30 cm as recommended in the manufacturer's manual. The blood flow was recorded and analysed by a Perisoft software (Figure 19). The blood flow value was expressed as arbitrary perfusion units (PU). The participant blood flow was measured in peripheral arteries of a whole hand, fingers, and a palm (Figure 20). The regions of interest were monitored from the hand placing on the table for 3-min of the baseline blood flow. The occlusion was performed with suprasystolic pressure (the 50-mmHg above the systolic arterial blood pressure) using a sphygmomanometer inadvertently inflated blood pressure cuff around the upper arm for 2-min. The cuff pressure was then immediately released, the maximal blood flow of post occlusive reactive hyperaemia (PORH) was assessed for the peak value of the RHBF. After the cuff deflated, the blood flow was 3-min continually measured for the extended recovery (Figure 21). Peak value of blood flow was determined in PU as maximal perfusion value during hyperaemia. The amplitude of the peak RHBF was normalised with the individual mean arterial blood pressure, then this parameter was expressed as the peak cutaneous vascular conductance PORH (peak CVC PORH). The PORH response was then calculated from the peak CVC PORH minus the baseline CVC. This method was modified according to various non-invasive effective assessments for microvascular function in human (Borges et al., 2016; Cordovil et al., 2012; Petrofsky et al., 2012; Roustit, & Cracowski, 2012).

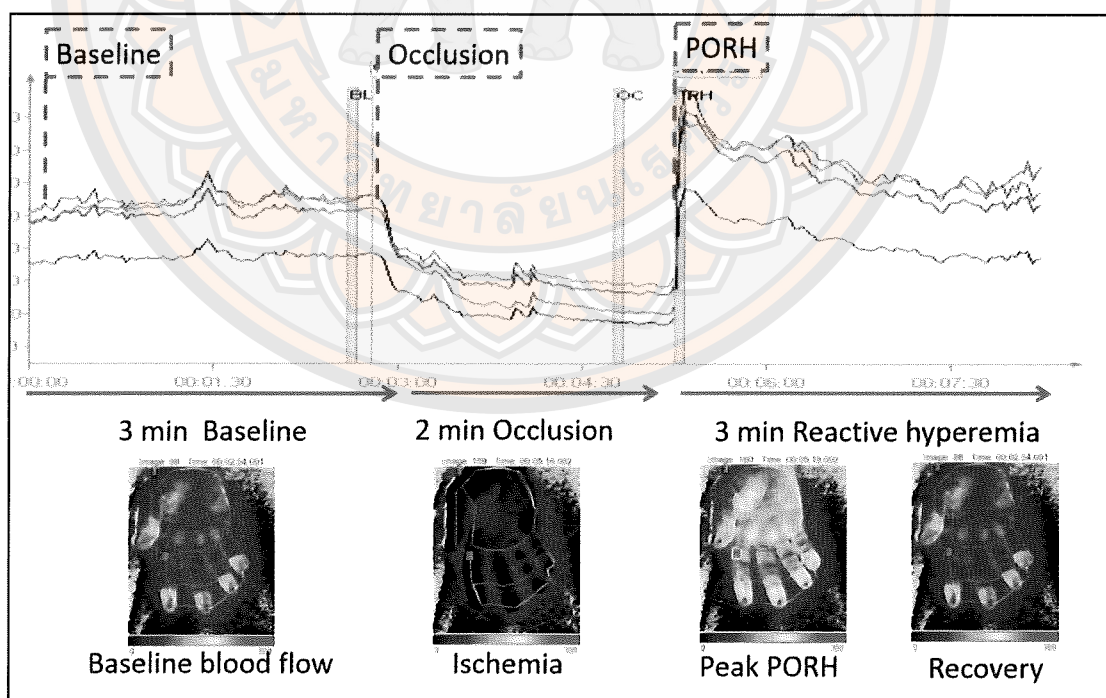


**Figure 19 Measurement of reactive hyperaemia blood flow, using Peri-Med**





**Figure 20** The region of interest for detecting PORH blood flow: Whole hand, 2) Fingers, 3) Palm



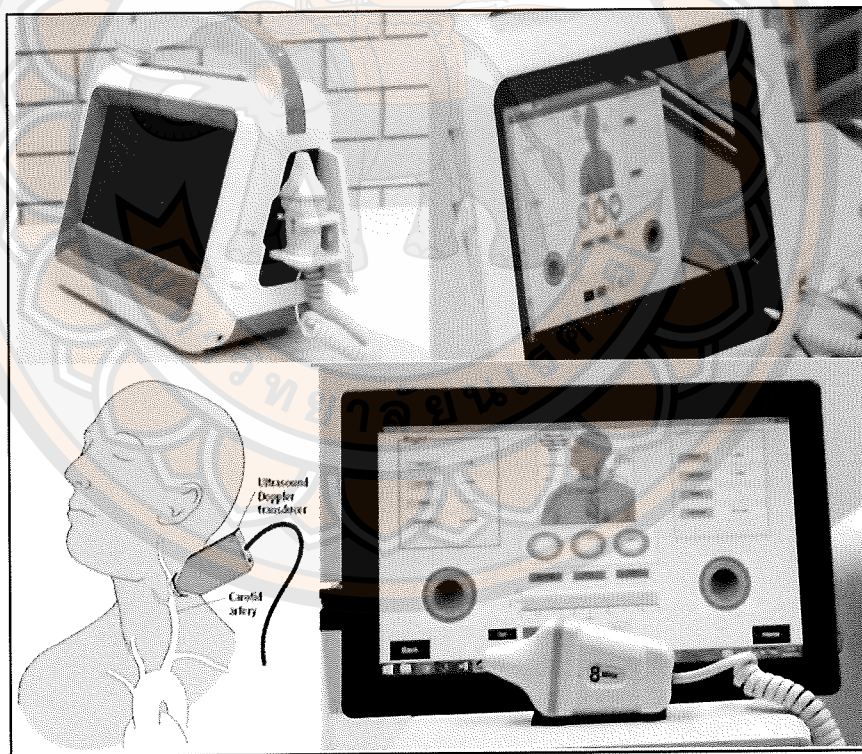
**Figure 21** Timeline and tracing for PORH of the whole hand (blue line), the fingers (red line) and the palm (green line)

#### 14. Carotid Blood Flow Velocity Assessment

The carotid blood flow velocity was evaluated in carotid arteries, which are located on each side of the neck (Figure 22). Blood is supplied to the brain via the internal carotid arteries, which arise at the point in the neck where the common carotid arteries (CCA) bifurcate, and the vertebral arteries. Thus, the blood flow velocities of participants were assessed in the right and left sides of CCA using the early detection of ischemic stroke device, a non-invasive device developed by Watchara Kaewmahanin, a lecturer at Biomedical Research Unit in Cardiovascular Sciences of Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University. The blood flow velocity measurement by this device employed the principle of Doppler ultrasound, a technique that evaluates blood velocity through a blood vessel (Lee, 2014). During the visit appointment (visit 2-6), a probe of the device was placed over the CCA of the participant, then the frequency of Doppler blood flow signals expressed in kHz were monitored and recored during a 5-sec breath-hold in a the sitting position. The data were conventionally converted to a velocity scale (cm/sec). The Doppler equation was used as  $\Delta F = 2 F_0 V \text{Cos } \Theta / C$ , where  $\Delta F$  was Doppler shift frequence (kHz),  $F_0$  was the ultrasound transmission frequency (MHz),  $V$  was the blood cell velocity (cm/s),  $\text{Cos } \Theta$  was the Cos of angle between us and flow direction, and  $C$  was the speed of sound in soft tissue (1,540 m/sec) (Zhang et al., 2017).



(A) Carotid blood flow velocity assessment

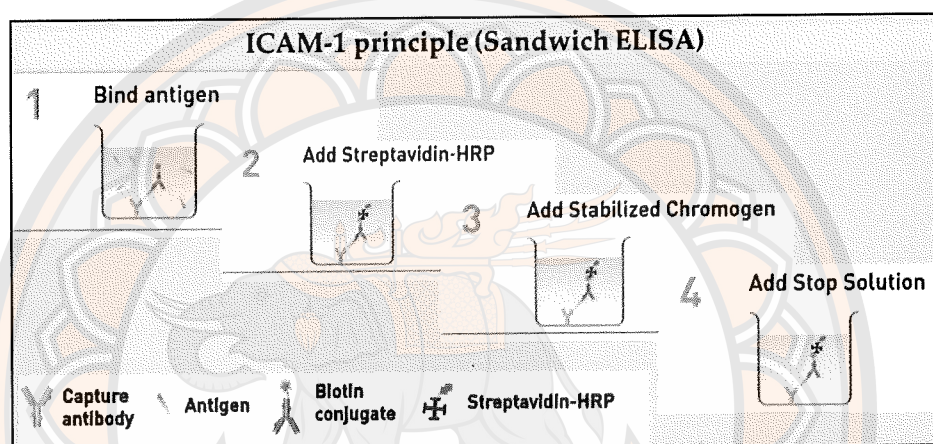


(B) The early detection of ischemic stroke device

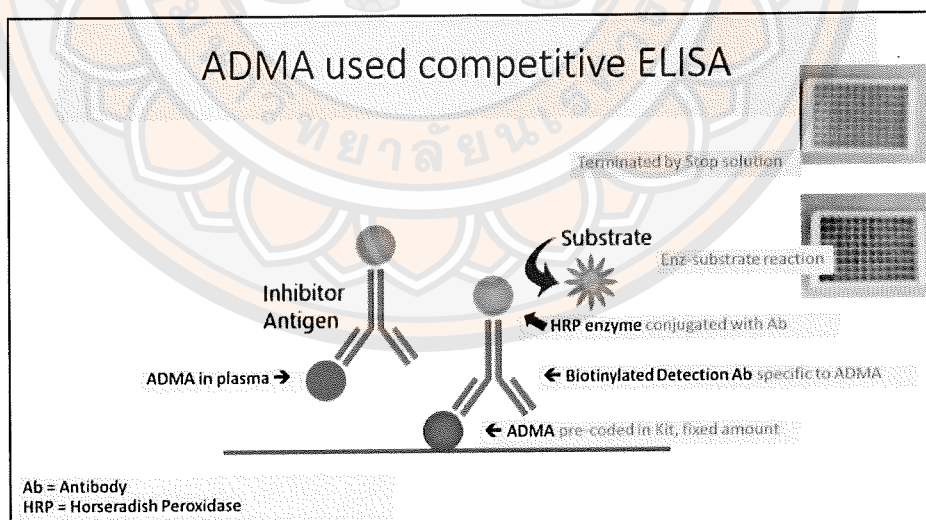
**Figure 22** Carotid blood flow velocity assessment, using vascular Doppler ultrasound for blood flow in the carotid artery (A), and the early detection of ischemic stroke device (B)

## 9. Endothelial marker assessment

Plasma concentrations of the endothelial markers, ICAM-1, VCAM-1 and ADMA were measured in the participants at week 0 and 12 of the treatment period using the commercial ELISA kits with the microplate reader at OD 450 nm. The competitive ELISA principle was used in ADMA Elisa Kit by Elabscience (Texas USA). The sandwich ELISA principle was used in ICAM-1 and the VCAM-1 ELISA kits, ThermoFisher Scientific (MA USA) (Figure 23).



(A) ICAM-1 and VCAM-1 measurement



(B) ADMA measurement

**Figure 23** The determination of ICAM-1 and VCAM-1 using the Sandwich ELISA (A), and the ADMA measurement using the competitive ELISA (B)

### **15.1 Assay Procedures of ICAM-1**

The microwell strips were washed twice with the 400  $\mu$ l Wash Buffer per well and allowed to sit in the wells for about 10–15 seconds before aspiration. The wells were then emptied on the paper towel. The 100  $\mu$ l Sample Diluent were then added in duplicate to standard wells and the blank wells. The 90  $\mu$ l Sample Diluent was then added to the sample wells. The 10  $\mu$ l each sample was then added in duplicate to the sample wells. The 50  $\mu$ l prepared HRP-Conjugate was added to all wells. The plate was covered with an adhesive film and incubated at room temperature (18°C to 25°C) for 1 hour on a microplate shaker. The adhesive film was removed and the wells were emptied, and washed for 3 times. The 100  $\mu$ l TMB Substrate Solution was pipetted to all wells and then incubated the microwell strips at room temperature for 10 minutes by avoiding of light. After that, the 100  $\mu$ l Stop Solution was added into each well and the absorbance of each microwell was read on a spectro-photometer using 450 nm as the primary wave length (optionally 620 nm as the reference wave length).

### **15.2 Assay Procedures of VCAM-1**

The microwell strips were washed twice with 400  $\mu$ l Wash Buffer per well and allowed to sit in the wells for about 10–15 seconds before aspiration. The wells were then emptied on the paper towel. Standard dilution was then added on the microwell plate for 4 times. The 100  $\mu$ l each prediluted sample was then added in duplicate to the sample wells. The 50  $\mu$ l prepared Conjugate Mixture was added to all wells. The plate was covered with an adhesive film and incubated at room temperature for 2 hours. The adhesive film was removed and the microwell strips were washed 3 times. The 100  $\mu$ l TMB Substrate Solution was pipetted to all wells and then incubated at room temperature for about 10 minutes by avoiding of light. The 100  $\mu$ l Stop Solution was added into each well. After that, the absorbance of each microwell was read on a spectro-photometer using 450 nm wave length.

### **15.3 Assay Procedures of ADMA**

The 50 $\mu$ l standard or sample (plasma) was added to the wells, immediately 50 $\mu$ l Biotinylated Detection Ab working solution was added to each well and then incubated for 45 min at 37°C. The plate was aspirated and washed for 3 times. The 100 $\mu$ l HRP conjugate working solution was added and then incubated for 30 min at 37°C. the plate was aspirated and washed for 5 times. The 90 $\mu$ l Substrate Reagent

was added and then incubated for 15 min at 37°C. The 50 µl Stop Solution was added. After that, the plate was read at 450nm immediately and calculation of the results.

### **16. Sample Size Calculation**

The sample size for the randomised controlled trial was estimated using the formula for comparing two means (Sakpal, 2010). The mean values were obtained from the previous clinical data on the memory speed test, reported by (Peth-Nui et al., 2012). The description sample size in the protocol was: A sample size of 32 participants, 16 in each arm, is sufficient to detect a clinically important difference of 0.5 between groups in increasing memory using a two-tailed *t*-test of difference between means with 80% power and a 5% level of significance. Considering a dropout rate of 10%, the sample size required is 36 (18 per group).

### **17. Statistical Analysis**

All test parameters were analysed using two-way repeated measure analysis of variance (ANOVA) or unpaired *t*-test for EBM treatment group and placebo group at the same time. The data analysis for this paper was generated using GraphPad Prism for Windows, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Values are expressed as mean±SEM. A *p*-value<0.05 was considered significant. 'n' is the number of participants.

## CHAPTER IV

### RESULTS

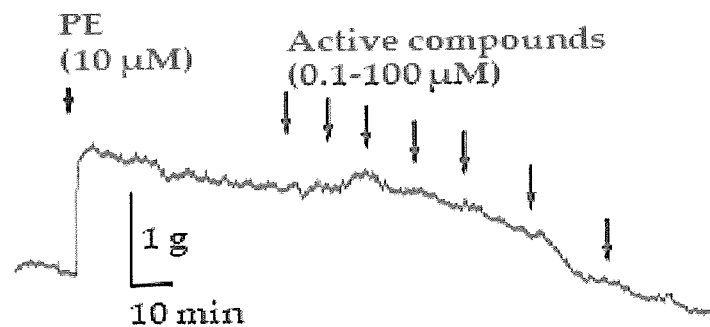
#### Preclinical study

##### 1. Vasorelaxant effects of the Brahmi active compounds

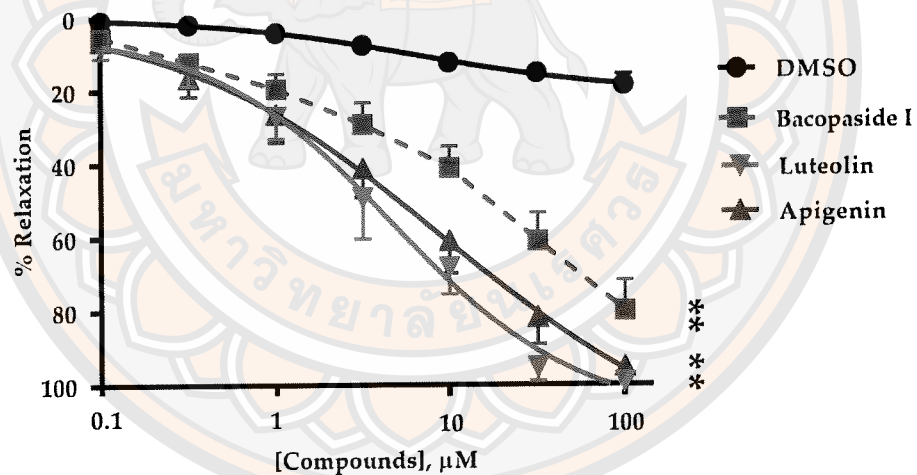
Brahmi active compounds, including 0.1-100  $\mu\text{M}$  flavonoids (luteolin and apigenin), 0.1-100  $\mu\text{M}$  bacopaside I, and the saponin mixture (bacoside A) at 0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ , caused vasorelaxation of endothelial intact (+EC) rat mesenteric arteries in a concentration-dependent manner (Figure 24). Luteolin and apigenin showed more efficacy ( $E_{\text{max}}$   $99.4 \pm 0.7$  and  $95.3 \pm 2.6\%$ ,  $p < xx$ ) than bacopaside I and bacoside A ( $E_{\text{max}}$   $79.9 \pm 8.2\%$  and  $83.6 \pm 2.9\%$ ). In addition, the potency of luteolin and apigenin ( $EC_{50}$   $4.35 \pm 1.31$   $\mu\text{M}$  and  $8.93 \pm 3.33$   $\mu\text{M}$ ,  $p < xx$ ) had also more potency than bacopaside I and bacoside A ( $EC_{50}$   $14.6 \pm 5.4$   $\mu\text{M}$  and  $9.3 \pm 5.4$   $\mu\text{g/ml}$ ) (Table 6 and Figure 25).

**Table 6 The  $EC_{50}$  and  $E_{\text{max}}$  of Brahmi active compounds on relaxation of endothelial intact rat mesenteric arteries**

Brahmi compounds	$EC_{50}$	$E_{\text{max}}$ (%)	n
Luteolin	$4.35 \pm 1.31$ $\mu\text{M}$	$99.4 \pm 0.7$	6
Apigenin	$8.93 \pm 3.33$ $\mu\text{M}$	$95.3 \pm 2.6$	9
Bacopaside I	$14.6 \pm 5.4$ $\mu\text{M}$	$79.9 \pm 8.2$ †	7
Bacoside A	$9.26 \pm 5.38$ $\mu\text{g/ml}$	$83.60 \pm 2.86$	7
DMSO	-	$17.4 \pm 3.1$ ††	7



**Figure 24** The example of original tracing showing the vasorelaxation of the 0.1-100  $\mu\text{M}$  active compound (apigenin) on endothelial intact rat mesenteric arteries (+EC) in a concentration-dependent manner

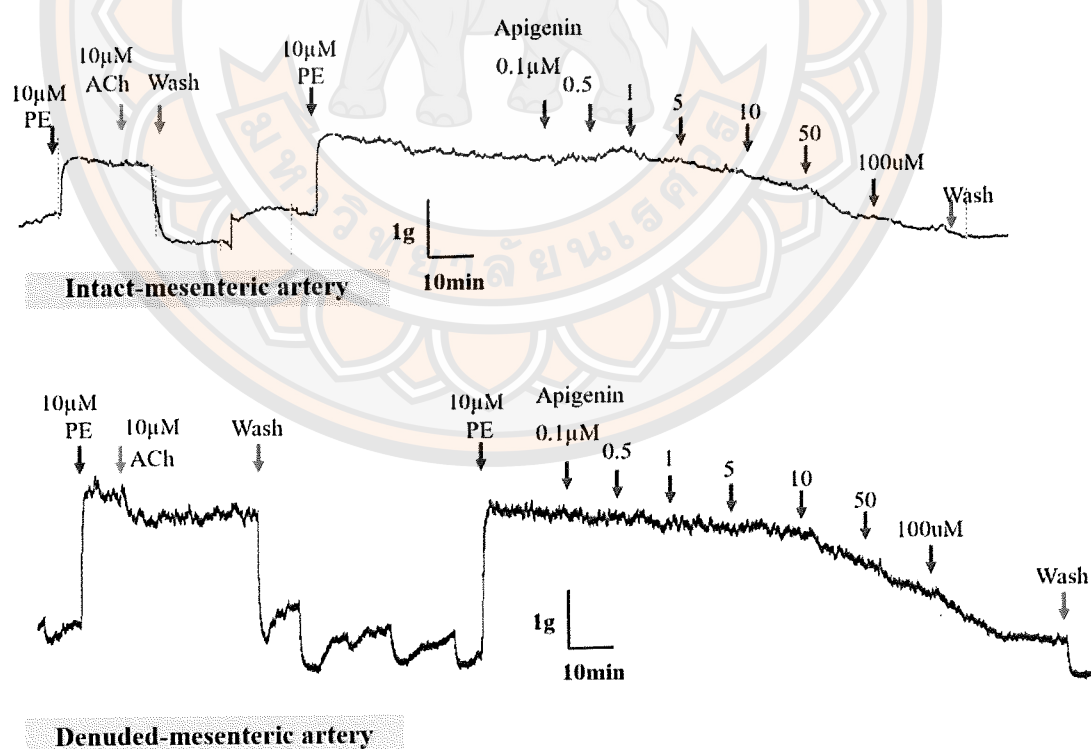


**Figure 25** Relaxations induced by luteolin, apigenin, and bacopaside I (0.1-100  $\mu\text{M}$ ) and vehicle (DMSO) in endothelial intact mesenteric arteries precontracted with phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ ). Values are mean $\pm$ SEM of 6-9 individual arterial rings. The significant p-values were indicated as  $*p < 0.01$  comparing relaxation for each compound with the control (DMSO) using two-way ANOVA (n=6-9). Lines were fitted by non-linear regression

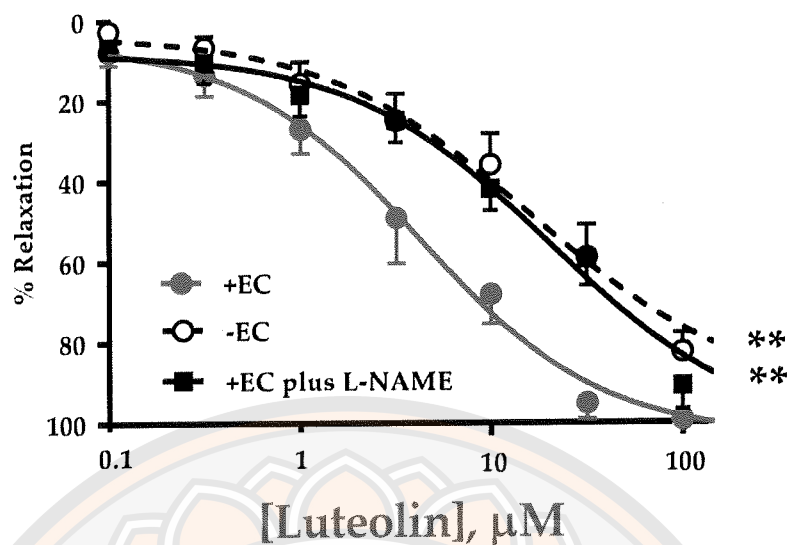


## 2. Mechanisms of vasorelaxation by Brahmi compounds

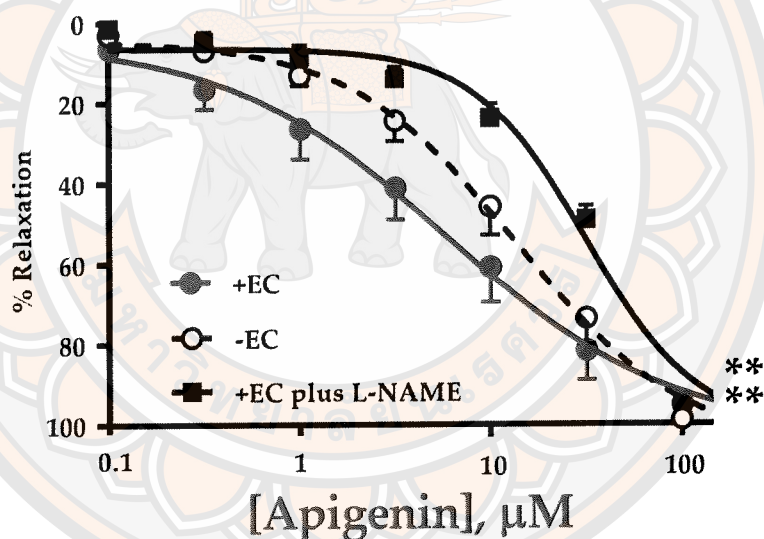
All the Brahmi compounds caused vasorelaxation in both endothelial intact (+EC) and endothelial denuded (-EC) mesenteric arterial rings. The original tracing showing the vasorelaxant effect of 0.1-100  $\mu\text{M}$  apigenin via endothelium and smooth muscle cells (Figure 26). The relaxations were slightly reduced by the removal of endothelium, implying that these compounds partly acted via an effect on endothelial vasodilators. The compounds still produced some vasorelaxation of the endothelial denuded arterial rings due to a direct action on vascular smooth muscle cells. For intact vessels, L-NAME (inhibitor of endothelial NO synthase; eNOS inhibitor) reduced the vasorelaxations. These reductions suggest that some vasorelaxations were mediated through production and release of NO by endothelial cells (Figure 27 and 28). The  $\text{EC}_{50}$  and  $\text{E}_{\text{max}}$  were demonstrated for the potency and the efficacy of Brahmi compounds on relaxations of endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings or endothelial intact arteries with L-NAME (Table 7).



**Figure 26** The original tracing showing the vasorelaxant effect of 0.1-100  $\mu\text{M}$  apigenin via endothelium and smooth muscle cells tracing.

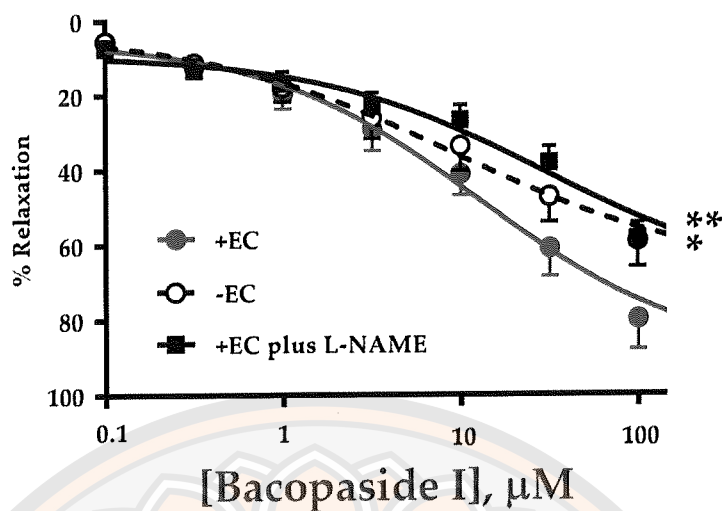


(A) Cumulative concentration-response curves of luteolin (0.1-100  $\mu\text{M}$ )

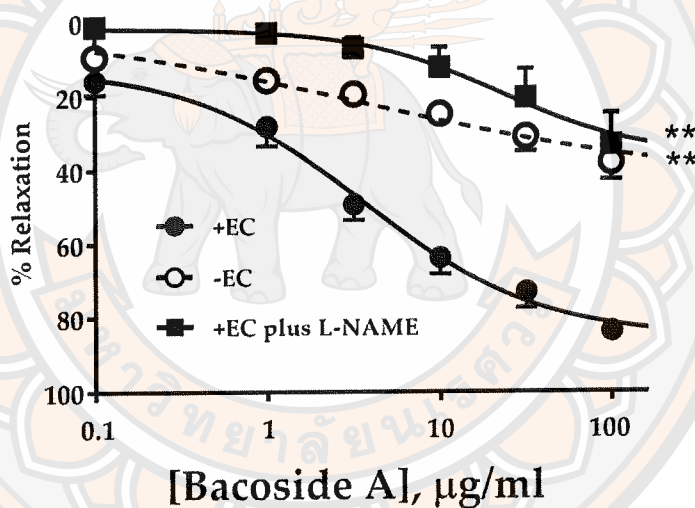


(B) Cumulative concentration-response curves of apigenin (0.1-100  $\mu\text{M}$ )

**Figure 27** Cumulative concentration-response curves of (A) luteolin and (B) apigenin in concentrations (0.1-100  $\mu\text{M}$ ) in endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings and endothelial intact vessels pre-incubated in L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ). The graphs are expressed as %relaxation of vessel pre-contracted with 10  $\mu\text{M}$  PE. Values are mean $\pm$ SEM of 6-9 individual arteries. **\*\* $p$ <0.001** each compound compared with intact vessels (+EC) using two-way ANOVA (n=6-9)



(A) Cumulative concentration-response curves of bacopaside I (0.1-100  $\mu\text{M}$ )



(B) Cumulative concentration-response curves of bacoside A (0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ )

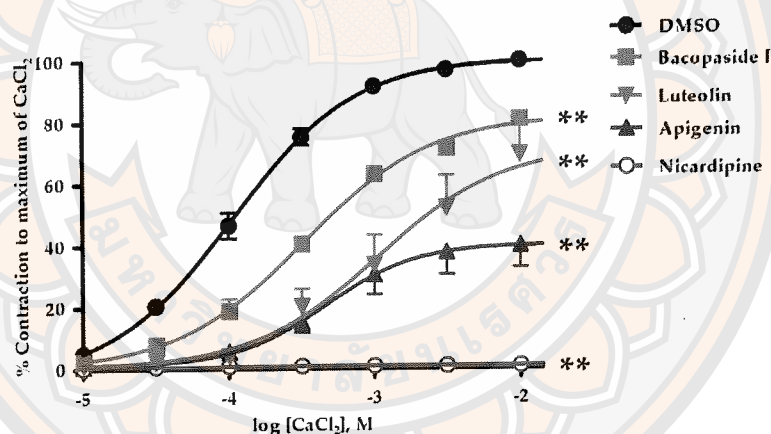
**Figure 28** Cumulative concentration-response curves of (A) bacopaside (0.1-100  $\mu\text{M}$ ) and (B) bacoside A (0.1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) in endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings and endothelial intact vessels pre-incubated in L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ). The graphs are expressed as %relaxation of vessel pre-contracted with 10  $\mu\text{M}$  PE. Values are mean $\pm$ SEM of 6-9 individual arteries. \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.001 each compound compared with intact vessels (+EC) using two-way ANOVA (n=6-9)

**Table 7** The  $EC_{50}$  and  $E_{max}$  of Brahmi compounds on relaxations of endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings or +EC with 100  $\mu$ M L-NAME. Comparison of  $EC_{50}$  or  $E_{max}$  of each compound in -EC or +EC plus L-NAME vs +EC was shown as  $\dagger p < 0.05$ ,  $\dagger\dagger p < 0.01$  using unpaired Student's *t*-test

Pure compounds	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$E_{max}$ (%)	n
Luteolin			
+EC	4.35 $\pm$ 1.31	99.35 $\pm$ 0.66	6
-EC	21.90 $\pm$ 5.86 $\dagger$	82.42 $\pm$ 4.65 $\dagger\dagger$	6
+EC plus L-NAME	14.99 $\pm$ 3.56 $\dagger$	90.85 $\pm$ 5.85	6
Apigenin			
+EC	8.93 $\pm$ 3.33	95.27 $\pm$ 2.61	9
-EC	12.80 $\pm$ 2.54	98.81 $\pm$ 1.19	8
+EC plus L-NAME	25.62 $\pm$ 3.38 $\dagger\dagger$	94.40 $\pm$ 2.10	7
Bacopaside I			
+EC	14.63 $\pm$ 5.36	79.94 $\pm$ 8.17	7
-EC	17.29 $\pm$ 4.75	58.97 $\pm$ 7.05 $\dagger$	7
+EC plus L-NAME	25.38 $\pm$ 4.33	58.45 $\pm$ 4.21 $\dagger$	7
Mixture compounds	$EC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)	$E_{max}$ (%)	n
Bacoside A			
+EC	9.26 $\pm$ 5.38	83.60 $\pm$ 2.86	7
-EC	10.74 $\pm$ 4.27	37.90 $\pm$ 4.72	6
+EC plus L-NAME	26.93 $\pm$ 5.01	33.16 $\pm$ 8.41	6

### 3. Effect of Brahmi compounds on $\text{Ca}^{2+}$ influx

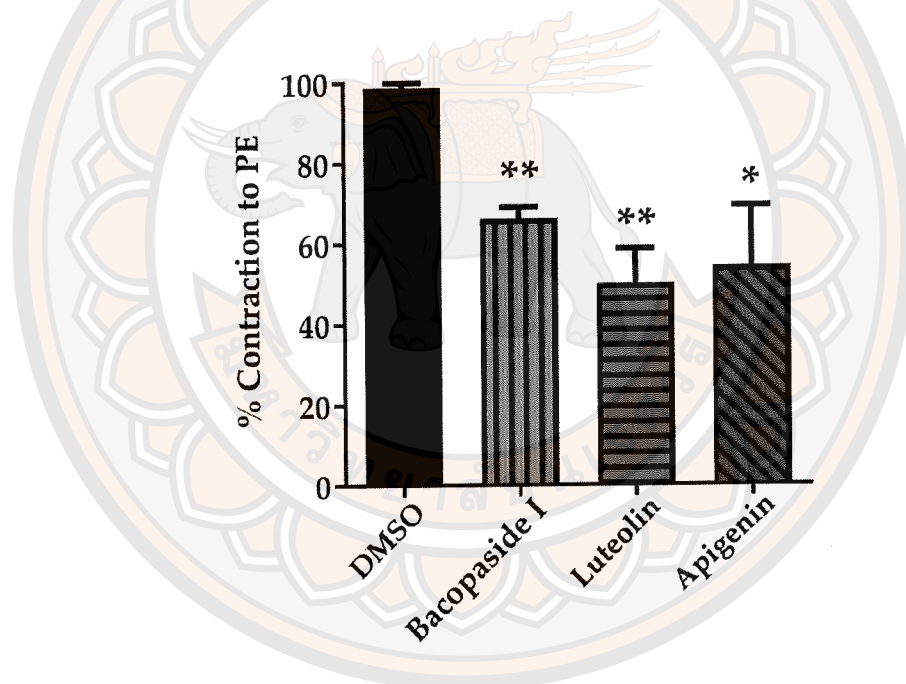
In this study, the voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VOCCs) were activated by depolarising denuded vessels with 80 mM  $\text{K}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution. Then vascular contraction elicited by  $\text{CaCl}_2$  accumulatively added at increasing concentrations (0.01-10 mM). In the same vessel, the protocol was repeated by pre-incubation with 10  $\mu\text{M}$  Brahmi compounds for 15 minutes and these  $\text{CaCl}_2$ -induced contractions were inhibited and seen as a rightward shift of the concentration response curve and reduced  $E_{\text{max}}$  from control (Figure 29). The maximum contraction ( $E_{\text{max}}$ ) of arterial ring in control and in the presence of bacopaside I, luteolin or apigenin were  $100 \pm 1.3$ ,  $81.9 \pm 1.7$ ,  $72.0 \pm 6.7$  and  $40.2 \pm 3.5\%$ , respectively. Positive control, L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blocker, nicardipine (1  $\mu\text{M}$ ) completely abolished this  $\text{CaCl}_2$ -induced vasoconstriction (Figure 29).



**Figure 29**  $\text{CaCl}_2$ -induced contractions of denuded mesenteric arteries pre-incubated in high  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -free media in the conditions of pre-incubation with DMSO (negative control), 10  $\mu\text{M}$  bacopaside I, 10  $\mu\text{M}$  luteolin, 10  $\mu\text{M}$  apigenin, and 1  $\mu\text{M}$  nicardipine (positive control). Y-axis, % contraction compared to the contraction achieved with the highest  $\text{CaCl}_2$  concentration during the initial run without a Brahmi compound in the same vessel. Values are mean  $\pm$  SEM of 4-6 individual arteries. \*\* $p < 0.01$  each of the active compounds compared to DMSO using two-way ANOVA ( $n=4-6$ )

#### 4. Effect of Brahmi compounds on intracellular $\text{Ca}^{2+}$ release

The release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum is another important trigger of vascular contraction. To study the effect of Brahmi active compounds on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, the denuded arterial rings were pre-incubated in  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution for 10 min and then 10  $\mu\text{M}$  PE added thereby eliciting a transient contraction. Then the protocol was repeated with the same arterial ring in the presence of the test compounds (control, apigenin, luteolin and bacopaside I) producing reduced contractions ( $98.8 \pm 1.2$ ,  $50.1 \pm 8.5$ ,  $54.3 \pm 14.9$ ,  $85.8 \pm 7.2$  and  $66.2 \pm 2.9\%$ , respectively) (Figure 30). Bacopaside I, luteolin and apigenin caused significant decrease in PE-induced contraction compared to the vehicle control ( $p < 0.001$ ,  $< 0.01$  and  $< 0.001$ , respectively).



**Figure 30** PE-induced contraction induced by  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum of endothelial denuded mesenteric arteries in the presence of DMSO (control), 10  $\mu\text{M}$  of bacopaside I, luteolin and apigenin. The data is % contraction to 10  $\mu\text{M}$  PE induced contraction compared to contractions produced by the initial protocol without test compound. Values are mean  $\pm$  SEM of 5-6 individual arteries. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  each of the active compounds compared with control using unpaired Student's t-test ( $n=5-6$ )

## The clinical trial study

### 1. Participant demographics

Demographic and baseline characteristics are shown and compared between EBM and placebo groups in Table 8. The study was conducted from June 2018 to February 2019 at Phitsanulok, Thailand. The population included the ages between 55 and 80 years. Total participants (n=80) have been enrolled for the screening process and some participants (n=53) were included to perform further studies by inclusion criteria screening. Five participants were excluded by exclusion criteria thus 48 people have been able to enrol for the placebo run-in period (Figure 31). After that the participants were randomised for the treatment period into EBM or placebo. There were 24 participants in each group. Some individuals of EBM were withdrawn during the treatment period, hence the data in each group of the per-protocol set (n=21, EBM and n=24, placebo) were analysed. The gender of the participants were 39 female and 6 male participants. The average age was  $62.5 \pm 5.2$  years, with a mean body mass index (BMI) of  $24.3 \pm 3.2$  kg/m<sup>2</sup>, or a mean WHR of  $0.89 \pm 0.06$ , within a normal range. The mean systolic/diastolic blood pressure was 120.3/76.4 mmHg. The individual education consists of four years of primary school (n=32), or higher (n=13). Major groups of occupations are 12 sellers, 15 farmers, 11 employees and 7 unemployed.

MMSE-Thai 2002 was used for cognitive screening. The optimal cut-off scores for detecting mild cognitive impairment were  $\leq 25/30$ . The mean MMSE score of our participants was  $26.5 \pm 2.0$ , defined as their normal cognitions. The differences between two groups (EBM and placebo) were not found in total scores on the MMSE as a screening test, nor each treatment period. The mean test score for TGDS was  $3.3 \pm 3.3$  considered without depression. Individuals with self-reported chronic disease (e.g., schizophrenia, dementia, depression, liver disease, kidney disease, diabetes, cancer, stroke, hypertension and hyperlipidaemia treated with therapeutic anti-hyperlipidaemia drugs), psychiatric or neurological diseases were excluded from the study.

Table 8 Participant demographic recorded at the baseline

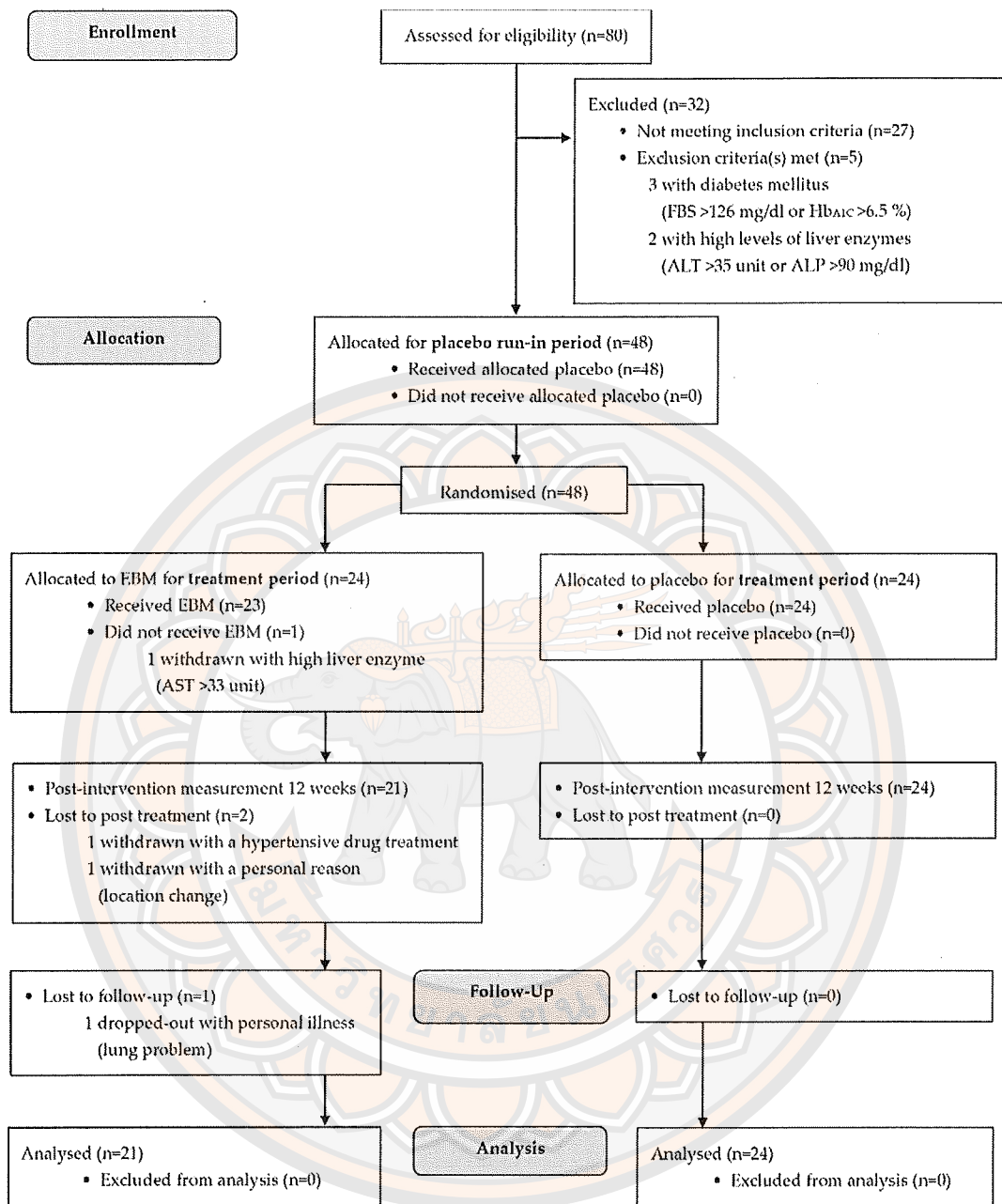
Demographic variable	Total	min to max	Placebo	EBM	p-value*
N	45 (100%)	-	24 (53.3%)	21 (46.7%)	-
Gender					
Female, n	39 (86.7%)	-	20	19	-
Male, n	6 (13.3%)	-	4	2	-
Age					
Age (years), mean $\pm$ SD	62.5 $\pm$ 5.2	55 to 72	62.0 $\pm$ 5.2	63.1 $\pm$ 5.4	0.46
Group 55-64 years; mean $\pm$ SD	59.1 $\pm$ 3	55 to 64	59.1 $\pm$ 2.9	59.3 $\pm$ 3.2	-
; n	28	-	16	12	-
Group 65-80 years; mean $\pm$ SD	68.2 $\pm$ 2	65 to 72	68.1 $\pm$ 2.2	68.3 $\pm$ 2.2	-
; n	17	-	8	9	-
Parameters, mean $\pm$ SD					
Height (cm)	154.1 $\pm$ 7.9	142 to 175	154.4 $\pm$ 7.8	153.8 $\pm$ 8.2	0.81
Body weight (kg)	57.8 $\pm$ 9.5	39.7 to 80.8	57.1 $\pm$ 7.6	58.7 $\pm$ 11.4	0.58
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.3 $\pm$ 3.2	18.4 to 31.6	24.0 $\pm$ 2.8	24.7 $\pm$ 3.6	0.46
Waist circumference (cm)	87.4 $\pm$ 9.5	68.6 to 114.0	86.9 $\pm$ 8.8	88.0 $\pm$ 10.5	0.72
Waist-hip ratio	0.86 $\pm$ 0.06	0.74 to 0.97	0.87 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.06	0.44
Blood pressure, mean $\pm$ SD					
Systolic blood pressure (mmHg)	120.3 $\pm$ 11.5	94 to 139	117.9 $\pm$ 11.9	123.1 $\pm$ 10.5	0.13
Diastolic blood pressure (mmHg)	76.4 $\pm$ 8.4	62 to 98	73.5 $\pm$ 7.8	79.6 $\pm$ 8.1	0.02
Mean arterial blood pressure	91.0 $\pm$ 8.6	72.7 to 111.7	88.3 $\pm$ 8.5	94.1 $\pm$ 7.9	0.02
Heart rate (BPM)	74.9 $\pm$ 10.7	48 to 106	74.6 $\pm$ 9.9	75.2 $\pm$ 11.8	0.86



Table 8 (cont.)

Demographic variable	Total	min to max	Placebo	EBM	p-value*
Education					
Education (years), mean $\pm$ SD	6.1 $\pm$ 3.6	4 to 16	5.5 $\pm$ 3.5	6.8 $\pm$ 3.7	0.25
Group 4 years of education, n	32	-	20	12	-
Group >4 years of education, n	13	-	4	9	-
Occupation					
Seller, n	12	-	6	6	-
Farmer, n	15	-	7	8	-
Employee, n	11	-	7	4	-
Unemployed, n	7	-	4	3	-
MMSE † score, mean $\pm$ SD	26.5 $\pm$ 2.0	22 to 30	26.3 $\pm$ 2.2	26.7 $\pm$ 1.9	0.54
TGDS †† score, mean $\pm$ SD	3.3 $\pm$ 3.3	0 to 12	4.2 $\pm$ 3.4	2.3 $\pm$ 3.0	0.06

† MMSE was considered to be a normal range score of 25-30 with a maximum score of 30; †† TGDS was considered to be within the normal range score of 0-12 with a maximum score of 30. \* The p-values were compared between EBM and placebo using unpaired Student's t-test. All data of the baseline mean the determined data before the placebo run-in period.



**Figure 31 Participant flow diagram in the study based on the CONSORT flow diagram**

## **2. Safety of EBM**

### **2.1 Body weight, Body mass index and Waist-hip ratio**

At baseline, the body weight (BW) of  $57.8 \pm 9.5$  g, the body mass index (BMI) of  $24.4 \pm 3.3$  kg/m<sup>2</sup> in women and  $23.6 \pm 2.7$  kg/m<sup>2</sup> in men have been found. The waist-hip ratio (WHR) in females were  $0.86 \pm 0.07$ , considered slightly overweight, however WHR in male was normal ( $0.86 \pm 0.06$ ). After 12 weeks of the treatment, there were no abnormal changes in these variables (Table 9).

### **2.2 Blood pressure and Heart rate**

Individual blood pressure (BP) and heart rate (HR) were measured using validated automated sphygmomanometer. The measure of BP taken at the brachial artery in triplicate at least 5 minutes apart with the person seated. The systolic BP/diastolic BP or HR were within the normal range with  $120.3 \pm 11.5/76.4 \pm 8.4$  mmHg or  $75 \pm 11$  beats/min, respectively. The intervention did not affect BP and HR between groups or time periods.

### **2.3 Blood biochemistry**

The FBG, HbA<sub>1c</sub>, lipid level, calcium level, liver function test i.e., AST, ALT and ALP, and kidney function test i.e., BUN, creatinine and eGFR were assessed from serum. No blood biochemical parameters were significantly different compared between groups. The baseline variances were shown separately for placebo and EBM in Table 9. Moreover, no effect of EBM on pro-inflammatory molecules i.e., ICAM-1, VCAM-1 or ADMA in plasma of EBM participants after the 12-week consumption (Table 9).

**Table 9 Blood biochemistry data of the participants. Values are mean±SD**

Blood biochemistry	Normal range	Placebo (n=24)				EBM (n=21)			
		Baseline	Treatment		Baseline	Treatment			
			week 0	week 12		week 0	week 12		
HbA <sub>1c</sub> (%)	4.6-6.5	5.8 ± 0.5	5.7 ± 0.4	5.7 ± 0.4	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.7 ± 0.4		
FBG (mg/dl)	<126	91.0 ± 7.1	92.0 ± 5.7	90.0 ± 6.8	90.1 ± 6.1	91.3 ± 7.0	90.0 ± 7.1		
Total cholesterol (mg/dl)	150-200	216.5 ± 35.8	208.5 ± 37.5	220.7 ± 40.6	221.5 ± 37.4	206.6 ± 45.3	210.6 ± 48.7		
Triglyceride (mg/dl)	30-150	112.3 ± 44.5	116.4 ± 53.5	112.0 ± 51.4	128.4 ± 49.7	122.4 ± 58.5	122.6 ± 58.3		
LDL (mg/dl)	<130	131.7 ± 36.4	126.2 ± 39.3	139.2 ± 39.9	125.8 ± 38.7	123.7 ± 55.1	126.0 ± 48.9		
HDL (mg/dl)	45-65	62.5 ± 13.8	59.2 ± 13.4	59.3 ± 14.3	63.5 ± 12.3	57.8 ± 14.1	56.6 ± 13.4		
BUN (mg/dl)	8-23	11.5 ± 2.7	11.9 ± 2.4	12.1 ± 2.5	11.8 ± 3.5	12.0 ± 3.7	13.1 ± 4.8		
Creatinine (mg/dl)	0.4-1.4	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1		
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	>60	77.9 ± 12.4	78.3 ± 8.6	80.7 ± 11.9	76.0 ± 11.5	76.5 ± 12.5	78.02 ± 11.8		
AST (unit)	0-33	22.7 ± 5.2	23.1 ± 5.4	22.9 ± 5.4	21.9 ± 4.6	21.4 ± 3.9	22.5 ± 5.4		
ALT (unit)	3-35	16.4 ± 6.9	17.2 ± 7.0	14.6 ± 6.1	16.8 ± 6.4	15.0 ± 5.6	14.7 ± 4.8		
ALP (I.U.)	25-90	68.5 ± 13.6	69.0 ± 12.2	77.6 ± 13.5	66.2 ± 11.4	66.05 ± 14.5	75.0 ± 14.7		
Calcium (mg/dl)	8.8-10.6	9.8 ± 0.3	9.9 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.9 ± 0.4	10.0 ± 0.4	10.1 ± 0.4		

Table 9 (cont.)

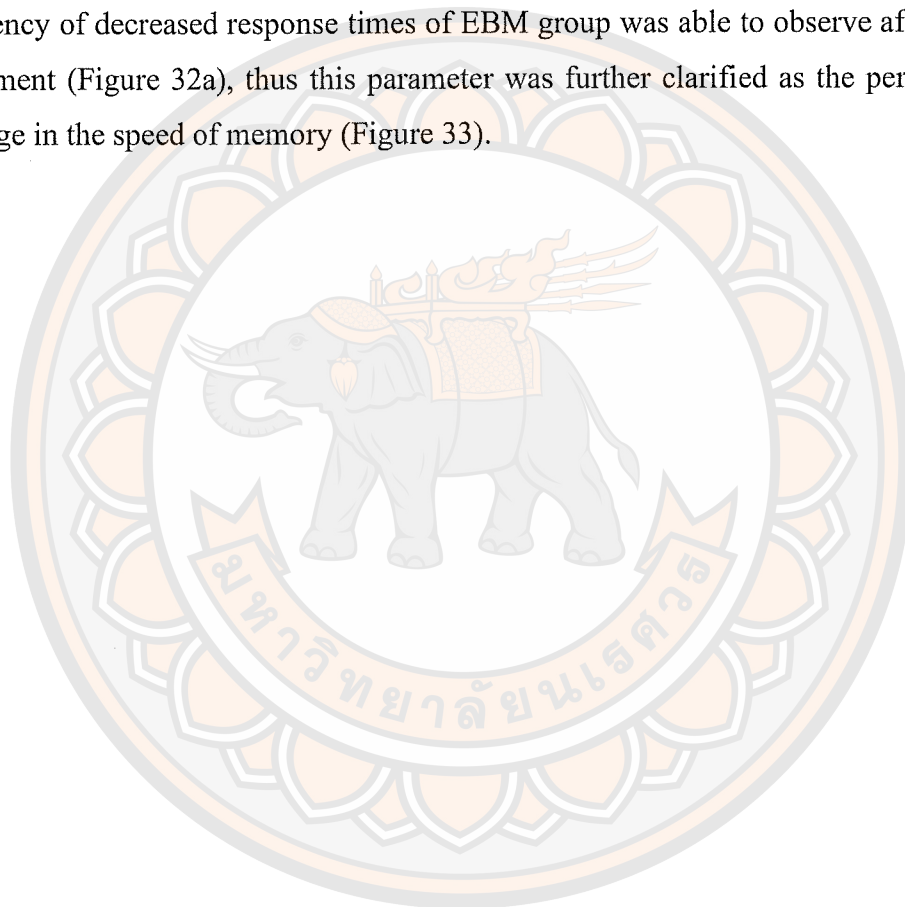
Blood biochemistry	Normal range	Placebo (n=24)			EBM (n=21)		
		Baseline	Treatment week 0	Treatment week 12	Baseline	Treatment week 0	Treatment week 12
ICAM-1 (ng/ml)	249-966	ND	733.2 ± 450.1	732.0 ± 396.9	ND	775.8 ± 334.8	852.0 ± 408.0
VCAM-1 (ng/ml)	431-2273	ND	913.3 ± 206.0	918.9 ± 178.5	ND	985.7 ± 250.2	959.9 ± 239.4
ADMA (ng/ml)	81-121	ND	143.3 ± 43.9	141.1 ± 40.9	ND	135.6 ± 29.8	137.2 ± 35.3

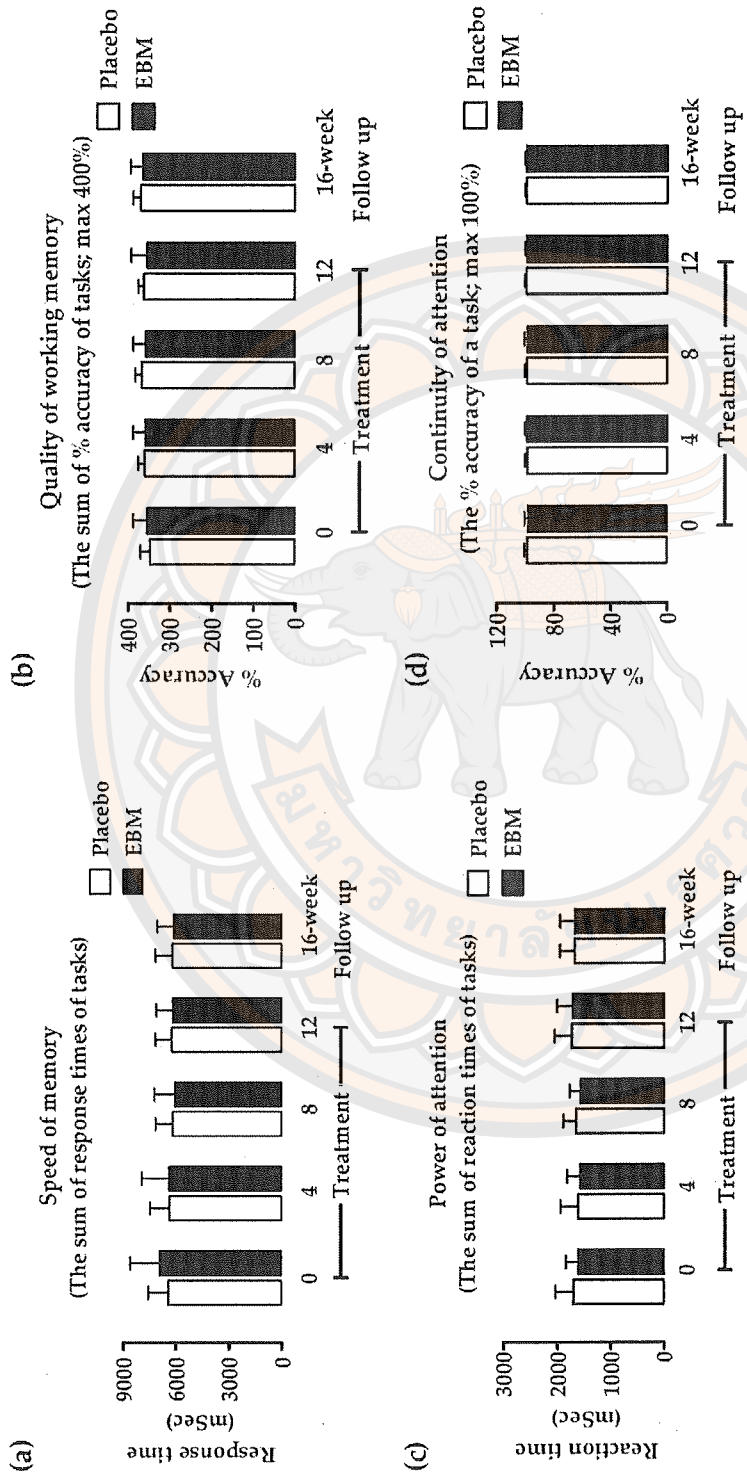
All values except ICAM-1, VCAM-1 or ADMA were determined at baseline (before the placebo run-in period), treatment week 0 and treatment week 12. ICAM-1, VCAM-1 or ADMA were determined at treatment week 0 and treatment week 12.

**Abbreviations:** fasting blood glucose (FBG), glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), blood urea nitrogen (BUN), estimated glomerular filtration rate (eGFR), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), asymmetric dimethylarginine (ADMA).

### 3. Cognitive effect of EBM

To assess the cognitive effect of EBM, the cognitive computerised battery test was used to test the memory and the attention by determining changes of the accuracy, the response time and the reaction time of test-tasks. The results with raw data of test-task shown in Figure 32 (a-d) indicated that EBM was unlikely to change the accuracy, the response time and the reaction time. The quality of memory of the EBM group was not improved, implying by the accuracy of tasks (Figure 32b). However, the tendency of decreased response times of EBM group was able to observe after 4-week treatment (Figure 32a), thus this parameter was further clarified as the percentage of change in the speed of memory (Figure 33).

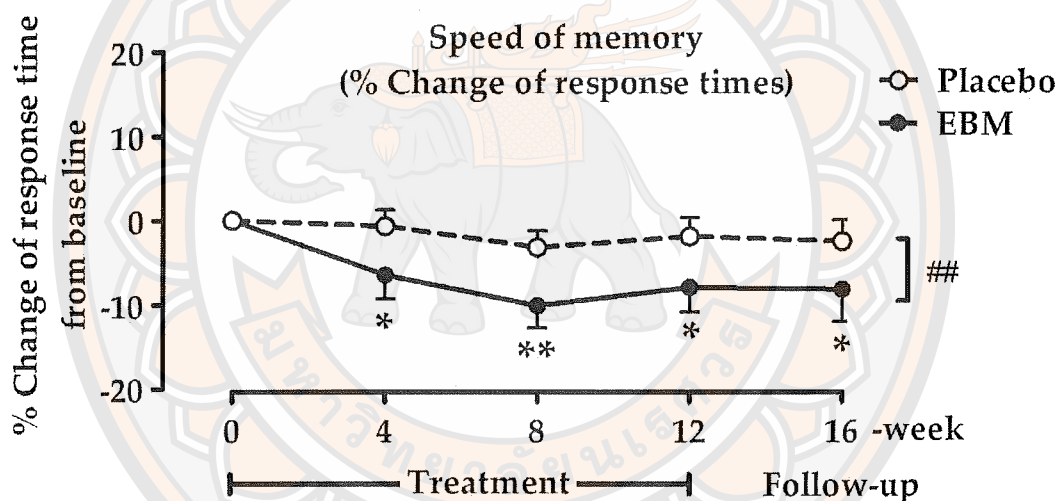




**Figure 32** The cognitive effects of chronic EBM consumption were shown as: (a) The sum of response times of tasks for the speed of memory; (b) The sum of % accuracy of tasks for the quality of working memory; (c) The sum of reaction times of tasks for the power of attention; (d) The % accuracy of a task for the continuity of attention. The data were shown as mean±SEM. The statistically significant differences between groups was analysed by Two-way ANOVA

#### 4. Effects of EBM on the speed of memory

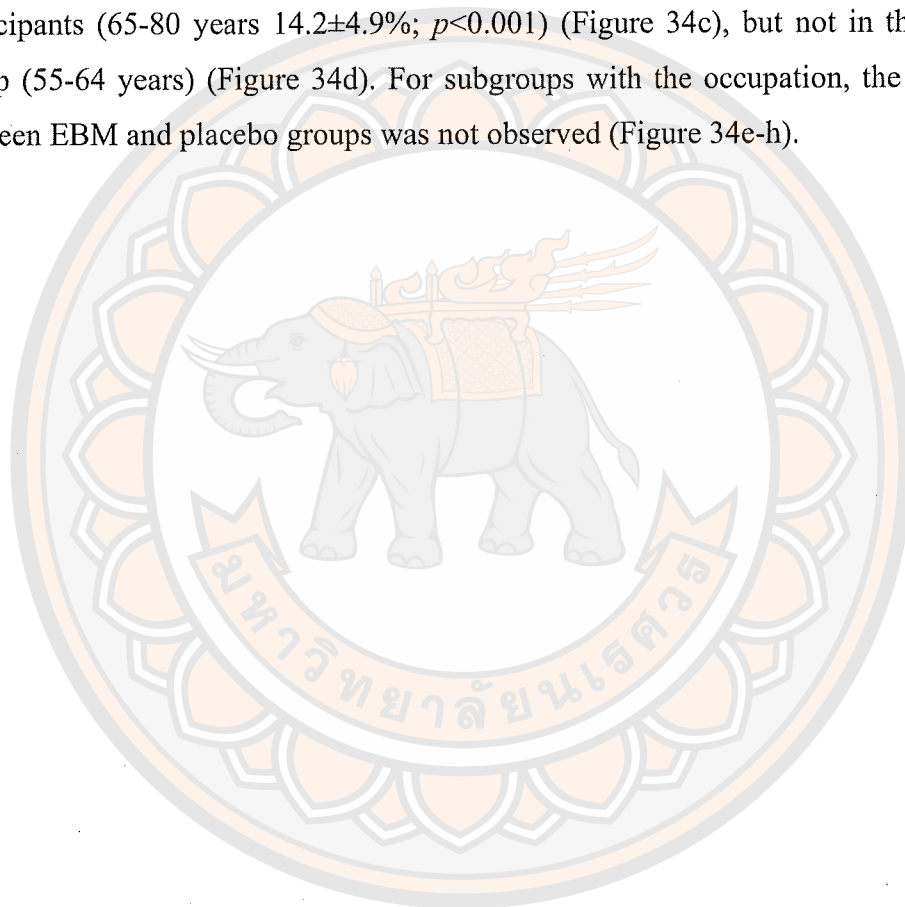
The speed of memory was examined from summation of the response time of relevant tasks, i.e. word recognition, picture recognition, spatial working memory and numeric working memory. By comparing the percentage change of the response time from the baseline, the participants in the EBM treatment group were found to reduce the response time, suggesting that EBM improved the speed of their memories (Figure 33). By contrast the placebo group did not have this effect (Figure 33). The improved memory speed in the EBM group occurred following week 4 of the treatment period. After 8 weeks, the improvement in memory speed in the EBM group ( $10.1 \pm 2.6\%$ ,  $p < 0.01$ ) was more pronounced than that of the placebo group ( $3.2 \pm 2.0\%$ ) (Figure 33).

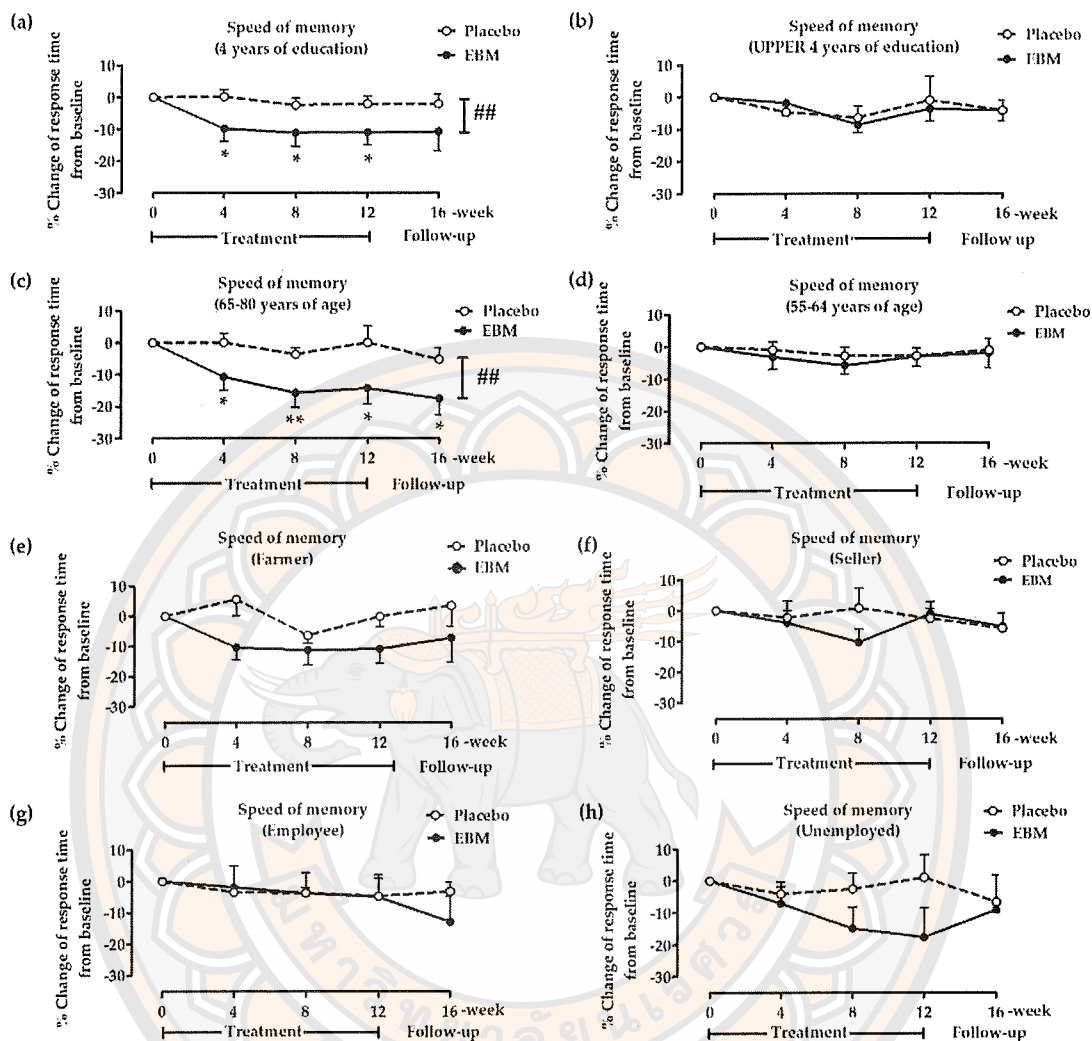


**Figure 33** The % change of response time from baseline for the speed of memory of participants in the EBM group and the placebo group. The data were shown as mean $\pm$ SEM. The statistically significant differences from the two groups (## $p < 0.01$ ) were analysed in a whole graph comparison of Two-way ANOVA and the difference between week 0 and another week within each group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) was analysed using paired Student's t-test



Memory speed was further analysed into sub-groups of education, age and occupation (Figure 34). EBM showed the improvement of the memory speed in some particular groups, in that at week 12 this was significantly better in the participants with 4 years of education for EBM group ( $11.0 \pm 4.1\%$ ;  $p < 0.001$ ) as compared with placebo ( $2.0 \pm 2.4\%$ ) (Figure 34a), however in participants with higher levels of education there was no difference in the improvement of memory speed between EBM and placebo groups (Figure 34b). The improvement of memory speed was significant in the older participants (65-80 years  $14.2 \pm 4.9\%$ ;  $p < 0.001$ ) (Figure 34c), but not in the younger group (55-64 years) (Figure 34d). For subgroups with the occupation, the difference between EBM and placebo groups was not observed (Figure 34e-h).

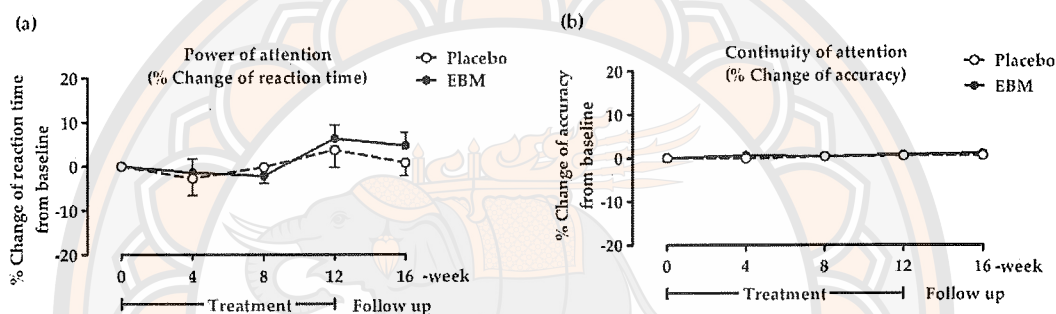




**Figure 34** Sub-group analysis of speed of memory on (a) 4 years of education, (b) more than 4 years of education, (c) 65-80 years of age, (d) 55-65 years of age, (e) farmer, (f) seller, (g) employee, and (h) unemployed. The data were shown as mean $\pm$ SEM. The statistically significant differences from the two groups (## $p$ <0.01) were analysed in a whole graph comparison of Two-way ANOVA and the difference between week 0 and another week within each group (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01) was analysed using paired Student's  $t$ -test

### 5. Effects of EBM on attention

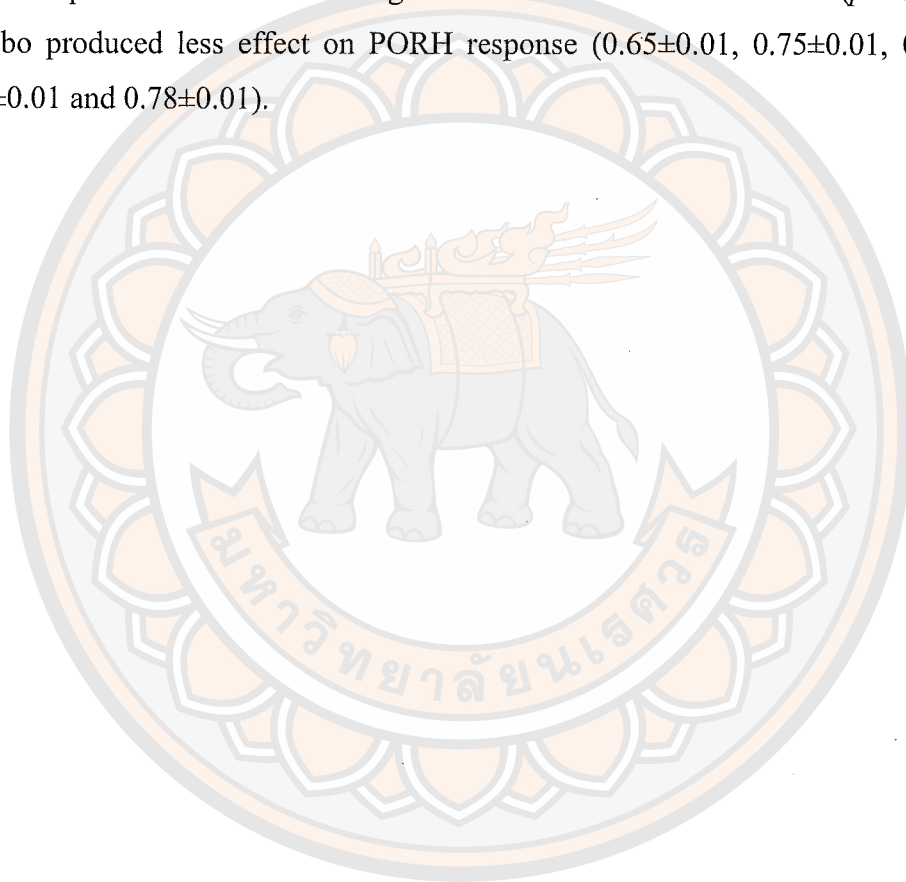
Effects of EBM on attention were considered from the % change of reaction time from baseline. We have demonstrated that participants of EBM and placebo did not cause any changes in the power of attention. Nevertheless, 12-week of EBM treatment likely increased the power of attention, but it made no significant difference when compared to the baseline ( $p=0.08$ ) (Figure 35). The EBM consumption did not improve the continuity of attention, regarding to the % change of accuracy from baseline (Figure 35).

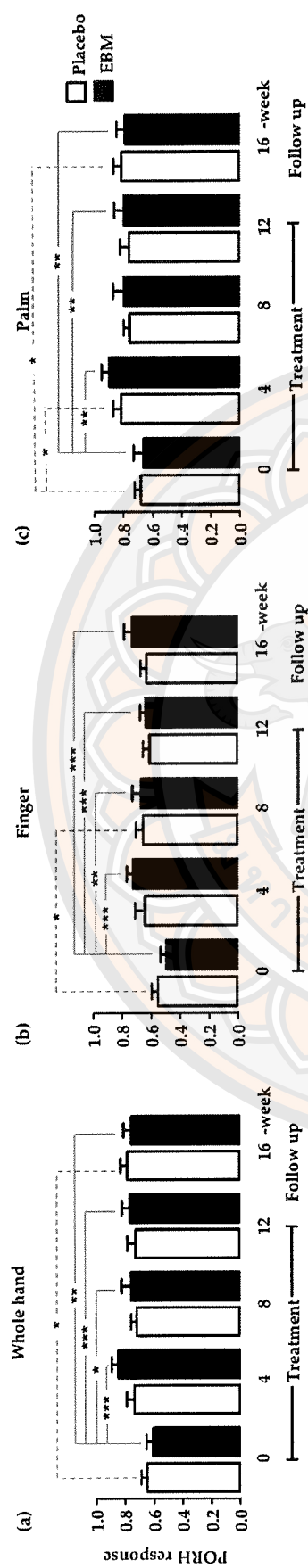


**Figure 35** (a) The % change of reaction time from baseline for the power of attention of participants in the EBM group and the placebo group and (b) the % change of accuracy from baseline for the continuity of attention. The data were shown as mean $\pm$ SEM. The statistically significant differences from the two groups were analysed in a whole graph comparison of Two-way ANOVA and the difference between week 0 and another week within each group was analysed using paired Student's t-test

## 6. Reactive hyperaemia blood flow enhancing effect of EBM

The PORH blood flow responses through microcirculation of the whole hand, the fingers and the palm of participants were significantly promoted by EBM consumption at 4 to 12 weeks. The effects still occurred in the follow-up period (Figure 36). The PORH responses of EBM group in whole hand area at the treatment week 0, 4, 8, 12 and follow-up (week 16) were  $0.61\pm 0.01$ ,  $0.85\pm 0.01$ ,  $0.76\pm 0.01$ ,  $0.75\pm 0.01$ , and  $0.67\pm 0.01$ , respectively (Figure 36). The PORH responses of week 4, 8 and 12 in treatment period of EBM were significant increased from week 0 ( $p < 0.001$ ). The placebo produced less effect on PORH response ( $0.65\pm 0.01$ ,  $0.75\pm 0.01$ ,  $0.72\pm 0.01$ ,  $0.73\pm 0.01$  and  $0.78\pm 0.01$ ).

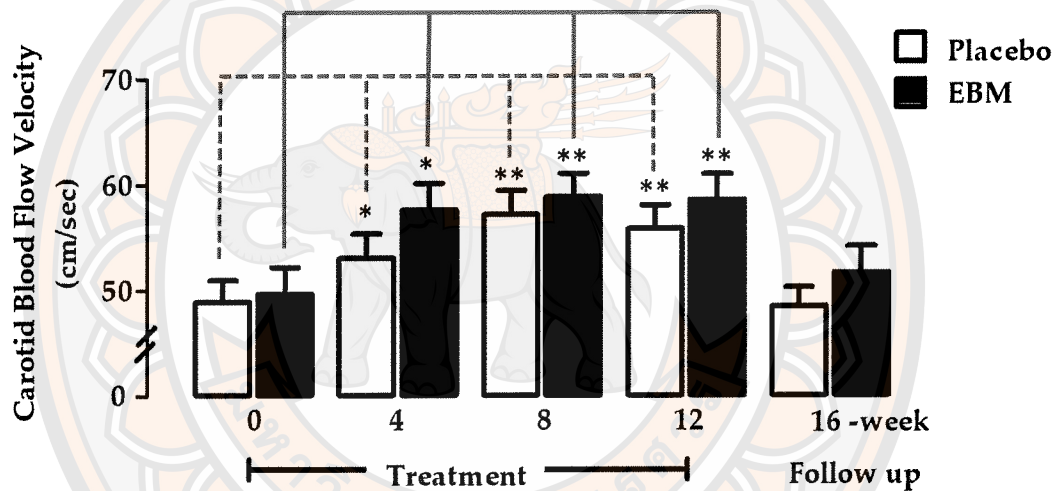




**Figure 36** Post-occlusive reactive hyperaemia (PORH) blood flow was presented as the PORH response in the whole hand (a), the finger (b), and the palm (c). Data represent mean $\pm$ SEM. The difference between week 0 and another week within each group (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001) was analysed using the paired Student's t-test

### 7. Carotid blood flow velocity effect of EBM

The blood flow velocity was averaged from both right and left CCA. The velocity of carotid blood flow at week 0 of placebo and EBM group were  $48.9 \pm 0.2$  and  $49.7 \pm 0.3$  cm/sec. The carotid blood flow velocity was improved after week 4 of administrations in both groups compared to baseline (week 0). The carotid blood flow velocity of EBM group at week 4, 8 and 12 were increased to  $57.6 \pm 0.3$ ,  $58.9 \pm 0.2$  and  $58.6 \pm 0.3$  cm/sec, while that of placebo group were increased to  $53.0 \pm 0.2$ ,  $57.2 \pm 0.2$  and  $55.9 \pm 0.2$  cm/sec. The carotid blood flow velocities were restored back to baseline in the follow-up period of both groups (Figure 37).



**Figure 37** The blood flow velocity in the average of the right and left common carotid arteries. The data were shown as means $\pm$ SEM. The difference between baseline (week 0) and another week within each group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) was analysed using the paired Student's t-test

## CHAPTER V

### CONCLUSION

#### Discussion of the preclinical study

This is the first study comparing the vasodilatory mechanisms elicited by saponins (particularly bacoside A and bacopaside I) and the principal flavonoids (luteolin and apigenin) were the most potent. However, these are present in BM extract at only about 1/20<sup>th</sup> the contents of the bacoside A saponins and bacopaside I. Thus in terms of the overall actions of the complete BM extract, the saponins would be expected to make a larger contribution to the vasorelaxation than the flavonoids.

However, higher potency of aglycone flavonoids compared to saponin glycosides may be due to sugar moieties interfering with the molecule interacting with the binding sites responsible for the vasorelaxation as suggested by previously, i.e. lipophilic groups in the ring skeleton of flavonoids increased their vasorelaxant activity (Wu et al., 2006). This provides a basis for study of the molecular mechanisms of vasorelaxation of flavonoids.

We investigated the mechanisms of flavonoid- and saponin-induced relaxation by endothelial denudation in mesenteric arterial rings which impaired vasorelaxation. Role of NO was investigated using the eNOS inhibitor (L-NAME) with the test compounds. L-NAME increased EC<sub>50</sub> and reduced E<sub>max</sub> which imitated the effect of endothelial denudation, suggesting the relaxation was mainly mediated by NO. This accords with observations made by Jin et al. (2009) that a cyclooxygenase (COX) inhibitor did not affect the relaxation induced by apigenin (Jin et al., 2009), and consistent with our previous study of BM extract, where indomethacin had no effect on vasorelaxation (Kamkaew et al., 2011). There were some important concentration dependent differences between flavonoids and saponins. Firstly, denudation or blockade of eNOS reduced the effect of bacoside A more than bacopaside I, luteolin and apigenin. Perhaps this was a reflection of bacoside A being a mixture of saponins. However, curiously the responses of luteolin and apigenin to denudation and L-NAME where the latter had a greater effect.

Vascular smooth muscle express plasma membrane L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels that allow depolarisation dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry to trigger contraction. All three compounds (luteolin, apigenin and bacopaside I) tested in denuded vessels depressed this mechanism of contraction that can also explain in part, the vasorelaxant effect. But here, apigenin appeared to be more effective than luteolin while it was less effective in relaxation studies suggesting some heterogeneity in the mechanism of flavonoid action.

$\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores also regulates contraction via inositol trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) or ryanodine receptors (RyR) associated channels in the SR membranes.  $\text{IP}_3$  associated channels are commonly activated by plasma membrane G-protein coupled receptors including  $\alpha_1$ -receptors which are activated by PE. RyR channels are activated by  $\text{Ca}^{2+}$  itself. The three pure compounds also inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  released from stores which can account for at least some vasorelaxation of vessels precontracted by PE. However, the bacoside A was without clear effect again suggesting some heterogeneity between the four test substances. Other  $\text{Ca}^{2+}$ -channels may also be involved, for example T-channels and TRP channels, especially TRPC4 which is activated by  $\alpha_1$ -receptor activation.

$\text{K}^+$  channels also play a role in regulation of vascular tone, i.e. voltage-dependent  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_v$ ) channels open upon depolarization of the plasma membrane in vascular smooth muscle cells, and thus inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  influx through VOCCs, resulting in vasodilation (Ko et al., 2008). Jiang et al. (2004) also reported that luteolin inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  channels, inhibited release of stored  $\text{Ca}^{2+}$  while  $\text{K}^+$  channels were activated, specifically via  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ,  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{K}_v$  and  $\text{K}_{\text{IR}}$  (Jiang et al., 2005) therefore the effects of apigenin, bacoside A and bacopaside I involving  $\text{K}^+$  channels deserve further investigation. Our findings support those of Si et al. (2014) that luteolin can directly act on vascular endothelial cells, by inducing eNOS phosphorylation at Ser1177, leading to NO production (Si et al., 2014). The flavonoids evoke relaxations and also protect endothelial dependent vasorelaxation against oxidative stress (Jin et al., 2009; Ma et al., 2008; Qian et al., 2010) and diabetes (El-Bassossy et al., 2013), however vasoprotective effects of saponins needs further comprehensive investigation.



### Discussion of the clinical trial study

The current study is the first to investigate the effects of 12 weeks' administration of the essence of *Bacopa monnieri* extract mixed with mulberries and the placebo on the cognitive function and the blood flow in healthy elderly 55-80 years of age. The main findings of the study indicated that the memory speed, in addition to the peripheral blood flow on reactive hyperaemia and the carotid blood flow significantly improved at the end of the 12-week supplementation in the group of participants who had taken EBM in comparison to those who had taken placebo. However, contrary to some other studies, our trial found no significant improvement in the quality of memory, the power and continuity of attention. One important point of the study demonstrates for the first time that the improvement of blood flow performance through microcirculation of the whole hand, the fingers and the palm of participants following chronic daily EBM contained Brahmi extract (194 mg with 16.03% of total saponins) in humans occurs. Primary outcome measures were well assessed via cognitive drug research (CDR) computerised battery test as described elsewhere (Peth-Nui et al., 2012; Saenghong et al., 2012; Wattanathorn et al., 2008). To objectively measure the working memory domains including the quality of memory, the speed of memory, the power of attention and the continuity of attention, the efficacy of EBM on cognitive function in participants were comprised.

The neuronal effects of Brahmi, including enhancing memory and intellectual, reducing of inflammatory reactive oxygen species, amyloid beta aggregation and toxicity, thus it can be used for dementia treatment (Abdul Manap et al., 2019; Chaudhari et al., 2017; Malishev et al., 2016). The improvements of the memory acquisition, the verbal learning, the delayed recall, the speed of information processing, the learning rate, the memory consolidation, the retention of new information, the mental control and the logical memory were reported (Calabrese et al., 2008; Morgan and Stevens, 2010; Raghav et al., 2006; Roodenrys et al., 2002; Stough et al., 2001). Our results demonstrated that EBM versus placebo significantly improved the speed of memory by CDR computerised battery test, especially in older people (the sub-group 65-80 years) and low education (the 4 years of education), but not in the sub-group subject of 55-64 years. Another study on the CDR computerised battery test throughout 12-week treatment of Brahmi extract also found the improved memory speed (Peth-

Nui et al., 2012). The difference in finding of the quality of memory were proposed due to the probably reasons as (i) the effects of the mulberry juice used as the presented placebo and (ii) the impact of the placebo run-in design on the cognitive test or potential implications of practice effects, it can minimize effects of practice on trial outcome (Jacobs et al., 2017; Peth-Nui et al., 2012). The quality of memory performance was higher for the placebo group was able to occur similar to at least one study for *Ginkgo biloba* during a longer period of time (Persson et al., 2004). In our study, the power of attention was not significant improved by EBM but it trended to increase the % change of reaction time at week 12 from the baseline week 0 (Figure 5a). The previous meta-analysis showed Brahmi extract improving cognitive function in the attention domain, particularly speed of attention (Kongkeaw et al., 2014). The difference in findings may reflect the relative size of the studies, as, while in our study these parameters did not reach significance, there was some evidence of a trend. With a larger group, the results may have become significant.

The changes in reactive hyperaemia blood flow, carotid blood flow and safety studies were secondary outcomes of the study. Our previous *Ex vivo* findings demonstrated that Brahmi extract and its active compounds acted as a vasodilator (Kamkaew et al., 2019; Kamkaew et al., 2011). As per our previous study, daily oral Brahmi extract (40 mg/kg) in rats for 8 weeks showed a significant increase in cerebral blood flow (Kamkaew et al., 2013), which are considered responsible for the positive effects on blood flow of healthy older adults that we observed in the present study.

The stimulation of endothelial cells is performed through shear stress elevation on blood vessel wall through creation of reactive hyperaemia. Vasodilator effect of endothelium is evaluated through measurement of blood flow variations. A reactive hyperaemia blood flow is a transient increasing of blood flow following a brief period of ischemia or arterial occlusion and unclamping an artery. This increased arterial blood flow was occurred due to autoregulation and endothelium-dependent vasorelaxation by the releasing of tissue local metabolites or waste products such as CO<sub>2</sub>, H<sup>+</sup>, nitric oxide (NO), adenosine, prostaglandins, K<sup>+</sup> and phosphate ions (Jacob et al., 2016). At the onset of reactive hyperaemia state, a sharp increase in blood flow was occurred which was normalised and expressed as PORH response. The PORH response was less in patients with dyslipidaemia (Cordovil et al., 2012), coronary artery disease (Borges

et al., 2016; Souza et al., 2014) and diabetes (Petrofsky et al., 2012), indicating the microvascular reactivity was impaired in the cardiovascular diseases' patients. This could be due to reduced sensitivity of the endothelium-dependent NO/cGMP pathway, and directly relaxes the vascular smooth muscle cells (Monica et al., 2016). The present study was the first one to show that EBM intake for 12 weeks of treatment improves PORH response. These results may be caused by improvements of the accumulation of vasodilator metabolites (including NO) of Brahmi extract (Chaudhari et al., 2017; Kamkaew et al., 2019; Kamkaew et al., 2011). The dietary antioxidants can modulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity thus the antioxidant activity of Brahmi extract could induce the increase in PORH response (Gonçalves et al., 2011; Tripathi et al., 1996; Varadharaj et al., 2017).

The carotid arteries are major blood vessels in the neck that supply blood to the brain (Blake et al., 2002). When the blood vessel is narrowed, velocity of blood flow through it increase. However, the increase of carotid blood flow caused by either reflex increase of cardiac output or direct local vasodilation. Our results found that the blood velocity after treatments of both EBM and placebo groups was small increase, however there were in the usual normal velocity of the CCA. Normal flow in the CCA is typically between 25-45 cm/sec (Oglat et al., 2018). A peak systolic velocity of 125 cm/sec in the internal carotid artery (ICA) or twice as fast as that of the CCA is thought to indicate possible ICA stenosis (Lee, 2014). However, increase in mean cerebral blood flow velocity of the cerebral artery was observed after active exercises in healthy participants (Doering et al., 1998). There were not significant difference of the carotid blood flow velocity between EBM and placebo, thus no effects of EBM on carotid blood flow velocity for the healthy elderly.

The Brahmi extract plus rosemary antioxidant is more neuroprotective than the single Brahmi extract (Ramachandran et al., 2014). Hence, the EBM containing mulberry used in our study would be combined with the mulberry effects, suggesting their synergistic effects. We demonstrated that placebo containing mulberry juice treatment also has an impact on improvement of memory and blood flow. The cognitive enhancing effect of mulberry fruit extract was observed in rats of vascular dementia (Kaewkaen et al., 2012). The mulberry possess anti-cholesterol, anti-obesity and hepatoprotective effects and antioxidant activities (Lim, & Choi, 2019). The mulberry

extract inhibited protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 in human umbilical vein endothelial cells (Park et al., 2014), however the FBG, HbA<sub>1c</sub>, TC, TG, LDL, or HDL levels were not reduced by clinical studies of mulberry (Phimarn et al., 2017). Vasodilators can reduce the expression of VCAM-1, ICAM-1 and ADMA (Herman, & Moncada, 2005). Although Brahmi and its active compounds had vasodilator actions (Kamkaew et al., 2019), changes in plasma ICAM-1, VCAM-1 nor ADMA after the consumption of EBM were not significant.

We demonstrated that EBM was safe. There was no change of serum FBG, HbA<sub>1c</sub>, lipid level, AST, ALT, ALP, BUN, creatinine, eGFR and calcium level after 12 weeks of EBM administration. We refute the increase in the serum calcium levels in *B. monnieri* group in the dose of 150 mg twice daily (Kumar et al., 2016). This provides some support for the clinical use of EBM on elderly. Further studies evaluating cerebral blood flow before and after treatment with EBM should be considered.

## Conclusions

The preclinical study demonstrated that BM active components including both saponins and flavonoids produced vasodilatory effects on rat isolated mesenteric arteries partially via endothelial dependent release of vasodilators and also by direct effects on vascular smooth muscle cells via blockade of Ca<sup>2+</sup> influx and its release from SR. This study for the first time reports the comparative vasodilatory effects of saponins and flavonoids found in BM extract. However, BM extract, flavonoids i.e., luteolin and apigenin would be a more potent vasodilator but saponins have a greater effect because of their greater contents. Accordingly, the clinical benefits on enhanced blood flow and cognitive function may arise from a combination of flavonoids and particularly the saponins.

The clinical trial study clearly demonstrated that EBM improves the speed of working memory during daily consumption of EBM for 12 weeks. The difference was not found in the quality of memory and the attention with EBM consumption. The EBM improved the post-occlusive blood flow in the peripheral vascular system without any effects on carotid blood flow velocity for the healthy elderly. In addition, no side effects related to EBM were found throughout this experiment. EBM did not alter arterial blood pressure, heart rate and blood biochemistries, i.e. glucose, HbA<sub>1c</sub>, liver

enzyme, kidney function, lipid profile and calcium levels, as well as ICAM-1, VCAM-1, ADMA. Further research should explore benefits on dementia or Alzheimer's patients.





**REFERENCES**

มหาวิทยาลัยนเรศวร

## REFERENCES

- Abdel-Rahman, A., Anyangwe, N., Carlacci, L., Casper, S., Danam, R. P., Enongene, E., ...Walker, N. J. (2011). The safety and regulation of natural products used as foods and food ingredients. *Toxicological Sciences*, *123*(2), 333-348.
- Abdul Manap, A. S., Vijayabalan, S., Madhavan, P., Chia, Y. Y., Arya, A., Wong, E. H., ...Koshy, S. (2019). Bacopa monnieri, a neuroprotective lead in Alzheimer Disease: a review on its properties, mechanisms of action, and preclinical and clinical studies. *Drug target insights*, *13*, 1177392819866412. doi:10.1177/1177392819866412
- Aguiar, S., & Borowski, T. (2013). Neuropharmacological review of the nootropic herb *Bacopa monnieri*. *Rejuvenation research*, *4*(16), 313-326. doi:10.1089/rej.2013.1431
- Al-Snafi, A. E. (2013). The pharmacology of *Bacopa monniera*. A review. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, *12*(4), 154-159.
- Alzheimer's-Disease-International. (2019). *World Alzheimer Report 2019*. London: Attitudes to dementia.
- Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K., & Devi, C. S. (2006). Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sciences*, *12*(78), 1378-1384. doi:10.1016/j.lfs.2005.07.030
- Anju, V., Naresh, C., & Avinash, P. (2017). Anatomical markers and Phytochemical study of different plant parts of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *International Journal of Life Sciences*, *3*(5), 379-386.
- Barbhaiya, H. C., Desai, R. P., Saxena, V. S., Pravina, K., Wasim, P., Geetharani, P., ...Amit, A. (2008). Efficacy and tolerability of BacoMind on memory improvement in elderly participants—a double blind placebo controlled study. *J Pharmacol Toxicol*, *3*(6), 425-434.
- Baskys, A., & Hou, A. C. (2007). Vascular dementia: pharmacological treatment approaches and perspectives. *Clinical Interventions in Aging*, *3*(2), 327-335

- Benson, S., Downey, L. A., Stough, C., Wetherell, M., Zangara, A., & Scholey, A. (2014). An acute, double-blind, placebo-controlled cross-over study of 320 mg and 640 mg doses of *Bacopa monnieri* (CDRI 08) on multitasking stress reactivity and mood. *Phytother Res*, 4(28), 551-559. doi:10.1002/ptr.5029
- Benson, S., Downey, L. A., Stough, C., Wetherell, M., Zangara, A., & Scholey, A. (2014). An acute, double-blind, placebo-controlled cross-over study of 320 mg and 640 mg doses of *Bacopa monnieri* (CDRI 08) on multitasking stress reactivity and mood. *Phytother Res*, 4(28), 551-559. doi:10.1002/ptr.5029
- Bhattacharya, S. K., Bhattacharya, A., Kumar, A., & Ghosal, S. (2000). Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytother Res*, 3(14), 174-179.
- Blake, M., Duffy, J., S. Myers, P., & Tompkins, C. (2002). Prevalence and patterns of right hemisphere cognitive/communicative deficits: Retrospective data from an inpatient rehabilitation unit. *Aphasiology*, 16, 537-547. doi:10.1080/02687030244000194
- Blazquez-Sanchez, M. T., de Matos, A. M., & Rauter, A. P. (2017). Exploring Anti-Prion Glyco-Based and Aromatic Scaffolds: A Chemical Strategy for the Quality of Life. *Molecules*, 6(22). doi:10.3390/molecules22060864
- Borges, J. P., Lopes, G. O., Verri, V., Coelho, M. P., Kopiler, D. A., & Tibirica, E. (2016). A novel effective method for the assessment of microvascular function in male patients with coronary artery disease: a pilot study using laser speckle contrast imaging. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 10(49), e5541. doi:10.1590/1414-431x20165541
- Cahill, P. A., & Redmond, E. M. (2016). Vascular endothelium—gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, 248, 97-109.
- Calabrese, C., Gregory, W. L., Leo, M., Kraemer, D., Bone, K., & Oken, B. (2008). Effects of a standardized *Bacopa monnieri* extract on cognitive performance, anxiety, and depression in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 6(14), 707-713. doi:10.1089/acm.2008.0018



- Chakravarty, A. K., Sarkar, T., Masuda, K., Shiojima, K., Nakane, T., & Kawahara, N. (2001). Bacopaside I and II: two pseudojujubogenin glycosides from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*, 4(58), 553-556. doi:10.1016/s0031-9422(01)00275-8
- Channa, S., Dar, A., Yaqoob, M., Anjum, S., Sultani, Z., & Atta ur, R. (2003). Broncho-vasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from *Bacopa monniera*. *J Ethnopharmacol*, 1(86), 27-35. doi:10.1016/s0378-8741(03)00013-8
- Charoenphon, N., Anandsongvit, N., Kosai, P., Sirisidthi, K., Kangwanransan, N., & Jiraungkoorskul, W. (2016). Brahmi (*Bacopa monnieri*): Up-to-date of memory boosting medicinal plant: A review. *Indian Journal Of Agricultural Research*, 50, 1. doi:10.18805/ijare.v50i1.8582
- Chaudhari, K. S., Tiwari, N. R., Tiwari, R. R., & Sharma, R. S. (2017). Neurocognitive Effect of Nootropic Drug Brahmi (*Bacopa monnieri*) in Alzheimer's Disease. *Ann Neurosci*, 2(24), 111-122. doi:10.1159/000475900
- Chen, C.-C., Liu, L.-K., Hsu, J.-D., Huang, H.-P., Yang, M.-Y., & Wang, C.-J. (2005). Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chemistry*, 4(91), 601-607.
- Cicero, A. F., Bove, M., Colletti, A., Rizzo, M., Fogacci, F., Giovannini, M., & Borghi, C. (2017). Short-term impact of a combined nutraceutical on cognitive function, perceived stress and depression in young elderly with cognitive impairment: a pilot, double-blind, randomized clinical trial. *J Prev Alzheimers Dis*, 4, 12-15. doi:10.14283/jpad.2016.10
- Cohen, R. A., Poppas, A., Forman, D. E., Hoth, K. F., Haley, A. P., Gunstad, J., ... Gerhard-Herman, M. (2009). Vascular and cognitive functions associated with cardiovascular disease in the elderly. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, 31(1), 96-110.
- Cordovil, I., Huguenin, G., Rosa, G., Bello, A., Köhler, O., de Moraes, R., & Tibiriçá, E. (2012). Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvascular research*, 83(3), 376-379. doi:10.1016/j.mvr.2012.01.004

- Dar, A., & Channa, S. (1997). Relaxant effect of ethanol extract of *Bacopa monniera* on trachea, pulmonary artery and aorta from rabbit and guinea-pig. *Phytotherapy Research*, 4(11), 323-325. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199706)11:4<323::AID-PTR93>3.0.CO;2-H
- Dar, A., & Channa, S. (1999). Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *J Ethnopharmacol*, 2(66), 167-174. doi:10.1016/s0378-8741(98)00240-2
- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S., & Singh, H. (2002). A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: Anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 4(73), 893-900.
- Dave, U. P., Wasim, P., Joshua, J., Geetharani, P., Murali, B., Mayachari, A., ... Amit, A. B. (2008). A cognitive enhancer in children requiring individual education programme. *J. Pharmacol. Toxicol*, 3, 302-310. doi: 10.3923/jpt.2008.302.310
- de La Torre, J. C. (2012). Cardiovascular risk factors promote brain hypoperfusion leading to cognitive decline and dementia. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 1, 20-35.
- de Mul, F. F., Blaauw, J., Smit, R. J., Rakhorst, G., & Aarnoudse, J. G. (2009). Time development models for perfusion provocations studied with laser-Doppler flowmetry, applied to iontophoresis and PORH. *Microcirculation*, 7(16), 559-571. doi:10.1080/10739680902956107
- Deb, D. D., Kapoor, P., Dighe, R. P., Padmaja, R., Anand, M. S., D'souza, P., ... Agarwal, A. (2008). In vitro safety evaluation and anticlastogenic effect of BacoMind™ on human lymphocytes. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(1), 7-23. doi:10.1016/s0895-3988(08)60002-1
- Dhanasekaran, M., Tharakan, B., Holcomb, L. A., Hitt, A. R., Young, K. A., & Manyam, B. V. (2007). Neuroprotective mechanisms of ayurvedic antidementia botanical *Bacopa monniera*. *Phytotherapy Research*, 10(21), 965-969. doi:10.1002/ptr.2195

- Dimpfel, W., Schombert, L., & Biller, A. (2016). Psychophysiological Effects of Sideritis and Bacopa Extract and Three Combinations Thereof—A Quantitative EEG Study in Subjects Suffering from Mild Cognitive Impairment (MCI). *Advances in Alzheimer's Disease*, *05*, 1-22. doi:10.4236/aad.2016.51001
- Doering, T. J., Resch, K. L., Steuernagel, B., Brix, J., Schneider, B., Fischer, G. C. (1998). Passive and active exercises increase cerebral blood flow velocity in young, healthy individuals. *Am J Phys Med Rehabil*, *6*(77), 490-493. doi:10.1097/00002060-199811000-00006
- Downey, L. A., Kean, J., Nemeh, F., Lau, A., Poll, A., Gregory, R., ...Stough, C. (2013). An acute, double-blind, placebo-controlled crossover study of 320 mg and 640 mg doses of a special extract of *Bacopa monnieri* (CDRI 08) on sustained cognitive performance. *Phytotherapy Research*, *27*(9), 1407-1413. doi:10.1002/ptr.4864
- Dureja, H., Kaushik, D., & Kumar, V. (2003). Development in nutraceuticals. *Indian Journal of Pharmacology*, *35*, 363-372.
- Dwivedi, S., Nagarajan, R., Hanif, K., Siddiqui, H. H., Nath, C., & Shukla, R. (2013). Standardized extract of *Bacopa monniera* attenuates okadaic acid induced memory dysfunction in rats: effect on Nrf2 pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *1*, 115-135.
- El-Bassossy, H. M., Abo-Warda, S. M., & Fahmy, A. (2013). Chrysin and luteolin attenuate diabetes-induced impairment in endothelial-dependent relaxation: Effect on lipid profile, AGEs and NO generation. *Phytotherapy Research*, *11*(27), 1678-1684. doi:10.1002/ptr.4917
- Fujiyoshi, K., Yamaoka-Tojo, M., Minami, Y., Kutsuna, T., Obara, S., Kakizaki, R., ... Ako, J. (2018). Endothelial Dysfunction Is Associated with Cognitive Impairment of Elderly Cardiovascular Disease Patients A Reactive Hyperemia-Peripheral Arterial Tonometry Study. *International heart journal*, *59*(5), 1034-1040.

- Gazzaniga, M. S., & Miller, M. B. (2009). The left hemisphere does not miss the right hemisphere. *The Neurology of Consciousness: Cognitive Neuroscience and Neuropathology*, 1, 261-270.
- Gonçalves, M. C., Bezerra, F. F., Eleutherio, E. C. d. A., Bouskela, E., & Koury, J. (2011). Organic grape juice intake improves functional capillary density and postocclusive reactive hyperemia in triathletes. *Clinics (Sao Paulo)*, 9(66), 1537-1541. doi:10.1590/s1807-59322011000900005
- Gorelick, P. B., Scuteri, A., Black, S. E., DeCarli, C., Greenberg, S. M., Iadecola, C., ...Seshadri, S. (2011). Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 42(9), 2672-2713. doi:10.1161/STR.0b013e3182299496
- Goswami, S., Kumar, N., Thawani, V., Tiwari, M., & Thawani, M. (2011). Effect of *Bacopa monnieri* on cognitive functions in Alzheimer's disease patients. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*, 3(4), 0-0.
- Gupta, G. L., & Sharma, L. (2019). *Bacopa monnieri* abrogates alcohol abstinence-induced anxiety-like behavior by regulating biochemical and Gabra1, Gabra4, Gabra5 gene expression of GABAA receptor signaling pathway in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 111, 1417-1428. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.048
- Gustavsson, A. M., van Westen, D., Stomrud, E., Engström, G., Nägga, K., & Hansson, O. (2020). Midlife Atherosclerosis and Development of Alzheimer or Vascular Dementia. *Ann Neurol*, 1(87), 52-62. doi:10.1002/ana.25645
- Herman, A. G., & Moncada, S. (2005). Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. *European Heart Journal*, 19(26), 1945-1955. doi:10.1093/eurheartj/ehi333
- Holcomb, L. A., Dhanasekaran, M., Hitt, A. R., Young, K. A., Riggs, M., & Manyam, B. V. (2006). *Bacopa monniera* extract reduces amyloid levels in PSAPP mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 3(9), 243-251.

- Hota, S., Barhwal, K., Baitharu, I., Prasad, D., Singh, S., & Ilavazhagan, G. (2009). *Bacopa monniera* leaf extract ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial memory impairment. *Neurobiology of Disease*, *34*, 23-39. doi:10.1016/j.nbd.2008.12.006
- Jacob, M., Chappell, D., & Becker, B. F. (2016). Regulation of blood flow and volume exchange across the microcirculation. *Critical Care (London, England)*, *1*(20), 319-319. doi:10.1186/s13054-016-1485-0
- Jacobs, D. M., Ard, M. C., Salmon, D. P., Galasko, D. R., Bondi, M. W., & Edland, S. D. (2017). Potential implications of practice effects in Alzheimer's disease prevention trials. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *3*(4), 531-535. doi:10.1016/j.trci.2017.08.010
- Jiang, H., Xia, Q., Wang, X., Song, J., & Bruce, I. C. (2005). Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Pharmazie*, *6*(60), 444-447.
- Jiang, Y., Dai, M., Nie, W., Yang, X., & Zeng, X. (2017). Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *200*, 228-235.
- Jiao, Y., Wang, X., Jiang, X., Kong, F., Wang, S., & Yan, C. (2017). Antidiabetic effects of *Morus alba* fruit polysaccharides on high-fat diet-and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *199*, 119-127.
- Jin, B. H., Qian, L. B., Chen, S., Li, J., Wang, H. P., Bruce, I. C., ... Xia, Q. (2009). Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *European journal of pharmacology*, *616*(1-3), 200-205. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.020
- Joshi, T., Gupta, A., Kumar, P., Singh, A., & Kumar, A. (2021). Chapter 3.2.4 - *Bacopa monnieri* (Brahmi). In T. Belwal, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, A. R. Dehpour, & S. Shirooie (Eds.), *Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease* (pp. 243-256). New York: Academic Press.

- Joshua Allan, J., Damodaran, A., Deshmukh, N. S., Goudar, K. S., & Amit, A. (2007). Safety evaluation of a standardized phytochemical composition extracted from *Bacopa monnieri* in Sprague--Dawley rats. *Food Chemical Toxicology*, *10*(45), 1928-1937. doi:10.1016/j.fct.2007.04.010
- Jyoti, A., & Sharma, D. (2006). Neuroprotective role of *Bacopa monniera* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. *Neurotoxicology*, *4*(27), 451-457. doi:10.1016/j.neuro.2005.12.007
- Jyoti, A., Sethi, P., & Sharma, D. (2007). *Bacopa monniera* prevents from aluminium neurotoxicity in the cerebral cortex of rat brain. *J Ethnopharmacol*, *1*(111), 56-62. doi:10.1016/j.jep.2006.10.037
- Kaewkaen, P., Tong-Un, T., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Kaewrueng, W., & Wongcharoenwanakit, S. (2012). Mulberry Fruit Extract Protects against Memory Impairment and Hippocampal Damage in Animal Model of Vascular Dementia. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2012*, 263520. doi:10.1155/2012/263520
- Kalaria, R. N. (2016). Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *5*(131), 659-685.
- Kamesh, V., & Sumathi, T. (2012). Antihypercholesterolemic effect of *Bacopa monniera* Linn. on high cholesterol diet induced hypercholesterolemia in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *5*, 949-955. doi:10.1016/S1995-7645(12)60180-1
- Kamkaew, N., Norman Scholfield, C., Ingkaninan, K., Taepavarapruk, N., & Chootip, K. (2013). *Bacopa monnieri* increases cerebral blood flow in rat independent of blood pressure. *Phytotherapy Research*, *1*(27), 135-138. doi:10.1002/ptr.4685
- Kamkaew, N., Paracha, T. U., Ingkaninan, K., Waranuch, N. and Chootip, K. (2019). Vasodilatory Effects and Mechanisms of Action of *Bacopa monnieri* Active Compounds on Rat Mesenteric Arteries. *Molecules*, *12*(24). doi:10.3390/molecules24122243

- Kamkaew, N., Scholfield, C. N., Ingkaninan, K., Manesai, P., Parkington, H. C., Tare, M., & Chootip, K. (2011). Bacopa monnieri and its constituents is hypotensive in anaesthetized rats and vasodilator in various artery types. *Journal of ethnopharmacology*, 137(1), 790-795. doi:10.1016/j.jep.2011.06.045
- Khan, M. B., Ahmad, M., Ahmad, S., Ishrat, T., Vaibhav, K., Khuwaja, G., & Islam, F. (2015). Bacopa monniera ameliorates cognitive impairment and neurodegeneration induced by intracerebroventricular-streptozotocin in rat: behavioral, biochemical, immunohistochemical and histopathological evidences. *Metabolic brain disease*, 30(1), 115-127. doi:10.1007/s11011-014-9593-5
- Kim, J., & Shin, W. (2014). How to do random allocation (randomization). *Clinics in Orthopedic Surgery*, 1(6), 103-109. doi:10.4055/cios.2014.6.1.103
- Ko, E. A., Han, J., Jung, I. D., & Park, W. S. (2008). Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research*, 2(44), 65-81.
- Kongkeaw, C., Dilokthornsakul, P., Thanarangsarit, P., Limpeanchob, N., & Norman Scholfield, C. (2014). Meta-analysis of randomized controlled trials on cognitive effects of *Bacopa monnieri* extract. *J Ethnopharmacol*, 1(151), 528-535. doi:10.1016/j.jep.2013.11.008
- Kongkeaw, C., Dilokthornsakul, P., Thanarangsarit, P., Limpeanchob, N., & Norman Scholfield, C. (2014). Meta-analysis of randomized controlled trials on cognitive effects of *Bacopa monnieri* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(151), 528-535. doi:10.1016/j.jep.2013.11.008
- Krishnakumar, A., Abraham, P. M., Paul, J., & Paulose, C. S. (2009). Down-regulation of cerebellar 5-HT<sub>2C</sub> receptors in pilocarpine-induced epilepsy in rats: therapeutic role of Bacopa monnieri extract. *Journal of the neurological sciences*, 284(1-2), 124-128. doi:10.1016/j.jns.2009.04.032

- Kumar, N., Abichandani, L. G., Thawani, V., Gharpure, K. J., Naidu, M. U. R., & Venkat Ramana, G. (2016). Efficacy of Standardized Extract of *Bacopa monnieri* (Bacognize®) on Cognitive Functions of Medical Students: A Six-Week, Randomized Placebo-Controlled Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 4103423-4103423. doi:10.1155/2016/4103423
- Kumar, S. S., Saraswathi, P., & Vijayaraghavan, R. (2015). Effect of *bacopa monniera* on cold stress induced neurodegeneration in hippocampus of wistar rats: A histomorphometric study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 1(9), AF05.
- Kunte, K. B., & Kuna, Y. (2013). Neuroprotective effect of *Bacopa monniera* on memory deficits and ATPase system in Alzheimer's disease (AD) induced mice. *J Sci Innov Res*, 4(2), 719-735.
- Le, X. T., Pham, H. T. N., Van Nguyen, T., Nguyen, K. M., Tanaka, K., Fujiwara, H., & Matsumoto, K. (2015). Protective effects of *Bacopa monnieri* on ischemia-induced cognitive deficits in mice: the possible contribution of bacopaside I and underlying mechanism. *Journal of ethnopharmacology*, 164, 37-45. doi:10.1016/j.jep.2015.01.041
- Lee, W. (2014). General principles of carotid Doppler ultrasonography. *Ultrasonography (Seoul, Korea)*, 1(33), 11-17. doi:10.14366/usg.13018
- Li, H., Wu, S., Chen, J., Wang, B., & Shi, N. (2013). Effect of glutathione depletion on Nrf2/ARE activation by deltamethrin in PC12 Cells. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 1(64), 87-97. doi:10.2478/10004-1254-64-2013-2251
- Lim, S. H., & Choi, C. I. (2019). Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients*, 2(11). doi:10.3390/nu11020437
- Limpeanchob, N., Jaipan, S., Rattanakaruna, S., Phrompittayarat, W., & Ingkaninan, K. (2008). Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(120), 112-117. doi:10.1016/j.jep.2008.07.039



- Ma, X., Li, Y. F., Gao, Q., Ye, Z. G., Lu, X. J., Wang, H. P., ... & Xia, Q. (2008). Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life sciences*, 83(3-4), 110-117. doi:10.1016/j.lfs.2008.05.010
- Madigan, J. B., Wilcock, D. M., & Hainsworth, A. H. (2016). Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Stroke*, 7(47), 1953-1959. doi:10.1161/STROKEAHA.116.012066
- Malishev, R., Nandi, S., Kolusheva, S., Shaham-Niv, S., Gazit, E., & Jelinek, R. (2016). Bacoside-A, an anti-amyloid natural substance, inhibits membrane disruption by the amyloidogenic determinant of prion protein through accelerating fibril formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 9(1858), 2208-2214. doi:10.1016/j.bbamem.2016.06.019
- Maneeply, C., Sujipuli, K., & Kunpratun, N. (2018). Growth of Brahmi *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. by NFT and DFT hydroponic systems and their accumulation of saponin bacosides. *NU. International Journal of Science*, 2(15), 114-124.
- Mannan, A., Abir, A. B., & Rahman, R. (2015). Antidepressant-like effects of methanolic extract of *Bacopa monniera* in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 337-337. doi:10.1186/s12906-015-0866-2
- Mathur, D., Goyal, K., Koul, V., & Anand, A. (2016). The Molecular Links of Re-Emerging Therapy: A Review of Evidence of Brahmi (*Bacopa monniera*). *Front Pharmacol*, 7, 44. doi:10.3389/fphar.2016.00044
- Micheli, L., Spitoni, S., Di Cesare Mannelli, L., Bilia, A. R., Ghelardini, C., & Pallanti, S. (2020). *Bacopa monnieri* as augmentation therapy in the treatment of anhedonia, preclinical and clinical evaluation. *Phytother Res*, 9(34), 2331-2340. doi:10.1002/ptr.6684
- Monica, F. Z., Bian, K., & Murad, F. (2016). The Endothelium-Dependent Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Advances in Pharmacology*, 77, 1-27. doi: 10.1016/bs.apha.2016.05.001

- Morgan, A., & Stevens, J. (2010). Does *Bacopa monnieri* improve memory performance in older persons? Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7(16), 753-759. doi:10.1089/acm.2009.0342
- Murugaiyan, S. M., & Bhargavan, R. (2020). *Bacopa monnieri* alleviates aluminium chloride-induced anxiety by regulating plasma corticosterone level in Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, ahead-of-print*, 1, 125-245.
- Nandave, M., K. Ojha, S., Sujata, J., Kumari, S., & S. Arya, D. (2007). Cardioprotective effect of *Bacopa monniera* against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *International Journal of Pharmacology*, 3, 385-392. doi:10.3923/ijp.2007.385.392
- Nuengchamnong, N., Sookying, S., & Ingkaninan, K. (2016). LC-ESI-QTOF-MS based screening and identification of isomeric jujubogenin and pseudojujubogenin aglycones in *Bacopa monnieri* extract. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 121-134. doi: 10.1016/j.jpba.2016.06.052
- Oglat, A. A., Matjafri, M. Z., Suardi, N., Oqlat, M. A., Abdelrahman, M. A., & Oqlat, A. A. (2018). A Review of Medical Doppler Ultrasonography of Blood Flow in General and Especially in Common Carotid Artery. *J Med Ultrasound*, 1(26), 3-13. doi: 10.4103/jmu.jmu\_11\_17
- Onsa-ard, A., Scholfield, C. N., Ingkaninan, K., Srimachai, S., Kamkaew, N., & Chootip, K. (2012). Oral *Bacopa monnieri* is antihypertensive in rats chronically treated with L-NAME. *Journal of Physiology*, 1(25), 23-26.
- Pardridge, W. M. (1999). Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of Neurovirology*, 6(5), 556-569. doi:10.3109/13550289909021285
- Park, Y. S., Kang, S. S., Choi, H. J., Yang, S. J., Shon, H. H., Seo, H. H., & Jeong, J. M. (2014). Effect of mulberry (*Morus alba* L.) extract on blood flow improvement. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43(4), 498-506. doi:10.3746/jkfn.2014.43.4.498

- Pelegrini, L. N., Mota, G. M., Ramos, C. F., Jesus, E., & Vale, F. A. (2019). Diagnosing dementia and cognitive dysfunction in the elderly in primary health care: A systematic review. *Dementia & neuropsychologia*, 2(13), 144-153.
- Peng, C.-H., Liu, L.-K., Chuang, C.-M., Chyau, C.-C., Huang, C.-N., & Wang, C.-J. (2011). Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(59), 2663-2671.
- Persson, J., Bringlov, E., Nilsson, L. G., & Nyberg, L. (2004). The memory-enhancing effects of Ginseng and Ginkgo biloba in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 4(172), 430-434. doi:10.1007/s00213-003-1675-8
- Peth-Nui, T., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Tong-Un, T., Piyavhatkul, N., Rangseekajee, P., ... Vittaya-Areekul, S. (2012). Effects of 12-Week *Bacopa monnieri* Consumption on Attention, Cognitive Processing, Working Memory, and Functions of Both Cholinergic and Monoaminergic Systems in Healthy Elderly Volunteers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 606424-606424. doi:10.1155/2012/606424
- Petrofsky, J., Berk, L., Alshammari, F., Lee, H., Hamdan, A., Yim, J. E., ... Al-Nakhli, H. (2012). The effect of moist air on skin blood flow and temperature in subjects with and without diabetes. *Diabetes technology & therapeutics*, 14(2), 105-116. doi:10.1089/dia.2011.0128
- Pham, H. T. N., Tran, H. N., Nguyen, P. T., Le, X. T., Nguyen, K. M., Phan, S. V., ... Matsumoto, K. (2020). *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Extract improves memory performance via promotion of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adolescent mice. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3365.
- Phimarn, W., Wichaiyo, K., Silpsavikul, K., Sungthong, B., & Saramunee, K. (2017). A meta-analysis of efficacy of *Morus alba* Linn. to improve blood glucose and lipid profile. *Eur J Nutr*, 4(56), 1509-1521. doi:10.1007/s00394-016-1197-x

- Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Jetiyanon, K., Wittaya-Areekul, S., & Ingkaninan, K. (2007a). Determination of pseudojubilogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochemical Analysis*, 5(18), 411-418. doi:10.1002/pca.996
- Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-Areekul, S., Jetiyanon, K., & Ingkaninan, K. (2007b). An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Analytica Chimica Acta*, 1(584), 1-6. doi:10.1016/j.aca.2006.11.017
- Phrompittayarat, W., Wittaya-Areekul, S., Jetiyanon, K., Putalun, W., Tanaka, H., & Ingkaninan, K. (2007). Determination of saponin glycosides in *Bacopa monnieri* by reversed phase high performance liquid chromatography. *Thai Pharm Health Sci J*, 2(1), 26-32.
- Pircher, A., Treps, L., Bodrug, N., & Carmeliet, P. (2016). Endothelial cell metabolism: a novel player in atherosclerosis? Basic principles and therapeutic opportunities. *Atherosclerosis*, 253, 247-257.
- Pravina, K., Ravindra, K. R., Goudar, K. S., Vinod, D. R., Joshua, A. J., Wasim, P., ... & Amit, A. (2007). Safety evaluation of BacoMind™ in healthy volunteers: a phase I study. *Phytomedicine*, 14(5), 301-308. doi:10.1016/j.phymed.2007.03.010
- Purusothaman, D., Chalichem, N. S. S., Bethapudi, B., Murugan, S., & Mundkinajeddu, D. (2021). *Bacopa monnieri* for cognitive health—a review of molecular mechanisms of action. *Nutraceuticals in Brain Health and Beyond*, 1, 15-30.
- Qian, L. B., Wang, H. P., Chen, Y., Chen, F. X., Ma, Y. Y., Bruce, I. C., & Xia, Q. (2010). Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress. *Pharmacological research*, 61(4), 281-287. doi: 10.1016/j.phrs.2009.10.004
- Raghav, S., Singh, H., Dalal, P. K., Srivastava, J. S., & Asthana, O. P. (2006). Randomized controlled trial of standardized *Bacopa monniera* extract in age-associated memory impairment. *Indian Journal of Psychiatry*, 4(48), 238-242. doi:10.4103/0019-5545.31555

- Rajan, K. E., Preethi, J., & Singh, H. K. (2015). Molecular and Functional Characterization of *Bacopa monniera*: A Retrospective Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 945217. doi:10.1155/2015/945217
- Raju, M., Gopi, V. P., Anitha, V., & Wahid, K. A. (2020). Multi-class diagnosis of Alzheimer's disease using cascaded three dimensional-convolutional neural network. *Physical and Engineering Sciences in Medicine*, 1, 1-10.
- Ramachandran, C., Quirin, K.-W., Escalon, E., & Melnick, S. J. (2014). Improved Neuroprotective Effects by Combining *Bacopa monnieri* and *Rosmarinus officinalis* Supercritical CO<sub>2</sub> Extracts. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2(19), 119-127. doi: 10.1177/2156587214524577
- Rastogi, M., Ojha, R. P., Prabu, P. C., Devi, B. P., Agrawal, A., & Dubey, G. P. (2012). Prevention of age-associated neurodegeneration and promotion of healthy brain ageing in female Wistar rats by long term use of bacosides. *Biogerontology*, 2(13), 183-195. doi:10.1007/s10522-011-9367-y
- Román, G. C. (2002). Vascular dementia may be the most common form of dementia in the elderly. *Journal of the Neurological Sciences*, 203-204, 7-10. doi:10.1016/s0022-510x(02)00252-6
- Roodenrys, S., Booth, D., Bulzomi, S., Phipps, A., Micallef, C., & Smoker, J. (2002). Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. *Neuropsychopharmacology*, 2(27), 279-281. doi:10.1016/s0893-133x(01)00419-5
- Roustit, M., & Cracowski, J. L. (2012). Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*, 1(19), 47-64. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x
- Russo, A., & Borrelli, F. (2005). *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: An overview. *Phytomedicine*, 4(12), 305-317. doi:10.1016/j.phymed.2003.12.008

- Saenghong, N., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Tongun, T., Piyavhatkul, N., Banchonglikitkul, C., & Kajsongkram, T. (2012). Zingiber officinale improves cognitive function of the middle-aged healthy women. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 9. doi: 10.1155/2012/383062
- Saesong, T., Nangngam, P., & Ingkaninan, K. (2019). Pharmacognostic and physico-chemical investigations of the aerial part of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Songklanakar Journal of Science and Technology*, 41, 397-404.
- Saha, S., Mahapatra, K. K., Mishra, S. R., Mallick, S., Negi, V. D., Sarangi, I.,... Bhutia, S. K. (2020). Bacopa monnieri inhibits apoptosis and senescence through mitophagy in human astrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111367. doi:10.1016/j.fct.2020.111367
- Saini, N., Singh, D., & Sandhir, R. (2019). *Bacopa monnieri* prevents colchicine-induced dementia by anti-inflammatory action. *Metabolic Brain Disease*, 2(34), 505-518. doi:10.1007/s11011-018-0332-1
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, R. K., & Bhattacharya, S. K. (2002). Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine*, 3(9), 207-211. doi: <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00116>
- Sakpal, T. V. (2010). Sample size estimation in clinical trial. *Perspectives in Clinical Research*, 2(1), 67-69.
- Sathyanarayanan, V., Thomas, T., Einother, S. J., Dobriyal, R., Joshi, M. K., & Krishnamachari, S. (2013). Brahmi for the better? New findings challenging cognition and anti-anxiety effects of Brahmi (*Bacopa monniera*) in healthy adults. *Psychopharmacology*, 2(227), 299-306. doi: 10.1007/s00213-013-2978-z
- Sharma, R., Chaturvedi, C., & Tewari, P. (1987). Efficacy of *Bacopa monniera* in revitalizing intellectual functions in children. *J Res Edu Ind Med.*, 1, 12.
- Si, H., Wyeth, R. P., & Liu, D. (2014). The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *European Journal of Nutrition*, 1(53), 269-275. doi:10.1007/s00394-013-0525-7

- Simpson, T., Deleuil, S., Echeverria, N., Komanduri, M., Macpherson, H., Suo, C.,... Stough, C. (2019). The Australian Research Council Longevity Intervention (ARCLI) study protocol (ANZCTR12611000487910) addendum: neuroimaging and gut microbiota protocol. *Nutrition journal*, 18(1), 1-9. doi:10.1186/s12937-018-0428-9
- Sireeratawong, S., Jaijoy, K., Khonsung, P., Lertprasertsuk, N., & Ingkaninan, K. (2016). Acute and chronic toxicities of *Bacopa monnieri* extract in Sprague-Dawley rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 249-249. doi:10.1186/s12906-016-1236-4
- Sookying, S., Pekthong, D., Oo-Puthinan, S., Nuengchamnong, N., & Ingkaninan, K. (2017). Quantitation of Bacopaside I in Rat Biological Samples by LC-QTOF-MS/MS and Its Pharmacokinetic Application. *Natural Product Communications*, 6(12), 1934578X1701200615. doi: 10.1177/1934578X1701200615
- Souza, E. G., De Lorenzo, A., Huguenin, G., Oliveira, G. M., & Tibirica, E. (2014). Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: studies with laser speckle contrast imaging. *Coronary Artery Disease*, 1(25), 23-28. doi:10.1097/mca.0000000000000055
- Srimachai, S., Devaux, S., Demougeot, C., Kumphune, S., Ullrich, N. D., Niggli, E., ...Chootip, K. (2017). *Bacopa monnieri* extract increases rat coronary flow and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-10. doi:10.1186/s12906-017-1637-z
- Srivilai, J., Nontakhot, K., Nutuan, T., Waranuch, N., Khorana, N., Wisuthiprot, W., ...Ingkaninan, K. (2018). Sesquiterpene-enriched extract of *Curcuma aeruginosa* Roxb. Retards axillary hair growth: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Skin pharmacology and Physiology*, 31(2), 99-106. doi:10.1159/000486136

- Stough, C. K., Pase, M. P., Cropley, V., Myers, S., Nolidin, K., King, R.,... Scholey, A. B. (2012). A randomized controlled trial investigating the effect of Pycnogenol and Bacopa CDR108 herbal medicines on cognitive, cardiovascular, and biochemical functioning in cognitively healthy elderly people: the Australian Research Council Longevity Intervention (ARCLI) study protocol (ANZCTR12611000487910). *Nutrition Journal*, *11*(1), 1-9. doi: 10.1186/1475-2891-11-11.
- Stough, C., Downey, L. A., Lloyd, J., Silber, B., Redman, S., Hutchison, C.,... Nathan, P. J. (2008). Examining the nootropic effects of a special extract of *Bacopa monniera* on human cognitive functioning: 90 day double-blind placebo-controlled randomized trial. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *22*(12), 1629-1634. doi:10.1002/ptr.2537
- Stough, C., Lloyd, J., Clarke, J., Downey, L., Hutchison, C., Rodgers, T., & Nathan, P. (2001). The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology*, *156*(4), 481-484. doi:10.1007/s002130100815
- Sukumaran, N. P., Amalraj, A., & Gopi, S. (2019). Neuropharmacological and cognitive effects of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst – A review on its mechanistic aspects. *Complementary Therapies in Medicine*, *44*, 68-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.03.016>
- Sunata, K., Terai, H., Seki, H., Mitsuhashi, M., Kagoshima, Y., Nakayama, S.,... Suzuki, Y. (2020). Analysis of clinical outcomes in elderly patients with impaired swallowing function. *PloS one*, *15*(9), e0239440. doi: 10.1371/journal.pone.0239440
- Thomas, R. B., Joy, S., Ajayan, M. S., & Paulose, C. S. (2013). Neuroprotective potential of *Bacopa monnieri* and Bacoside A against dopamine receptor dysfunction in the cerebral cortex of neonatal hypoglycaemic rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *8*(33), 1065-1074. doi:10.1007/s10571-013-9973-0



- Tripathi, S., Mahdi, A. A., Hasan, M., Mitra, K., & Mahdi, F. (2011). Protective potential of *Bacopa monniera* (Brahmi) extract on aluminum induced cerebellar toxicity and associated neuromuscular status in aged rats. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 1(57), 3-15.
- Tripathi, Y. B., Chaurasia, S., Tripathi, E., Upadhyay, A., & Dubey, G. P. (1996). *Bacopa monniera* Linn. as an antioxidant: mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology*, 6(34), 523-526.
- Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S., & Ingkaninan, K. (2010). Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(127), 26-31. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.056
- Udhaya Lavinya, B., & Sabina, E. P. (2015). Anti-hyperglycaemic effect of Brahmi (*Bacopa monnieri* L.) in streptozotocin-induced diabetic rats: A study involving antioxidant, biochemical and haematological parameters. *J. Chem. Pharm. Res*, 7, 531-534.
- Varadharaj, S., Kelly, O. J., Khayat, R. N., Kumar, P. S., Ahmed, N., & Zweier, J. L. (2017). Role of Dietary Antioxidants in the Preservation of Vascular Function and the Modulation of Health and Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 64(4). doi:10.3389/fcvm.2017.00064
- Vohora, D., Pal, S. N., & Pillai, K. K. (2000). Protection from phenytoin-induced cognitive deficit by *Bacopa monniera*, a reputed Indian nootropic plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 383-390. doi:10.1016/S0378-8741(99)00213-5
- Vollala, V. R., Upadhyay, S., & Nayak, S. (2010). Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on learning and memory in rats: A behavioral study. *Journal of Veterinary Behavior*, 2(5), 69-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2009.08.007>
- Vollala, V. R., Upadhyay, S., & Nayak, S. (2011a). Enhancement of basolateral amygdaloid neuronal dendritic arborization following *Bacopa monniera* extract treatment in adult rats. *Clinics (Sao Paulo)*, 4(66), 663-671.

- Vollala, V. R., Upadhyaya, S., & Nayak, S. (2011b). Enhanced dendritic arborization of amygdala neurons during growth spurt periods in rats orally intubated with *Bacopa monniera* extract. *Anat Sci Int*, 4(86), 179-188.  
doi: 10.1007/s12565-011-0104-z
- Vollala, V. R., Upadhyaya, S., & Nayak, S. (2011c). Enhanced dendritic arborization of hippocampal CA3 neurons by *Bacopa monniera* extract treatment in adult rats. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 3(52), 879-886.
- Vollala, V. R., Upadhyaya, S., & Nayak, S. (2011d). Learning and memory-enhancing effect of *Bacopa monniera* in neonatal rats. *Bratislavske Lekarske Listy*, 12(112), 663-669.
- Wang, Y., Xiang, L., Wang, C., Tang, C., & He, X. (2013). Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PloS One*, 7(8), e71144.
- Wattanathorn, J., Mator, L., Muchimapura, S., Tongun, T., Pasuriwong, O., Piyawatkul, N., ... & Singkhoraard, J. (2008). Positive modulation of cognition and mood in the healthy elderly volunteer following the administration of *Centella asiatica*. *Journal of ethnopharmacology*, 116(2), 325-332. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.038>
- Weller, J., & Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*, 7, 45-55. doi: 10.12688/f1000research.14506.1
- Wisutthathum, S., Chootip, K., Martin, H., Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Totoson, P., & Demougeot, C. (2018a). Vasorelaxant and hypotensive effects of an ethanolic extract of *Eulophia macrobulbon* and Its main compound 1-(4'-hydroxybenzyl)-4, 8-dimethoxyphenanthrene-2, 7-diol. *Frontiers in pharmacology*, 9, 484. doi:10.3389/fphar.2018.00484

- Wisutthathum, S., Demougeot, C., Totoson, P., Adthapanyawanich, K., Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., & Chootip, K. (2018b). Eulophia macrobulbon extract relaxes rat isolated pulmonary artery and protects against monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Phytomedicine*, *50*, 157-165. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.05.014>
- Wisutthathum, S., Kamkaew, N., Inchan, A., Chaturong, U., Paracha, T. U., Ingkaninan, K.,... Chootip, K. (2019). Extract of *Aquilaria crassna* leaves and mangiferin are vasodilators while showing no cytotoxicity. *Journal of traditional and complementary medicine*, *9*(4), 237-242. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.09.002>
- World-Health-Organization. (2017). *Global action plan on the public health response to dementia 2017-2025*. U.S.A.: World-Health-Organization.
- Wu, H., Jiang, H., Wang, L., & Hu, Y. (2006). Relationship between vasorelaxation of flavonoids and their retention index in RP-HPLC. *Pharmazie*, *8*(61), 667-669.
- Xu, X., Wang, B., Ren, C., Hu, J., Greenberg, D. A., Chen, T.,... Jin, K. (2017). Age-related impairment of vascular structure and functions. *Aging and disease*, *8*(5), 590.
- Yamchuen, P., Chaiwiang, N., Lapphanichayakool, P., Ingkaninan, K., & Limpeanchob, N. (2017). Neuroprotective effect of *Bacopa Monnieri* extract on oxidized low density lipoprotein-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Thai Journal of Pharmacology*, *39*(1), 5-18.
- Yang, X., Yang, L., & Zheng, H. (2010). Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food and Chemical Toxicology*, *8-9*(48), 2374-2379.
- Yeshanew, G. M., & Ingkaninan, K. (2020). *Chemical characterization of metabolites of medicinal plants using liquid chromatography mass spectrometry (GC-MS)*. Phisanulok: Naresuan University.
- Zhang, H., Ma, Z. F., Luo, X., & Li, X. (2018). Effects of mulberry fruit (*Morus alba* L.) consumption on health outcomes: A mini-review. *Antioxidants*, *5*(7), 69.

- Zhang, Y., Zhang, Y., Gao, L., Deng, L., Hu, X., Zhang, K., & Li, H. (2017). The variation in frequency locations in Doppler ultrasound spectra for maximum blood flow velocities in narrowed vessels. *Medical engineering & physics*, *49*, 46-55.
- Zhao, X., Yuan, L., Feng, L., Xi, Y., Yu, H., Ma, W., ... & Xiao, R. (2015). Association of dietary intake and lifestyle pattern with mild cognitive impairment in the elderly. *The journal of nutrition, health & aging*, *19*(2), 164-168.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, *2*(129), 83-94.
- Zhou, Y., Peng, L., Zhang, W. D., & Kong, D. Y. (2009). Effect of triterpenoid saponins from *Bacopa monniera* on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Planta Medica*, *6*(75), 568-574. doi:10.1055/s-0029-1185339
- Zhou, Y., Shen, Y.-H., Zhang, C., Su, J., Liu, R.-H., & Zhang, W.-D. (2007). Triterpene Saponins from *Bacopa monnieri* and Their Antidepressant Effects in Two Mice Models. *Journal of Natural Products*, *70*, 652-655. doi: 10.1021/np060470s
- Zissimopoulos, J. M., Tysinger, B. C., St Clair, P. A., & Crimmins, E. M. (2018). The Impact of Changes in Population Health and Mortality on Future Prevalence of Alzheimer's Disease and Other Dementias in the United States. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, *1*, (73), S38-s47. doi: 10.1093/geronb/gbx147



**APPENDIX**

มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ราชบัณฑิตยสถาน

## APPENDIX A APPROVAL ANIMAL ETHIC



### เอกสารรับรองโครงการ

คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร (คกส.)

ชื่อโครงการ	ฤทธิ์ของสารสำคัญสมุนไพรมมีต่อการป้องกันหัวใจขาดเลือดและการคลายตัวของหลอดเลือดแดงในหนูขาว Effect of Bacopa monnieri active compounds on rat myocardial infarct protection and vasorelaxation of rat isolated arteries
เลขที่โครงการ	NU-AE600710
เลขที่เอกสารรับรอง	60 01 012
ประเภทการรับรอง	เต็มรูปแบบ
ชื่อหัวหน้าโครงการ/ผู้ยื่นขอฯ	ศส.ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์
สังกัดหน่วยงาน /คณะ	วิทยาศาสตร์การแพทย์
วันที่รับรอง	27 กันยายน 2560
วันสิ้นสุดการรับรอง	27 กันยายน 2563

ขอรับรองว่าโครงการวิจัยนี้ ได้รับการรับรองด้านจรรยาบรรณการใช้สัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (คกส.)

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตติมา จีนาพงษา)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (คกส.)  
มหาวิทยาลัยนเรศวร

## APPENDIX B PUBLICATION OF ANIMAL STUDY



Article

# Vasodilatory Effects and Mechanisms of Action of *Bacopa monnieri* Active Compounds on Rat Mesenteric Arteries

Natakorn Kamkaew<sup>1,2</sup>, Tamkeen Urooj Paracha<sup>3</sup>, Kornkanok Ingkaninan<sup>4</sup>, Neti Waranuch<sup>5</sup> and Krongkarn Chootip<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; natakornk@gmail.com
  - <sup>2</sup> Division of Physiology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand
  - <sup>3</sup> Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; ctamz@hotmail.com
  - <sup>4</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; kornkanoki@nu.ac.th
  - <sup>5</sup> Cosmetics and Natural Products Research Center, Department of Pharmaceutical Technology and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; netiw@nu.ac.th
- \* Correspondence: krongkarn@nu.ac.th; Tel.: +66-55-964658

Academic Editor: H.P. Vasantha Rupasinghe

Received: 17 May 2019; Accepted: 11 June 2019; Published: 15 June 2019



**Abstract:** *B. monnieri* extract (BME) is an abundant source of bioactive compounds, including saponins and flavonoids known to produce vasodilation. However, it is unclear which components are the more effective vasodilators. The aim of this research was to investigate the vasorelaxant effects and mechanisms of action of saponins and flavonoids on rat isolated mesenteric arteries using the organ bath technique. The vasorelaxant mechanisms, including endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway and calcium flux were examined. Saponins (bacoside A and bacopaside I), and flavonoids (luteolin and apigenin) at 0.1–100  $\mu\text{M}$  caused vasorelaxation in a concentration-dependent manner. Luteolin and apigenin produced vasorelaxation in endothelial intact vessels with more efficacy ( $E_{\text{max}}$  99.4  $\pm$  0.7 and 95.3  $\pm$  2.6%) and potency ( $EC_{50}$  4.35  $\pm$  1.31 and 8.93  $\pm$  3.33  $\mu\text{M}$ ) than bacoside A and bacopaside I ( $E_{\text{max}}$  83.6  $\pm$  2.9 and 79.9  $\pm$  8.2%;  $EC_{50}$  10.8  $\pm$  5.9 and 14.6  $\pm$  5.4  $\mu\text{M}$ ). Pretreatment of endothelial intact rings, with L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), an eNOS inhibitor, or removal of the endothelium reduced the relaxant effects of all compounds. In  $\text{K}^+$ -depolarised vessels suspended in  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution, these active compounds inhibited  $\text{CaCl}_2$ -induced contraction in endothelial denuded arterial rings. Moreover, the active compounds attenuated transient contractions induced by 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium containing EGTA (1 mM). Thus, relaxant effects occurred in both endothelial intact and denuded vessels which signify actions through both endothelium and vascular smooth muscle cells. In conclusion, the flavonoids have about twice the potency of saponins as vasodilators. However, in the BME, there is  $\sim 20 \times$  the amount of vaso-reactive saponins and thus are more effective.

**Keywords:** luteolin; apigenin; bacoside A; bacopaside I; vasorelaxation

### 1. Introduction

*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. or Brahmi, is an Ayurvedic medicine traditionally used as a memory enhancer. Along with memory improvement, it is known to promote mental health,

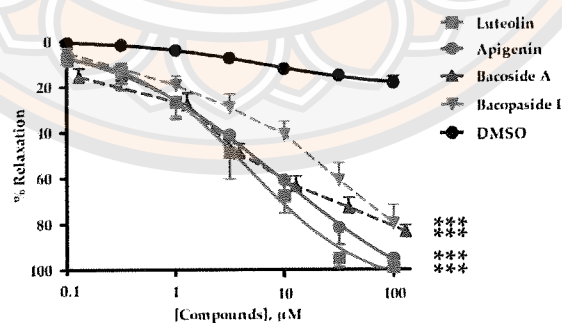
as a neurotonic and cardiotoxic agent. *B. monnieri* extract (BME) clearly has a cognitive enhancing potential and neuroprotective effects [1–16]. It has been shown to be antioxidant in rat brain [17,18] and to possess several pharmacological actions such as anti-depressant [19–21], anti-dementia [9], anti-cholinesterase [8,9], anti-hyperglycaemic [22] and anti-hyperlipidaemia [23]. *B. monnieri* appears to be non-toxic using haematological and blood biochemical diagnostics [24–26]. BME demonstrated cardioprotection, improved coronary blood flow, and protection against myocardial ischemia reperfusion injury [27,28]. Our recent work showed that BME acted as a vasodilator by releasing nitric oxide (NO) from endothelium and inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  influx and  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum (SR). These mechanisms mediated an acute decrease in blood pressure [29]. Also, daily oral BME (40 mg/kg) in rats for 8 weeks showed a significant increase in cerebral blood flow [30], which implies cerebrovascular dilation.

BME contains an abundance of bioactive compounds. They include dammarane-type triterpenoid saponins, jujubogenin and pseudojujubogenin glycosides. These saponins are predominantly bacopaside I and bacoside A, a mixture of bacoside A<sub>3</sub>, bacopaside II, jujubogenin isomer of bacopasaponin C, and bacopasaponin C [31–33]. Other than saponins, flavonoids, essentially luteolin and apigenin are also present in *B. monnieri* [10,34–36]. Bacoside A<sub>3</sub> and bacopaside II relax rat mesenteric arteries [29] but the mechanism(s) of their relaxation are presently unknown. The flavonoids found in *B. monnieri* also relax rat aortae [37–41] but these experiments used a variety of protocols and vascular preparations. Therefore, it is important to make a side-by-side comparison of these flavonoids with the *B. monnieri* saponins using a resistance vessel type. For this we choose the mesenteric artery which better exemplifies actions on regional blood flow and systemic blood pressure than the aorta. This work provides evidence to clarify the effective *B. monnieri* components for vasorelaxation which could be related to the improvement of blood flow or memory enhancement.

## 2. Results

### 2.1. Vasorelaxant Effects of the *B. monnieri* Active Compounds

Mesenteric arteries of rats were isolated and mounted in an organ bath via intraluminal wire hooks connected to a force transducer. The vessels were pre-contracted with 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine (PE), before adding *B. monnieri* compounds including flavonoids (luteolin and apigenin), bacopaside I, and the saponin mixture (bacoside A) at 0.1–100  $\mu\text{M}$ . *B. monnieri* compounds caused vasorelaxation of endothelial intact arteries (+EC) in a concentration-dependent manner (Figure 1) with  $\text{EC}_{50}$  and  $\text{E}_{\text{max}}$  values shown in Table 1.



**Figure 1.** Relaxations induced by luteolin, apigenin, bacoside A, and bacopaside I (0.1–100  $\mu\text{M}$ ) and vehicle (DMSO) in endothelial intact mesenteric arteries precontracted with phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ ). Values are mean  $\pm$  SEM of 6–9 individual arterial rings. \*\*\* indicates  $p < 0.001$  comparing relaxation for each compound with the control (DMSO) using two-way ANOVA ( $n = 6–9$ ). Lines were fitted by non-linear regression.



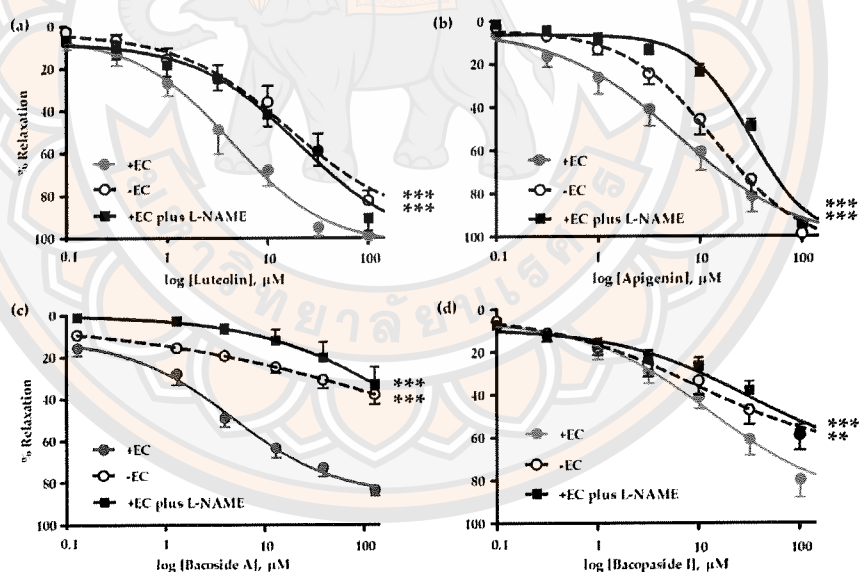
**Table 1.** The EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> of *B. monnieri* active compounds on relaxation of endothelial intact rat mesenteric arteries.

Active Compounds		EC <sub>50</sub> (μM)	E <sub>max</sub> (%)	n	p-Value Whole Graph Curves
Flavonoids	Luteolin	4.35 ± 1.31	99.4 ± 0.7	6	-
	Apigenin	8.93 ± 3.33	95.3 ± 2.6	9	NS
Saponins	Bacoside A	10.8 ± 5.9	83.6 ± 2.9 ††	7	< 0.05 †
	Bacopaside I	14.6 ± 5.4	79.9 ± 8.2 †	7	< 0.01 ††
Vehicle	DMSO	-	17.4 ± 3.1 ††	7	< 0.01 ††

Significantly different compared with luteolin †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  using unpaired Student's *t*-test (n = 6–9).

## 2.2. Mechanisms of Vasorelaxation by *B. monnieri* Compounds

All the *B. monnieri* compounds caused vasorelaxation in both endothelial intact (+EC) and endothelial denuded (-EC) mesenteric arterial rings. The relaxations were reduced by the removal of endothelium, implying that these compounds acted via an effect on endothelial vasodilators. However, the compounds still produced some vasorelaxations of the endothelial denuded arterial rings due to a direct action on vascular smooth muscle cells. For intact vessels, L-NAME (inhibitor of endothelial NO synthase; eNOS inhibitor), also reduced the vasorelaxations (Figure 2, Table 2). These reductions suggest that some or all the vasorelaxations were mediated through production and release of NO by endothelial cells.



**Figure 2.** Cumulative concentration-response curves of (a) luteolin, (b) apigenin, (c) bacoside A and (d) bacopaside I in concentrations (0.1–100 μM) in endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings and endothelial intact vessels pre-incubated in L-NAME (100 μM). The graphs are expressed as %relaxation of vessel pre-contracted with 10 μM PE. Values are mean ± SEM of 6–9 individual arteries. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  each compound compared with intact vessels (+EC) using two-way ANOVA (n = 6–9).

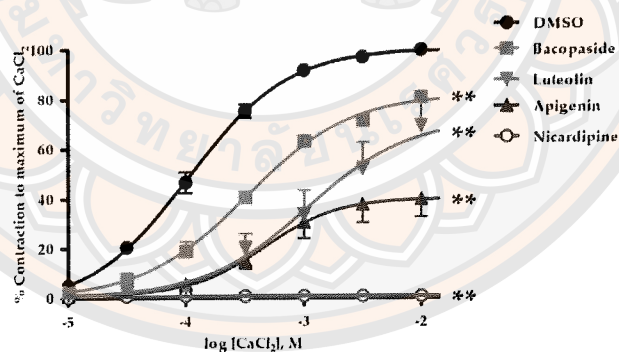
**Table 2.** The EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> of *B. monnieri* compounds on relaxations of endothelial intact (+EC), denuded (-EC) mesenteric arterial rings or endothelial intact arteries with L-NAME.

Active Compounds	EC <sub>50</sub> (μM)	E <sub>max</sub> (%)	n
<b>Luteolin</b>			
+EC	4.35 ± 1.31	99.35 ± 0.66	6
-EC	21.90 ± 5.86 †	82.42 ± 4.65 ††	6
+EC plus L-NAME	14.99 ± 3.56 †	90.85 ± 5.85	6
<b>Apigenin</b>			
+EC	8.93 ± 3.33	95.27 ± 2.61	9
-EC	12.80 ± 2.54	98.81 ± 1.19	8
+EC plus L-NAME	25.62 ± 3.38 ††	94.40 ± 2.10	7
<b>Bacoside A</b>			
+EC	10.81 ± 5.95	83.60 ± 2.86	7
-EC	14.50 ± 6.30	37.90 ± 4.72 ††	6
+EC plus L-NAME	33.81 ± 6.25 †	33.16 ± 8.41 ††	5
<b>Bacopaside I</b>			
+EC	14.63 ± 5.36	79.94 ± 8.17	7
-EC	17.29 ± 4.75	58.97 ± 7.05 †	7
+EC plus L-NAME	25.38 ± 4.33	58.45 ± 4.21 †	7

Comparison of EC<sub>50</sub> or E<sub>max</sub> of each component +EC vs. -EC or +EC plus L-NAME. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  using unpaired Student's *t*-test.

### 2.3. *B. monnieri* Compounds and Ca<sup>2+</sup> Influx

Voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels (VOCCs) were activated by depolarising denuded vessels with 80 mM K<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup>-free Krebs' solution. Then vascular contraction elicited by CaCl<sub>2</sub> accumulatively added at increasing concentrations (0.01–10 mM). In the same vessel, the protocol was repeated by pre-incubation with 10 μM *B. monnieri* compounds for 15 min and these CaCl<sub>2</sub>-induced contractions were inhibited and seen as a rightward shift of the plots and reduced E<sub>max</sub> from control (Figure 3).

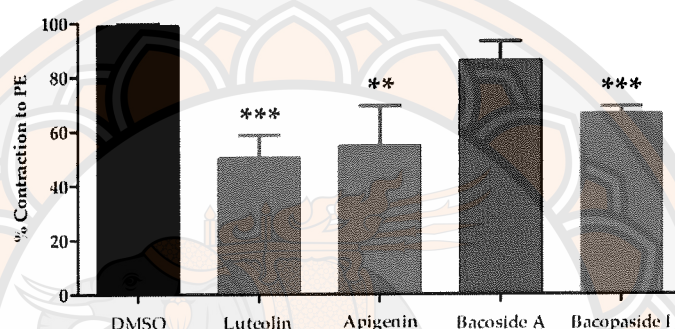


**Figure 3.** CaCl<sub>2</sub>-induced contractions of denuded mesenteric arteries pre-incubated in high K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>-free media in the conditions of pre-incubation with DMSO (negative control), 10 μM bacopaside I, 10 μM luteolin, 10 μM apigenin, and 1 μM nicardipine (positive control). Y-axis, % contraction compared to the contraction achieved with the highest Ca<sup>2+</sup> concentration during the initial run without a *B. monnieri* compound in the same vessel. Values are mean ± SEM of 4–6 individual arteries. \*\*  $p < 0.01$  each of the active compounds compared to DMSO using two-way ANOVA (n = 4–6).

The maximum contraction (E<sub>max</sub>) of control, bacopaside I, luteolin and apigenin were 100 ± 1.3, 81.9 ± 1.7, 72.0 ± 6.7 and 40.2 ± 3.5%, respectively. Positive control, L-type Ca<sup>2+</sup>-channel blocker, nicardipine (1 μM) completely abolished this CaCl<sub>2</sub>-induced vasoconstriction (Figure 3).

#### 2.4. *B. monnieri* Compounds and Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Release

The release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum is another important trigger of vascular contraction. Denuded arterial rings were pre-incubated in  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution for 10 min and then 10  $\mu\text{M}$  PE added thereby eliciting a transient contraction. Then the protocol was repeated with the same arterial ring in the presence of the test compounds (control, apigenin, luteolin, bacoside A and bacopaside I) producing reduced contractions ( $98.8 \pm 1.2$ ,  $50.1 \pm 8.5$ ,  $54.3 \pm 14.9$ ,  $85.8 \pm 7.2$  and  $66.2 \pm 2.9\%$ , respectively) (Figure 4). Luteolin, apigenin and bacopaside I caused significant decrease in PE-induced contraction compared to the vehicle control ( $p < 0.001$ ,  $< 0.01$  and  $< 0.001$ , respectively).



**Figure 4.** PE-induced contraction induced by  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum of endothelial denuded mesenteric arteries in the presence of DMSO (control), 10  $\mu\text{M}$  of luteolin, apigenin, bacoside A and bacopaside I. The data is % contraction to 10  $\mu\text{M}$  PE induced contraction compared to contractions produced by the initial protocol without test compound. Values are mean  $\pm$  SEM of 5–6 individual arteries. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  each of the active compounds compared with control using unpaired Student's *t*-test ( $n = 5-6$ ).

### 3. Discussion

This is the first study comparing the vasodilatory mechanisms elicited by saponins (particularly bacoside A and bacopaside I) and the principal flavonoids (luteolin and apigenin) were the most potent ( $\text{EC}_{50}$  4.4 and 8.9  $\mu\text{M}$ ) (Figure 1). However, these are present in BME at only about 1/20th the contents of the bacoside A saponins and bacopaside I (Figure S1 and Table S1) [42]. Thus in terms of the overall actions of the complete BME, the saponins would be expected to make a larger contribution to the vasorelaxation than the flavonoids.

However, higher potency of aglycone flavonoids compared to saponin glycosides may be due to sugar moieties interfering with the molecule interacting with the binding sites responsible for the vasorelaxation as suggested by previously, i.e., lipophilic groups in the ring skeleton of flavonoids increased their vasorelaxant activity [43]. This provides a basis for study of the molecular mechanisms of vasorelaxation of flavonoids.

We investigated the mechanisms of flavonoid- and saponin-induced relaxation by endothelial denudation in mesenteric arterial rings which impaired vasorelaxation (Figure 2). Role of NO was investigated using the eNOS inhibitor (L-NAME) with the test compounds. L-NAME increased  $\text{EC}_{50}$  and reduced  $E_{\text{max}}$  which imitated the effect of endothelial denudation, suggesting the relaxation was mainly mediated by NO. This accords with observations made by Jin et al. that a cyclooxygenase (COX) inhibitor did not affect the relaxation induced by apigenin [44], and consistent with our previous study of *B. monnieri* extract, where indomethacin had no effect on vasorelaxation [29]. There were some important concentration dependent differences between flavonoids and saponins. Firstly, denudation or blockade of eNOS reduced the effect of bacoside A more than bacopaside I, luteolin and apigenin.

Perhaps this was a reflection of bacoside A being a mixture of saponins. However, curiously the responses of luteolin and apigenin to denudation and L-NAME where the latter had a greater effect.

Vascular smooth muscle express plasma membrane L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels that allow depolarisation dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry to trigger contraction. All three compounds (luteolin, apigenin and bacoside I) tested in denuded vessels depressed this mechanism of contraction that can also explain in part, the vasorelaxant effect. But here, apigenin appeared to be more effective than luteolin while it was less effective in relaxation studies suggesting some heterogeneity in the mechanism of flavonoid action.

$\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores also regulates contraction via inositol trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) or ryanodine receptors (RyR) associated channels in the SR membranes.  $\text{IP}_3$  associated channels are commonly activated by plasma membrane G-protein coupled receptors including  $\alpha_1$ -receptors which are activated by PE. RyR channels are activated by  $\text{Ca}^{2+}$  itself. The three pure compounds also inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  released from stores which can account for at least some vasorelaxation of vessels precontracted by PE. However, the bacoside A was without clear effect again suggesting some heterogeneity between the four test substances. Other  $\text{Ca}^{2+}$ -channels may also be involved, for example T-channels and TRP channels, especially TRPC4 which is activated by  $\alpha_1$ -receptor activation.

$\text{K}^+$  channels also play a role in regulation of vascular tone, i.e., voltage-dependent  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_v$ ) channels open upon depolarization of the plasma membrane in vascular smooth muscle cells, and thus inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  influx through VOCCs, resulting in vasodilation [45]. Jiang et al. also reported that luteolin inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  channels, inhibited release of stored  $\text{Ca}^{2+}$  while  $\text{K}^+$  channels were activated, specifically via  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ,  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{K}_v$  and  $\text{K}_{\text{IR}}$  [40] therefore the effects of apigenin, bacoside A and bacoside I involving  $\text{K}^+$  channels deserve further investigation. Our findings support those of Si et al. that luteolin can directly act on vascular endothelial cells, by inducing eNOS phosphorylation at Ser1177, leading to NO production [41]. The flavonoids evoke relaxations and also protect endothelial dependent vasorelaxation against oxidative stress [44,46,47] and diabetes [48], however vasoprotective effects of saponins needs further comprehensive investigation.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. General Information

Tissues were from male Wistar rats (200–300 g) which were obtained from Nomura Siam International Co. Ltd. (Bangkok, Thailand). Experiments were approved by the Naresuan University Animal Care and Use Committee (NUACUC), protocol number NU-AE 600710. The rats were housed under the environmental conditions at  $22 \pm 1$  °C, 12-h light and dark cycle, fed with standard rodent diet and tap water in Naresuan University Center for Animal Research (NUCAR) according to the guidelines for care and use of laboratory animals (Institute of Laboratory Animal Research, eighth edition 2011). Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of thiopental sodium (100 mg/kg BW) and killed. The mesenteric arteries were excised, cleaned of surrounding loose connective tissue and cut into rings of 3–5 mm width. In some experiments, endothelial cells were mechanically removed by gently rubbing the lumen with a stainless steel wire. The mesenteric rings were mounted on a pair of intraluminal wires in organ chambers containing physiological Krebs' solution (mM): NaCl, 122; KCl, 5; [N-(2-hydroxyethyl) piperazine N'-(2-ethanesulfonic acid)] HEPES, 10;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{MgCl}_2$ , 1; glucose, 11; and  $\text{CaCl}_2$ , 1.8 (pH 7.3), at 37 °C and aerated [29,49–51]. The vessel segments were allowed to equilibrate for 1-h at a resting tension of 1–1.3 g during which the solution was replaced every 15 min. Changes in isometric tension were measured using force transducer lever (CB Sciences Inc., Milford, MA, USA) connected to a MacLab A/D converter (Chart V7; A.D. Instruments, Castle Hill, NSW, Australia), stored and displayed on a personal computer. Following stabilization, the arterial rings were tested for viability by the application of 10  $\mu\text{M}$  PE. Upon development of a steady contraction, the endothelium status was tested with 10  $\mu\text{M}$  ACh. The vessel was considered endothelial intact when the ACh induced >70% relaxation. After establishing the status of the endothelium, the rings were then rinsed with Krebs' solution for 30 min and one of the following protocols was initiated.

Luteolin (lot 126M4061V) and apigenin (lot WE445301/1) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bacoside A (lot 00002005-003) and bacopaside I (lot 00002002-T17H) were purchased from ChromaDex, Inc. (Irvine, CA, USA).

#### 4.2. Vasorelaxant Effects of *B. monnieri* Active Compounds on Endothelial Intact Arteries

Following stabilization, endothelial intact rings of mesenteric arteries were pre-contracted with 10  $\mu\text{M}$  PE. After the contraction had become constant, the *B. monnieri* active compounds (0.1–100  $\mu\text{M}$ ), including luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I were added cumulatively.

#### 4.3. Vasorelaxant Effects of *B. monnieri* Active Compounds on Endothelial Denuded Arteries

Successful endothelial denudation was confirmed by the absence of relaxation upon addition of 10  $\mu\text{M}$  ACh. For investigation of the role of endothelium in 0.1–100  $\mu\text{M}$  *B. monnieri* active compounds (luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I) induced vasorelaxation, endothelial denuded arteries were used. The data of effect of active compounds were presented as %relaxation.

#### 4.4. Study of Vasorelaxant Mechanisms of *B. monnieri* Active Compounds via eNOS Pathway

The role of the endothelial relaxing factor, NO, in *B. monnieri* active compounds (luteolin, apigenin, bacoside A or bacopaside I) induced vasorelaxation were evaluated in endothelial intact ring pre-treated with  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100  $\mu\text{M}$ ), an inhibitor of eNOS, for 30 min prior to 10  $\mu\text{M}$  PE exposure.

#### 4.5. Study of Vasorelaxant Mechanisms of *B. monnieri* Active Compounds on Extracellular $\text{Ca}^{2+}$ Influx

Endothelial denuded mesenteric arteries were equilibrated in  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution (containing (mM): ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N,N tetra acetic acid (EGTA), 0.01; NaCl, 122; KCl, 5; HEPES, 10;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5;  $\text{MgCl}_2$ , 1 and glucose, 11 (pH 7.3)) for 30 min followed by replacing with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution containing 80 mM  $\text{K}^+$  for 10 min which depolarizes the vascular smooth muscle cells, thus opening VOCCs. Various concentrations of  $\text{CaCl}_2$  were then added (0.01–10 mM) in a logarithmic progression. After obtaining the maximum response, the baths were washed out and replenished with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution for 30 min. The  $\text{Ca}^{2+}$ -free 80 mM  $\text{K}^+$  solution was then re-applied following pre-incubation for 10 min with either: 10  $\mu\text{M}$  active compounds or 1  $\mu\text{M}$  nifedipine (antagonist of VOCCs). Concentration-response curves to cumulative addition of  $\text{CaCl}_2$  were then repeated and compared with maximum contraction evoked by previous control  $\text{CaCl}_2$  challenges.

#### 4.6. Study of Vasorelaxant Mechanisms of *B. monnieri* Active Compounds on Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Release

To stimulate initial  $\text{Ca}^{2+}$  loading of the SR  $\text{Ca}^{2+}$  stores, endothelial denuded mesenteric arteries were exposed to 80 mM  $\text{K}^+$  solution for 5 min, and then washed out with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution containing 1 mM EGTA for 10 min. The arterial rings were then challenged with 10  $\mu\text{M}$  PE (acting through phospholipase C/ $\text{IP}_3$  signaling) which release  $\text{Ca}^{2+}$  from the SR thereby eliciting a transient contraction [29]. The same protocol was then repeated to ensure that similar transient contractions to PE could be obtained. Then, the arterial rings were challenged again with 80 mM  $\text{K}^+$  solution for 5 min, and washed out with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs' solution containing 1 mM EGTA and 10  $\mu\text{M}$  active compounds for 10 min. The arterial rings were again challenged with 10  $\mu\text{M}$  PE. The PE-induced contractions were compared in the presence or absence of active compounds.

#### 4.7. Statistical Analyses

Statistical analyses used GraphPad Prism version 5.00 for Windows, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data from each concentration-effect curve was analysed using non-repeated two-way ANOVA. Curve fitting in the figures was generated by the same software using non-linear regression.

EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> were compared using unpaired Student's *t* test. Values are expressed as mean ± SEM. A *p*-value < 0.05 was considered significant. 'n' is the number of vascular rings used, each ring originating from a different animal.

## 5. Conclusions

This study demonstrated that *B. monnieri* active components, including both saponins and flavonoids, produced vasodilatory effects on rat isolated mesenteric arteries partially via endothelial dependent release of vasodilators and also by direct effects on vascular smooth muscle cells via blockade of Ca<sup>2+</sup> influx and its release from SR. This study for the first time reports the comparative vasodilatory effects of saponins and flavonoids found in *B. monnieri* extract. However, *B. monnieri* extract, flavonoids i.e., luteolin and apigenin would be more potent vasodilators but saponins have a greater effect because of their greater contents. Accordingly, the clinical benefits on enhanced blood flow and cognitive function may arise from a combination of flavonoids and particularly the saponins.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials are available online. Figure S1: Representative HPLC-UV chromatogram of mixed seven standards at 20 µg/mL for 1 and 2 and 100 µg/mL for 3–7 (A) and Brahmi extract (2 mg/mL) (B); luteolin (1), apigenin (2), bacoside A3 (3), bacopaside II (4), bacopaside X (5), bacopasaponin C (6) and bacopaside I (7), Table S1: Amount of each compound in 95% ethanolic extract of Brahmi analyzed by HPLC.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.I., N.W. and K.C.; methodology and experimental design, N.K., T.U.P. and K.C.; software, N.K.; validation, N.K., T.U.P. and K.C.; formal analysis, N.K. and K.C.; investigation, N.K.; resources, K.I., N.W. and K.C.; data curation and interpretation, N.K. and K.C.; writing—original draft preparation, N.K.; manuscript writing—review and editing, T.U.P. and K.C.; visualization, K.I., N.W. and K.C.; supervision, K.I., N.W. and K.C.; project administration, K.C.; funding acquisition, K.C.

**Funding:** This research was funded by National Research Council of Thailand (NRCT), grant No. R2561B032.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the International Research Network (IRN61W0005) on research facility support. We would like to thank C. Norman Scholfield for his constructive criticism of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declared no conflict of interest.

## References

1. *Bacopa monniera*. Monograph. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* **2004**, *9*, 79–85.
2. Russo, A.; Borrelli, F. *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: An overview. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 305–317. [CrossRef] [PubMed]
3. Kumar, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: An overview. *Phytother. Res. PTR* **2006**, *20*, 1023–1035. [CrossRef]
4. Rajan, K.E.; Preeti, J.; Singh, H.K. Molecular and functional characterization of *Bacopa monniera*: A retrospective review. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. eCAM* **2015**, *2015*, 945217. [CrossRef] [PubMed]
5. Aguiar, S.; Borowski, T. Neuropharmacological review of the nootropic herb *Bacopa monnieri*. *Rejuvenation Res.* **2013**, *16*, 313–326. [CrossRef] [PubMed]
6. Singh, H.K. Brain enhancing ingredients from Ayurvedic medicine: Quintessential example of *Bacopa monniera*, a narrative review. *Nutrients* **2013**, *5*, 478–497. [CrossRef] [PubMed]
7. Mathur, D.; Goyal, K.; Koul, V.; Anand, A. The molecular links of re-emerging therapy: A review of evidence of Brahmi (*Bacopa monniera*). *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 44. [CrossRef]
8. Das, A.; Shanker, G.; Nath, C.; Pal, R.; Singh, S.; Singh, H. A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: Anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *73*, 893–900. [CrossRef]
9. Dhanasekaran, M.; Tharakan, B.; Holcomb, L.A.; Hitt, A.R.; Young, K.A.; Manyam, B.V. Neuroprotective mechanisms of ayurvedic antidementia botanical *Bacopa monniera*. *Phytother. Res. PTR* **2007**, *21*, 965–969. [CrossRef]
10. Limpeanchob, N.; Jaipan, S.; Rattanakaruna, S.; Phrompittayarat, W.; Ingkaninan, K. Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 112–117. [CrossRef]

11. Uabundit, N.; Wattanathorn, J.; Mucimapura, S.; Ingkaninan, K. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 26–31. [CrossRef] [PubMed]
12. Vollala, V.R.; Upadhy, S.; Nayak, S. Enhancement of basolateral amygdaloid neuronal dendritic arborization following *Bacopa monniera* extract treatment in adult rats. *Clinics (Sao Paulo Brazil)* **2011**, *66*, 663–671. [CrossRef] [PubMed]
13. Vollala, V.R.; Upadhy, S.; Nayak, S. Learning and memory-enhancing effect of *Bacopa monniera* in neonatal rats. *Bratisl. Lek. Listy* **2011**, *112*, 663–669. [PubMed]
14. Vollala, V.R.; Upadhy, S.; Nayak, S. Enhanced dendritic arborization of hippocampal CA3 neurons by *Bacopa monniera* extract treatment in adult rats. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2011**, *52*, 879–886. [PubMed]
15. Vollala, V.R.; Upadhy, S.; Nayak, S. Enhanced dendritic arborization of amygdala neurons during growth spurt periods in rats orally intubated with *Bacopa monniera* extract. *Anat. Sci. Int.* **2011**, *86*, 179–188. [CrossRef] [PubMed]
16. Kongkeaw, C.; Dilokthornsakul, P.; Thanarangsarit, P.; Limpeanchob, N.; Norman Scholfield, C. Meta-analysis of randomized controlled trials on cognitive effects of *Bacopa monnieri* extract. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 528–535. [CrossRef] [PubMed]
17. Anbarasi, K.; Vani, G.; Balakrishna, K.; Devi, C.S. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci.* **2006**, *78*, 1378–1384. [CrossRef] [PubMed]
18. Jyoti, A.; Sharma, D. Neuroprotective role of *Bacopa monniera* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. *Neurotoxicology* **2006**, *27*, 451–457. [CrossRef]
19. Mannan, A.; Abir, A.B.; Rahman, R. Antidepressant-like effects of methanolic extract of *Bacopa monniera* in mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **2015**, *15*, 337. [CrossRef]
20. Sairam, K.; Dorababu, M.; Goel, R.K.; Bhattacharya, S.K. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 207–211. [CrossRef]
21. Kadali, S.R.M.; Das, M.C.; Rao, A.S.; Sri, G.K. Antidepressant activity of brahmi in albino mice. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **2014**, *8*, 35–37. [CrossRef] [PubMed]
22. Udhaya Lavanya, B.; Sabina, E.P. Anti-hyperglycaemic effect of Brahmi (*Bacopa monnieri* L.) in streptozotocin-induced diabetic rats: A study involving antioxidant, biochemical and haematological parameters. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 531–534.
23. Kamesh, V.; Sumathi, T. Antihypercholesterolemic effect of *Bacopa monniera* Linn. on high cholesterol diet induced hypercholesterolemia in rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2012**, *5*, 949–955. [CrossRef]
24. Sireeratawong, S.; Jaijoy, K.; Khonsung, P.; Lertprasertsuk, N.; Ingkaninan, K. Acute and chronic toxicities of *Bacopa monnieri* extract in Sprague-Dawley rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 249. [CrossRef] [PubMed]
25. Joshua Allan, J.; Damodaran, A.; Deshmukh, N.S.; Goudar, K.S.; Amit, A. Safety evaluation of a standardized phytochemical composition extracted from *Bacopa monnieri* in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1928–1937. [CrossRef] [PubMed]
26. Pravina, K.; Ravindra, K.R.; Goudar, K.S.; Vinod, D.R.; Joshua, A.J.; Wasim, P.; Venkateshwarlu, K.; Saxena, V.S.; Amit, A. Safety evaluation of BacoMind in healthy volunteers: A phase I study. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 301–308. [CrossRef] [PubMed]
27. Srimachai, S.; Devaux, S.; Demougeot, C.; Kumphune, S.; Ullrich, N.D.; Niggli, E.; Ingkaninan, K.; Kamkaew, N.; Scholfield, C.N.; Tapechum, S.; et al. *Bacopa monnieri* extract increases rat coronary flow and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 117. [CrossRef]
28. Nandave, M.; Ojha, S.K.; Sujata, J.; Kumari, S.; Arya, D.S. Cardioprotective effect of *Bacopa monniera* against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Int. J. Pharmacol.* **2007**, *3*, 385–392.
29. Kamkaew, N.; Scholfield, C.N.; Ingkaninan, K.; Mancesai, P.; Parkington, H.C.; Tare, M.; Chootip, K. *Bacopa monnieri* and its constituents is hypotensive in anaesthetized rats and vasodilator in various artery types. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 790–795. [CrossRef]
30. Kamkaew, N.; Norman Scholfield, C.; Ingkaninan, K.; Taepavarapruk, N.; Chootip, K. *Bacopa monnieri* increases cerebral blood flow in rat independent of blood pressure. *Phytother. Res. PTR* **2013**, *27*, 135–138. [CrossRef]

31. Phrompittayarat, W.; Putalun, W.; Tanaka, H.; Jetiyanon, K.; Wittaya-Areekul, S.; Ingkaninan, K. Determination of pseudojubilogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochem. Anal. PCA* **2007**, *18*, 411–418. [CrossRef] [PubMed]
32. Phrompittayarat, W.; Putalun, W.; Tanaka, H.; Wittaya-Areekul, S.; Jetiyanon, K.; Ingkaninan, K. An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
33. Nuengchamnon, N.; Sookying, S.; Ingkaninan, K. LC-ESI-QTOF-MS based screening and identification of isomeric jubilogenin and pseudojubilogenin aglycones in *Bacopa monnieri* extract. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 121–134. [CrossRef] [PubMed]
34. Honnegowda, S.; Bagul, M.S.; Padh, H.; Rajani, M. A rapid densitometric method for the quantification of luteolin in medicinal plants using HPTLC. *Chromatographia* **2004**, *60*, 131–134.
35. Deepak, M.; Sangli, G.K.; Arun, P.C.; Amit, A. Quantitative determination of the major saponin mixture bacopaside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. *Phytochem. Anal. PCA* **2005**, *16*, 24–29. [CrossRef] [PubMed]
36. Rajasekaran, A. Simultaneous estimation of luteolin and apigenin in methanol leaf extract of *Bacopa monnieri* Linn by HPLC. *Br. J. Pharm. Res.* **2014**, *4*, 1629–1637. [CrossRef]
37. Chan, E.C.; Pannangpetch, P.; Woodman, O.L. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: Mechanism of action and structure-activity relationships. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2000**, *35*, 326–333. [CrossRef]
38. Calderone, V.; Chericoni, S.; Martinelli, C.; Testai, L.; Nardi, A.; Morelli, I.; Breschi, M.C.; Martinotti, E. Vasorelaxing effects of flavonoids: Investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naturyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, *370*, 290–298. [CrossRef]
39. Je, H.D.; Kim, H.-D.; La, H.-O. The inhibitory effect of apigenin on the agonist-induced regulation of vascular contractility via calcium desensitization-related pathways. *Biomol. Ther.* **2014**, *22*, 100–105. [CrossRef]
40. Jiang, H.; Xia, Q.; Wang, X.; Song, J.; Bruce, I.C. Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. *Die Pharm.* **2005**, *60*, 444–447.
41. Si, H.; Wyeth, R.P.; Liu, D. The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *53*, 269–275. [CrossRef] [PubMed]
42. Saesong, T.; Temkitthawon, P.; Nangngam, P.; Ingkaninan, K. Pharmacognostic and physico-chemical investigations of the aerial part of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *SJST* **2019**, *41*, 397–404.
43. Wu, H.; Jiang, H.; Wang, L.; Hu, Y. Relationship between vasorelaxation of flavonoids and their retention index in RP-HPLC. *Die Pharm.* **2006**, *61*, 667–669.
44. Jin, B.H.; Qian, L.B.; Chen, S.; Li, J.; Wang, H.P.; Bruce, I.C.; Lin, J.; Xia, Q. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *616*, 200–205. [CrossRef] [PubMed]
45. Ko, E.A.; Han, J.; Jung, I.D.; Park, W.S. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.* **2008**, *44*, 65–81. [CrossRef] [PubMed]
46. Ma, X.; Li, Y.F.; Gao, Q.; Ye, Z.G.; Lu, X.J.; Wang, H.P.; Jiang, H.D.; Bruce, I.C.; Xia, Q. Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life Sci.* **2008**, *83*, 110–117. [CrossRef]
47. Qian, L.B.; Wang, H.P.; Chen, Y.; Chen, F.X.; Ma, Y.Y.; Bruce, I.C.; Xia, Q. Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress. *Pharmacol. Res.* **2010**, *61*, 281–287. [CrossRef]
48. El-Bassossy, H.M.; Abo-Warda, S.M.; Fahmy, A. Chrysin and luteolin attenuate diabetes-induced impairment in endothelial-dependent relaxation: Effect on lipid profile, AGEs and NO generation. *Phytother. Res. PTR* **2013**, *27*, 1678–1684. [CrossRef]
49. Wisuthathum, S.; Kamkaew, N.; Inchan, A.; Chatturong, U.; Paracha, T.U.; Ingkaninan, K.; Wongwad, E.; Chootip, K. Extract of *Aquilaria crassna* leaves and mangiferin are vasodilators while showing no cytotoxicity. *J. Tradit. Complement. Med.* **2018**, in press. [CrossRef]
50. Wisuthathum, S.; Demougeot, C.; Totoston, P.; Adthapanyawanich, K.; Ingkaninan, K.; Temkitthawon, P.; Chootip, K. *Eulophia macrobulbon* extract relaxes rat isolated pulmonary artery and protects against monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Phytomedicine* **2018**, *50*, 157–165. [CrossRef]

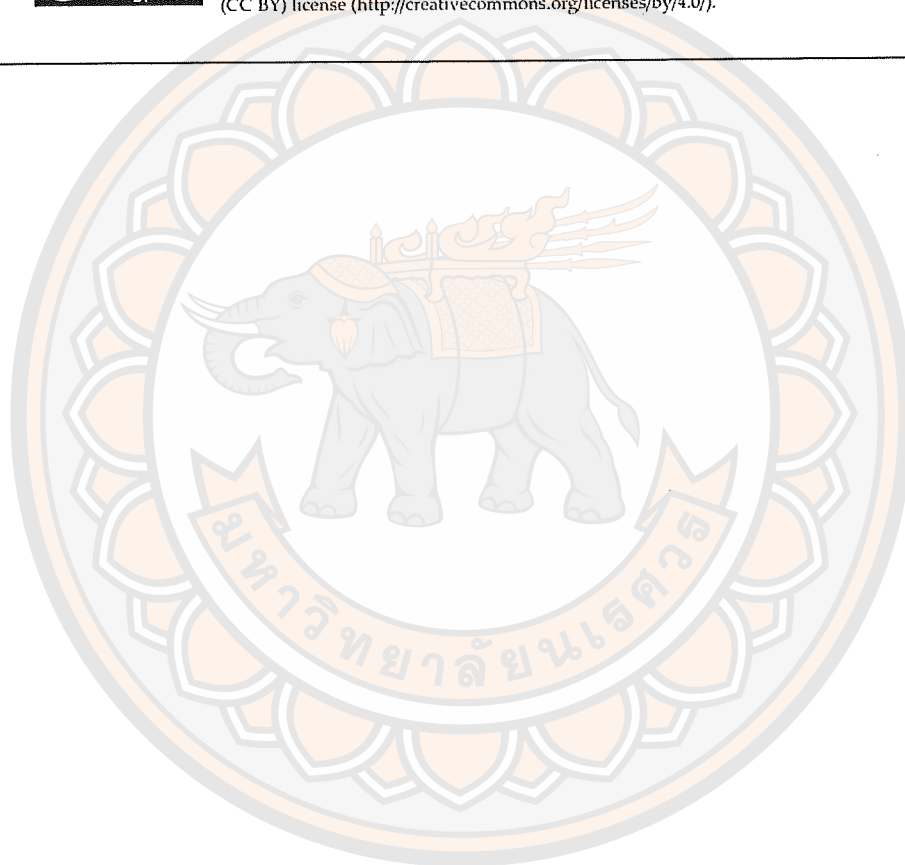


51. Wisutthathum, S.; Chootip, K.; Martin, H.; Ingkaninan, K.; Temkitthawon, P.; Totoson, P.; Demougeot, C. Vasorelaxant and hypotensive effects of an ethanolic extract of *Eulophia macrorubron* and its main compound 1-(4'-hydroxybenzyl)-4,8-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 484. [CrossRef] [PubMed]

**Sample Availability:** Samples of the compounds, luteolin, apigenin, bacoside A and bacoside I are not available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## APPENDIX C APPROVAL HUMAN ETHIC (APPROVAL MAY, 16 2018)

COA No. 197/2018

IRB No. 0898/60



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

NARESUAN UNIVERSITY INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

99 หมู่ 9 ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000 เบอร์โทรศัพท์ 05596 8642

### เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : ผลของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดสมองและหลอดเลือดส่วนปลายของผู้สูงอายุสุขภาพดี

Study Title : Effects of Brahmi concentrated essence on memory, cerebral and peripheral blood flows in the healthy elderly .

ผู้วิจัยหลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรรณกาญจน์ ชูทิพย์

Principal Investigator : Assistant professor Dr. Krongkarn Chootip

สังกัดหน่วยงาน : คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผู้ร่วมวิจัย : รศ.ดร.กรรณ กิ่งคณินันท์ รศ.ดร.เนติ วรรณุช  
รศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร ผศ.ดร.อรรชวี คงสมบัติ  
ผศ.ดร.จันทร์จิรา วสุนธราวัฒน์ นายแพทย์พีระพงศ์ เอื้อราวัฒน์  
อาจารย์วิรัช แก้วหาญ อ.ดร.ดวงภา รุ่งทิบุลโสภิษฐ์  
พญ.พรรณวลัย ผดุงวนิชย์กุล นายณัฐกร คำแก้ว

วิธีทบทวน : คณะกรรมการเต็มชุด (Full Board Review)

รายงานความก้าวหน้า : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

### เอกสารรับรอง

1. AF 01-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 25 ตุลาคม 2560
2. AF 02-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 19 ตุลาคม 2560
3. AF 03-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 25 ตุลาคม 2560
4. AF 04-10 เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 21 มกราคม 2561
5. AF 05-10 เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 19 ตุลาคม 2560
6. สรุปโครงการเพื่อการพิจารณาทางจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 22 มกราคม 2561
7. แบบข้อเสนอโครงการ เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
8. ประวัติผู้วิจัย เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
9. จบประมาณของโครงการวิจัย เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
10. เอกสารเชิญชวนอาสาสมัคร เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
11. แบบบันทึกประจำวัน เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 23 มกราคม 2561
12. แบบฟอร์ม บันทึกข้อมูล เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 22 มกราคม 2561
13. แบบฟอร์มการคัดกรองอาสาสมัคร เวอร์ชัน 2.0 วันที่ 22 มกราคม 2561

ลงนาม

(นายแพทย์สมบูรณ์ ต้นสุกสวัสดิ์กุล)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์  
มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันที่รับรอง : 16 พฤษภาคม 2561

Date of Approval : May 16, 2018

วันหมดอายุ : 16 พฤษภาคม 2562

Approval Expire Date : May 16, 2019

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

APPENDIX D APPROVAL AMENDMENT HUMAN ETHIC (APPROVAL  
MARCH, 01 2019)

COA No. 197/2018  
IRB No. 0898/68



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์  
มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

99 หมู่ 9 ตำบลโพธิ์โพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 65000 เบอร์โทรศัพท์ 05596 8637

หนังสือรับรองเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ดำเนินการให้การรับรองเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย  
ตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เป็นมาตรฐานสากลซึ่งมี Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS  
Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ CH-GCP

ชื่อโครงการ : ผลของน้ำพรมีสกลจันทร์เข้มข้นต่อความจำ สมองไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอและหลอดเลือดส่วนปลายของผู้สูงอายุสุขภาพดี

Study Title : Effect of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the healthy elderly

ผู้วิจัยหลัก : รศ.ศาสตราจารย์ ดร.กรรณกาญจน์ จุฬิพันธ์

สังกัดหน่วยงาน : คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

เอกสารที่ได้รับการรับรอง

1. แบบรายงานการขออนุมัติโครงการวิจัย (AF 01-13) เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2562
2. ตารางสรุปการเปลี่ยนแปลง (AF 02-13) เวอร์ชัน 1.0 วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2562
3. สรุปโครงการเพื่อขอพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เวอร์ชัน 3.0 วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2562
4. ประเด็นวิจัย เวอร์ชัน 3.0 วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2562

ลงนาม

(นายแพทย์สมบุญ ดันตฤกษ์วิเศษกุล)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วันที่รับรอง : 01 มีนาคม 2562

Date of Approval : March 01, 2019

หมายเหตุ : ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขที่ต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ (ผู้ดำเนินการของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

APPENDIX E APPROVAL ADVERTISING FOR CLINICAL TRIAL

(สำหรับประชาสัมพันธ์ แบบนำขออนุมัติ และ online)

**โครงการ** ผลของน้ำพรมมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร



**รับสมัคร  
อาสาสมัครเข้าร่วม  
โครงการ  
Approval**

29 ต.ค. 2561 NU-IR3

**รศ.ดร.กรรณกาญจน์ ชุติพันธ์**  
หัวหน้าโครงการวิจัย

**นพ.ไพโรจน์ ศรีระวัฒน์**  
แพทย์ผู้ร่วมโครงการวิจัย

สอบถามรายละเอียดเพิ่มเติม  
คุณณัฐกร คำแก้ว โทร. 088-261-5924  
ภาควิชาสูติศาสตร์และสูติศาสตร์การแพทย์  
มหาวิทยาลัยนครสวรรค์



**คุณสมบัติ  
อาสาสมัคร**

- ✓ เพศชายและหญิง
- ✓ อายุ 55-80 ปี
- ✓ เชื้อชาติไทย
- ✓ สามารถฟัง อ่าน และเขียนภาษาไทยได้ (จบการศึกษา ไม่ต่ำกว่า ป.4)
- ✓ มีสุขภาพดี

**ต้องไม่มีโรคประจำตัว ดังต่อไปนี้**

• ความดันโลหิตสูง	• โรคไต
• เบาหวาน	• โรคจิตประสาท
• ไขมันในเลือดสูง	• โรคสมองเสื่อม
• โรคตับ	• โรคซึมเศร้า

**ระยะเวลาการศึกษาวิจัย**  
ระยะเวลา 4 เดือน มากน้อยจำนวน 6 ครั้ง  
วันละประมาณ 3 ชั่วโมง

**สถานที่ศึกษาวิจัย**  
ศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (CosNat)  
และคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

ท่านจะได้รับค่าเดินทางและเงินชดเชยการสูญเสียรายได้ หากท่านมาร่วมโครงการตามนัด



**APPENDIX F SUBJECTS ADVERTISING AND SCREENING FOR  
CLINICAL TRIAL**





## APPENDIX G INFORMATION SHEET FOR RESEARCH PARTICIPANT

Version 3.0 Date 11/07/2561

AF 04-10/4.0



Naresuan University Institutional Review Board

ข้อมูลคำอธิบายสำหรับอาสาสมัครในโครงการวิจัย  
(Information Sheet for Research Participant)

**ชื่อโครงการวิจัย** ผลของน้ำพริกที่มีรสเผ็ดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร

**ผู้สนับสนุนการวิจัย** ศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ (TCELS)

ที่อยู่/โทรเลข: 69 อาคารมิว ชั้น 22 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400

**ผู้ทำวิจัย (หัวหน้าโครงการวิจัย)**

ชื่อ รศ.ดร. ภรอนงาญจน์ ชูพิทยุ

ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เบอร์โทรศัพท์ 055-964658, 081-7853618

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ นาย ณัฐกร คำแก้ว

ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เบอร์โทรศัพท์ 088-2615924

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ รศ.ดร. กรรณก อิงคนินันท์

ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เบอร์โทรศัพท์ 055-961860, 081-4817350

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ รศ.ดร. เนติ วรรณสุข

ที่อยู่ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เบอร์โทรศัพท์ 055-961880, 081-5339002

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ นายแพทย์ พีระพงศ์ เขียววัฒน์

ที่อยู่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เบอร์โทรศัพท์ 055-965018, 083-4966321

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ แพทย์หญิง ดวงนภา รุ่งพิบูลโสภิงค์

ที่อยู่ ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยงานประสาทวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เบอร์โทรศัพท์ 080-2044433

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ อาจารย์ วชิรา แก้วมหาณิล

ที่อยู่ ภาควิชาเทคโนโลยีหัวใจและทรวงอก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เบอร์โทรศัพท์ 055-966360, 094-6487516

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ ผศ.ดร. อรรระวี คงสมบัติ  
 ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 055-964654, 088-2811276

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ ผศ.ดร. จันทร์จิรา วสุนธราวัฒน์  
 ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 055-964652, 084-050-2756

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ รศ.ดร. จินตนาภรณ์ วัฒนธร  
 ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
 เบอร์โทรศัพท์ 081-8721809

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ ดร. นันทิรา เบ็ญจจันทร์  
 ที่อยู่ สำนักงานเลขานุการ คณะวิทยาศาสตร์ มนเรศวร (ตัวแทน นักวิทยาศาสตร์ระดับปฏิบัติการ)  
 เบอร์โทรศัพท์ 089-8291285

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ ดร. ศุภฉวี วิสุทธธรรมา  
 ที่อยู่ สถาบันวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 086-2169577

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ น.ส.อุษณา จัตุรงค์  
 ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 080-5064927

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ น.ส.งามขวัญ งามดอกไม้  
 ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 08-80118503

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ น.ส.อัญจรีย์ อิมจันทร์  
 ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 089-7039930

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ น.ส.ศิศาภรณ์ ปิงยศ  
 ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 084-6556546

**ผู้ร่วมในโครงการวิจัย**

ชื่อ นายกิตติวุฒิ ไชยอ่อน  
 ที่อยู่ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 เบอร์โทรศัพท์ 082-0074185



### เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านมีอายุ 55-80 ปี และไม่เป็นผู้ป่วยจิตเภท โรคสมองเสื่อม โรคซึมเศร้า โรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) โรคความดันโลหิตสูง หรือภาวะไขมันในเลือดสูงที่ได้รับยาเพื่อการรักษา ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากคณะผู้วิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

### เหตุผลความเป็นมา

การรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากสมุนไพรเพื่อส่งเสริมสุขภาพกำลังเป็นที่นิยม โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ช่วยชะลอความเสื่อมของสมอง บำรุงสมองและความจำ หนึ่งในนั้นคือ “พรมมิ” ซึ่งเป็นพืชในตำราการแพทย์อายุรเวชของอินเดียที่ใช้มาอย่างยาวนาน การศึกษาพรมมิทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์แสดงฤทธิ์ของพรมมิในการบำรุงระบบประสาท เพิ่มการเรียนรู้และความจำ ด้านภาวะสมองเสื่อม

ผลวิจัยในมนุษย์ พบว่าการรับประทานพรมมิในรูปแบบอาหารเสริมชนิดเม็ด มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของสมอง ทั้งในผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของพรมมิในการเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปสู่สมองในมนุษย์ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งในการเพิ่มความจำ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาผลิตภัณฑ์พรมมิในรูปแบบพรมมิน้ำสกัดเข้มข้น เพื่อง่ายต่อการรับประทานโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ การศึกษาที่จึงเป็นการศึกษาผลของการรับประทานพรมมิน้ำสกัดเข้มข้นในอาสาสมัครสูงอายุสุขภาพดี โดยจะประเมินและเปรียบเทียบค่าต่าง ๆ ได้แก่ ความจำ การไหลเวียนเลือดที่บริเวณคอ และแขน รวมทั้งจะเจาะเลือดเพื่อวัดค่าต่าง ๆ ในเลือด เช่น ระดับไขมันในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือด ค่าการทำงานของตับหรือไต เป็นต้น อีกทั้งยังมีการตรวจปัสสาวะและอุจจาระเพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของไต การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร metabolites หรือสารสำคัญของน้ำสกัดพรมมิเข้มข้น และเพื่อช่วยในการวินิจฉัยผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ รวมถึงการวัดความดันโลหิต

### วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาผลของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลเวียนเลือดที่บริเวณคอ และแขน และผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ในอาสาสมัคร จำนวน 40 คน เมื่อให้รับประทานน้ำพรมมิสกัดเข้มข้น เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

### วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ผู้วิจัยจะอธิบายทำความเข้าใจกับท่านก่อนที่จะขอความยินยอม หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในการวิจัย ซึ่งท่านจะได้รับการประเมินจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญและนักวิจัย โดยใช้แบบสอบถามทางการแพทย์ และแบบประเมินการทำงานของสมอง รวมทั้งการตรวจประเมินขั้นพื้นฐาน เช่น วัดความดันโลหิต และชั่งน้ำหนัก

หลังจากการคัดเลือกอาสาสมัคร ท่านจะได้รับการสุ่มเข้ากลุ่มวิจัย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 20 คน อาสาสมัครและผู้วิจัยจะไม่ทราบว่าได้รับผลิตภัณฑ์น้ำพรมมิสกัดหรือผลิตภัณฑ์หลอก และหลังจากนั้น ท่านจะได้รับเชิญให้เดินทางมาพบแพทย์และนักวิจัย ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (CosNat) มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งท่านจะได้รับเชิญให้มาทั้งสิ้น 6 ครั้ง ระยะเวลาที่อาสาสมัครจะต้องใช้ในแต่ละนัด คือ 3-4 ชั่วโมง เพื่อรับการประเมินค่าต่าง ๆ ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

**ครั้งที่ 1** ท่านจะได้รับการร้องขอให้งดน้ำงดอาหารและเครื่องดื่มทุกชนิด อย่างน้อย 12 ชั่วโมง ก่อนเดินทางมาถึงที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อตรวจสุขภาพ ท่านได้รับการร้องขอให้เก็บอุจจาระจากที่บ้าน ได้เมื่อท่านมาถึงคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ท่านจะได้รับการวัดความดันโลหิตขณะพัก และเจาะเลือดประมาณ 1 ข้อนโต๊ะ (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) โดยนักเทคนิคการแพทย์ และขอเก็บปัสสาวะ ต่อมาท่านจะรับประทานอาหารเช้า (มีอาหารเตรียมไว้ให้) จากนั้น ท่านจะได้รับการทดสอบความจำ ที่ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบท่านจะได้รับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับรับประทานทั้งสิ้น 2 สัปดาห์ โดยในแต่ละวันให้รับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารรูปแบบน้ำ บรรจุในขวดที่มีปริมาณ 40 มิลลิลิตร (คล้ายขวดเบรนต์) วันละ 1 ขวด ในช่วงเวลาใกล้เคียงกันของทุกวัน หลังอาหารเช้า ทั้งนี้ท่านจะต้องบันทึกการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนี้ในแต่ละวันในสมุดบันทึกที่นักวิจัยเตรียมไว้ให้ และให้ท่านเก็บขวดเปล่าที่รับประทานหมดแล้วนำมาคืนในอีก 2 สัปดาห์ข้างหน้า

**ครั้งที่ 2** ท่านจะต้องงดน้ำงดอาหาร และเครื่องดื่มทุกชนิด เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ท่านได้รับการร้องขอให้เก็บอุจจาระจากที่บ้าน เมื่อเดินทางมาถึงที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และท่านจะได้รับการสอบถามอาการอื่นไม่พึงประสงค์จากการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ท่านจะได้รับการเจาะเลือดประมาณ 1 ข้อนโต๊ะมาตรฐาน และขอเก็บปัสสาวะ ท่านจะได้รับการวัดค่าต่าง ๆ ได้แก่ ความจำ การไหลเวียนเลือดที่บริเวณคอ และแขน วัดความดันโลหิตขณะพัก

โดยมีขั้นตอน ดังนี้

(1) ท่านจะถูกวัดการไหลของเลือดบริเวณคอ ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยผู้วิจัยจะใช้เครื่อง vascular Doppler ultrasound ซึ่งจะวาง probe ไว้ตรงบริเวณคอในตำแหน่งหลอดเลือดคอ (internal carotid artery) ทั้งด้านขวาและซ้ายของคอ ใช้เวลาประมาณ 10 นาที เพื่อดูความเร็วการไหลของเลือดในหน่วย cm/sec

(2) ท่านจะถูกร้องขอให้วัดความจำ ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยท่านจะใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที ทดสอบความจำโดยแบบทดสอบโนโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และแพทย์จะสอบถามท่าน โดยใช้แบบทดสอบสภาวะสมอง

(3) ท่านจะถูกวัดการไหลของเลือดบริเวณแขน ที่ศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อดูการไหลของเลือดจากภาวะ reactive hyperemia โดยวางแขนขนาบไว้บนโต๊ะ นักวิจัยจะติดตั้งหัวตรวจ PERI-MED ให้ส่วนลำแสงเลเซอร์ลอยเหนืออยู่บริเวณแขนของอาสาสมัคร วัดค่าการไหลของเลือด 1 นาที เพื่อหาค่าการไหลของเลือดเริ่มต้น (baseline) จากนั้นอาสาสมัครจะถูกพัน cuff รัดรอบที่บริเวณต้นแขนส่วนบนนาน 3 นาที จากนั้นจึงปล่อย cuff ออกแล้ววัดค่าการไหลของเลือดต่อเนื่องอีก 2 นาที

จากนั้นท่านจะได้รับผลิตภัณฑ์เสริมอาหารไปรับประทานอีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ท่านจะต้องบันทึกการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเก็บขวดเปล่าที่มากคืนในอีก 4 สัปดาห์ ถัดไป

**ครั้งที่ 3** ท่านจะได้รับการวัดค่าต่าง ๆ ได้แก่ ความจำ การไหลเวียนเลือดที่บริเวณคอ และแขน วัดความดันโลหิตขณะพัก จากนั้นท่านจะรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารไปรับประทานอีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ท่านจะต้องบันทึกการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเก็บขวดเปล่าที่มากคืนในอีก 4 สัปดาห์ ถัดไป

**ครั้งที่ 4** ท่านจะได้รับการวัดค่าต่าง ๆ ได้แก่ ความจำ การไหลเวียนเลือดที่บริเวณคอ และแขน วัดความดันโลหิตขณะพัก จากนั้นท่านจะรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารไปรับประทานอีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ท่านจะต้องบันทึกการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเก็บขวดเปล่าที่มากคืนในอีก 4 สัปดาห์ ถัดไป

**ครั้งที่ 5** ท่านจะได้รับการร้องขอให้งดน้ำงดอาหาร และเครื่องดื่มทุกชนิด เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ท่านได้รับการร้องขอให้เก็บอุจจาระจากที่บ้าน เมื่อเดินทางมาถึงที่ศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (CosNat) มหาวิทยาลัยนเรศวร และท่านจะได้รับการเจาะเลือดประมาณ 1 ข้อนโต๊ะมาตรฐาน โดยนักเทคนิคการแพทย์ และขอเก็บปัสสาวะ ชั่งน้ำหนัก และวัดความดันโลหิตขณะพัก ท่านจะหยุดรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ให้นำสมุดบันทึกการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารคืนนักวิจัย และเก็บขวดเปล่าคืน

**ครั้งที่ 6** ในอีก 4 สัปดาห์หลังจากสิ้นสุดการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ท่านจะได้รับการติดตามผล และสอบถามอาการอื่นไม่พึงประสงค์

#### **ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย**

เพื่อให้งานวิจัยประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรรับประทานยาบำรุงประสาท หรือยาสมุนไพรอื่น ๆ จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา ทั้งนี้เนื่องจากยาดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อผลการศึกษารววิจัย ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย ทั้งนี้ ก่อนได้รับการรับการตรวจประเมิน อาสาสมัครต้องไม่ออกกำลังกายแบบหักโหม ไม่สูบบุหรี่ คืมเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีนเป็นส่วนประกอบเป็นเวลา 30 นาที

#### **ความเสี่ยงที่อาจได้รับ**

การรับประทานทรมมี อาจมีความเสี่ยงต่อผู้ที่มีปัญหาเกี่ยวกับตับและไต ดังนั้น กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่มีอาการอื่น ๆ ระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัย ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสุขภาพของท่าน ขอให้ท่านรายงานให้ผู้ทำวิจัยทราบโดยเร็ว ความเสี่ยงของเครื่องมือที่ใช้วัด ดังนี้ ความเสี่ยงของการวัดการไหลของเลือดบริเวณแขน โดยเครื่อง perimed อาสาสมัครอาจจะเกิดจุดเล็กๆ ที่แขนจากรัด cuff ที่แขน เป็นจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง เกิดจากการที่เส้นเลือดผู้สูงอายุอาจจะเปราะ การไหลของเลือดโดยบล็อกตอนที่รัดแขน ทำให้เส้นเลือดฝอยแตก เป็นจุดแดงเล็กๆได้ แต่ไม่อันตรายทั้งไว้หายเองได้ อย่างไรก็ตาม ท่านไม่มีความเสี่ยงของการวัดการไหลของเลือดที่คอ โดยเครื่อง vascular Doppler ultrasound เพราะเป็นวิธีที่ปลอดภัยเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีไม่รุกล้ำเข้าไปในร่างกาย (non-invasive technology)

#### **ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด**

ความเสี่ยงจากการเจาะเลือด เช่น ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ ปวด เลือดออก รอยช้ำจากการเจาะเลือด บวม บริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด เป็นลมได้ ซึ่งเป็นความเสี่ยงปกติที่อาจเกิดขึ้นจากการเจาะเลือด ผู้วิจัยจึงมีแนวทางการป้องกันและแก้ไข ได้แก่ การมีนักเทคนิคการแพทย์ที่มีทักษะการเจาะเลือด มีการเตรียมอุปกรณ์ปฐมพยาบาล การแนะนำให้ท่านใช้แรงกดจากมือประมาณ 5 นาทีหลังถอดเข็ม และปิดพลาสติกเอาไว้ และหากมีอาการหน้ามืด เป็นลมจะมีแพทย์ผู้ทำการวิจัยดูแลและให้การรักษาทันที

#### **ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน**

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อมีความผิดปกติใด ๆ เกิดขึ้น หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขออนุญาตออกจากโครงการวิจัย

#### **การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง**

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันทีโดยไม่เสียค่าใช้จ่ายใด ๆ หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

**ประโยชน์ที่อาจได้รับ** การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้น แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้น

### **วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร**

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

### **ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย**

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- หากท่านมีความจำเป็นใช้ยาอื่น เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา ขอให้ท่านปรึกษาผู้วิจัยก่อนใช้ยา
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาอื่นนอกเหนือจากยาที่ใช้ร่วมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านนำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ใช้ในการศึกษาของท่านทั้งหมดที่หลีกเลี่ยงการรับประทานมาให้ผู้ทำวิจัยทุกครั้งที่นัดหมายให้มาพบ

### **อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย**

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที และหากท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ นายณัฐกร คำแก้ว เบอร์โทรศัพท์ 088-2615924 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

### **การจัดการกับตัวอย่างชีวภาพที่เหลือ**

บริษัท BioLab ที่เป็นผู้ตรวจค่าชีวเคมีของเลือดเป็นผู้ทำลายตัวอย่างเลือดที่เหลือ

### **ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย**

ท่านจะได้รับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ในโครงการวิจัยจากผู้สนับสนุนการวิจัยโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย รวมถึงค่าธรรมเนียมทางการแพทย์ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

### **ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย**

ท่านจะไม่ได้รับได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ไม่มีค่าชดเชยการเดินทางและเสียเวลาในขั้นตอนการคัดกรอง (screening) แต่หลังจากที่ท่านผ่านการคัดกรองว่ามีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในการวิจัย ท่านจะได้รับเงินชดเชยการเสียเวลา การสูญเสียรายได้ หรือ ความไม่สะดวกสบาย รวมถึงค่าเดินทางในการมาพบแพทย์ในวันนัดหมายต่อมา ทุกครั้ง (ทั้งหมด 6 ครั้ง) ครั้งละ 500 บาท

### **การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย**

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอลงถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่ส่งผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย ไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร การนัด

หรือการตรวจร่างกาย

- ท่านตั้งครุภัณฑ์ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย
- ท่านแจ้งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้
- ท่านได้รับยารักษาโรคหรือยาสมุนไพรที่มีผลต่อการทำงานของระบบประสาทระหว่างการศึกษาวิจัย
- ท่านได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่าเป็นโรคจิตเภทระหว่างการศึกษาวิจัย
- ท่านได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่าเป็นโรคสมองเสื่อมระหว่างการศึกษาวิจัย
- ค่าการทำงานของตับหรือไตของท่านสูงขึ้นกว่าค่าปกติ ในระหว่างการศึกษาวิจัย กล่าวคือ AST (SGOT) >33 units, ALT (SGPT) >35 units, และ Creatinine >1.4 mg/dl
- ท่านประสบอุบัติเหตุจนไม่สามารถเข้าร่วมการศึกษาต่อไปได้
- ท่านขอยกเลิกการเข้าร่วมการทดลอง
- ในระหว่างที่ดำเนินการทดลอง ผู้วิจัยพิจารณาว่าท่านเกิดอาการข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ร้ายแรง (SAE) อันเกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์

#### การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่ท่านนำไปสู่การเปิดเผยตัวตน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน ทั้งนี้ ข้อมูลของท่านจะถูกจัดเก็บ 1 ปี สถานที่เก็บ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และจะทำลายภายใน 1 ปี หลังจากสิ้นสุดโครงการวิจัยด้วยเครื่องทำลายเอกสาร

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึก ขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ รศ.ดร.ทรงภาณุเจริญ ชูทิพย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 65000 หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก จากการลงนามยินยอมของท่าน แพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

**สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย** ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของโครงการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและสำเนาเอกสารยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่

10. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชัดเจนอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร กองบริหารการวิจัย ชั้น 2 อาคารมหาธรรมราชา มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000 หมายเลขโทรศัพท์ 055968642 หมายเลขโทรสาร 055968637 ในเวลาราชการ หรือ e-mail : NU-IRB@nu.ac.th

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้



### วิธีการเก็บตัวอย่างชีววัตถุ

โครงการวิจัยนี้จะเก็บตัวอย่างเพื่อการทดสอบ 3 ช่วงเวลา Run in, Week 0, Week 12 โดยจะเก็บเลือด ปัสสาวะ และอุจจาระ ทุกครั้ง

#### การเก็บตัวอย่างเลือด และการเตรียมพลาสมา

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร (อดอาหาร 12 ชม.) โดยเจ้าหน้าที่จากไบโอแลป (Biolab) จำนวน 15 mL (10mL สำหรับไบโอแลป, 5 mL สำหรับผู้วิจัย ติดฉลาก (code) อาสาสมัครที่ EDTA tube ก่อนเจาะเลือด)
2. เลือดจำนวน 5mL จะถูกเก็บใน EDTA tube ขนาด 3 mL (Lavender-Top 3mL) จำนวน 2 หลอด
3. เมื่อบรรจุเลือดในหลอดแล้วให้เขย่าเบาๆ หันที่แบบกลับหัวไปมาประมาณ 8-10 ครั้ง
4. นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge; Hettich: Universal 320 R) ที่อุณหภูมิ  $6^{\circ}\text{C}$ , 1700g เป็นเวลา 13 นาที จะได้ชั้นพลาสมาแยกตัวออกมา (เลือด 5mL จะได้พลาสมาประมาณ 2-2.5 mL)
5. ปิเปต (Pipet-Lite XLS, Rainin) พลาสมา 200 microlitre ( $\mu\text{L}$ ) ลงใน cryovial ขนาด 1.8 mL ติดฉลากระบุชื่อตัวอย่าง วันเวลาที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ (จะได้ 10-12 vial/อาสาสมัคร 1 คน)
6. แบ่งพลาสมาจากข้อ 5 เป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 สำหรับตรวจคุณสมบัติต่างๆ (ณฐกร) อีกส่วนหนึ่งสำหรับศึกษาด้าน Metabolomic; ดร. นิหรา เนื่องจากร่างกาย เก็บ ตย. ที่ติดฉลากเรียบร้อยแล้วลงในกล่องเก็บ cryovial ขนาด 10x10
7. นำกล่องไปเก็บในตู้  $-80^{\circ}\text{C}$  (Froilabo) ทันที
8. บันทึกรายละเอียดของตัวอย่างและตำแหน่งที่เก็บลงใน Log book
9. วัสดุที่สัมผัสเลือดให้ทิ้งลงในถุงสีแดง รัดปากถุง นำไป autoclave และทิ้งลงถังขยะ
10. ทำความสะอาดบริเวณใช้งานด้วย 70% alcohol ทั้งก่อนและหลังทำงาน
11. สวมถุงมือ และเสีอกาวน้ทุกครั้งระหว่างปฏิบัติงาน
12. ควรมีผู้ปฏิบัติงานจำนวน 2 คน ทำงานไปด้วยกัน (Double check) เพื่อกันความผิดพลาดขณะปฏิบัติงาน
13. คู่มือปฏิบัติงานจะต้องวางในบริเวณปฏิบัติงาน เพื่อสามารถตรวจสอบขั้นตอนขณะปฏิบัติงานได้

#### การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ (Urine)

1. มอภฯ จะเก็บปัสสาวะที่ติดฉลากระบุ code ให้อาสาสมัครพร้อมวิธีเก็บตัวอย่าง พร้อมอธิบายขั้นตอนการเก็บด้วยวาจา
2. เก็บตัวอย่างประมาณ 5 mL

3. ถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 mL ที่ติดฉลากแล้ว
  4. นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge; Hettich:Universal 320 R) ที่อุณหภูมิ 6 °C, 1700g เป็นเวลา 13 นาที
  5. ปิเปต (Pipet-Lite XLS, Rainin) ปัสสาวะ 1 mL ลงใน cryovial ขนาด 1.8 mL ติดฉลากระบุชื่อตัวอย่าง วันเวลาที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ
  6. เก็บตย.ที่ติดฉลากเรียบร้อยแล้วลงในกล่องเก็บ cryovial ขนาด 10x10
  7. นำกล่องไปเก็บในตู้ -20°C ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ทันที
  8. บันทึกรายละเอียดของตัวอย่างและตำแหน่งที่เก็บลงใน Log book
  9. วัสดุที่สัมผัสปัสสาวะให้ทิ้งลงในถุงสีแดง รัดปากถุง นำไป autoclave และทิ้งลงถังขยะ
  10. ทำความสะอาดบริเวณใช้งานด้วย 70% alcohol ทั้งก่อนและหลังทำงาน
  11. สวมถุงมือ และเสือกาวน์ทุกครั้งระหว่างปฏิบัติงาน
  12. ควรมีผู้ปฏิบัติงานจำนวน 2 คน ทำงานไปด้วยกัน (Double check) เพื่อกันความผิดพลาดขณะปฏิบัติงาน
  13. คู่มือปฏิบัติงานจะต้องวางในบริเวณปฏิบัติงาน เพื่อสามารถตรวจสอบขั้นตอนขณะปฏิบัติงานได้
- การเก็บตัวอย่างอุจจาระ (Stool)**
1. มอภษาขณะเก็บอุจจาระที่ติดฉลากระบุ code ให้อาสาสมัครพร้อมวิธีเก็บตัวอย่าง พร้อมอธิบายขั้นตอนการเก็บด้วยวาจา
  2. เก็บตัวอย่างประมาณ 5 กรัม หรือขนาดเท่าลูกชิ้น 1 ลูก หรือ 1 ซ้อนชา ติดฉลากระบุชื่อตัวอย่าง วันเวลาที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ
  3. เก็บตย.ที่ติดฉลากเรียบร้อยแล้วลงในกล่องเก็บ
  4. นำกล่องไปเก็บในตู้ -20°C ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ทันที
  5. บันทึกรายละเอียดของตัวอย่างและตำแหน่งที่เก็บลงใน Log book
  6. วัสดุที่สัมผัสอุจจาระให้ทิ้งลงในถุงสีแดง รัดปากถุง นำไป autoclave และทิ้งลงถังขยะ
  7. ทำความสะอาดบริเวณใช้งานด้วย 70% alcohol ทั้งก่อนและหลังทำงาน
  8. สวมถุงมือ และเสือกาวน์ทุกครั้งระหว่างปฏิบัติงาน
  9. ควรมีผู้ปฏิบัติงานจำนวน 2 คน ทำงานไปด้วยกัน (Double check) เพื่อกันความผิดพลาดขณะปฏิบัติงาน
  10. คู่มือปฏิบัติงานจะต้องวางในบริเวณปฏิบัติงาน เพื่อสามารถตรวจสอบขั้นตอนขณะปฏิบัติงานได้



# APPENDIX H INFORMED CONSENT FORM

Version 2.0 Date 15/07/61

AF 05-10/4.0



Naresuan University Institutional Review Board

หนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย  
(Informed Consent Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของฟ้าพรที่มีสัลดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลาย  
ของอาสาสมัคร

วันที่ทำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่..... ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสาร  
ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดย  
สมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสาร  
ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึง  
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้  
รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการ  
ซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสีย  
ค่าใช้จ่ายและจะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วม  
การวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้า  
เท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการ  
อาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลผลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบ  
ความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติ  
ทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้  
ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการ  
ใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

Version 2.0 Date 15/07/61

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูล เพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม  
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง  
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยความงามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย  
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง  
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน  
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง  
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

## APPENDIX I IDENTIFIER FORM

<p><b>แบบฟอร์มข้อมูลทั่วไป (Identifier form)</b></p> <p>โครงการ ผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร</p> <p>(Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)</p>	<p>Patient Code</p> <div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>
<p>Inform date (day/month/year): <input type="text"/> / <input type="text"/> / 25<input type="text"/></p>	
<p><b>ข้อมูลทั่วไป (Participant general information)</b></p>	
NAME (ชื่อ-นามสกุล)	
ID citizen	
Ethnicity	
Nationality	
Date of birth (day/month/year)	
Age (years)	
Address as in the house registration	
Present address	
Telephone number	
Present house map	

Version 2.0 Date 22/01/201

. page1/2

<b>แบบฟอร์มข้อมูลทั่วไป (Identifier form)</b> โครงการ ผลของน้ำพรมะลิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)	<b>Patient Code</b> <input data-bbox="1099 360 1326 416" type="text"/>																						
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="300 589 791 622">Occupation</td> <td data-bbox="791 589 1310 622"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 622 791 678">Marital status (single/married/divorced/widow/separated)</td> <td data-bbox="791 622 1310 678"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 678 791 712">No. of children (0/1/2/...)</td> <td data-bbox="791 678 1310 712"></td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="300 757 1310 790"><b>Emergency personal contract</b></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 790 791 824">Name-Family name</td> <td data-bbox="791 790 1310 824"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 824 791 857">Relationships</td> <td data-bbox="791 824 1310 857"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 857 791 891">Telephone number</td> <td data-bbox="791 857 1310 891"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 925 791 958">Height (cm)</td> <td data-bbox="791 925 1310 958"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 958 791 992">Weight (kg)</td> <td data-bbox="791 958 1310 992"></td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="300 1037 1310 1070"><b>Education</b></td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 1070 791 1126">Can you understand, read and write in Thai language? (yes/ no)</td> <td data-bbox="791 1070 1310 1126"></td> </tr> </table>		Occupation		Marital status (single/married/divorced/widow/separated)		No. of children (0/1/2/...)		<b>Emergency personal contract</b>		Name-Family name		Relationships		Telephone number		Height (cm)		Weight (kg)		<b>Education</b>		Can you understand, read and write in Thai language? (yes/ no)	
Occupation																							
Marital status (single/married/divorced/widow/separated)																							
No. of children (0/1/2/...)																							
<b>Emergency personal contract</b>																							
Name-Family name																							
Relationships																							
Telephone number																							
Height (cm)																							
Weight (kg)																							
<b>Education</b>																							
Can you understand, read and write in Thai language? (yes/ no)																							
<p>ผู้ส่งข้อมูล ..... Date: <input data-bbox="799 1223 863 1256" type="text"/> <input data-bbox="879 1223 943 1256" type="text"/> <input data-bbox="959 1223 1023 1256" type="text"/> <input data-bbox="1038 1223 1102 1256" type="text"/> <input data-bbox="1118 1223 1182 1256" type="text"/> <input data-bbox="1198 1223 1262 1256" type="text"/></p> <p>แพทย์ผู้ตรวจฉบบ ..... Date: <input data-bbox="799 1279 863 1312" type="text"/> <input data-bbox="879 1279 943 1312" type="text"/> <input data-bbox="959 1279 1023 1312" type="text"/> <input data-bbox="1038 1279 1102 1312" type="text"/> <input data-bbox="1118 1279 1182 1312" type="text"/> <input data-bbox="1198 1279 1262 1312" type="text"/></p>																							
<p>Version 2.0 Date 22/01/2011 <span style="float: right;">page2/2</span></p>																							

## APPENDIX J SCREENING FORM

<p><b>แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)</b></p> <p>โครงการ ผลของน้ำพรมเข้มข้นที่มีผลต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร</p> <p>(Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)</p>	<p>Patient Code</p> <div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>
<p>Inform date (day/month/year):    <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/></p>	
<p><b>ข้อมูลสุขภาพ</b></p>	
<p>Sex (male/female)</p> <p>If you are female, have you got menopause?</p>	<p>(yes/ no)</p>
<p>Height (cm)</p>	
<p>Weight (kg)</p>	
<p>Body Mass Index (BMI) (calculated from kg/m<sup>2</sup>)</p>	
<p>Systolic blood pressure (mmHg)</p>	
<p>Diastolic blood pressure (mmHg)</p>	
<p>Heart rate (BPM)</p>	
<p>Smoking (Smoke or &gt;10 cigarettes daily/ Smoke or ≤ 10 cigarettes daily/ Do not smoke/ Used to smoke but quit)</p> <p>If you smoke, how many of cigarettes per day? xxx</p>	
<p>Alcohol drinking</p>	<p>(Drink a lot/ Drink occasionally/ Do not drink)</p> <p>If you drink, how frequency drinking per week? (1-7)</p>
<p>Mini-Mental State Examination: Thai version (MMSE-Thai 2002) (score 0 - 30)</p>	
<p>Have you got a dementia? (yes/no)</p>	
<p>Have you got a schizophrenia? (yes/no)</p>	
<p>Thai Geriatric Depression Scale (TGDS) (score 0 - 30)</p>	
<p>Version 2.0 Date 22/01/201</p>	<p>page 1/12</p>

แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)		Patient Code																				
โครงการ ผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดฝอยปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input type="text"/>																				
<table border="1"> <tr> <td>Have you been seriously ill or received a severe accident or operation during the past 2 years? (yes /no)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>If so, please specify details</td> <td></td> </tr> </table>			Have you been seriously ill or received a severe accident or operation during the past 2 years? (yes /no)		If so, please specify details																	
Have you been seriously ill or received a severe accident or operation during the past 2 years? (yes /no)																						
If so, please specify details																						
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">Drug using</td> </tr> <tr> <td>Addictive drug (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Name of addictive drugs (if do drug)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Number of addictive drugs per day (if do drug)</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Herbal supplement (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)</td> </tr> <tr> <td>Name of herbal supplement (if do drug)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Number of herbal supplement per day (if do drug)</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Other dietary supplements, i.e. vitamin C, calcium, etc. (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)</td> </tr> <tr> <td>Name of others supplements (if do drug)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Number of other supplements per day (if do drug)</td> <td></td> </tr> </table>			Drug using		Addictive drug (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)		Name of addictive drugs (if do drug)		Number of addictive drugs per day (if do drug)		Herbal supplement (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)		Name of herbal supplement (if do drug)		Number of herbal supplement per day (if do drug)		Other dietary supplements, i.e. vitamin C, calcium, etc. (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)		Name of others supplements (if do drug)		Number of other supplements per day (if do drug)	
Drug using																						
Addictive drug (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)																						
Name of addictive drugs (if do drug)																						
Number of addictive drugs per day (if do drug)																						
Herbal supplement (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)																						
Name of herbal supplement (if do drug)																						
Number of herbal supplement per day (if do drug)																						
Other dietary supplements, i.e. vitamin C, calcium, etc. (Do drug/ Do not do drug/ Used to do drug but quit)																						
Name of others supplements (if do drug)																						
Number of other supplements per day (if do drug)																						
Version 2.0 Date 22/01/201		page2/12																				

<b>แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)</b> โครงการ ผลของน้ำพรมสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)	Patient Code <input data-bbox="1086 365 1337 421" type="text"/>
Have you got other personal illnesses? (yes/no)	
If so; specific details: the name of the illness:	
The doctor (if any):	
The medical institution:	
ท่านเป็นโรคตับ หรือไม่?	
ท่านเป็นโรคไต หรือไม่?	
ท่านเป็นโรคเบาหวาน หรือไม่?	
ท่านเป็นโรคมะเร็ง หรือไม่?	
ท่านเป็นโรคหลอดเลือดสมอง (stroke) หรือไม่?	
ท่านเป็นโรคความดันโลหิตสูง หรือไม่?	
ท่านมีภาวะไขมันในเลือดสูงที่ได้รับยาเพื่อการรักษาหรือไม่?	
ผู้ลงข้อมูล ..... Date: <input data-bbox="798 1576 853 1615" type="text"/> <input data-bbox="853 1576 909 1615" type="text"/> <input data-bbox="909 1576 965 1615" type="text"/> <input data-bbox="965 1576 1021 1615" type="text"/> <input data-bbox="1021 1576 1077 1615" type="text"/>	
แพทย์ผู้ตรวจสอบ ..... Date: <input data-bbox="798 1637 853 1675" type="text"/> <input data-bbox="853 1637 909 1675" type="text"/> <input data-bbox="909 1637 965 1675" type="text"/> <input data-bbox="965 1637 1021 1675" type="text"/> <input data-bbox="1021 1637 1077 1675" type="text"/>	
Version 2.0 Date 22/01/201	page3/12

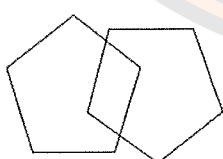
แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)		Patient Code		
โครงการ ผลของน้ำพรมโสมเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input type="text"/>		
ภาวะซึมเศร้า (แบบวัดความซึมเศร้าในผู้สูงอายุของไทย Thai Geriatric Depression Scale : TGDS)				
ลำดับ	ในช่วง 1 สัปดาห์ที่ผ่านมา	ใช่	ไม่ใช่	คะแนน
1.	ท่านพอใจกับชีวิตความเป็นอยู่ตอนนี้			
2.	ท่านไม่ชอบทำอะไรในสิ่งที่เคยสนใจหรือเคยทำเป็นประจำ			
3.	ท่านรู้สึกชีวิตของท่านช่วงนี้ว่างเปล่าไม่รู้จะทำอะไร			
4.	ท่านรู้สึกเบื่อหน่ายบ่อยๆ			
5.	ท่านหวังว่าจะมีสิ่งที่ดีเกิดขึ้นในวันหน้า			
6.	ท่านมีเรื่องกังวลตลอดเวลา และเลิกคิดไม่ได้			
7.	ส่วนใหญ่แล้วท่านรู้สึกอารมณ์ดี			
8.	ท่านรู้สึกกลัวว่าจะมีเรื่องไม่ดีเกิดขึ้นกับท่าน			
9.	ส่วนใหญ่ท่านรู้สึกมีความสุข			
10.	บ่อยครั้งที่ท่านรู้สึกไม่มีที่พึ่ง			
11.	ท่านรู้สึกกระวนกระวาย กระสับการส่ายบ่อยๆ			
12.	ท่านชอบอยู่กับบ้านมากกว่าที่จะออกนอกบ้าน			
13.	บ่อยครั้งที่ท่านรู้สึกวิตกกังวลเกี่ยวกับชีวิตข้างหน้า			
14.	ท่านคิดว่าความจำท่านไม่ดีเท่ากับคนอื่น			
15.	การที่มีชีวิตอยู่ถึงปัจจุบันนี้เป็นเรื่องที่น่ายินดีหรือไม่			
16.	ท่านรู้สึกหมดกำลังใจหรือเศร้าใจบ่อยๆ			
17.	ท่านรู้สึกว่าชีวิตท่านค่อนข้างไม่มีคุณค่า			
18.	ท่านรู้สึกกังวลมากกว่าชีวิตที่ผ่านมา			
19.	ท่านรู้สึกว่าชีวิตนี้มีเรื่องน่าสนุกอีกมาก			
20.	ท่านรู้สึกลำบากที่จะเริ่มต้นทำอะไรใหม่			
21.	ท่านรู้สึกกระตือรือร้น			
22.	ท่านรู้สึกสิ้นหวัง			
23.	ท่านคิดว่าคนอื่นดีกว่าท่าน			
24.	ท่านอารมณ์เสียง่ายกับเรื่องเล็กๆน้อยๆ อยู่เสมอ			
25.	ท่านรู้สึกอยากร้องไห้บ่อยๆ			
26.	ท่านมีความตั้งใจทำอะไรสิ่งหนึ่งได้ไม่นาน			
Version 2.0 Date 22/01/201		page4/12		

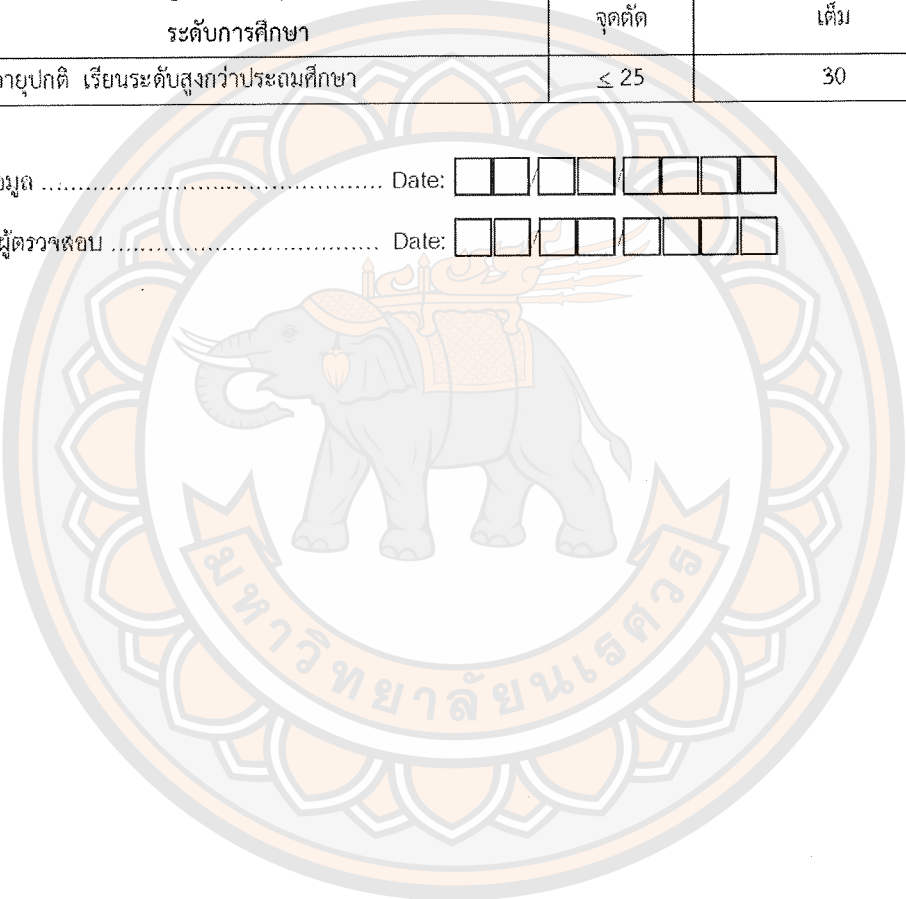


แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)		Patient Code	
โครงการ ผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input type="text"/>	
27.	ท่านรู้สึกสดชื่นในเวลาตื่นนอนตอนเช้า		
28.	ท่านไม่ชอบพบปะพูดคุยกับคนอื่น		
29.	ท่านตัดสินใจอะไรได้เร็ว		
30.	ท่านมีจิตใจสบายแจ่มใสเหมือนก่อน		
รวม			
<b>หมายเหตุ</b> 1. การคิดคะแนน ข้อ 1,5,7,9,15,19,21,27,29,30 ถ้าตอบว่า "ไม่ใช่" ได้ 1 คะแนน ข้อที่เหลือถ้าตอบว่า "ใช่" ได้ 1 คะแนน 2. การแปลผล * ผู้สูงอายุปกติ คะแนน 0 - 12 คะแนน * ผู้มีความเศร้าเล็กน้อย (Mild depression) คะแนน 13 - 18 คะแนน * ผู้มีความเศร้าปานกลาง (Moderate depression) คะแนน 19 - 24 คะแนน * ผู้มีความเศร้ารุนแรง (Severe depression) คะแนน 25 - 30 คะแนน			
ผู้ลงข้อมูล .....		Date: <input type="text"/>	
แพทย์ผู้ตรวจสอบ .....		Date: <input type="text"/>	
Version 2.0 Date 22/01/201		page5/12	

แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)		Patient Code
โครงการ ผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input type="text"/>
สภาวะสมอง (แบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้น ฉบับภาษาไทย : MMSE -Thai 2002)		
	บันทึกคำตอบทุกครั้ง ( ทั้งคำตอบที่ถูกและผิด )	คะแนน
<b>1.Orientation for Time (5 คะแนน)</b> (ตอบถูกข้อละ 1 คะแนน)		
1.1	วันนี้ วันที่เท่าไร	
1.2	วันนี้ วันอะไร	
1.3	เดือนนี้ เดือนอะไร	
1.4	ปีนี้ ปีอะไร	
1.5	ฤดูนี้ ฤดูอะไร	
<b>2.Orientation for Place (5 คะแนน) (ให้เลือกทำข้อใดข้อหนึ่ง) (ตอบถูกข้อละ 1 คะแนน)</b>		
กรณีอยู่ที่บ้านพักคนชรา		
2.1	สถานที่ตรงนี้ เรียกว่าอะไร และ.....ชื่อว่าอะไร	
2.2	ขณะนี้ อยู่ที่ชั้นเท่าไรของตัวอาคาร	
2.3	ที่นี่อยู่ในอำเภอ - เขตอะไร	
2.4	ที่นี่จังหวัดอะไร	
2.5	ที่นี่ภาคอะไร	
<b>3. Registration (3 คะแนน)</b>		
ต่อไปนี้เป็นการทดสอบความจำ ผม (ดิฉัน) จะบอกชื่อของสามอย่าง คุณ (ตา,ยาย,...) ตั้งใจฟังให้ดีนะ เพราะจะบอกเพียงครั้งเดียว ไม่มีการบอกซ้ำอีก เมื่อ ผม (ดิฉัน) พูดจบ ให้คุณ (ตา,ยาย,...) พูดทบทวนตามที่ได้ยินให้ครบทั้งสามชื่อ แล้วพยายามจำไว้ให้ดี เดี่ยวผม (ดิฉัน) จะถามซ้ำ * การบอกชื่อแต่ละคำให้ห่างกันประมาณ 1 วินาที ต้องไม่ซ้ำหรือเร็วเกินไป (ตอบถูก 1 คำ ได้ 1 คะแนน)		
( )	ดอกไม้ ( )	แม่น้ำ ( )
( )	รถไฟ ( )	รถยนต์ ( )
( )	ต้นไม้ ( )	ทะเล ( )
( )	รถยนต์ ( )	รถจักรยาน ( )

แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)		Patient Code
โครงการ ผลของน้ำหมอมัสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input style="width: 100px; height: 20px;" type="text"/>
	บันทึกคำตอบทุกครั้ง ( ทั้งคำตอบที่ถูกและผิด )	คะแนน
<b>4. Attention /Calculation (5 คะแนน) ให้เลือกทำข้อใดข้อหนึ่ง</b>		
ข้อนี้เป็นการคิดเลขในใจ เพื่อทดสอบสมาธิ คุณ (ตา,ยาย...) คิดเลขในใจเป็นไหม?		
* ถ้าตอบคิดเป็นให้ตอบข้อ 4.1 * ถ้าตอบคิดไม่เป็นหรือไม่ตอบ ให้ตอบข้อ 4.2		
<b>4.1</b> “ข้อนี้คิดในใจ เอา 100 ตั้ง ลบออกทีละ 7 ไปเรื่อยๆ ได้ผลลัพธ์เท่าไร บอกมา”		
บันทึกตัวเลขไว้ทุกครั้ง ( ทั้งคำตอบที่ถูกหรือผิด ) ทำทั้งหมด 5 ครั้ง ถ้าลบได้ 1, 2 หรือ 3 แล้วตอบไม่ได้ ให้คิดคะแนนเท่าที่ทำได้ โดยไม่ต้องย้ายไปทำข้อ 4.2		
<b>4.2</b> “ผม (ดิฉัน) สกกดคำว่ามะนาว ให้คุณ (ตา,ยาย,...) ฟัง แล้วให้คุณ (ตา,ยาย,...) สกกดถอยหลังจากพยัญชนะตัวหลังไปตัวแรก”		
คำว่า มะนาว สกกดว่า มอม่่า-สระอะ-นอหนู-สระอา-วอแหวน โหนคุณ (ตา,ยาย,...) สกกดถอยหลังให้ฟังสิ		
..... ว    า    น    ะ    ม		
<b>5. Recall (3 คะแนน)</b>		
“เมื่อสักครู่นี้จำของ 3 อย่าง จำได้ไหม มีอะไรบ้าง”		
(ตอบถูก 1 คำ ได้ 1 คะแนน)		
( ) ดอกไม้ ( ) แม่น้ำ ( ) รถไฟ		
( ) ต้นไม้ ( ) ทะเล ( ) รถยนต์		
<b>6. Naming (2 คะแนน)</b>		
<b>6.1</b> ยืนดินสอให้ผู้สูงอายุแล้วถามว่า “ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร”		
<b>6.2</b> ชี้นำหิภา่มือให้ผู้สูงอายุแล้วถามว่า “ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร”		
<b>7. Repetition (1 คะแนน)</b>		
(พูดตามได้ถูกต้องได้ 1 คะแนน)		
“ตั้งใจฟังผม (ดิฉัน) นะ เมื่อผม (ดิฉัน) ให้คุณ (ตา,ยาย,...) พูดตาม		
Version 2.0 Date 22/01/201		page 7/9

แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)		Patient Code
โครงการ ผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>
ผม (ดิฉัน) จะบอกเพียงเที่ยวเดียว ” “ใคร ใคร ชาย ไก่ ไข่”		
8. Verbal command (3 คะแนน) “ฟังดีดิ้นนะ เดี่ยวผม (ดิฉัน) จะส่งกระดาษให้ แล้วคุณ (ตา,ยาย,..) รับด้วยมือขวา พับครึ่งแล้ววางที่..... (พื้น, โต๊ะ, เติง) ผู้ทดสอบแสดงกระดาษเปล่า ขนาดประมาณ เอ - 4 ไม่มีรอยพับ ให้ผู้สูงอายุ ( ) รับด้วยมือขวา ( ) พับครึ่ง ( ) แล้ววางที่... (พื้น,โต๊ะ,เตียง)		
9. Written command (3 คะแนน) ต่อไปนี้เป็นคำสั่งที่เขียนเป็นตัวหนังสือ ต้องการให้คุณ (ตา,ยาย,..) อ่านแล้วทำตาม คุณ (ตา,ยาย,..) จะอ่านออกเสียงหรือในใจก็ได้ ผู้ทดสอบแสดงกระดาษให้ผู้สูงอายุดู <div style="text-align: center;"><b>หลับตา</b></div> ( ) หลับตาได้		
10. Writing (1 คะแนน) ข้อความนี้เป็นคำสั่งให้คุณ (ตา,ยาย,..) เขียนข้อความอะไรก็ได้ ที่ อ่านแล้วรู้เรื่อง หรือมีความหมายมา 1 ประโยค .....		
11. Visuo-construction (1 คะแนน) ข้อนี้เป็นคำสั่ง “จงวาดให้เหมือนภาพตัวอย่าง” ในที่ว่างด้านข้าง ของภาพตัวอย่าง <div style="text-align: center;">  </div> รูปห้าเหลี่ยมต้องมีมุม 5 มุม ตามภาพตัวอย่าง การตัดกันต้องเกิด รูปสี่เหลี่ยมด้านในทำตามได้ทั้งหมดจึงจะได้คะแนน 1 คะแนน		
<b>คะแนนรวม</b>		
Version 2.0 Date 22/01/201		page5/9

แบบฟอร์มคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form)		Patient Code						
โครงการ ผลของน้ำพรมิถัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input type="text"/>						
จุดตัด Cut-off สำหรับคะแนนที่สงสัยภาวะสมองเสื่อม (Congenital impaired) ระดับการศึกษา		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">คะแนน</th> </tr> <tr> <th>จุดตัด</th> <th>เต็ม</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับสูงกว่าประถมศึกษา</td> <td>≤ 25      30</td> </tr> </tbody> </table>	คะแนน		จุดตัด	เต็ม	- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับสูงกว่าประถมศึกษา	≤ 25      30
คะแนน								
จุดตัด	เต็ม							
- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับสูงกว่าประถมศึกษา	≤ 25      30							
ผู้ลงทะเบียน ..... Date: <input type="text"/>								
แพทย์ผู้ตรวจหาข้อบ ..... Date: <input type="text"/>								
								
Version 2.0 Date 22/01/201		page9/9						

## APPENDIX K CASE REPORT FORM

<b>แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล (Case report form)</b> โครงการ ผลของน้ำพรมขมิ้นเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		Patient Code <input type="text"/>
Inform date (day/month/year): <input type="text"/> / <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/>		
ผู้ลงข้อมูล ..... Date: <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>		
<u>ชั่งน้ำหนักและวัดความดันโลหิต</u>		
<b>ชั่งน้ำหนัก</b> .....kg		
<b>ความดันโลหิต</b>	Systolic blood pressure.....mmHg	
	Diastolic blood pressure.....mmHg	
	Heart rate.....BPM	
<b>รอบเอว</b> Waist circumference (cm)		
<b>รอบสะโพก</b> Hip circumference (cm)		
<b>Waist/Hip ratio</b>		
Version 3.1 Date 161118		page17

<p><b>แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล (Case report form)</b></p> <p>โครงการ เภสัชกรรมบำบัดที่คิดค้นขึ้นเพื่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร</p> <p>(Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)</p>	<p style="text-align: center;">Patient Code</p> <div style="border: 1px solid black; height: 20px; width: 100%;"></div>			
<p>Inform date (day/month/year):    <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / 25 <input type="text"/> <input type="text"/></p>				
<p>ผู้ลงข้อมูล ..... Date: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p>ผู้ตรวจสอบข้อมูล ..... Date: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p>				
<p><b>การประเมินความจำ</b></p>				
<p>Task</p>	<p>วิธีการ</p>	<p>ประเด็นประเมิน</p>	<p>ผลการประเมิน</p>	<p>ข้อสังเกต แต่ละ Task</p>
<p>1. Word recognition</p>	<p>การจำคำศัพท์ภาษาไทย (มีทั้งหมด 15 คำ) แล้วเมื่อปรากฏคำในอีกครั้ง ให้กรณุ่ม (ใช่/ไม่ใช่) ให้ถูกต้องและเร็วที่สุด</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Number of correct answers</li> <li>- Number of incorrect answers</li> <li>- Accuracy (%)</li> <li>- Average response time (correct) (ms)</li> <li>- Average response time (incorrect) (ms)</li> </ul>	<p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>.....</p>
<p>2. Picture recognition</p>	<p>การจำภาพ (มีทั้งหมด 20 ภาพ) แล้วเมื่อปรากฏภาพนั้นอีกครั้ง ให้กรณุ่ม (ใช่/ไม่ใช่) ให้ถูกต้องและเร็วที่สุด</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Number of correct answers</li> <li>- Number of incorrect answers</li> <li>- Accuracy (%)</li> <li>- Average response time (correct) (ms)</li> <li>- Average response time (incorrect) (ms)</li> </ul>	<p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>.....</p>
<p>3. Simple reaction time</p>	<p>เมื่อคำว่า "ใช่" ปรากฏ ให้กรณุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Average reaction time (ms)</li> </ul>	<p>.....</p>	<p>.....</p>
<p>4. Digit vigilance task</p>	<p>"ตัวเลขเป้าหมาย" และบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ทางหน้าจอ จากนั้นจะมีลำดับตัวเลขปรากฏทีละตัวเลขตรงกลางจอคอมพิวเตอร์ เมื่อมีตัวเลขตรงกลางจอตรงกับตัวเลขเป้าหมาย ให้กรณุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Average reaction time (ms)</li> <li>- Accuracy (%)</li> <li>- Number of false alarms (times)</li> <li>- จำนวนครั้งที่คลิกทั้งหมด (Number of total clicks) (times)</li> </ul>	<p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>.....</p>
<div style="border: 1px solid black; height: 30px; width: 100%;"></div> <p>comments</p>				
<p>Version 3.1 Date 161118 <span style="float: right;">page 2/7</span></p>				

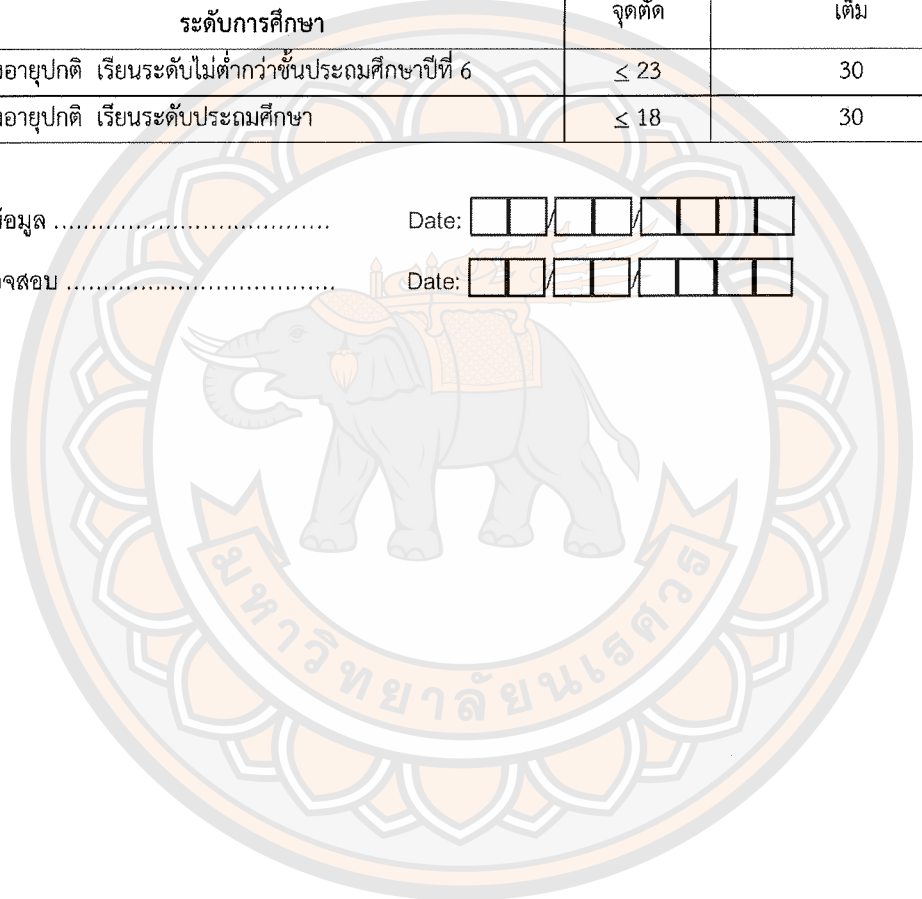
แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล (Case report form)				Patient Code
โครงการ ผลของน้ำพรมืดกึ่งเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร				<input style="width: 100px; height: 20px;" type="text"/>
(Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)				
Task	วิธีการ	ประเด็นประเมิน	ผลการประเมิน	ข้อสังเกต แต่ละ Task
5. Choice reaction time	เมื่อคำว่า "ไฟ" ปรากฏ ให้กดปุ่ม (ใช่) หรือ คำว่า "ไม่ใช่" ปรากฏ ให้กดปุ่ม (ไม่ใช่) ให้เร็วที่สุด	- Average reaction time (ms) - Accuracy (%)	..... .....	
	6. Spatial working memory	มีชื่อหน้าต่างบ้าน ๑ บ้าน ซึ่งปรากฏแสงสว่าง ๔ บ้าน (ตำแหน่ง) จากนั้นเมื่อต่างบ้าน จะ ปรากฏแสง ถ้าตรงกับ ตำแหน่งแรก ให้กดปุ่ม (ใช่) ถ้าไม่ตรงกับ ตำแหน่งแรก ให้กดปุ่ม (ไม่ใช่) ให้เร็วที่สุด	- Number of correct answers - Number of incorrect answers - Accuracy (%) - Average response time (correct) (ms) - Average response time (incorrect) (ms)	..... ..... ..... ..... .....
7. Numeric working memory	มีลำดับตัวเลขปรากฏ 5 ตัวเลข จากนั้น หนึ่งในตัวเลขจะปรากฏ ถ้าตรงกับตัวเลขแรก ให้กดปุ่ม (ใช่) ถ้าไม่ตรงกับตัวเลขแรก ให้กดปุ่ม (ไม่ใช่)	- Number of correct answers - Number of incorrect answers - Accuracy (%) - Average response time (correct) (ms) - Average response time (incorrect) (ms)	..... ..... ..... ..... .....	
	comments			
Version 3.1 Date 151118				Page 3/7



แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล (Case report form)		Patient Code	
โครงการ ผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input style="width: 100px; height: 20px;" type="text"/>	
<b>สภาพสมอง (แบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้น ฉบับภาษาไทย : MMSE -Thai 2002)</b>			
	บันทึกคำตอบทุกครั้ง (ทั้งคำตอบที่ถูกต้องและผิด)	คะแนน	หมายเหตุ/ ตัวอย่างคำตอบ
<b>1.Orientation for Time (5 คะแนน)</b> (ตอบถูกข้อละ 1 คะแนน)			
1.1 วันนี้ วันที่เท่าไร			
1.2 วันนี้ วันอะไร			จันทร์, อังคาร พุธ, ...
1.3 เดือนนี้ เดือนอะไร			มกราคม, กุมภาพันธ์, ... หรือเดือนแบบไทยเดิม เดือน 1 ตรงกับธันวาคม เดือน 2 ตรงกับมกราคม
1.4 ปีนี้ ปีอะไร			2561
1.5 ช่วงเวลานี้ เวลาอะไรของวัน			เช้า(ก่อนเที่ยง), บ่าย(หลังเที่ยง), เย็นหรือค่ำ
<b>2.Orientation for Place (5 คะแนน)</b> (ตอบถูกข้อละ 1 คะแนน)			
2.1 ขณะนี้ เรียกว่าคณะอะไร			คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
2.2 ขณะนี้ อยู่ที่ชั้นเท่าไรของตัวอาคาร			
2.3 ที่นี้อยู่ในอำเภออะไร			
2.4 ที่นี้อยู่ในจังหวัดอะไร			
2.5 ที่นี้อยู่ในภาคอะไร			
<b>3. Registration (3 คะแนน)</b>			
ต่อไปนี้เป็นารทดสอบความจำ ผม (ดิฉัน) จะบอกชื่อของ สามอย่าง คุณ (ตา,ยาย,...) ตั้งใจฟังให้ดีนะ เพราะจะบอก เพียงครั้งเดียว ไม่มีการบอกซ้ำอีก เมื่อ ผม (ดิฉัน) พูดจบ ให้คุณ (ตา,ยาย,...) พูดทบทวนตามที่ได้ยินให้ครบทั้งสามชื่อ แล้วพยายามจำไว้ให้ดี เดี่ยวผม (ดิฉัน) จะถามซ้ำ ( ) ท้องนา ( ) ภูเขา ( ) ถนน	( ) ท้องนา ( ) ภูเขา ( ) ถนน		การบอกชื่อแต่ละคำให้ ห่างกันประมาณ 1 วินาที ต้องไม่ซ้ำหรือเร็วเกินไป (ตอบถูก 1 คำ - ได้ 1 คะแนน) (ให้พูดครบ 3 คำก่อน แล้วค่อยทวน)
Version 3.1 Date 151118		page4/7	

แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล (Case report form)		Patient Code
โครงการ ผลของน้ำพรมสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<input style="width: 100px; height: 20px;" type="text"/>
	บันทึกคำตอบทุกครั้ง	คะแนน
<b>4. Attention /Calculation (5 คะแนน)</b> ให้เลือกทำข้อใดข้อหนึ่ง ข้อนี้เป็นการคิดเลขในใจ เพื่อทดสอบสมาธิ คุณ (ตา,ยาย...) คิดเลขในใจเป็นไหม? * ถ้าตอบ "คิดเป็น" ให้ทำข้อ 4.1 * ถ้าตอบ "คิดไม่เป็นหรือไม่ตอบ" ให้ทำข้อ 4.2		
<b>4.1</b> "ข้อนี้คิดในใจ เอา 100 ตั้ง ลบออกทีละ 7 ไปเรื่อย ๆ 5 ครั้ง ได้ผลลัพธ์เท่าไร" ค่อย ๆ คิดได้	..... 93 86 79 72 65	บันทึกตัวเลขไว้ ทุกครั้ง (ทั้งคำตอบที่ถูก หรือผิด)
<b>4.2</b> "ผม (ดิฉัน) สกกดคำว่ามะนาว ให้คุณ (ตา,ยาย,...) ฟัง แล้วให้คุณ (ตา,ยาย,...) สกกดรอยหลังจากพยัญชนะตัวหลังไปตัวแรก" คำว่า มะนาว สกกดว่า มอม่่า-สระอะ-นอหนู-สระอา-วอแหวน ไท่นคุณ (ตา,ยาย,...) สกกดรอยหลังให้ฟังซิ ค่อย ๆ คิดได้	..... ว า น ะ ม	
<b>5. Recall (3 คะแนน)</b> "เมื่อสักครู่นี้ให้จำของ 3 อย่าง จำได้ไหม มีอะไรบ้าง" ค่อย ๆ คิดได้	<input type="checkbox"/> ท้องถิ่น <input type="checkbox"/> ภูเขา <input type="checkbox"/> ถนน	(ตอบถูก 1 คำ ได้ 1 คะแนน)
<b>6. Naming (2 คะแนน)</b>		
<b>6.1</b> ยืน แหวน ให้ผู้สูงอายุแล้วถามว่า "ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร"		
<b>6.2</b> ซี่ แวนตา ให้ผู้สูงอายุดูแล้วถามว่า "ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร"		
<b>7. Repetition (1 คะแนน)</b>		
"ตั้งใจฟังผม (ดิฉัน) นะ เมื่อผม (ดิฉัน) ให้คุณ (ตา,ยาย,...) พูดยตามผม (ดิฉัน) จะบอกเพียงเที่ยวเดียว" "ใคร ใคร ชาย ไก่ ไช้"		(พูดตามได้ ถูกต้องได้ 1 คะแนน)
Version 3.1 Date 151118		page5/7

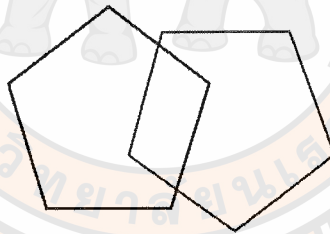
แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล (Case report form)		Patient Code
โครงการ ผลของน้ำพรมัดกัฒเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div>
	บันทึกคำตอบทุกครั้ง	คะแนน
<b>8. Verbal command (3 คะแนน)</b>		
“ฟังดีทีนะ เตี่ยวम्म (ดีฉัน) จะส่งกระดาษให้ แล้วคุณ (ตา,ยาย,..) รับผิดชอบต่อมือขวา พับครึ่ง แล้ววางบนโต๊ะ ผู้ทดสอบแสดงกระดาษเปล่า ขนาดประมาณ เอ - 4 ไม่มีรอยพับ ให้ผู้สูงอายุ ( ) รับผิดชอบต่อมือขวา ( ) พับครึ่ง ( ) แล้ววางบนโต๊ะ	<input type="checkbox"/> รับผิดชอบต่อมือขวา <input type="checkbox"/> พับครึ่ง <input type="checkbox"/> แล้ววางบนโต๊ะ	ทำตามคำสั่ง ถูก 1 คำ ได้ 1 คะแนน
<b>9. Written command (1 คะแนน)</b>		
ต่อไปนี้เป็นคำสั่งที่เขียนเป็นตัวหนังสือ ต้องการให้คุณ (ตา,ยาย,..) อ่านแล้วทำตาม คุณ (ตา,ยาย,..) จะอ่านออกเสียงหรือในใจก็ได้ ผู้ทดสอบแสดงกระดาษให้ผู้สูงอายุดู <div style="text-align: center;">กำมือ</div>	<input type="checkbox"/> กลับตา	
<b>10. Writing (1 คะแนน)</b>		
ข้อความนี้เป็นคำสั่งให้คุณ (ตา,ยาย,..) เขียนข้อความอะไรก็ได้ ที่ อ่านแล้วรู้เอง หรือมีความหมายมา 1 ประโยค .....		
<b>11. Visuo-construction (1 คะแนน)</b>		
ข้อนี้เป็นคำสั่ง “จงวาดให้เหมือนภาพตัวอย่าง” ในที่ว่างด้านข้าง ของภาพตัวอย่าง <div style="text-align: center;">  </div>		รูปห้าเหลี่ยมต้องมีมุม 5 มุม ตามภาพ ตัวอย่าง การตัดกัน ต้องเกิดรูปสี่เหลี่ยม ด้านในทำตามได้ ทั้งหมดจึงจะได้ คะแนน 1 คะแนน
<b>คะแนนรวม</b>		

<b>แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล (Case report form)</b> โครงการ ผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)		Patient Code <input type="text"/>														
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">จุดตัด Cut-off สำหรับคะแนนที่สงสัยภาวะสมองเสื่อม</th> <th colspan="2">คะแนน</th> </tr> <tr> <th>จุดตัด</th> <th>เต็ม</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ระดับการศึกษา</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับไม่ต่ำกว่าชั้นประถมศึกษาปีที่ 6</td> <td>≤ 23</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับประถมศึกษา</td> <td>≤ 18</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			จุดตัด Cut-off สำหรับคะแนนที่สงสัยภาวะสมองเสื่อม	คะแนน		จุดตัด	เต็ม	ระดับการศึกษา			- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับไม่ต่ำกว่าชั้นประถมศึกษาปีที่ 6	≤ 23	30	- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับประถมศึกษา	≤ 18	30
จุดตัด Cut-off สำหรับคะแนนที่สงสัยภาวะสมองเสื่อม	คะแนน															
	จุดตัด	เต็ม														
ระดับการศึกษา																
- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับไม่ต่ำกว่าชั้นประถมศึกษาปีที่ 6	≤ 23	30														
- ผู้สูงอายุปกติ เรียนระดับประถมศึกษา	≤ 18	30														
ผู้ลงข้อมูล ..... Date: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	ผู้ตรวจสอบ ..... Date: <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>															
																
Version 3.1 Date 151118		page7/7														

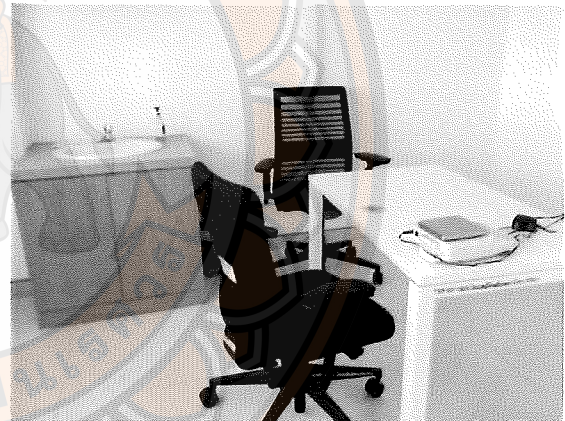
Code BMEs \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

(ข้อ 10) เขียนข้อความอะไรก็ได้ ที่อ่านแล้วรู้เรื่อง

(ข้อ 11) จงวาดให้เหมือนภาพตัวอย่าง



**APPENDIX L THE SITE VISIT IN FACULTY OF MEDICAL SCIENCE AND  
THE COS-NAT**



## APPENDIX M PROTOCOL SYNOPSIS

สรุปโครงการเพื่อการพิจารณาทางจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

(Protocol Synopsis for Ethical Review)

Approval  
-- 1 ส.ค. 2562  
NU-IRB

1. ชื่อโครงการ (Proposal Title)

ภาษาไทย (Thai): ผลของน้ำพรมมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร

ภาษาอังกฤษ (English): Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers

2. ชื่อคณะผู้วิจัย (Investigators)

2.1 ผู้วิจัยหลัก: รศ.ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์

สังกัด: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
(Ph.D. in Physiology & Pharmacology)

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: หัวหน้าโครงการวิจัย ทำวิจัยและตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):

- ผ่านการอบรม เรื่อง “แนวทางการวิจัยทางคลินิกตามมาตรฐานการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (Good Clinical Practice: ICH-GCP)” วันที่ 1-2 มิถุนายน พ.ศ. 2560 ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
- ผ่านการอบรม “Two-day intensive course on the principles of Good Clinical Practise (GCP) training” วันที่ 4-5 มิถุนายน 2558 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดย Thailand Center of Excellence for Life Sciences (TCELS) & Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University & Medical Research Network of the Consortium of Thai Medical Schools

2.2 ผู้วิจัยร่วม: รศ.ดร. กรรณก อิงคนินันท์

สังกัด: ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
(Ph.D. in Pharmacognosy)

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: คัดเลือกอาสาสมัคร ทำวิจัยและตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):

- ผ่านการอบรมเรื่องหลักจริยธรรมและการขอรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร วันที่ 7 สิงหาคม พ.ศ. 2558 ณ ห้องประชุมไขยานุภาพ 2 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ม.นเรศวร ร่วมกับคณะเภสัชศาสตร์ ม.นเรศวร
- ผ่านการอบรม Good clinical practice (GCP) training “Two-day intensive course on the principles of GCP Training” ระหว่างวันที่ 16-17 มีนาคม 2560 ณ ห้องสัมมนาเอกาทศรถ

มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดย Thailand Center of Excellence for Life Sciences (TCELS) ร่วมกับ MedResNet

### 2.3 ผู้วิจัยร่วม: รศ.ดร. เนติ วรรณุช

สังกัด: ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
(Ph.D. in Pharmaceutics)

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย (Research Responsibility): คัดเลือกอาสาสมัคร ทำวิจัยและตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):

- การอบรม Two-day intensive course on the principles of Good Clinical Practice (GCP) Training วันที่ 4-5 มิถุนายน พ.ศ. 2558 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดย Thailand Center of Excellence for Life Sciences (TCELS) & Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University & Medical Research Network of the Consortium of Thai Medical Schools

### 2.4 ผู้วิจัยร่วม: นายแพทย์ พีระพงศ์ เขียวรัตน์

สังกัด: ภาควิชาศัลยศาสตร์ หน่วยงานศัลยกรรมประสาท คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย (Research Responsibility): คัดเลือกอาสาสมัคร ประเมินสภาพสมองและสภาวะซึมเศร้าในอาสาสมัคร และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):

- ผ่านการอบรม The Good Clinical Practices (GCP) six-hour required course จัดโดย The National Institute on Drug Abuse (NIDA) Center for Clinical Trials (CCTN) Clinical Trials Network (CTN) วันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ.2559

### 2.5 ผู้วิจัยร่วม: อาจารย์ วัชรา แก้วมหานิล

สังกัด: ภาควิชาเทคโนโลยีหัวใจและทรวงอก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย (Research Responsibility): ทำวิจัยประเมินการไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ (carotid blood flow) และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):



- อบรม Good clinical practice (GCP) training "Two-day intensive course on the principles of GCP Training" ระหว่างวันที่ 16-17 มีนาคม 2560 ณ ห้องสัมมนาเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดย TCELS ร่วมกับ MedResNet

- อบรมหลักสูตร Human Subject Protection Course ประกาศนียบัตรมีผลตั้งแต่วันที่ 23 มกราคม 2560 ถึง 23 มกราคม 2563 ณ ห้องสัมมนาเอกาทศรถ 210-211 อาคารเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

## 2.6 ผู้วิจัยร่วม: ผศ.ดร. จันทร์จิรา วสุนทรวัฒน์

สังกัด: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

(Ph.D. in Biomedical Sciences)

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย (Research Responsibility): ทำวิจัยประเมินความจำ (memory) และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):

- Two-day intensive course on the principles of good clinical practice (GCP) training จัดโดย Naresuan university institutional review board & TCELS & medical research network of the consortium of Thai medical schools & Faculty of medicine, Naresuan university วันที่ 27-28 เมษายน 2559 ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยนเรศวร

- Human subject protection course จัดโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ วันที่ 24 มีนาคม 2560 ณ ห้องสัมมนาเอกาทศรถ 211 อาคารเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร

## 2.7 ผู้วิจัยร่วม: ผศ.ดร. อรรระวี คงสมบัติ

สังกัด: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

(Ph.D. in Physiology)

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: คัดเลือกอาสาสมัคร ทำวิจัยประเมินความจำ (memory) และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):

- อบรม Good Clinical Practice: GCP Training ในวันที่ 14-15 ธันวาคม 2560 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดย โดย วช. (NRCT) & เครือข่ายวิจัยกลุ่มสถาบันแพทยศาสตร์แห่งประเทศไทย (MedResNet)

- อบรมเรื่อง Basic human subject protection course ในวันที่ 11 พฤษภาคม 2558 ณ ห้อง Slop 232 คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จัดโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ร่วมกับคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

- อบรมเรื่อง จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ด้านสมุนไพร เครื่องสำอาง และอาหารเสริม ในวันที่ 21 กรกฎาคม 2560 ณ ห้องสัมมนาเอกาทศรถ 208 ชั้น 2 อาคารเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร

## 2.8 ผู้วิจัยร่วม: นาย อนุรักษ์ คำแก้ว

สังกัด: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (Ph.D. student in Physiology)

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย (Research Responsibility): ติดต่อกับอาสาสมัคร ทำวิจัยทั้งหมด และประเมินการเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia และเก็บรวบรวมข้อมูลทั้งหมด

การอบรมที่เกี่ยวข้องกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (Human Research Ethic Training):

- Good clinical practice: ICH-GCP จัดโดยคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล วันที่ 18-19 กุมภาพันธ์ 2559 ณ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

- Two-day intensive course on the principles of good clinical practice (GCP) training and passed GCP examination at satisfactorily level จัดโดย Naresuan university institutional review board & TCELS & medical research network of the consortium of Thai medical schools & Faculty of medicine, Naresuan university วันที่ 27-28 เมษายน 2559 ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยนเรศวร

- Basic human subject protection course จัดโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร วันที่ 22 กรกฎาคม 2559 ณ ห้องสัมมนาเอกาทศรถ 301 อาคารเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร

## 2.9 ผู้วิจัยร่วม: พญ. ดวงนภา รุ่งพิบูลโสภิษฐ์

สังกัด: ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยงานประสาทวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย (Research Responsibility):

- คัดกรองอาสาสมัคร และทำวิจัยประเมินสภาพสมองและสภาวะซึมเศร้าในอาสาสมัคร

**2.10 ผู้วิจัยร่วม: รศ.ดร. จินตนาภรณ์ วัฒนธร**

สังกัด: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย (Research Responsibility):

- ทำวิจัยประเมินความจำ (memory) และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

**2.11 ผู้วิจัยร่วม: ดร.นิทรา เนื่องจำนงค์**

สังกัด สำนักงานเลขานุการ คณะวิทยาศาสตร์ ม.นเรศวร (ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ระดับ

ปฏิบัติการ)ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: ทำหน้าที่เก็บปัสสาวะและอุจจาระเพื่อวิเคราะห์ต่อไป

**2.12 ผู้วิจัยร่วม: ดร.ศุภินี วิสุทธธรรม**

สังกัด สถานีวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: วัดความดันโลหิต ชั่งน้ำหนัก และสอบถามอาการอื่นไม่พึงประสงค์

**2.13 ผู้วิจัยร่วม: น.ส.อุษณา จัตูรงค์**

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: ทำหน้าที่ช่วยวัดความจำอาสาสมัครด้วยโปรแกรม Battery cognitive test

**2.14 ผู้วิจัยร่วม: น.ส.งามรยู งามดอกไม้**

สังกัด ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: ทำหน้าที่ช่วยวัดความจำอาสาสมัครด้วยโปรแกรม Battery cognitive test

**2.15 ผู้วิจัยร่วม: น.ส.อัญจรีย์ อินจันทร์**

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: ประสานงาน และช่วยดูแลอำนวยความสะดวกแก่อาสาสมัคร

**2.16 ผู้วิจัยร่วม: น.ส.ชิตาภรณ์ ปิงยศ**

สังกัด ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: ประสานงาน และช่วยดูแลอำนวยความสะดวกแก่อาสาสมัคร

**2.17 ผู้วิจัยร่วม: นายกิตติวุฒิ โตอ่อน**

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: ประสานงาน และช่วยดูแลอำนวยความสะดวกแก่  
อาสาสมัคร

**2.18 ผู้วิจัยร่วม: Mrs. Genet Minale Yeshanew**

สังกัด ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: วิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร metabolites หรือ  
สารสำคัญของน้ำสกัดพรมมิเข้มข้นใน plasma ที่เก็บไว้แล้วใน -80 °C

**2.19 ผู้วิจัยร่วม: น.ส.วีรดา รักเสนาะ**

สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความรับผิดชอบต่อโครงการวิจัย: วิเคราะห์ปริมาณ endothelial markers ใน plasma ที่  
เก็บไว้แล้วใน -80 °C

**3. ชื่อหน่วยงานที่ให้ทุน (Source of funding)**

ได้รับทุนจาก:

- ศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ (TCELS)

ที่อยู่ผู้ให้ทุน: 69 อาคารมิว ชั้น 22 ถ.วิภาวดีรังสิต แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ  
10400

ปี พ.ศ. ที่ได้รับทุน: พ.ศ. 2561

**4. หลักการและเหตุผล และที่มาของโครงการวิจัย (Rationale and Background)**

สมองเสื่อมที่มีสาเหตุมาจากหลอดเลือดตีบหรืออุดตัน เรียกว่า “สมองเสื่อมเหตุสมอง  
ขาดเลือด” หรือ “vascular dementia” เป็นภาวะสมองเสื่อมที่เกิดขึ้นเป็นอันดับสองรองจากโรคสมอง  
เสื่อมอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) และพบได้บ่อยในผู้สูงอายุ (Roman, 2002) vascular  
dementia ทำให้ความจำเสื่อมจากพยาธิสภาพของหลอดเลือดในตำแหน่งของสมองส่วนที่ทำหน้าที่  
เกี่ยวข้องกับ ความจำ พฤติกรรม การเรียนรู้ และการตัดสินใจ พยาธิสภาพของหลอดเลือดนี้เกิดจาก  
อายุที่เพิ่มขึ้น การแข็งตัวและขาดความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด (arteriosclerosis) โดยเฉพาะ  
หลอดเลือดแดงขนาดใหญ่ อาทิ หลอดเลือดแดงบริเวณคอ (carotid arteries) หรือการแข็งตัวของผนัง  
หลอดเลือดแดงขนาดเล็ก อาทิ หลอดเลือดสมอง ถ้าผนังหลอดเลือดหนาตัวขึ้นหรือตีบตันจนขัดขวาง  
การไหลของเลือด จะทำให้การไหลเวียนเลือดไปสู่สมองลดลง ส่งผลให้เซลล์สมองขาดออกซิเจนและ

สารอาหารจนอาจทำให้เซลล์สมองตายและเกิดพยาธิสภาพในเนื้อสมอง เช่น การตายของเนื้อสมอง เนื่องจากการขาดเลือด (infarction) รอยโรคที่เนื้อสมองส่วนสีขาวใต้เปลือกสมอง (subcortical white matter lesion) สมองฝ่อ (cerebral atrophy) เลือดออกในสมอง (hemorrhage) เป็นต้น จนส่งผลให้เกิด vascular dementia (de la Torre, 2012; Kalaria, 2016; กัมมันต์ พันธุมจินดา, 2555) ปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิด vascular dementia ได้แก่ ความดันโลหิตสูง (hypertension) โรคหัวใจ (heart disease) โรคเบาหวาน (diabetes) ภาวะเลือดมีไขมันเกิน (hyperlipidemia) ทั้งนี้ยังไม่มียารักษา vascular dementia ที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการรักษาในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นการควบคุมปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคดังกล่าว (Baskys, & Hou, 2007)

การรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากสมุนไพรเพื่อส่งเสริมสุขภาพกำลังเป็นที่นิยม โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ช่วยชะลอความเสื่อมของสมอง บำรุงสมองและความจำ หนึ่งในนั้นคือ “พรมมิ” (*Bacopa monnieri*) ซึ่งเป็นพืชในตำราการแพทย์อายุรเวชของอินเดียที่ใช้มาอย่างยาวนาน พรมมิใช้เป็นยาบำรุงความจำ บำรุงระบบประสาทและระบบหัวใจ (Research, 2004 ; Russo and Borrelli, 2005; Kumar, 2006; Gohil, & Patel, 2010; Aguiar and Borowski, 2013; Singh, 2013; Charoenphon et al., 2016) ผลการวิจัยพบว่าพรมมิมีฤทธิ์บำรุงระบบประสาท เพิ่มการเรียนรู้และความจำ และปกป้องระบบประสาท (Das et al., 2002; Dhanasekaran et al., 2007; Limpeanchob et al., 2008; Uabundit et al., 2010; Vollala et al., 2010) ด้านสารอนุมูลอิสระในระบบประสาท (Anbarasi et al., 2006; Jyoti and Sharma, 2006) ด้านภาวะซึมเศร้า (anti-depressant) (Sairam, 2002) ด้านภาวะสมองเสื่อม (anti-dementic activity) ด้วยกลไกต้านเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส (anti-cholinesterase activity) ที่เป็นตัวทำลายสารตัวกลางนำส่งกระแสประสาท (Das, et al., 2002; Saraf et al., 2011) ด้านภาวะเลือดมีน้ำตาลเกิน (anti-hyperglycemia) (Mitra et al., 2014) ทั้งนี้พรมมิไม่มีความเป็นพิษทั้งทางด้านโลหิตวิทยาและชีวเคมี (haematological and blood biochemistry parameters) และไม่พบปฏิกิริยาอันไม่พึงประสงค์และผลข้างเคียงใด ๆ (Joshua et al., 2007) นอกจากนี้ พรมมียังมีฤทธิ์ปกป้องหัวใจ (cardioprotection) (Nandave et al., 2007) เพิ่มการไหลของเลือดที่หลอดเลือดหัวใจ (coronary blood flow) ฟื้นฟูการทำงานของหัวใจหลังขาดเลือด (ischemia/reperfusion injury) (Srimachai et al., 2016) พรมมียังทำให้หลอดเลือดขยายผ่านการหลั่งสาร nitric oxide จากเซลล์เอนโดทีเลียม (endothelium) ของหลอดเลือด และผ่านกลไกการยับยั้งแคลเซียมไอออนเข้าเซลล์และหลังจาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์ (Kamkaew et al., 2011) ที่สำคัญคือคณะผู้วิจัยได้ศึกษาต่อยอดพบว่าพรมมิเพิ่มการไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณผิวเปลือกสมอง (superficial cerebral blood flow) ในหนูปกติที่ให้กินสารสกัดพรมมิเป็น

เวลานาน 8 สัปดาห์ โดยมีฤทธิ์เทียบเท่ากับสารสกัดแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) (Kamkaew et al., 2013) การศึกษานี้แสดงว่าพรมมิน้ำจะทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดโดยตรงบริเวณสมอง (cerebrovascular dilatation) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าพรมมิมีผลเพิ่มการไหลของเลือดไปสู่สมองและน่าจะมีประสิทธิภาพในการรักษา vascular dementia

การศึกษาในมนุษย์ (clinical trial) พบว่าอาสาสมัครรับประทานพรมมิในรูปแบบอาหารเสริมชนิดเม็ดทำให้ความจำเพิ่มขึ้นทั้งในอาสาสมัครสุขภาพดีวัยเด็ก วัยผู้ใหญ่ วัยชรา ในอาสาสมัครที่ป่วยด้วยโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์และผู้ป่วยที่มีภาวะวิตกกังวล (Stough et al., 2001; 2008; Roodenrys et al., 2002; Raghav et al., 2006; Barbhaiya et al., 2008; Calabrese et al., 2008; Peth-Nui et al., 2012; Downey et al., 2013; Kongkeaw et al., 2014; Kean et al., 2015) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของพรมมิในการเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปสู่สมองในมนุษย์ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการเพิ่มความจำ การศึกษานี้จึงมุ่งหวังว่าถ้าพรมมิเพิ่มการไหลเวียนโลหิตสู่สมองในอาสาสมัครสูงวัยสุขภาพดีได้ จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้พรมมิเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในผู้ป่วย vascular dementia ต่อไป

รศ.ดร.กรรณก อิงคินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้วิจัยและพัฒนาสมุนไพรพรมมิเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด ภายใต้การผลิตควบคุมและจำหน่ายโดยองค์การเภสัชกรรม หรือ GPO พรมมิหนึ่งเม็ดประกอบด้วย standardized Brahmi extract ขนาด 300 mg รับประทานวันละ 1 เม็ด คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พรมมิในรูปแบบพรมมิน้ำสกัดเข้มข้น (Brahmi concentrated essence) เพื่อง่ายต่อการรับประทานโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ นอกจากนี้ พรมมิน้ำสกัดเข้มข้นจะผสมลูกหม่อนเพิ่มรสสัมผัส ปรับรสชาติให้นำรับประทาน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาผลของการรับประทานพรมมิน้ำสกัดเข้มข้นในอาสาสมัครสูงวัยสุขภาพดี โดยจะประเมินและเปรียบเทียบค่าต่าง ๆ ได้แก่ ความจำ การไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ (carotid blood flow) การเปลี่ยนแปลงของการไหลของเลือดหลอดเลือดส่วนปลายจากภาวะ reactive hyperemia ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพการคลายตัวของหลอดเลือด และค่าชีวเคมีเลือด (blood biochemistry) ที่บ่งบอกการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียลที่หลอดเลือด (endothelial marker) ได้แก่ soluble I-CAM1, V-CAM1, and asymmetric dimethylarginine (ADMA) และตัวบ่งชี้ความปลอดภัยของการบริโภคพรมมิในค่า fasting blood sugar (FBS), glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), lipid level, calcium level, liver function test, blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine รวมทั้งค่าความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจของอาสาสมัคร ดังนั้นการศึกษานี้จะให้ข้อมูลที่จำเป็นประโยชน์สำหรับผู้บริโภคเพื่อเพิ่มทางเลือกในการรับประทานอาหาร

เสริม และเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงผลของพรมมิต่อความจำว่าสัมพันธ์กับการไหลเวียนของเลือดสู่สมองหรือไม่อย่างไร ตลอดจนผลของพรมมิต่อประสิทธิภาพในการคลายตัวของหลอดเลือดและความปลอดภัย อันจะเป็นประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้พรมมิเพื่อป้องกันและรักษาผู้ป่วย vascular dementia ในผู้สูงอายุต่อไป

## 5. ทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Review Literature)

### 5.1 สมองเสื่อมเหตุสมองขาดเลือด (vascular dementia)

Vascular dementia เป็นภาวะสมองเสื่อมที่มีสาเหตุจากพยาธิสภาพที่หลอดเลือดสมอง พบได้บ่อย ประมาณร้อยละ 1-4 ในผู้สูงอายุที่อายุตั้งแต่ 65 ปี ความชุกสูงขึ้นไปเรื่อย ๆ เป็น 2 เท่าเมื่ออายุมากขึ้นทุก 5-10 ปี และเพิ่มเป็นร้อยละ 14-16 ในผู้สูงอายุเกิน 80 ปี (McVeigh and Passmore, 2006; Baskys and Hou, 2007) และพบเป็นอันดับสองรองจากโรคสมองเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ ทั้งนี้ vascular dementia แบ่งเป็น 3 ชนิดตามตำแหน่งของหลอดเลือดสมองที่ผิดปกติ ดังนี้

- (1) Cortical vascular dementia หรือ Multi-infarction dementia ภาวะสมองเสื่อมที่เกิดจากหลอดเลือดสมองขนาดใหญ่ตีบหรืออุดตันในหลายตำแหน่ง ลักษณะการดำเนินโรคเกิดขึ้นรวดเร็ว
- (2) Subcortical vascular dementia หรือ Subcortical ischemic vascular dementia ภาวะสมองเสื่อมที่เกิดจากหลอดเลือดสมองขนาดเล็กตีบตัน
- (3) Strategic infarct dementia หรือ Single infarct dementia ภาวะสมองเสื่อมที่เกิดจากการตีบหรืออุดตันของหลอดเลือดสมองในตำแหน่งเดียว พบเป็นรอยโรคเฉพาะตำแหน่งเล็ก ๆ

Subcortical vascular dementia หรือ ภาวะสมองเสื่อมเนื่องจากการขาดเลือดบริเวณใต้เปลือกสมอง เป็นภาวะสมองเสื่อมที่พบบ่อย มีอาการของสมองขาดเลือด โดยประสาทตายเป็นหย่อม (Binswanger's disease) ซึ่งจะขัดขวางวงจร fronto-subcortical circuit ของสมองส่วน prefrontal cortex, basal ganglia และการเชื่อมต่อของ thalamus และ cortex จึงทำให้เกิดการล่าช้าของความจำ กระบวนการคิด (mental process) การพูด (speech) และพฤติกรรม (behavior) การตีบตันของหลอดเลือดขนาดเล็กทำให้อเนื้อสมองตายเป็นหย่อมเล็ก (lacunar infarction) ได้หลายบริเวณ เช่น สมองส่วน basal ganglia และสมองส่วนกลาง (midbrain) การขาดเลือดที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete infarction) ทำให้มีพยาธิสภาพบริเวณชั้นแขนงประสาทแบบกระจาย (diffuse white matter lesion) ลักษณะอาการที่พบ เช่น คิดซ้ำ ทำซ้ำกว่าปกติ สูญเสียการวางแผนความคิดริเริ่มหรือการวางแผนกระทำเป็นขั้นตอน พูดหรือการทำซ้ำ ๆ โดยไม่มีความหมาย (perseveration) ความสามารถในการเรียนรู้เรื่องใหม่

เสียไป (ineffective learning) ไม่สามารถทำงานที่สลับซับซ้อนได้ เป็นต้น (Erkinjuntti and Gauthier, 2009; กัมมันต์ พันธุมจินดา, 2555)

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด vascular dementia แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ปัจจัยเสี่ยงที่ปรับเปลี่ยนไม่ได้ และปัจจัยเสี่ยงที่ปรับเปลี่ยนได้ โดยปัจจัยที่ปรับเปลี่ยนไม่ได้ ได้แก่ อายุมาก เพศชาย พันธุกรรม เชื้อชาติ และประวัติเป็นโรคหลอดเลือดสมอง ส่วนปัจจัยเสี่ยงที่ปรับเปลี่ยนได้ ได้แก่ ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจร่วมหลอดเลือด เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดแดงส่วนปลาย การสูบบุหรี่ เป็นต้น (McVeigh and Passmore, 2006)

## 5.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรมมิต่ระบบประสาทในสัตว์ทดลอง

บทความทบทวนวรรณกรรม (literature review) หลาย ๆ บทความในวารสารทางวิชาการชี้ให้เห็นประสิทธิภาพหลักของสมุนไพรพรมมิต่ระบบประสาทในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำ (Research, 2004 ; Russo and Borrelli, 2005; Kumar, 2006; Gohil and Patel, 2010; Aguiar and Borowski, 2013; Singh, 2013; Charoenphon et al., 2016) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

สารสื่อประสาท (neurotransmitter) ชนิดอเซทิลโคลีน (acetylcholine, ACh) ภายในสมองมีบทบาทควบคุมการเรียนรู้และความจำ ถ้าเซลล์ประสาทชนิดที่สร้าง ACh (cholinergic neurons) บริเวณ hippocampus เสื่อมสภาพลง จะทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อม ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของ central cholinergic system ด้วยสารกลุ่ม anticholinesterase ซึ่งลดการทำลาย ACh จึงเป็นเภสัชบำบัดที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อม การศึกษาพรมมิโดยป้อนทางปากเป็นเวลา 2 สัปดาห์ในหนูที่ได้รับสาร colchicines (ซึ่งเป็น neurotoxin เพื่อทำลายเซลล์ประสาทภายในสมอง) พบว่าการให้สารสกัดพรมมิทางปากทำให้ปริมาณสาร ACh กลับมาเป็นปกติ (Dhawan and Singh, 1996) นอกจากนี้สารสกัดพรมมียังมีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูความทรงจำ (antidementic activity) ในหนูที่เหนียวนำไปให้เกิดความจำเสื่อมด้วยสาร scopolamine และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในหลอดทดลอง ผลการยับยั้งเป็นแบบ dose-dependent inhibition แสดงว่าสารสกัดพรมมามีคุณสมบัติเพิ่มการเรียนรู้เป็นอย่างมาก (potent cognitive enhancing properties) (Das, et al., 2002; Saraf et al., 2011) สารสกัดพรมมิสามารถลดภาวะสมองเสื่อมในหนูที่เหนียวนำไปให้ความจำเสื่อมจากผลข้างเคียงของยากันชัก phenytoin (Vohora et al., 2000) นอกจากนี้สารสำคัญของสกัดพรมมิ bacoside ยังเพิ่มความจำในหนูที่มีภาวะความจำเสื่อมจากสมองขาดออกซิเจน (hypobaric hypoxia) และลดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ประสาท (Dhanasekaran et al., 2007; Hota et al., 2009; Dwivedi et al., 2013) จากรายงานการวิจัยให้สารสำคัญของสารสกัด



พรมมิ bacoside A พบว่าการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสาร bacoside A เกิดจากการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการขจัดอนุมูลอิสระในสมองหนู เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) เป็นต้น (Anbarasi et al., 2006; Jyoti and Sharma, 2006) นอกจากนี้ พรมมิทำให้ความยาวและจำนวนแขนงของเซลล์ประสาท (dendrite) ในหนูเพิ่มขึ้น ทำให้เพิ่มการเรียนรู้และความจำ (Vollala et al., 2010; 2011a; 2011b) งานวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่าสารสกัดพรมมิยับยั้งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory cytokines) ได้แก่ TNF- $\alpha$  และ IL-6 ที่หลังจากเซลล์ค้ำจุนในระบบประสาท (microglial cells) และยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์สมอง ได้แก่ caspase 1, caspase 3 และ matrix metalloproteinase (Nemetchek et al., 2017) การเพิ่มการเรียนรู้และความจำอีกหนึ่งกลไก คือ สารสกัดพรมมิทำให้สารสื่อประสาท serotonin (5-HT) ในสมองหนูมีปริมาณเพิ่มขึ้น และการแสดงออกของยีนที่ใช้ในการสร้าง serotonin transporter (SERT) เพิ่มขึ้น (Charles et al., 2011)

นอกจากนี้ พรมมิสามารถลดอาการวิตกกังวล (anxiolytic effect) ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอาการวิตกกังวล (clinical anxiety) การให้สารสกัดพรมมิทางปากเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้ยา lorazepam พบว่าสารสกัดพรมมิลดอาการวิตกกังวลมากกว่ายา lorazepam และพรมมิไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงความจำเสื่อมชั่วคราวดังที่มักพบในยารักษาอาการวิตกกังวล (Bhattacharya and Ghosal, 1998) และพรมมียังช่วยลดอาการซึมเศร้า (antidepressant activity) ในหนูที่ทำให้เกิดอาการซึมเศร้าด้วยวิธี behavioral despair test และ learned helplessness test การให้สารสกัดพรมมิทางปากเปรียบเทียบกับยารักษาโรคซึมเศร้า imipramine พบว่าสารสกัดพรมมิลดอาการซึมเศร้าได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่ายา imipramine (Sairam et al., 2002) นอกจากนี้สารสกัดพรมมียังสามารถควบคุมอาการลมชัก (epilepsy) ในหนูได้เป็นอย่างดี (Mathew et al., 2010)

การศึกษาผลของพรมมิต่อการปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotection) พบว่าพรมมิสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากการทำลายของ  $\beta$ -amyloid ในเซลล์เพาะเลี้ยง (primary cortical cell culture) ซึ่งพรมมิมีฤทธิ์ต้านการเกิด lipid peroxidation ลดการเกิด metal ion reducing ลดการเกิด oxidative stress ภายในเซลล์ (intracellular reactive oxygen species; ROS) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ภายในเซลล์ประสาท (Limpeanchob et al., 2008) สารสกัดพรมมิช่วยลดระดับ  $\beta$ -amyloid ในสมองหนูตัดแปลงพันธุกรรมโมเดลโรคสมองเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ (Holcomb et al., 2006; Dhanasekaran et al., 2007) และพรมมียังเพิ่มการเรียนรู้และความจำ และปกป้องการเสื่อมของเซลล์ประสาทในหนูที่ป้อนสารสกัดพรมมิ ก่อน 2 สัปดาห์แล้วเหนี่ยวนำให้

เป็นโรคสมองเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ด้วยสาร ethylcholine aziridinium ion (AF64A) (Uabundit et al., 2010)

### 5.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรมมีต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพรมมีต่อหลอดเลือดในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารสกัดพรมมีทำให้หลอดเลือดแดงปอด (pulmonary arteries) และหลอดเลือดแดงเอออร์ตา (aorta) ของกระต่ายคลายตัว ด้วยกลไกผ่านการกระตุ้น cyclooxygenase และการลดการไหลของแคลเซียมอออนเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (Dar, & Channa, 1997; 1999) ผู้วิจัยและคณะได้รายงานผลการวิจัยเมื่อฉีดสารสกัดพรมมี (20-60 mg/kg) เข้าหลอดเลือดดำโดยตรงสามารถลดความดันโลหิตในหนูได้ และยังแสดงว่าสารสกัดพรมมีทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด โดยผ่านกลไกการหลั่งสาร nitric oxide จากเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด และผ่านกลไกการยับยั้งการไหลของแคลเซียมอออนเข้าสู่เซลล์และการหลั่งแคลเซียมอออนจาก sarcoplasmic reticulum ภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ประเด็นที่น่าสนใจ คือ สารสกัดพรมมีทำให้หลอดเลือดหลายชนิดคลายตัว ทั้งนี้ หลอดเลือดสมอง (basilar artery) มีความไว (sensitive) ต่อสารสกัดพรมมีมากที่สุด โดยหลอดเลือดแดงแต่ละชนิดที่มีความไว (sensitivity) ต่อสารสกัดพรมมีเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ (i) หลอดเลือดแดงสมอง (the inhibitory concentration 50%;  $IC_{50} = 102 \pm 16 \mu\text{g/ml}$ ) (ii) หลอดเลือดแดงลำไส้ (mesenteric artery;  $IC_{50} = 171 \pm 31 \mu\text{g/ml}$ ) (iii) หลอดเลือดแดงเอออร์ตา ( $IC_{50} = 213 \pm 68 \mu\text{g/ml}$ ) (iv) หลอดเลือดแดงไต (renal artery;  $IC_{50} = 375 \pm 51 \mu\text{g/ml}$ ) (v) หลอดเลือดแดงหางหนู (tail artery;  $IC_{50} = 494 \pm 93 \mu\text{g/ml}$ ) และ (vi) หลอดเลือดแดงบริเวณขาหนีบ (femoral arteries;  $IC_{50} > 1,000 \mu\text{g/ml}$ ) (Kamkaew et al., 2011)

คณะผู้วิจัยยังพบว่าพรมมีเพิ่มการไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณผิวเปลือกสมอง (superficial cerebral blood flow) ในหนูปกติที่ให้กินสารสกัดพรมมีเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ โดยมีฤทธิ์เทียบเท่ากับสารสกัดแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) (Kamkaew et al., 2013) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าพรมมีทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดโดยตรงบริเวณสมอง (cerebrovascular dilatation) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าพรมมีมีผลเพิ่มการไหลของเลือดไปสู่สมอง และน่าจะมีประสิทธิภาพในการรักษา vascular dementia

#### 5.4 การศึกษาความปลอดภัย (toxicity study) ของสารสกัดพรมมิ

จากการศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดพรมมิโดยบ่อนสารสกัดพรมมิขนาดสูง 5,000 mg/kg ทางปากครั้งเดียว แล้วสังเกตอาการแสดงความเป็นพิษเฉียบพลันเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ไม่พบความผิดปกติในลักษณะอาการพฤติกรรมและไม่พบการตายของหนู และเมื่อทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังโดยให้หนูกินสารสกัดพรมมิขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 mg/kg ทุกวันนาน 9 เดือน ไม่ก่อให้เกิดสัญญาณและอาการแสดงของความเป็นพิษในลักษณะทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในและค่าเลือดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับ ไต และตับอ่อน (Sireeratawong et al., 2016) นอกจากนี้ในหนูที่ให้กิน standardized extract ของพรมมิขนาด 85, 210 และ 500 mg/kg เป็นเวลา 3 เดือน ไม่พบความเป็นพิษจากการวิเคราะห์อาการทางคลินิก ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณการกินอาหาร น้ำหนักตัวและค่าเลือด ซึ่งสารสกัดพรมมิมีค่า LD<sub>50</sub> ทางปากของหนู เท่ากับ 2.2 g/kg (Joshua Allan et al., 2007)

ประเด็น toxicity เกี่ยวกับ serious, non-serious adverse events และ frequency ไม่พบ case report ที่แสดงถึง adverse events และไม่พบรายงาน liver and kidney toxicity

จากการศึกษาประเมินความปลอดภัย phase I ในอาสาสมัครสุขภาพดีที่รับประทาน BacoMind™ 300 mg ติดต่อกันนาน 15 วัน และต่อเนื่องด้วยขนาด 450 mg อีก 15 วัน ปรากฏว่า ไม่พบ adverse effects ที่เกี่ยวกับ hematological parameter, biochemical parameter หรือ electrocardiographic parameters แต่พบรายงานบ้าง เกี่ยวกับอาการไม่สบายท้องเล็กน้อย (mild gastrointestinal disturbances) จากอาสาสมัคร 2 ราย ขณะรับประทาน BacoMind™ ขนาด 300 mg และ อาสาสมัคร 1 ราย ขณะรับประทาน BacoMind™ ขนาด 450 mg ซึ่งเป็นผู้ที่ไม่ประสงค์ออกจากการศึกษา (Pravina et al., 2007)

ผลของพรมมิที่มีต่อ liver enzyme P450 พบว่ามีรายงานหนึ่งเรื่องที่แสดงว่า เมื่อบ่อนสารสกัดเอทานอลจากพรมมิขนาด 31 mg/kg/day นาน 1 สัปดาห์ ในหนูทดลอง มีผลทำให้การทำงานของ cytochrome P450 3A (CYP3A) ที่ตับลดลง 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นยา carbamazepine และ digoxin ที่ถูก metabolised ด้วย CYP3A จะช้าลง ทำให้ค่า area under the plasma concentration-time curve (AUC) ของยาสูงขึ้น (Singh et al., 2013)

#### 5.5 การศึกษาทางด้านคลินิกในมนุษย์ (clinical study) ที่เกี่ยวข้องกับพรมมิ

การศึกษาในมนุษย์และการศึกษาแบบ meta-analysis ชี้ให้เห็นว่าการรับประทานพรมมิช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำ (Kongkeaw et al., 2014) เมื่อรับประทานพรมมิชนิดเม็ดขนาด 300 mg นาน 12 สัปดาห์ เพิ่มความจำในอาสาสมัครสุขภาพดีอายุ 18-60 ปี (Stough et al., 2001; 2008) และ

พรมมิช่วยในการจดจำข้อมูลใหม่ ๆ ได้เป็นอย่างดีในอาสาสมัครสุขภาพดีอายุ 35-60 ปี (Roodenrys et al., 2002) และเมื่อรับประทานพรมมิขนาด 320 mg แบบจับพลันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพิ่มความสามารถในการทวนซ้ำข้อมูล (repetition performance) ในอาสาสมัครสุขภาพดีอายุ 18-56 ปี (Downey et al., 2013) การศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีสูงอายุ 55 ปีขึ้นไป พบว่าเมื่อรับประทานพรมมิขนาด 300 mg นาน 12 สัปดาห์ ทำให้ความจำเพิ่มขึ้น (Raghav et al., 2006; Barbhaiya et al., 2008; Calabrese et al., 2008) ผลการศึกษาสอดคล้องกับผลการศึกษาประสิทธิภาพของพรมมิในอาสาสมัครอายุมากกว่า 55 ปี จำนวน 60 คน แบ่งเป็นกลุ่มที่ได้ยาหลอก (placebo) และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิชนิดเม็ดของ GPO ขนาด 300 และ 600 mg ต่อวันเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิเพิ่มคุณภาพชีวิตโดยเพิ่มประสิทธิภาพการทรงตัว เพิ่มการตื่นตัวต่อสิ่งเร้า เพิ่มสมาธิ เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำ คลายอาการซึมเศร้า โดยไม่พบอาการพิษและภาวะข้างเคียงใด ๆ (Peth-Nui et al., 2012) พรมมียังช่วยลดอาการสมาธิสั้นในเด็ก (Kean et al., 2015) นอกจากนี้ พรมมียังเพิ่มความจำในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ (Downey, 2013) และเพิ่มความจำในผู้ป่วยที่มีภาวะวิตกกังวล (Singh, 1980)

#### 5.6 การศึกษาความปลอดภัยและฤทธิ์ของลูกหม่อน (*Morus alba* fruit; Mulberry)

หม่อน หรือ มัลเบอร์รี่ (Mulberry) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus alba* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ *Moraceae* สารสกัดจากลูกหม่อนมีแอนโทไซยานิน (anthocyanins) เป็นสารสำคัญหลักในปริมาณสูง การประเมินความปลอดภัยโดยศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของลูกหม่อน เมื่อให้หนูกินสารสกัดลูกหม่อนขนาด 40, 200, 1000 mg/kg ติดต่อกันนาน 90 วัน พบว่าไม่ทำให้หนูตายหรือเกิดอาการไม่พึงประสงค์ ปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำไม่เปลี่ยนแปลง และสารสกัดลูกหม่อนยังไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวหนู รวมทั้งไม่พบผลเป็นพิษ (toxic effect) ต่อน้ำหนักอวัยวะภายใน ค่าชีวเคมีจากเลือดและปัสสาวะ (Chang et al., 2016) นอกจากนี้ ในหนูเบาหวาน (streptozotocin-induced diabetic mice) ที่ป้อนสารสกัดลูกหม่อน (200 mg/kg) นาน 2 สัปดาห์ มีผลลดน้ำตาลในเลือด (fasting blood glucose) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม (diabetic control group) และทำให้เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับเพิ่มขึ้น ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GSH-Px) สารสกัดลูกหม่อนจึงมีฤทธิ์ antidiabetic และ antioxidant activities (Wang et al., 2013) เช่นเดียวกับสารที่แยกจากลูกหม่อน (*M. alba* fruit fraction) มีฤทธิ์ต้านภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูง เมื่อป้อนนาน 7 สัปดาห์ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและไขมันสูง (Jiao et al., 2017) นอกจากนี้ ในหนูที่มีภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerotic rat) เมื่อป้อนสารสกัดลูกหม่อน (210 mg/kg) นาน 6

ส์ปดาห์ พบว่าระดับไขมันในเลือด (serum lipid profile) ลดลง ได้แก่ total cholesterol, triglyceride และ LDL-cholesterol levels และยังคงลดความหนา (intima-media thickness) ของหลอดเลือดแดง aorta ดังนั้น สารสกัดลูกหม่อนจึงมีฤทธิ์ anti-atherosclerotic properties (Jiang et al., 2017)

การกินลูกหม่อนขนาด 2, 10 และ 50 mg/kg ก่อน 7 วันและ 21 วัน ในหนูหลังจากทำให้มีภาวะหลอดเลือดสมองอุดตัน (occlusion of right middle cerebral artery) ทำให้ความจำเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้กินลูกหม่อน และยังเพิ่มจำนวนเซลล์ประสาท (densities of neuron, cholinergic neuron, Bcl-2-immunopositive neuron) และลด oxidative stress ในสมองส่วน hippocampus. จึงอนุมานได้ว่าลูกหม่อนเพิ่ม cholinergic function และมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective effect) ผ่านกลไกการลด oxidative stress และการตายของเซลล์ (apoptosis) (Kaewkaen et al., 2012)

## 5.7 Parameters ต่าง ๆ เกี่ยวกับตัววัดประสิทธิผล และความปลอดภัยของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้น

### 5.7.1 การประเมินความจำ

เป็นการประเมินหรือวัดความจำ (memory) และ ความตั้งใจหรือสมาธิจดจ่อ (attention) เพื่อประเมินผลของพรมมิต่อความจำระยะสั้นที่ใช้ในการทำงาน (working memory) ของอาสาสมัคร ซึ่งจะแปลผลเป็น 4 domain ได้แก่ (Peth-Nui et al., 2012)

Domain 1: Power of attention หมายถึง พลังความตั้งใจ

Domain 2: Continuity of attention หมายถึง ความต่อเนื่องของความตั้งใจ

Domain 3: Quality of memory หมายถึง คุณภาพของความจำ

Domain 4: Speed of memory หมายถึง ความเร็วของความจำ

ประเมินความจำ โดยใช้โปรแกรม cognitive computerized battery test ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. จินตนาภรณ์ วัฒนธร ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น cognition test ประกอบด้วย 7 task ได้แก่ (Peth-Nui et al., 2012)

การประเมินความจำระยะสั้นสัมพันธ์กับข้อมูลพื้นฐานของพรมมิ ดังนี้

Kongkeaw et al. (2014) ทำการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) ศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อความจำในมนุษย์หลังจากการรับประทานสารสกัดพรมมิเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในแง่ประสิทธิภาพของสารสกัดพรมมิต่อ working memory พบมีแค่การศึกษาจาก Stought et al.

(2008) และ Peth-Nui et al. (2012) แสดงผลการเพิ่ม working memory ที่เกี่ยวกับความตั้งใจจดจ่อ แปรผลจากการลดลงของ choice reaction time อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ค่ามัธยฐานสำคัญทางสถิติพบว่าพรมมีไม่มีผลเพิ่ม working memory ที่เกี่ยวกับ picture recognition, numeric working memory, word recognition เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการยืนยันผลการทดลองดังกล่าว

### 5.7.2 การไหลของเลือดในหลอดเลือดบริเวณคอ (Carotid blood flow)

การวัดการไหลเวียนเลือดที่หลอดเลือดแดงใหญ่บริเวณคอ (carotid artery) ซึ่งเป็นหลอดเลือดสำคัญที่นำเลือดจากหัวใจไปเลี้ยงสมองด้วยเครื่อง vascular Doppler ultrasound เป็นวิธีที่ปลอดภัยเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีไม่รุกรานเข้าไปในร่างกาย (non-invasive technology) ด้วยหลักการคลื่นเสียงสะท้อนกลับจากการกระทบเม็ดเลือดที่กำลังเคลื่อนที่อยู่ในหลอดเลือดซึ่งสามารถนำมาคำนวณการไหลเวียนเลือดที่ไปเลี้ยงสมองจากความเร็วของเม็ดเลือดที่สะท้อนกลับจากกราฟ spectral waveform ทำให้สามารถวัดระดับการตีบของหลอดเลือดจากความเร็วที่เพิ่มขึ้น แต่ถ้าหลอดเลือดขยายตัวจะทำให้ความเร็วลดลง รวมทั้งยังสามารถประเมินหลอดเลือดแดงอุดตันจากภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerotic plaque) และความเสียหายของโรคสมองขาดเลือด (ischemic stroke) (Lee W., 2014)

การประเมินการไหลของเลือดในหลอดเลือดบริเวณคอสัมพันธ์กับข้อมูลพื้นฐานของพรมมี ดังนี้

พรมมีฤทธิ์เพิ่ม memory และ attention และมีรายงานพบว่าการเพิ่มขึ้นของ carotid intima media thickness มีความสัมพันธ์กับการลดลงของ attention (Cohen et al., 2009) ซึ่งถ้า carotid intima media thickness เพิ่มขึ้น การไหลของเลือดที่หลอดเลือดบริเวณค่อน่าจะลดลง ดังนั้น การศึกษานี้จะแสดงผลของการรับประทานพรมมีต่อการไหลของเลือดที่หลอดเลือดบริเวณคอ ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์กับผลของพรมมีต่อความจำ

### 5.7.3 การเปลี่ยนแปลงของการไหลของเลือดบริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia

การวัดการเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia หลังจากรัดแขนส่วนบนด้วย cuff โดยใช้เครื่องมือ คือ peri-med หรือ real-time microcirculation imaging peri-cam PSI system ที่สามารถแสดงเป็นภาพสะท้อนให้เห็นถึงการไหลเวียนเลือด (blood perfusion) ถ้าหลอดเลือดมีการทำงานที่ดีจะเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า reactive hyperemia ซึ่งหมายถึงการเพิ่มขึ้นของ blood flow แบบชั่วคราวเมื่ออวัยวะได้รับเลือดมาเลี้ยงอีกครั้งหลังจากที่ขาดเลือด (ischemia) โดยการรัดแขนส่วนบนด้วย cuff ชั่วคราว เนื่องจากการรัดแขน

ส่วนบนจะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่ต่ำลงมาเกิดภาวะ hypoxia จึงกระตุ้นให้เซลล์หลั่ง local metabolites และ waste product รวมถึง nitric oxide ซึ่งหลังจาก endothelium ทำให้หลอดเลือดบริเวณนั้นคลายตัวแล้วมีผลเพิ่ม blood flow (กรองกาญจน์ ชูทิพย์, 2559)

ถ้าเซลล์ endothelium เสียหาย หรือเกิดภาวะ endothelial dysfunction จะส่งผลให้การหลั่งของ endothelial vasodilators โดยเฉพาะ nitric oxide ลดลง หากวัดการไหลของเลือดจากภาวะ reactive hyperemia จะพบการลดลงของการไหลของเลือดในบริเวณที่วัด ดังนั้น การวัดการไหลของเลือดจากภาวะ reactive hyperemia จึงบ่งชี้ endothelial function ได้

การประเมินการไหลของเลือดในหลอดเลือดบริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia สัมพันธ์กับข้อมูลพื้นฐานของพรมมิ ดังนี้

การลดลงของการไหลของเลือดจากภาวะ reactive hyperemia พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับลดลงของ cognitive function และพบโครงสร้างของสมองที่ผิดปกติ (Cohen et al., 2009) และมีรายงานว่าพรมมิมีกกลไกที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของหลอดเลือด โดยกระตุ้นการหลั่งสาร nitric oxide จากเซลล์ endothelium (Kamkaew et al., 2011) ดังนั้น การรับประทานพรมมิจึงอาจเพิ่มการหลั่ง nitric oxide และอาจส่งผลเพิ่มการไหลของเลือดในภาวะ reactive hyperemia ซึ่งอาจสัมพันธ์กับผลของพรมมิที่มีต่อความจำ

#### 5.7.4 ค่าต่าง ๆ ในเลือด (blood biochemistry)

Markers ที่บ่งชี้การทำงานของ endothelium ที่หลอดเลือด ได้แก่

##### (i) I-CAM1 และ V-CAM1

Soluble intercellular adhesion molecule-1 (I-CAM1) และ vascular cell adhesion molecule-1 (V-CAM1) เป็นโปรตีนที่จับกับผิวเซลล์ (cell surface binding protein) แต่สามารถพบได้ใน plasma ในรูปแบบ circulating form I-CAM1 ใน serum จะเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีความเสียหายของเซลล์ endothelium และกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของ V-CAM1 ใน endothelial cell ระหว่างการเกิดการอักเสบ โดยมี ROS เป็นตัวเหนี่ยวนำ (Lawson & Wolf, 2009; Cook-Mills et al., 2011) การประเมิน I-CAM1 และ V-CAM1 สัมพันธ์กับข้อมูลพื้นฐานของพรมมิ ดังนี้

สารสำคัญของสารสกัดพรมมิมียุทธิต้านอนุมูลอิสระ และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการขจัดอนุมูลอิสระในสมองหนู (Anbarasi et al., 2006; Jyoti and Sharma, 2006) จึงมีฤทธิ์ลดการอักเสบ และพรมมิมียุทธิต้านการเกิด ROS ภายในเซลล์ประสาท (Limpeanchob et al., 2008) ดังนั้นหากพรมมิสามารถลด ROS ได้ จึงน่า

ช่วยให้ endothelial function ดีขึ้น ซึ่งบ่งชี้จากการลดลงของ I-CAM1 และ V-CAM1 ในเลือด และน่าจะสัมพันธ์กับความจำที่เพิ่มขึ้น

(ii) Asymmetric dimethylarginine (ADMA)

ADMA เป็น analogue ของ L-arginine เกิดขึ้นจากกระบวนการ metabolism ตามธรรมชาติและพบในกระแสเลือด ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ ADMA จะยับยั้งการสร้าง nitric oxide จึงเป็น marker ที่บ่งบอกถึง endothelial dysfunction (Sibal et al., 2010) ADMA ยังมีบทบาทต่อ onset และ progression ของภาวะ dementia ซึ่งการศึกษาทางระบาดวิทยา (epidemiological study) พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับ ADMA กับ cognitive impairment (pAsif et al., 2013) และยังพบการเพิ่มขึ้นของ ADMA ใน plasma ของผู้ป่วยโรค Alzheimer (Arlt et al., 2008)

การประเมิน ADMA สัมพันธ์กับข้อมูลพื้นฐานของพรมมิ ดังนี้

การรับประทานพรมมิส่งผลเพิ่มความจำในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ (Downey, 2013) ดังนั้นการรับประทานพรมมิจึงอาจจะช่วยเพิ่ม endothelial function และน่าจะลดระดับ ADMA ในกระแสเลือด และอาจจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของความจำ

(iii) Markers ที่บ่งชี้ความปลอดภัยของอาสาสมัคร ได้แก่

รายการตรวจ	ค่าปกติ	หน่วย	ความหมายของการตรวจ
FBS	70-100	mg/dl	ตรวจน้ำตาลในเลือดเพื่อค้นหาโรคเบาหวาน
HbA <sub>1c</sub>	4.6-6.2	%	ตรวจหาน้ำตาลเฉลี่ยสะสม
Total cholesterol	150-200	mg/dl	ตรวจหาระดับไขมันโคเลสเตอรอลรวม
Triglyceride	30-150	mg/dl	ตรวจหาระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์
HDL-cholesterol	45-65	mg/dl	ตรวจหาระดับไขมันโคเลสเตอรอล ชนิดดี
LDL- cholesterol	<130	mg/dl	ตรวจหาระดับไขมันโคเลสเตอรอล ชนิดอุดตันเส้นเลือด
Calcium	8.8-10.6	mg/dl	ตรวจหาปริมาณแคลเซียมในเลือด
Total protein	6.0-8.0	g/dl	ตรวจโปรตีนรวม
Albumin	3.8-5.5	g/dl	ตรวจโปรตีนอัลบูมิน
Globulin	2.3-3.5	g/dl	ตรวจโปรตีนโกลบูลิน
Total bilirubin	0.2-1.2	mg/dl	ตรวจทางเดินน้ำดี



Direct bilirubin	0-0.15 mg/dl	ตรวจทางเดินน้ำดี
AST (SGOT)	0-33 units	ตรวจการทำงานของตับ
ALT (SGPT)	3-35 units	ตรวจการทำงานของตับ
ALP	25-90 I.U.	ตรวจการทำงานของตับและทางเดินน้ำดี
BUN	8-23 mg/dl	ตรวจระดับของเสียในเลือดเพื่อดูการทำงานของไต
Creatinine	0.4-1.4 mg/dl	ตรวจระดับของเสียในเลือดเพื่อดูการทำงานของไต

ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ บ่งบอกถึงความปลอดภัยของอาสาสมัครเมื่อได้รับน้ำพรมมิสกดเข้มข้นในระยะยาว โดยวัดความดันโลหิตบริเวณ brachial artery ด้วยเครื่องวัดความดัน validated automated sphygmomanometer ในทำนองหลังจากพักก่อนการวัดเป็นเวลา 5 นาที (Calabrese et al., 2008)

## 6. วัตถุประสงค์/สมมติฐานการวิจัย (Research Questions/Objectives/Hypothesis)

### 6.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

(1) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิผล (efficacy) ผลของน้ำพรมมิสกดเข้มข้นกับยาหลอก (placebo) เมื่อให้รับประทานในระยะยาวในอาสาสมัครสุขภาพดีสูงอายุ และแสดงความสัมพันธ์ของประสิทธิผลของพรมมิระหว่าง parameters ต่าง ๆ ได้แก่

- (i) ความจำ (memory)
- (ii) การไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ (carotid blood flow)
- (iii) การเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia
- (iv) ค่าต่าง ๆ ในเลือด (blood biochemistry) ได้แก่ (i) markers ที่บ่งชี้การทำงานของ endothelium ที่หลอดเลือด ได้แก่ soluble I-CAM1, V-CAM1 และ Asymmetric dimethylarginine (ADMA)

(2) เพื่อศึกษาความปลอดภัย (safety) ผลของน้ำพรมมิสกดเข้มข้น เมื่อให้รับประทานในระยะยาวในอาสาสมัครสุขภาพดีสูงอายุ ซึ่งศึกษาจาก parameters ดังนี้

- (i) ค่าชีวเคมีในเลือด ได้แก่ FBS, HbA<sub>1c</sub>, lipid level, calcium level, ค่าตับ liver function test, และค่าไต BUN และ creatinine
- (ii) ความดันโลหิต (blood pressure) และอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate)

(iii) การตรวจปัสสาวะและอุจจาระเพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของไต การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร metabolites หรือสารสำคัญของน้ำสกัดพรมมิเข้มข้น และเพื่อช่วยในการวินิจฉัยผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์

## 7. คำสำคัญ (Keywords)

พรมมิ (Brahmi), น้ำพรมมิสกัดเข้มข้น (Brahmi concentrated essence), ความจำ (memory), การไหลของเลือดที่หลอดเลือดบริเวณคอ (carotid blood flow)

## 8. ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

8.1 รูปแบบการวิจัย (research design) ระบุว่าเป็น

การวิจัยเชิงคุณภาพ (qualitative research) ทางคลินิก (clinical trial) ให้อาสาสมัครเข้ากลุ่มด้วยวิธีสุ่ม โดยแบ่งอาสาสมัครแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 (treatment group) อาสาสมัครได้รับน้ำพรมมิสกัดเข้มข้น (ประกอบด้วย Brahmi extract 300 mg) และกลุ่ม 2 (control group; กลุ่มควบคุม) อาสาสมัครได้รับ placebo ของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้น ทำการศึกษาทั้งสองกลุ่มที่คู่ขนานกัน และมีการปกปิดชนิดยาแก่ทั้งอาสาสมัครและนักวิจัย (randomized, double-blind, parallel groups design)

### Outcomes

- Primary outcome คือ ผลเพิ่มความจำของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้น
- Secondary outcome ได้แก่
  - (1) ผลเพิ่ม carotid blood flow
  - (2) ผลเพิ่ม blood flow จากภาวะ reactive hyperemia และผลของ endothelium markers หรือค่าเลือดที่บ่งชี้การทำงานของ endothelium ที่หลอดเลือด ได้แก่ soluble I-CAM1, V-CAM1 และ Asymmetric dimethylarginine (ADMA)
  - (3) ผลควบคุม FBS, lipid profile, HbA<sub>1c</sub>, และ calcium levels
  - (4) ผลควบคุม blood pressure

8.2 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

คำนิยาม (definition) ของคำว่า “อาสาสมัคร” ในการศึกษานี้

อาสาสมัคร ในการศึกษาครั้งนี้ คือ อาสาสมัครที่มี อายุ 55-80 ปี และไม่เป็นผู้ป่วยจิตเภท โรคสมองเสื่อม โรคซึมเศร้า โรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) โรคความดันโลหิตสูง หรือภาวะไขมันในเลือดสูงที่ได้รับยาเพื่อการรักษา

ช่องทางการหาอาสาสมัครเพื่อเข้าสู่กระบวนการ screening ดังนี้

- บัณฑิตอาสาสมัครที่ประกาศภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร โรงพยาบาล และ รพ.สต. จังหวัดพิษณุโลก
- ใบประกาศอาสาสมัครโครงการแบบออนไลน์ (online)
- นักวิจัยลงพื้นที่หาอาสาสมัครในชุมชน จังหวัดพิษณุโลก

1. บัณฑิตอาสาสมัครที่ประกาศภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร โรงพยาบาล และ รพ.สต. จังหวัดพิษณุโลก และประกาศอาสาสมัครโครงการแบบออนไลน์ โดยกระบวนการ คือผู้วิจัยติดต่อ บัณฑิตอาสาสมัครที่ระบุรายละเอียด คุณสมบัติของอาสาสมัคร และเบอร์โทรศัพท์ติดต่อนักวิจัย เมื่ออาสาสมัครสนใจเข้าร่วมโครงการอาสาสมัครจะโทรศัพท์เข้ามาสอบถามนักวิจัย นักวิจัยชี้แจง inclusion criteria รายละเอียดโครงการโดยสังเขป เมื่ออาสาสมัครสนใจเข้าร่วมโครงการจึงจะนัดให้อาสาสมัครมาพบที่ Cos-Nat เพื่อชี้แจงรายละเอียดโครงการโดยละเอียด อธิบายประโยชน์และความเสี่ยง วิธีการวิจัย รวมถึงเปิดโอกาสให้อาสาสมัครสอบถาม จากนั้นจึงขอให้อาสาสมัครลงนามใน consent เพื่อเข้าสู่กระบวนการคัดกรองโดยแพทย์ต่อไป

2. นักวิจัยลงพื้นที่หาอาสาสมัครในชุมชน จังหวัดพิษณุโลก โดยกระบวนการ คือนักวิจัยลงพื้นที่โดยเริ่มจาก รพ.สต. ของแต่ละตำบล ซึ่งจะประสานขอความช่วยเหลือในเรื่องการประชาสัมพันธ์ และนักวิจัยเข้าไปหาอาสาสมัครโดยวิธีการสอบถามจากบุคคลในพื้นที่

#### 8.4 เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion Criteria)

อาสาสมัครที่สามารถเข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องมีคุณสมบัติ ดังนี้

- (1) มีอายุ 55-80 ปี
- (2) เชื้อชาติไทย
- (3) สามารถฟัง อ่าน และเขียนภาษาไทยได้
- (4) อาสาสมัครจะต้องลงลายมือชื่อในใบยินยอมด้วยความสมัครใจ
- (5) จบการศึกษา ไม่ต่ำกว่าประถมศึกษาปีที่ 4

#### 8.5 เกณฑ์การคัดออก (Exclusion Criteria)

อาสาสมัครที่จะคัดออก หรือไม่สามารถเข้าร่วมโครงการวิจัย ดังนี้

- (1) ตั้งครรภ์หรือกำลังให้นมบุตร หรือวางแผนจะตั้งครรภ์

- (2) รับประทานยาหรือยาสมุนไพรที่มีผลต่อระบบประสาท ซึ่งแพทย์ผู้เชี่ยวชาญวินิจฉัยว่าจะรบกวนผลการศึกษาทางคลินิกนี้
- (3) สูบบุหรี่ยเป็นประจำ หรือสูบบุหรี่จำนวนมากกว่า 10 มวนต่อวัน
- (4) ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่าเป็นโรคจิตเภท
- (5) ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่ามีภาวะสมองเสื่อม ประเมินจากแบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้นฉบับภาษาไทย Mini-Mental State Examination: Thai version (MMSE-Thai 2002) (จุดตัดของคะแนน ตามเอกสารแนบ MMSE-Thai 2002) ผู้สูงอายุปกติเรียนจบสูงกว่าระดับประถมศึกษา จุดตัดคะแนน  $\leq 25$  ถือว่ามีภาวะ mild cognitive impairment (MCI)
- (6) กำลังพยายามลดน้ำหนัก
- (7) ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่ามีภาวะซึมเศร้า ประเมินจากแบบวัดความซึมเศร้าในผู้สูงอายุของไทย Thai Geriatric Depression Scale (TGDS) (เกณฑ์การวินิจฉัยของคะแนน ตามเอกสารแนบ แบบวัดความซึมเศร้าในผู้สูงอายุของไทย)
- (8) เป็นโรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) โรคความดันโลหิตสูง หรือภาวะไขมันในเลือดสูงที่ได้รับการรักษา ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจากการซักประวัติผู้ป่วย

#### 8.6 เกณฑ์การนำอาสาสมัครออกจากการทดลอง (Withdrawal of Participant criteria)

- (1) ตั้งครรภ์ในระหว่างการศึกษาวินิจฉัย
- (2) ได้รับการรักษาโรคหรือยาสมุนไพรที่มีผลต่อการทำงานของระบบประสาทระหว่างการศึกษาวินิจฉัย
- (3) ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่าเป็นโรคจิตเภทระหว่างการศึกษาวินิจฉัย
- (4) ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่าเป็นโรคสมองเสื่อมระหว่างการศึกษาวินิจฉัย
- (5) ไม่ให้ความร่วมมือในการรับประทานสารสกัด การนัด หรือการตรวจร่างกาย
- (6) ค่าการทำงานของตับหรือไตสูงขึ้นกว่าค่าปกติ ในระหว่างการศึกษาวินิจฉัย กล่าวคือ  
 AST (SGOT) >33 units  
 ALT (SGPT) >35 units  
 Creatinine >1.4 mg/dl
- (7) ประสบอุบัติเหตุจนไม่สามารถเข้าร่วมการศึกษาต่อไปได้
- (8) อาสาสมัครขอยกเลิกการเข้าร่วมการทดลอง

(9) ในระหว่างที่ดำเนินการทดลอง ผู้วิจัยพิจารณาว่าอาสาสมัครเกิดอาการข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ร้ายแรง (SAE) อันเกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์หรือยา

#### 8.7 เกณฑ์การยุติโครงการ (Termination Criteria)

อาสาสมัครจะได้รับการร้องขอให้ยุติโครงการวิจัย ในกรณี Sponsor หรือ ผู้วิจัย ยกเลิกโครงการวิจัย

#### 9. วิธีการศึกษาวิจัย (intervention)

การศึกษาวิจัยโครงการ "ผลของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดสมองและหลอดเลือดส่วนปลายของผู้สูงอายุสุขภาพดี" เป็นการศึกษาประสิทธิผลของการรับประทานพรมมิน้ำสกัดเข้มข้นในอาสาสมัครสุขภาพดีสูงอายุ โดยการศึกษาเป็นแบบ randomized, double-blind, parallel groups design

ในการศึกษานี้ ใช้อาสาสมัครที่มี อายุ 55-80 ปี ที่ไม่เป็นผู้ป่วยจิตเภท โรคสมองเสื่อม โรคซึมเศร้า โรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) โรคความดันโลหิตสูง และภาวะไขมันในเลือดสูงที่ได้รับยาเพื่อการรักษา

ช่องทางการหาอาสาสมัครเพื่อเข้าสู่กระบวนการ screening ได้แก่ บัณฑิตอาสาสมัครที่ประกาศภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร โรงพยาบาล และ รพ.สต. จังหวัดพิษณุโลก และนักวิจัยลงพื้นที่หาอาสาสมัครในชุมชน จังหวัดพิษณุโลก

ผู้วิจัยจะอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น และประโยชน์จากการวิจัย รวมทั้งเปิดโอกาสให้อาสาสมัครซักถามข้อสงสัยก่อนที่จะลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย หลังจากอาสาสมัครลงนามให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยใน informed consent form ด้วยความสมัครใจแล้ว

การขอ consent จะทำก่อนรับอาสาสมัครเข้าการ screening การคัดเลือกอาสาสมัครตามเกณฑ์ที่ระบุไว้จะดำเนินการโดยแพทย์ผู้ร่วมโครงการ ทั้งนี้การเข้าร่วมจะเริ่มนัดอาสาสมัครเมื่อ screening ผ่าน และหากไม่ผ่านการ screening เรียกว่า screening failure

การคัดกรองอาสาสมัคร (screening) อาสาสมัครจะได้รับการประเมินผลต่าง ๆ เพื่อเป็นการคัดกรอง ดังนี้

- ✓ แบบสอบถามข้อมูลทั่วไป (personal general information questionnaire)
- ✓ แบบสอบถามทางการแพทย์ (medical health questionnaire)
- ✓ แบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้นฉบับภาษาไทย Mini-Mental State Examination: Thai version (MMSE-Thai 2002) (จุดตัดของคะแนน ตามเอกสารแนบ MMSE-Thai 2002)

✓ แบบวัดความซึมเศร้าในผู้สูงอายุของไทย Thai Geriatric Depression Scale (TGDS) (เกณฑ์การวินิจฉัยของคะแนน ตามเอกสารแนบ แบบวัดความซึมเศร้าในผู้สูงอายุของไทย)

เมื่อ screening ผ่านแล้ว อาสาสมัครจะต้องเดินทางมาที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (CosNat) มหาวิทยาลัยนเรศวร ทั้งหมด 6 ครั้ง อาสาสมัครจะได้รับการประเมินค่า parameters ต่าง ๆ ใน run-in period และ treatment period ในสัปดาห์ที่ 0, 4, 8 และ 12 ตามลำดับ และมีการติดตามผล (follow up) เป็นการประเมินเป็นครั้งสุดท้าย (delay) หลังจากสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 12 ไปแล้ว 4 สัปดาห์

#### ครั้งที่ 1 Placebo run-in period:

หลังจากอาสาสมัครผ่านกระบวนการคัดกรองแล้ว อาสาสมัครจะได้รับการร้องขอให้งดอาหารดอาหาร เครื่องดื่ม อย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง ก่อนเดินทางมาถึงที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ และดำเนินการต่ออาสาสมัคร ดังนี้

(1) อาสาสมัครได้รับการร้องขอให้เก็บอุจจาระจากที่บ้าน จากนั้นเมื่อมาถึงที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ อาสาสมัครจะได้รับการวัดความดันโลหิตขณะพัก และเจาะเลือดประมาณ 1 ซ้อนโต๊ะ (ประมาณ 15 มิลลิลิตร) โดยนักเทคนิคการแพทย์ (ใช้ syringe ขนาด 20 ml, จำนวน 1 syringe) และขอเก็บปัสสาวะ ต่อมาเลือดจะถูกแบ่งเพื่อวัดค่าชีวเคมีของเลือด ดังนี้ (i) เลือด 10 ml เพื่อวัด FBS, lipid profile, HbA<sub>1c</sub>, calcium, LFT, BUN and creatinine (ขั้นตอนนี้กระทำโดยนักเทคนิคการแพทย์) และ (ii) เลือด 5 ml เพื่อวัด endothelium markers ได้แก่ soluble I-CAM1, V-CAM1, และ ADMA โดยใช้ assay kits (ขั้นตอนนี้กระทำโดยนักวิจัย ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร) และเพื่อวิเคราะห์ bacopa ในเลือด หรือองค์ประกอบทางเคมีในเลือด โดย รศ.ดร.กรรณก อิงคินันท์ (วิธีการเก็บตัวอย่างชีววัตถุ ตามเอกสารแนบวิธีการเก็บตัวอย่างชีววัตถุ)

(2) อาสาสมัครจะได้รับการประเมินความจำ working memory โดยใช้โปรแกรม computerized cognitive battery test ซึ่งประมวลผลโดยคอมพิวเตอร์ และประเมินความจำด้วยแบบทดสอบ MMSE-Thai 2002 โดยแพทย์ผู้ร่วมโครงการ ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

อาสาสมัครทุกคนจะได้รับยาหลอก ซึ่งมีส่วนผสมเป็นลูกหม่อน และชุกราโลส เพื่อรับประทานในช่วง run-in period ทั้งสิ้น 2 สัปดาห์ โดยในแต่ละวันอาสาสมัครจะรับประทานวันละ 1 ขวด 1 ครั้งในช่วงเวลาใกล้เคียงกันของทุกวัน หลังอาหารเช้า ทั้งนี้ อาสาสมัครจะได้รับการร้องขอให้บันทึกการรับประทานยาหลอกนี้ในแต่ละวันในสมุดบันทึก (diary) ที่นักวิจัยเตรียมไว้ให้ และให้อาสาสมัครเก็บขวดเปล่าที่รับประทานหมดแล้วนำมาคืนเมื่อสิ้นสุด run-in period (2 สัปดาห์)

ประโยชน์ของ run-in period จากการศึกษาครั้งนี้ คือ (i) เพื่อเป็นการคัดกรองอาสาสมัครที่สามารถกระทำได้ตามจำนวน วัน และช่วงเวลาที่กำหนดตลอดทั้งการศึกษาได้ (ii) เพื่อเป็นการศึกษาความปลอดภัยเบื้องต้นหรืออาการอันไม่พึงประสงค์ของอาสาสมัครในการรับประทานยาหลอก และ (iii) เพื่อให้ได้ค่าชีวเคมีของเลือด เพื่อใช้เป็น baseline 2 ค่า

## ครั้งที่ 2 Treatment period สัปดาห์ที่ 0

Treatment period คือ ช่วงระยะเวลาที่อาสาสมัครรับประทานน้ำพรมิสกัดเข้มข้น ทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ โดยจะวัด parameters ต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 0 เป็น baseline และ สัปดาห์ที่ 4, 8, และ 12 ตามลำดับ

ใน treatment period สัปดาห์ 0 (baseline) อาสาสมัครจะได้รับการร้องขอให้งดอาหารด อาหาร เครื่องดื่ม อย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง ก่อนเดินทางมาถึงที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทำ เช่นเดียวกับในครั้งที่ 1 run-in period -ข้อ (1) และดำเนินการต่ออาสาสมัคร ดังนี้

(1) อาสาสมัครทุกคนจะได้รับการสอบถามอาการอันไม่พึงประสงค์จากการรับประทาน placebo ใน placebo run-in period และวัดความดันโลหิตขณะพัก ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

(2) อาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือด เก็บปัสสาวะและอุจจาระ กระทำเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 run-in period -ข้อ (1) ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

(3) อาสาสมัครจะได้รับการประเมินความจำ working memory โดยใช้โปรแกรม computerized cognitive battery test ซึ่งประมวลผลโดยคอมพิวเตอร์ และประเมินความจำด้วยแบบทดสอบ MMSE-Thai 2002 ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

(4) การไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ ประเมินที่ Cos-Nat โดยอาจารย์วัชรวิทย์ แก้วมหานิล ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

(5) อาสาสมัครจะได้รับการวัดการเปลี่ยนแปลงของการไหลของเลือดบริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia ที่ CosNat โดยนายณัฐกร คำแก้ว และรศ.ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์ ที่ Cosnat

จากนั้น อาสาสมัครจะได้รับการสุ่ม โดยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบกลุ่มย่อย (block randomization) หรือ block of four แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 20 คน ได้แก่

(1) กลุ่ม Brahmi treatment อาสาสมัครจะได้รับน้ำพรมิสกัดเข้มข้น เพื่อรับประทาน ทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ โดยในแต่ละวันอาสาสมัครจะรับประทานวันละ 1 ขวด 1 ครั้งในช่วงเวลา ใกล้เคียงกันของทุกวัน หลังอาหารเช้า ซึ่งพรมมีน้ำสกัดเข้มข้นมีส่วนผสมของสารสกัดพรมมิ ลูกหม่อน (mulberry) และซูคราโลส (sucralose สารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงาน)

(2) กลุ่ม Placebo control อาสาสมัครจะได้รับยาหลอก เพื่อรับประทานทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ โดยในแต่ละวันอาสาสมัครจะรับประทานวันละ 1 ขวด 1 ครั้งในช่วงเวลาใกล้เคียงกันของทุกวัน หลังอาหารเช้า ซึ่งยาหลอกประกอบด้วยลูกหม่อน และซูคราโลส โดยยาหลอกจะให้มีสี กลิ่น รสชาติและเนื้อสัมผัสเช่นเดียวกับน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นผสมลูกหม่อน แต่ยาหลอกไม่มีผลทางการรักษาใด ๆ

อาสาสมัครจะได้รับ Brahmi essence หรือ placebo รับประทานเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จำนวน 28 ขวดต่อคน ทั้งนี้ อาสาสมัครจะได้รับการร้องขอให้บันทึกการรับประทานน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นหรือยาหลอกในแต่ละวันในสมุดบันทึก (diary) ที่นักวิจัยเตรียมไว้ให้ และให้อาสาสมัครเก็บขวดเปล่าที่รับประทานหมดแล้วนำมาคืนใน treatment period สัปดาห์ที่ 4

#### ครั้งที่ 3 Treatment period สัปดาห์ 4

อาสาสมัครจะได้รับการวัด (i) ความจำ (ii) การไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ และ (iii) การเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia และ (iv) ความดันโลหิต

อาสาสมัครจะได้รับ Brahmi essence หรือ placebo รับประทานอีก 4 สัปดาห์ จำนวน 28 ขวดต่อคน ขอให้บันทึกการรับประทานน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นหรือยาหลอก และเก็บขวดเปล่าคืนใน treatment period สัปดาห์ที่ 8

#### ครั้งที่ 4 Treatment period สัปดาห์ 8

เช่นเดียวกับครั้งที่ 3 อาสาสมัครจะได้รับการวัด (i) ความจำ (ii) การไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ (iii) การเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia และ (iv) ความดันโลหิต

อาสาสมัครจะได้รับ Brahmi essence หรือ placebo รับประทานอีก 4 สัปดาห์ จำนวน 28 ขวดต่อคน ขอให้บันทึกการรับประทานน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นหรือยาหลอก และเก็บขวดเปล่าคืนใน treatment period สัปดาห์ที่ 12 (treatment period สัปดาห์สุดท้าย)

#### ครั้งที่ 5 Treatment period สัปดาห์ 12

เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 12 อาสาสมัครยุติการรับประทานพรมมิหรือ placebo และอาสาสมัครจะได้รับการร้องขอให้งดอาหารงดอาหาร เครื่องดื่ม อย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง ก่อนเดินทางมาถึงที่



คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทำเช่นเดียวกับในครั้งที่ 1 run-in period -ข้อ (1) และดำเนินการต่ออาสาสมัคร ดังนี้

(1) อาสาสมัครทุกคนจะได้รับการสอบถามอาการอันไม่พึงประสงค์จากการรับประทานผลิตภัณฑ์ และวัดความดันโลหิตขณะพัก ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

(2) อาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือด เก็บปัสสาวะและอุจจาระ กระทำเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 run-in period -ข้อ (1) ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

(2) อาสาสมัครจะได้รับการวัด (i) ความจำ (ii) การไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ (iii) การเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia และ (iv) ความดันโลหิต

อาสาสมัครจะหยุดรับประทาน Brahmi essence หรือ placebo และขอให้กลับบ้านที่ทำการรับประทานน้ำพรมมิสดักเข้มข้นหรือยาหลอกคืนนักวิจัย และเก็บขวดเปล่าคืน  
ครั้งที่ 6 Follow up period

หลังจากสิ้นสุดระยะ treatment ในสัปดาห์ 12 อาสาสมัครจะได้รับการติดตามผล สอบถามอาการอันไม่พึงประสงค์ ในอีก 4 สัปดาห์หลังจากสิ้นสุดการรับประทานน้ำพรมมิ และดำเนินการต่ออาสาสมัคร ดังนี้ อาสาสมัครจะได้รับการวัด (i) ความจำ (ii) การไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณคอ (iii) การเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia และ (iv) ความดันโลหิต

นักวิจัยเปิด (break) รหัสที่ระบุกลุ่มของอาสาสมัคร (code) เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการศึกษา

**การดูแลและคุ้มครองอาสาสมัคร ดังนี้**

- อาสาสมัครจะได้รับการประเมิน adverse events ในทุกครั้งที่มีการนัดที่ 0, 4, 8, 12, 16 week (F/U) ยกเว้น screening ผู้วิจัยระบุ adverse events ใน diary ของอาสาสมัคร โดยในแบบบันทึกประจำวันให้มีช่องระบุ อาการที่เกิดขึ้นต่ออาสาสมัคร ความถี่ รายละเอียดที่เกิดขึ้น การจัดการของอาสาสมัครต่ออาการที่เกิดขึ้น และระบุข้อความ "หากอาการไม่ดีขึ้นหรือร้ายแรงให้ติดต่อทีมผู้วิจัยหรือพบแพทย์ทันที"

- ผู้วิจัยจะตรวจการตั้งครรภ์ให้กับอาสาสมัครหญิง ในกรณีต่อไปนี้

1. กรณีที่อาสาสมัครหญิงยังคงมีประจำเดือนมาเป็นปกติ ผู้วิจัยจะจัดให้มีการตรวจการตั้งครรภ์ก่อนและหลัง (week 0 และ week 16 F/U)

2. กรณีที่ผู้วิจัยสอบถามอาสาสมัครหญิงว่าประจำเดือนหมดมานานเท่าไรหรือประจำเดือนมาครั้งสุดท้ายเมื่อไหร่ หากอาสาสมัครหญิงรายนั้นตอบว่าทั้งหมดประจำเดือนมาไม่เกิน 1 ปี ผู้วิจัยจะจัดให้มีการตรวจการตั้งครรภ์ก่อนและหลัง (week 0 และ week 16 F/U)

- ถ้าพบความผิดปกติจากผลการตรวจ carotid blood flow และพบความผิดปกติอื่นๆ เช่น ค่าพารามิเตอร์ในเลือด ผู้วิจัยจะมีมาตรการในการดำเนินการต่ออาสาสมัคร คือจะให้แพทย์ผู้เชี่ยวชาญเขียนใบส่งตัวเพื่อให้ไปรักษาตามสิทธิการรักษา

- อาสาสมัครจะถูกประเมินค่าการทำงานของตับและไต ทุกช่วงที่มีการเจาะเลือด ได้แก่

- (i) Run-in period week 0,
- (ii) Treatment period week 0
- (iii) Treatment period week 12

ทั้งนี้ การเจาะเลือดในครั้งแรก คือ ช่วง Run-in period week 0 ซึ่งในการเจาะเลือดครั้งนี้ อาสาสมัครยังไม่ได้รับประทาน placebo หรือ treatment ใดๆ ดังนั้น ที่มิจัยจะเพิ่มค่าการทำงานของตับและไต ที่ต่ำ-สูงกว่าเกณฑ์ปกติในระหว่างศึกษา เป็น withdrawal criteria เมื่อพบค่าผิดปกติในระหว่างศึกษาช่วง Run-in period week 0 จึงจะให้อาสาสมัคร withdraw ออกจากโครงการ

การตรวจค่าการทำงานของตับและไต กำหนดค่าปกติ ดังนี้

AST (SGOT) 0-33 units

ALT (SGPT) 3-35 units

Creatinine 0.4-1.4 mg/dl

การทดสอบ parameters ต่างๆ มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

#### 1. Cognition assessment

เป็นการประเมินหรือวัดความจำ (memory) และสมาธิจดจ่อ (attention) เพื่อประเมินผลของพรมมิในความจำระยะสั้นที่ใช้ในการทำงาน (working memory) ของอาสาสมัคร ซึ่งจะแปลผลได้เป็น 4 domain ได้แก่ power of attention, continuity of attention, quality of memory และ speed of memory (Peth-Nui et al., 2012) ประเมินความจำ โดยใช้โปรแกรม cognitive computerized battery test ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. จินตนาภรณ์ วัฒนธร ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## 2. Carotid blood flow

อาสาสมัครจะได้รับการวัดการไหลเวียนโลหิตที่หลอดเลือดแดงใหญ่บริเวณคอ (carotid artery) ซึ่งเป็นหลอดเลือดสำคัญที่นำเลือดจากหัวใจไปเลี้ยงสมองด้วยเครื่อง vascular Doppler ultrasound ซึ่งเป็นวิธีที่ปลอดภัยเนื่องจากเป็นเทคโนโลยีไม่รุกรานเข้าไปในร่างกาย (non-invasive technology) ด้วยหลักการคลื่นเสียงสะท้อนกลับจากการกระทบเม็ดเลือดที่กำลังเคลื่อนที่อยู่ในหลอดเลือดซึ่งสามารถนำมาคำนวณการไหลเวียนโลหิตที่นำเลือดไปเลี้ยงสมองจากความเร็วของเม็ดเลือดที่สะท้อนกลับจากกราฟ spectral waveform ทำให้สามารถวัดระดับการตีบของหลอดเลือดจากความเร็วที่เพิ่มขึ้น แต่ถ้าหลอดเลือดขยายตัวจะทำให้ความเร็วลดลง รวมทั้งยังสามารถประเมินหลอดเลือดแดงอุดตันจากภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerotic plaque) และความเสียหายของโรคสมองขาดเลือด (ischemic stroke) (Lee W., 2014)

## 3. Reactive hyperemia response

อาสาสมัครจะได้รับการวัดการเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia หลังจากรัดแขนส่วนบนด้วย cuff โดยใช้เครื่องมือ คือ peri-med หรือ real-time microcirculation imaging peri-cam PSI system ที่สามารถแสดงเป็นภาพสะท้อนให้เห็นถึงการไหลเวียนของเลือด (blood perfusion) ถ้าหลอดเลือดมีการทำงานที่ดีจะเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า reactive hyperemia ซึ่งหมายถึงการเพิ่มขึ้นของ blood flow แบบชั่วคราว เมื่ออวัยวะได้รับเลือดมาเลี้ยงอีกครั้งหลังจากที่ขาดออกซิเจน (ischemia) โดยการรัดแขนส่วนบนด้วย cuff ชั่วคราว เนื่องจากการรัดแขนส่วนบนจะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่ต่ำลงมาเกิดภาวะ hypoxia จึงกระตุ้นให้เซลล์หลั่ง local metabolites และ waste product รวมถึง nitric oxide ทำให้หลอดเลือดบริเวณนั้นคลายตัวแล้วมีผลเพิ่ม blood flow (กรองกาญจน์ ชูทิพย์, 2559)

## 4. Blood biochemistry

อาสาสมัครจะได้รับการร้องขอให้งดอาหารดอาหาร เครื่องดื่ม อย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง ก่อนเดินทางมาถึงที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จากนั้นอาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือด ในปริมาตรเลือด 15 ml หรือ ประมาณ 1 ซ้อนโต๊ะ (ใช้ syringe ขนาด 20 ml, จำนวน 1 syringe) กระทำที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยนักเทคนิคการแพทย์ ต่อมาเลือดจะถูกแบ่งเพื่อวัดค่าชีวเคมีของเลือด ดังนี้ (i) เลือด 10 ml เพื่อวัด FBS, lipid profile, HbA<sub>1c</sub>, calcium, LFT, BUN and creatinine (ขั้นตอนนี้กระทำโดยนักเทคนิคการแพทย์) และ (ii) เลือด 5 ml เพื่อวัด endothelium markers ได้แก่ soluble I-CAM1, V-CAM1, และ ADMA โดยใช้ assay

kits (ขั้นตอนนี้จะกระทำโดยนักวิจัย ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์) และเพื่อวิเคราะห์ bacopa ในเลือด หรือองค์ประกอบทางเคมีในเลือด โดย รศ.ดร.กรรณก อิงคนินันท์

การวัดค่า blood biochemistry นี้ จะวัด 3 ครั้ง ได้แก่ run-in period, treatment สัปดาห์ 0 และวัดเมื่อสิ้นสุดระยะ treatment ในสัปดาห์ 12

#### 5. Mean arterial pressure

อาสาสมัครจะได้รับการวัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ แล้วคำนวณค่าเป็น mean arterial pressure และ pulse pressure โดยวัดความดันโลหิตบริเวณ brachial artery ด้วยเครื่องวัดความดัน validated automated sphygmomanometer ในท่านั่งหลังจากพัก ก่อนการวัดเป็นเวลา 5 นาที (Calabrese et al., 2008)

#### 10. วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร (Approach to participant)

กระบวนการขอความยินยอม (Informed consent process) ผู้ทำวิจัยจะอธิบายข้อมูล ให้กับอาสาสมัครทั้งในส่วนวิธีการ ความเสี่ยง ผลและประโยชน์ที่ได้จากการศึกษา แจกเอกสาร ข้อมูลและแบบขอความยินยอมให้อาสาสมัครนำกลับไปพิจารณา ก่อนตัดสินใจ

#### 11. การเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

การเก็บข้อมูลจะถูกบันทึกในแบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย (case report form) ประกอบด้วย ข้อมูลส่วนบุคคลทั่วไป ข้อมูลสุขภาพ ข้อมูลที่ได้จากการวัด parameters ต่างๆ การเก็บรวบรวม ข้อมูลใน placebo run-in period และวัด parameters ต่าง ๆ ใน treatment period ในสัปดาห์ 0, 4, 8, และ 12 ตามลำดับ และติดตามผล (follow up) หลังจากสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 12 ไปแล้ว 4 สัปดาห์ และแบบรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์

นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จะถูกเก็บบันทึกลงในโปรแกรมบน software คอมพิวเตอร์ของ เครื่องมือนั้น ต่อมาจะคีย์ข้อมูลที่ได้ลงในเครื่องคอมพิวเตอร์กลาง รวมทั้งมีการ back up ข้อมูลไว้ในแผ่น CD ด้วย แฟ้มข้อมูลนี้ รวมทั้ง CD ข้อมูลจะเก็บเป็นความลับ ใส่ไว้ในตู้ locker ที่มีกุญแจ ล็อค

#### 12. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data Analysis and Statistics)

ข้อมูลจากการศึกษาจะนำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (means  $\pm$  SEM) การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลค่า parameters ต่าง ๆ ภายในกลุ่มระหว่างก่อน

และหลัง treatment ในแต่ละสัปดาห์ จะใช้สถิติ student t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่ม โดยสถิติ repeated ANOVA และ post hoc test ด้วย multiple comparison tukey test กำหนดค่านัยสำคัญ  $p\text{-value} < 0.05$

### 13. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration) ตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคน ซึ่งมีดังต่อไปนี้

13.1 หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) โดยการให้ข้อมูลอย่างครบถ้วนจนอาสาสมัครเข้าใจเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย และให้ความสำคัญถ้าการศึกษาเกี่ยวข้องกับประชากรกลุ่มเปราะบาง (vulnerable population) เก็บรักษาความลับของข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัคร โดยเก็บข้อมูลในตู้ที่มีกุญแจล็อกและมีรหัส และการเก็บในคอมพิวเตอร์ที่มีรหัสผ่าน

13.2 หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่อาสาสมัคร (Risk and Benefit) โดยการระบุว่าอาสาสมัครจะได้รับประโยชน์อะไรบ้าง และความเสี่ยงที่อาจเกิดต่อตัวอาสาสมัครมีอะไรบ้าง

อาสาสมัครได้รับการวัดความจำ การไหลของเลือดบริเวณสมองและหลอดเลือดโดยใช้เครื่องมือมาตรฐานและทันสมัย ปลอดภัย การเจาะเลือดกระทำโดยนักเทคนิคการแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ เจาะเลือดในปริมาณที่ปลอดภัย อาสาสมัครไม่เสียค่าใช้จ่าย และได้ค่าเดินทางและเงินชดเชยการสูญเสียรายได้ หรือความไม่สะดวกสบายในการมาพบแพทย์

13.3 การรักษาความลับของอาสาสมัคร (Privacy and Confidentiality) โดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวอาสาสมัคร โดยต้องระบุว่า จะมีการทำลายข้อมูลแบบใดและหลังการวิจัยเสร็จสิ้นจำนวนกี่ปี

ในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวอาสาสมัคร ข้อมูลอาสาสมัครจะถูกทำลายใน 1 ปี หลังสิ้นสุดโครงการวิจัยด้วยเครื่องทำลายเอกสาร

13.4 หลักความยุติธรรม (Justice) คือ มีเกณฑ์การคัดเลือกและออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน โดยวิธีคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมโครงการงานวิจัยนี้ระบุเกณฑ์คัดเลือกที่ชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียม วิธีคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมโครงการโดยวิธีการใช้คอมพิวเตอร์สุ่มขึ้นมา

13.5 อุปสรรคและความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นต่ออาสาสมัครและความรับผิดชอบของผู้วิจัย (Challenges and risks towards participants including investigator's Responsibility) คือ อุปสรรคหรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นต่ออาสาสมัคร เช่น คำถามบางคำถามอาจกระทบกระเทือนจิตใจอาสาสมัคร ดังนั้นผู้วิจัยมีวิธีป้องกันโดยการมีแพทย์ที่มีประสบการณ์ในการให้คำปรึกษาหากมีกรณีดังกล่าวเกิดขึ้น เป็นต้น

เนื่องจากงานวิจัยนี้จะทำการเจาะเลือดอาสาสมัคร จึงมีความเสี่ยงเกิดขึ้นจากความเชี่ยวชาญของผู้เจาะเลือด จึงดำเนินการโดยนักเทคนิคการแพทย์ ผู้มีประสบการณ์เจาะเลือดเป็นประจำ จากคลินิกเทคนิคการแพทย์

#### 14. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected or Anticipated Benefit Gain)

1. การเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภคในการรับประทานอาหารเสริมในรูปแบบน้ำพรมมิสกัดเข้มข้น
2. เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญเพื่อแสดงผลของพรมมิในการเพิ่มการไหลของเลือดสู่สมองและในหลอดเลือดส่วนปลาย
3. เป็นประโยชน์การประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาผู้ป่วย vascular dementia ในผู้สูงอายุ

#### 15. ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ (Study Period)

มกราคม 2561 – ธันวาคม 2561

#### 16. สถานที่ดำเนินการวิจัย (Venue of the Study)

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ และศูนย์วิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (CosNat) มหาวิทยาลัยนเรศวร

#### 17. การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Tabulation of Research Activities and Timeline)

ปี	กิจกรรม	ม. ค.	ก. พ.	มี. ค.	เม. ย.	พ. ค.	มิ. ย..	ก. ค.	ส. ค.	ก. ย.	ต. ค.	พ. ย..	ธ. ค.
2561	คัดเลือกอาสาสมัคร	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2561	การทดสอบทางคลินิก ในอาสาสมัคร	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ปี	กิจกรรม	ม. ค.	ก. พ.	มี. ค.	เม. ย.	พ. ค.	มิ. ย.	ก. ค.	ส. ค.	ก. ย.	ต. ค.	พ. ย.	ธ. ค.
2561	วิเคราะห์ข้อมูล สรุป ผลการวิจัย	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2561	เขียนรายงานการวิจัย	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

### 18. เอกสารอ้างอิง (References)

- กรองกาญจน์ ชูทิพย์. สรีรวิทยาระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดกับการประยุกต์ใช้ทางเภสัชวิทยา. พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2560; 335-387
- กัมมันต์ พันธุ์จินดา. Basic and Clinical Neuroscience 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2555; 30-38
- นิตยา สุวรรณเวลา. Basic and Clinical Neuroscience 5. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2555
- แบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้นฉบับภาษาไทย. สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ. กรมการแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข; 2542.
- Aguiar, S. and Borowski, T. (2013). Neuropharmacological review of the nootropic herb *Bacopa monnieri*. *Rejuvenation Res*, 16(4), 313-326. doi: 10.1089/rej.2013.1431
- Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K., & Devi, C. S. (2006). Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci*, 78(12), 1378-1384. doi: 10.1016/j.lfs.2005.07.030
- Arlt, S., Schulze, F., Eichenlaub, M., Maas, R., Lehmebeck, J. T., Schwedhelm, E., . . . Boger, R. H. (2008). Asymmetrical dimethylarginine is increased in plasma and decreased in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 26(1), 58-64. doi: 10.1159/000144026
- Asif, M., Soiza, R. L., McEvoy, M., & Mangoni, A. A. (2013). Asymmetric dimethylarginine: a possible link between vascular disease and dementia. *Curr Alzheimer Res*, 10(4), 347-356.

- Barbhaiya, H. C., Desai, R. P., Saxena, V. S., Pravina, K., Wasim, P., Geetharani, P., Allan, J. J., Venkateshwarlu, K., & Agarwal, A. (2008). Efficacy and Tolerability of BacoMind® on Memory Improvement in Elderly Participants - A Double Blind Placebo Controlled Study. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3(6), 425-434. doi: 10.3923/jpt.2008.425.434
- Baskys, A., & Hou, A. C. (2007). Vascular dementia: Pharmacological treatment approaches and perspectives. *Clinical Interventions in Aging*, 2(3), 327-335.
- Bhattacharya, S. K., & Ghosal, S. (1998). Anxiolytic activity of a standardized extract of *Bacopa monniera*: an experimental study. *Phytomedicine*, 5(2), 77-82. doi: 10.1016/s0944-7113(98)80001-9
- Calabrese, C., Gregory, W. L., Leo, M., Kraemer, D., Bone, K. and Oken, B. (2008). Effects of a standardized *Bacopa monnieri* extract on cognitive performance, anxiety, and depression in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Altern Complement Med*, 14(6), 707-713. doi: 10.1089/acm.2008.0018
- Charles, P. D., Ambigapathy, G., Geraldine, P., Akbarsha, M. A., & Rajan, K. E. (2011). *Bacopa monniera* leaf extract up-regulates tryptophan hydroxylase (TPH2) and serotonin transporter (SERT) expression: implications in memory formation. *J Ethnopharmacol*, 134(1), 55-61. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.045
- Charoenphon, N., Anandsongvit, N., Kosai, P., Sirisidthi, K., Kangwanrangsan, N., & Jiraungkoorskul, W. (2016). Brahmi (*Bacopa monnieri*): Up-to-date of memory boosting medicinal plant: A review. *Indian Journal of Agricultural Research*, 50(1), 1-7. doi: 10.18805/ijare.v50i1.8582
- Chan EW, Lye P, Wong S. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Journal of Natural Medicines* 2016, 14(1): 0017-0030 doi: 10.3724/SP.J.1009.2016.00017
- Chang, B. Y., Kim, S. B., Lee, M. K., Park, H., & Kim, S. Y. (2016). Nonclinical Safety Assessment of *Morus alba* L. Fruits: Study of 90-D Toxicity in Sprague Dawley Rats and Genotoxicity in Salmonella. *J Food Sci*, 81(5), T1328-1335. doi: 10.1111/1750-3841.13285



- Chen CC, Liu LK, Hsu JD et al. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits [J]. *Food Chem*, 2005, 91: 601-607.
- Cohen, R. A., Poppas, A., Forman, D. E., Hoth, K. F., Haley, A. P., Gunstad, J., . . . Gerhard-Herman, M. (2009). Vascular and cognitive functions associated with cardiovascular disease in the elderly. *J Clin Exp Neuropsychol*, 31(1), 96-110. doi: 10.1080/13803390802014594
- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S. and Singh, H. (2002). A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacol Biochem Behav*, 73(4), 893-900.
- Dhawan, B. N., & Singh, H. K. (1996). Pharmacological studies on *bacopa monniera*, an Ayurvedic nootropic agent. *European Neuropsychopharmacology*, 6, 144. doi: 10.1016/0924-977X(96)87969-7
- de la Torre, J. C. (2012). Cardiovascular Risk Factors Promote Brain Hypoperfusion Leading to Cognitive Decline and Dementia. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 15. doi: 10.1155/2012/367516
- Deepak, M., Sangli, G. K., Arun, P. C. and Amit, A. (2005). Quantitative determination of the major saponin mixture bacoside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. *Phytochem Anal*, 16(1), 24-29. doi: 10.1002/pca.805
- Dhanasekaran, M., Tharakan, B., Holcomb, L. A., Hitt, A. R., Young, K. A., & Manyam, B. V. (2007). Neuroprotective mechanisms of ayurvedic antidementia botanical *Bacopa monniera*. *Phytother Res*, 21(10), 965-969. doi: 10.1002/ptr.2195
- Downey, L. A., Kean, J., Nemeh, F., Lau, A., Poll, A., Gregory, R., Murray, M., Rourke, J., Patak, B., Pase, M. P., Zangara, A., Lomas, J., Scholey, A. and Stough, C. (2013). An acute, double-blind, placebo-controlled crossover study of 320 mg and 640 mg doses of a special extract of *Bacopa monnieri* (CDRI 08) on sustained cognitive performance. *Phytother Res*, 27(9), 1407-1413. doi: 10.1002/ptr.4864

- Dwivedi, S., Nagarajan, R., Hanif, K., Siddiqui, H. H., Nath, C., & Shukla, R. (2013). Standardized Extract of *Bacopa monniera* Attenuates Okadaic Acid Induced Memory Dysfunction in Rats: Effect on Nrf2 Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 294501. doi: 10.1155/2013/294501
- Erkinjuntti, T., & Gauthier, S. (2009). The concept of vascular cognitive impairment. *Front Neurol Neurosci*, 24, 79-85. doi: 10.1159/000197886
- Gohil, K. and Patel, J. (2010). A review on *Bacopa monniera*: current research and future prospects. *International journal of green pharmacy*, 4(1), 1.
- Holcomb, L. A., Dhanasekaran, M., Hitt, A. R., Young, K. A., Riggs, M., & Manyam, B. V. (2006). *Bacopa monniera* extract reduces amyloid levels in PSAPP mice. *J Alzheimers Dis*, 9(3), 243-251.
- Hota, S. K., Barhwal, K., Baitharu, I., Prasad, D., Singh, S. B., & Ilavazhagan, G. (2009). *Bacopa monniera* leaf extract ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial memory impairment. *Neurobiology of Disease*, 34(1), 23-39. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.12.006>
- Jiao, Y., Wang, X., Jiang, X., Kong, F., Wang, S., & Yan, C. (2017). Antidiabetic effects of *Morus alba* fruit polysaccharides on high-fat diet- and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *J Ethnopharmacol*, 199, 119-127. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.003
- Joshua Allan, J., Damodaran, A., Deshmukh, N. S., Goudar, K. S., & Amit, A. (2007). Safety evaluation of a standardized phytochemical composition extracted from *Bacopa monnieri* in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1928-1937. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.04.010>
- Jyoti, A., & Sharma, D. (2006). Neuroprotective role of *Bacopa monniera* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. *Neurotoxicology*, 27(4), 451-457. doi: 10.1016/j.neuro.2005.12.007
- Kaewkaen, P., Tong-Un, T., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Kaewrueng, W., & Wongcharoenwanakit, S. (2012). Mulberry Fruit Extract Protects against Memory Impairment and Hippocampal Damage in Animal Model of Vascular Dementia. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 263520. doi: 10.1155/2012/263520

- Kalaria, R. N. (2016). Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 131(5), 659-685. doi: 10.1007/s00401-016-1571-z
- Kamkaew, N., Norman Scholfield, C., Ingkaninan, K., Taepavarapruk, N. and Chootip, K. (2013). *Bacopa monnieri* increases cerebral blood flow in rat independent of blood pressure. *Phytother Res*, 27(1), 135-138. doi: 10.1002/ptr.4685
- Kamkaew, N., Scholfield, C. N., Ingkaninan, K., Manesai, P., Parkington, H. C., Tare, M. and Chootip, K. (2011). *Bacopa monnieri* and its constituents is hypotensive in anaesthetized rats and vasodilator in various artery types. *J Ethnopharmacol*, 137(1), 790-795. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.045
- Kean, J. D., Kaufman, J., Lomas, J., Goh, A., White, D., Simpson, D., . . . Stough, C. (2015). A Randomized Controlled Trial Investigating the Effects of a Special Extract of *Bacopa monnieri* (CDRI 08) on Hyperactivity and Inattention in Male Children and Adolescents: BACHI Study Protocol (ANZCTRN12612000827831). *Nutrients*, 7(12), 9931-9945. doi: 10.3390/nu7125507
- Khan, K. M., Windt, A., Davis, J. C., Dawes, M., Liu-Ambrose, T., Madden, K., . . . Adams, D. J. (2015). Group Medical Visits (GMVs) in primary care: an RCT of group-based versus individual appointments to reduce HbA<sub>1c</sub> in older people. *BMJ Open*, 5(7), e007441. doi: 10.1136/bmjopen-2014-007441
- Kongkeaw, C., Dilokthornsakul, P., Thanarangsarit, P., Limpeanchob, N. and Norman Scholfield, C. (2014). Meta-analysis of randomized controlled trials on cognitive effects of *Bacopa monnieri* extract. *J Ethnopharmacol*, 151(1), 528-535. doi: 10.1016/j.jep.2013.11.008
- Kumar, V. (2006). Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. *Phytother Res*, 20(12), 1023-1035. doi: 10.1002/ptr.1970
- Lee, W. (2014). General principles of carotid Doppler ultrasonography. *Ultrasonography* 33(1), 11-17.
- Limpeanchob, N., Jaipan, S., Rattanakaruna, S., Phrompittayarat, W. and Ingkaninan, K. (2008). Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *J Ethnopharmacol*, 120(1), 112-117. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.039

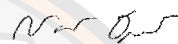
- Mathew, J., Paul, J., Nandhu, M. S., & Paulose, C. S. (2010). Bacopa monnieri and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. *Fitoterapia*, *81*(5), 315-322. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.11.005>
- McPhee, G. M., Downey, L. A., Noble, A., & Stough, C. (2016). Cognitive training and Bacopa monnieri: Evidence for a combined intervention to alleviate age associated cognitive decline. *Medical Hypotheses*, *95*, 71-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.09.002>
- McVeigh, C., & Passmore, P. (2006). Vascular dementia: prevention and treatment. *Clinical Interventions in Aging*, *1*(3), 229-235.
- Mitra, P., Ghosh, T., & Mitra, P. K. (2014). Effect of an isolated compound (BM-1) from Bacopa monnieri (L.) Wettst. leaves on serum lipids in normal and diabetic Rats. *SMU Med. J.*, *1*, 166-174.
- Mitra, P. K. (2014). Hypolipidemic effect of Bacopa monnieri (L.) Wettst leaves in rats: seasonal variation. *Eur. J. Mol. Biol. Biochem.*, *1*, 124-127.
- Nandave, M., Ojha, S. K., Joshi, S., Kumari, S., & Arya, D. S. (2007). Cardioprotective effect of Bacopa monnieri against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *International Journal of Pharmacology*, *3*(5), 385-395. doi: [10.3923/ijp.2007.385.392](https://doi.org/10.3923/ijp.2007.385.392)
- Nemetchek, M. D., Stierle, A. A., Stierle, D. B., & Lurie, D. I. (2017). The Ayurvedic plant Bacopa monnieri inhibits inflammatory pathways in the brain. *Journal of Ethnopharmacology*, *197*, 92-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.073>
- Onsard, A., Scholfield, C.N., Ingkaninan, K., Srimachai, S., Kamkaew, N. and Chootip, K. (2012). Oral Bacopa monnieri is antihypertensive in rats chronically treated with L-NAME. *J. Physiol. Biomed. Sci.*, *25*: 23-26.
- Peth-Nui, T., Wattanathorn, J., Muchimapura, S., Tong-Un, T., Piyavhatkul, N., Rangseekajee, P., Ingkaninan, K. and Vittaya-Areekul, S. (2012). Effects of 12-Week Bacopa monnieri Consumption on Attention, Cognitive Processing, Working Memory, and Functions of Both Cholinergic and Monoaminergic Systems in Healthy Elderly Volunteers. *Evid Based Complement Alternat Med*, 606424. doi: [10.1155/2012/606424](https://doi.org/10.1155/2012/606424)

- Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Jetiyanon, K., Wittaya-Areekul, S. and Ingkaninan, K. (2007a). Determination of pseudojuginogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochem Anal*, 18(5), 411-418. doi: 10.1002/pca.996
- Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-Areekul, S., Jetiyanon, K. and Ingkaninan, K. (2007b). An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal Chim Acta*, 584(1), 1-6. doi: 10.1016/j.aca.2006.11.017
- Pravina, K., Ravindra, K. R., Goudar, K. S., Vinod, D. R., Joshua, A. J., Wasim, P., . . . Amit, A. (2007). Safety evaluation of BacoMind in healthy volunteers: a phase I study. *Phytomedicine*, 14(5), 301-308. doi: 10.1016/j.phymed.2007.03.010
- Raghav, S., Singh, H., Dalal, P. K., Srivastava, J. S. and Asthana, O. P. (2006). Randomized controlled trial of standardized *Bacopa monniera* extract in age-associated memory impairment. *Indian J Psychiatry*, 48(4), 238-242. doi: 10.4103/0019-5545.31555
- Research, T. (2004). *Bacopa monniera*. Monograph. *Altern Med Rev*, 9(1), 79-85.
- Roodenrys, S., Booth, D., Bulzomi, S., Phipps, A., Micallef, C. and Smoker, J. (2002). Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. *Neuropsychopharmacology*, 27(2), 279-281. doi: 10.1016/s0893-133x(01)00419-5
- Russo, A. and Borrelli, F. (2005). *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine*, 12(4), 305-317. doi: 10.1016/j.phymed.2003.12.008
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, R. K., & Bhattacharya, S. K. (2002). Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine*, 9(3), 207-211. doi: 10.1078/0944-7113-00116
- Saraf, M. K., Prabhakar, S., Khanduja, K. L., & Anand, A. (2011). *Bacopa monniera* Attenuates Scopolamine-Induced Impairment of Spatial Memory in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 236186. doi: 10.1093/ecam/neq038

- Sathyanarayanan, V., Thomas, T., Einother, S. J., Dobriyal, R., Joshi, M. K. and Krishnamachari, S. (2013). Brahmi for the better? New findings challenging cognition and anti-anxiety effects of Brahmi (*Bacopa monniera*) in healthy adults. *Psychopharmacology (Berl)*, 227(2), 299-306. doi: 10.1007/s00213-013-2978-z
- Sibal, L., Agarwal, S. C., Home, P. D., & Boger, R. H. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev*, 6(2), 82-90. doi: 10.2174/157340310791162659
- Singh, R. H., & Singh, L. (1980). Studies on the anti-anxiety effect of the medhya rasayana drug, Brahmi (*Bacopa monniera* Wettst)-part 1. *J Res Ayur Siddha*, 1, 133-148.
- Singh, H. K. (2013). Brain Enhancing Ingredients from Āyurvedic Medicine: Quintessential Example of *Bacopa monniera*, a Narrative Review. *Nutrients*, 5(2), 478-497. doi: 10.3390/nu5020478
- Singh, R., Panduri, J., Kumar, D., Kumar, D., Chandsana, H., Ramakrishna, R., & Bhatta, R. S. (2013). Evaluation of Memory Enhancing Clinically Available Standardized Extract of *Bacopa monniera* on P-Glycoprotein and Cytochrome P450 3A in Sprague-Dawley Rats. *PLOS ONE*, 8(8), e72517. doi: 10.1371/journal.pone.0072517
- Sireeratawong, S., Jaijoy, K., Khonsung, P., Lertprasertsuk, N., & Ingkaninan, K. (2016). Acute and chronic toxicities of *Bacopa monnieri* extract in Sprague-Dawley rats. *BMC Complement Altern Med*, 16, 249. doi: 10.1186/s12906-016-1236-4
- Srimachai, S., Devaux, S., Demougeot, C., Kumphune, S., Ullrich, N. D., Niggli, E., ... Chootip, K. (2017). *Bacopa monnieri* extract increases rat coronary flow and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 117. <http://doi.org/10.1186/s12906-017-1637-z>
- Stough, C., Lloyd, J., Clarke, J., Downey, L., Hutchison, C., Rodgers, T. and Nathan, P. (2001). The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology*, 156(4), 481-484. doi: 10.1007/s002130100815

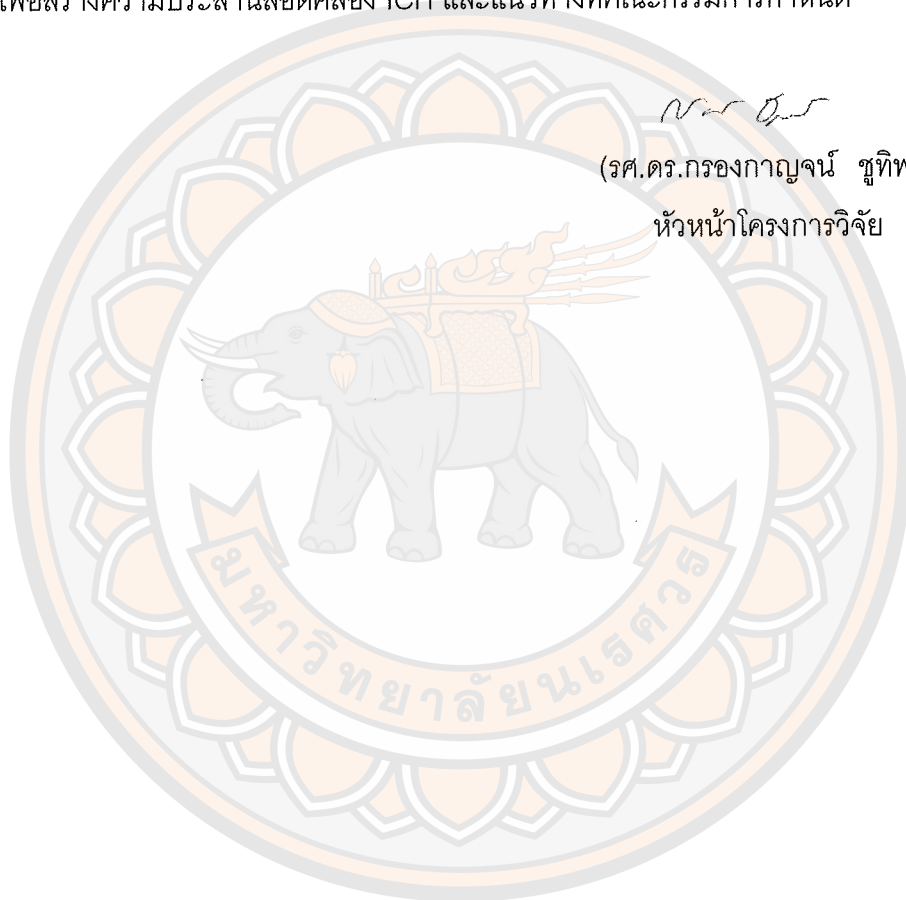
- Stough, C., Downey, L. A., Lloyd, J., Silber, B., Redman, S., Hutchison, C., Wesnes, K. and Nathan, P. J. (2008). Examining the nootropic effects of a special extract of *Bacopa monniera* on human cognitive functioning: 90 day double-blind placebo-controlled randomized trial. *Phytother Res*, 22(12), 1629-1634. doi: 10.1002/ptr.2537
- Sztefko, K., Mamica, K., Bugajska, J., Maziarz, B., & Tomasik, P. (2014). [Blood volume for biochemistry determinations--laboratory needs and everyday practice]. *Przeegl Lek*, 71(1), 10-13.
- Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S., & Ingkaninan, K. (2010). Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J Ethnopharmacol*, 127(1), 26-31. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.056
- Vohora, D., Pal, S. N., & Pillai, K. K. (2000). Protection from phenytoin-induced cognitive deficit by *Bacopa monniera*, a reputed Indian nootropic plant. *J Ethnopharmacol*, 71(3), 383-390.
- Vollala, V. R., Upadhy, S., & Nayak, S. (2010). Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on learning and memory in rats: A behavioral study. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 5(2), 69-74. doi: 10.1016/j.jveb.2009.08.007
- Vollala, V. R., Upadhy, S., & Nayak, S. (2011a). Enhancement of basolateral amygdaloid neuronal dendritic arborization following *Bacopa monniera* extract treatment in adult rats. *Clinics*, 66(4), 663-671. doi: 10.1590/S1807-59322011000400023
- Vollala, V. R., Upadhy, S., & Nayak, S. (2011b). Learning and memory-enhancing effect of *Bacopa monniera* in neonatal rats. *Bratisl Lek Listy*, 112(12), 663-669.
- Wang, Y., Xiang, L., Wang, C., Tang, C., & He, X. (2013). Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PLoS One*, 8(7), e71144. doi: 10.1371/journal.pone.0071144
- Zhong, B. (2009). How to Calculate Sample Size in Randomized Controlled Trial? *Journal of Thoracic Disease*, 1(1), 51-54.

“ข้าพเจ้าจะดำเนินการวิจัยตามหลักแนวทางจริยธรรมการทำวิจัยในคนแห่งชาติ ของชมรมจริยธรรมการวิจัยในคนในประเทศไทย พ.ศ. 2550 ปฏิญญาเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) รายงาน เบลมอนต์ (Belmont Report) แนวทางจริยธรรมสากลสำหรับการศึกษาวิจัยทางชีวเวชศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ของสภาองค์การสากลด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ (The National and International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects : CIOMS) แนวทางการปฏิบัติเกี่ยวกับการวิจัยที่ดีขององค์การอนามัยโลกและองค์การสากลเพื่อสร้างความประสานสอดคล้อง ICH และแนวทางที่คณะกรรมการกำหนด ”



(รศ.ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์)

หัวหน้าโครงการวิจัย









## บันทึกประจำวัน (Diary record)

งานวิจัย ผลของน้ำพรมมิสกักเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของ  
อาสาสมัคร

เลขที่โครงการวิจัย 0898/60

Diary ประจำเดือน.....

วันที่	ระยะเวลา กิน เช่น 20.00 น.	กินปกติ (✓)	ลืมกิน (✓)	พบอาการข้างเคียงไหม ?				
				พบ (✓)	ไม่พบ (✓)	(ถ้าพบ) ระบุอาการ รายละเอียดที่ เกิดขึ้น	(ถ้าพบ) ระบุความถี่	(ถ้าพบ) การจัดการของ ท่าน ต่ออาการที่ เกิดขึ้น
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								

กรณีพบอาการข้างเคียง หากท่านอาการไม่ดีขึ้นหรือร้ายแรงให้ติดต่อทีมผู้วิจัยหรือพบแพทย์ทันที  
ติดต่อ นายณัฐกร คำแก้ว คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โทร 0882615924

## APPENDIX O ADVERSE EVENT REPORT



### บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โทร 4658

ที่ ศธ 0527.16.01/\_ วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2561

เรื่อง ขอส่งรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรง

เรียน ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ด้วย ข้าพเจ้า รองศาสตราจารย์ ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์ อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีความประสงค์ที่จะส่งรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ของโครงการวิจัย เรื่อง (ชื่อภาษาไทย) ผลของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (ภาษาอังกฤษ) Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers เลขที่โครงการ IRB.No. 0898/2561 ซึ่งได้ผ่านการรับรอง จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2561 และขอแนบเอกสารประกอบการพิจารณา ดังนี้

1. Adverse Event and Problem Report จำนวน 1 ชุด
2. CD ข้อมูลเอกสารทั้งหมด

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์)

หัวหน้าโครงการวิจัย



## บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ โทร 4658

ที่ ศธ 0527.16.01/ วันที่ มีนาคม 2562

เรื่อง ขอแจ้งผลการติดตามเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรง

เรียน ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ด้วย ข้าพเจ้า รองศาสตราจารย์ ดร.กรรณกาญจน์ ชูทิพย์ อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง (ชื่อภาษาไทย) ผลของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (ภาษาอังกฤษ) Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers เลขที่โครงการ IRB.No. 0898/2561 ซึ่งได้ผ่านการรับรอง จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2561


สืบเนื่องจากที่รายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ บันทึกข้อความ ศธ 0527.16.01/.. ลงวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2562 โดยรายงานระบุว่า อาสาสมัคร 1 ราย มีอาการหายใจลำบาก ต้องเข้ารับการรักษา ณ ห้องไอซียู โรงพยาบาลพุทธชินราช ตั้งแต่วันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2562 นั้น

ข้าพเจ้าได้ติดตามอาการมาโดยตลอด จึงมีความประสงค์ที่จะแจ้งผลการติดตามเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ดังกล่าว โดยแพทย์วินิจฉัยสาเหตุว่าเกิดจากการแพ้อย่างรุนแรงจากควินูป การเผาขยะ หรือฝุ่นละออง ปัจจุบันมีอาการดีขึ้น เมื่อวันที่ 5 มีนาคม 2562 ย้ายเข้าห้องพิเศษ และวันที่ 18 มีนาคม 2562 ย้ายกลับมาพักที่บ้านแล้ว

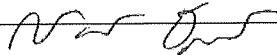
จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรรณกาญจน์ ชูทิพย์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

 Naresuan University Institutional Review Board	แบบรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ ชนิดร้ายแรง ในสถาบัน <b>Adverse Events and          Problem          Report Form - Internal</b>
---	---

<b>Protocol Title:</b>	ผลของน้ำพรมมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers)
<b>COA No:</b>	IRB.No. 0898/2561
<b>Principal Investigator:</b>	รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์
<b>Sponsor:</b>	TCELS
<b>Medicine or cosmetic or device</b>	-
<b>Study site:</b>	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
<b>Adverse Event:</b>	หายใจลำบาก
<b>Onset of SAE: (dd/mm/yyyy)</b>	6 กุมภาพันธ์ 2561
<b>Event reported:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Initial report <input type="checkbox"/> Follow-up report
<b>Severity of event:</b>	<input type="checkbox"/> Death                      Type equation here. <input type="checkbox"/> Life threatening <input checked="" type="checkbox"/> Hospitalization or prolongation of hospitalization <input type="checkbox"/> Persistent or significant disability or incapacity <input type="checkbox"/> Congenital anomaly or birth defect <input type="checkbox"/> Required intervention to prevent permanent impairment <input type="checkbox"/> Other .....
<b>Causality of event:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Unrelated (clearly not related to the research) <input type="checkbox"/> Unlikely (doubtfully related to the research) <input type="checkbox"/> Possible (may be related to the research) <input type="checkbox"/> Probable (likely related to the research) <input type="checkbox"/> Definite (clearly related to the research)
<b>Is the reaction expected?</b>	<input type="checkbox"/> Expected <input checked="" type="checkbox"/> Unexpected (not mentioned in the protocol or Investigator Brochure)
<b>Is the event classified as a SUSAR</b>	<input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> Yes

<b>Progression</b>	Is the event due to progression of an underlying illness? <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes
<b>Action take with study treatment:</b>	<input type="checkbox"/> Continued <input type="checkbox"/> Reduced <input type="checkbox"/> Increased <input type="checkbox"/> Temporary stop <input checked="" type="checkbox"/> Permanent stop
<b>Outcome of SAE:</b>	<input type="checkbox"/> Resolved <input type="checkbox"/> Resolved with sequelae <input type="checkbox"/> Improved <input type="checkbox"/> Persistent <input type="checkbox"/> Worsened <input type="checkbox"/> Fatal <input checked="" type="checkbox"/> Unknown
<b>Other actions taken:</b>	<input type="checkbox"/> No action required <input type="checkbox"/> Amend consent document <input type="checkbox"/> Amend protocol <input type="checkbox"/> Inform current subjects <input type="checkbox"/> Terminate or suspend protocol <input checked="" type="checkbox"/> Others ... withdraw ให้อาสาสมัครออกจากโครงการ
<b>Have Similar Adverse Events Occurred on this protocol?</b>	<input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes      How many? _____
<b>Comment (Principle investigator or Site investigator):</b>	
<p>อาสาสมัคร 1 ราย ชื่อ น.ส.กิมเอ็ง กาญจนกาญจน์ อายุ 67 ปี เป็นอาสาสมัครสุขภาพดี ไม่มีโรคประจำตัว ได้แก่ โรคสมองเสื่อม ความดัน เบาหวาน ไขมันสูง และโรคตับ จากแบบสอบถามและตรวจค่าเลือด เข้าร่วมโครงการ โดยดื่มน้ำผลไม้สดที่สกัดเข้มข้นวันละ 1 ขวดเบอร์นั้ ตั้งแต่ 11 ตุลาคม 2561 ถึง 17 มกราคม 2562 สิ้นสุดการรับประทานน้ำสกัด และได้มาวัดความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลาย แล้วจำนวน 5 ครั้ง โดยทุกครั้ง ได้สอบถามอาการไม่พึงประสงค์ พบว่าไม่พบเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการรับประทานน้ำสกัด เมื่อวันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2562 ญาติโทรแจ้งว่า อาสาสมัครเข้ารับการรักษาอยู่ ห้อง ICU โรงพยาบาลพุทธชินราช ตั้งแต่ 6 กุมภาพันธ์ 2562 ระบุอาการหายใจลำบาก ญาติแจ้งว่าแพทย์อยู่ระหว่างวินิจฉัยหาสาเหตุว่าอาจเกิดจากโรคปอดติดเชื้อหรือไม่ วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2562 ผู้วิจัยแจ้งหัวหน้าโครงการและแพทย์ผู้ร่วมโครงการทราบ พิจารณาให้อาสาสมัครออกจากโครงการ ผู้วิจัยได้เข้าไปเยี่ยมอาสาสมัครที่ห้อง ICU ชั้น 4 คึกอายุกรรม โรงพยาบาลพุทธชินราช และวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2562 แพทย์เจ้าของไข้ โรงพยาบาลพุทธชินราช ได้โทรมาสอบถามเกี่ยวกับโครงการวิจัยที่ผู้ป่วยเข้าร่วม ผู้วิจัยให้ข้อมูลที่แพทย์สอบถาม โดยแพทย์แจ้งว่าขณะนี้อาสาสมัครยังรับการรักษาอยู่ที่โรงพยาบาล อาการไม่ดีขึ้น และกำลังหาสาเหตุของโรค</p>	
<input checked="" type="checkbox"/> Principle investigator <input type="checkbox"/> Site investigator	<b>Name:</b> รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์
<b>Date</b> วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2562	<b>Signature</b> 

## APPENDIX P PROJECT CLOSURE REPORT FOR HUMAN ETHIC



### บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยวงจวิทยา โทร. 4658

ที่ ศบ ๐๕๒๗.๑๖.๐๕/๒๕๖๘

วันที่ ๒๓ เมษายน พ.ศ. ๒๕๖๒

เรื่อง ขอส่งรายงานสรุปผลการวิจัยที่ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

เรียน ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยวงจวิทยา

ด้วย ข้าพเจ้า รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์ สถานภาพ อาจารย์ (ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์) คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีความประสงค์ที่จะส่งรายงานสรุปผลการวิจัย เรื่อง (ชื่อภาษาไทย) ผลของน้ำพรมมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอ และหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (ภาษาอังกฤษ) Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers เลขที่โครงการ IRB No..0898/60 ซึ่งได้ผ่านการรับรอง จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2561 และขอแนบเอกสารประกอบการพิจารณา ดังนี้

1. แบบรายงานสรุปผลการวิจัย จำนวน 1 ชุด
2. Executive Summary จำนวน 1 ชุด

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

(รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ  
กรณีหัวหน้าโครงการวิจัยเป็นนิติ



## APPENDIX Q STANDARD OPERATION PROCEDURES (SOPS) OF MMSE

### การทดสอบความจำ (Mini Mental State Examination: MMSE)

#### 1. วัตถุประสงค์

การจัดทำคู่มือการปฏิบัติงานนี้ ทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการทดสอบความจำ (Mini Mental State Examination: MMSE) กับอาสาสมัคร ในโครงการวิจัยผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอและหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers) , IRB No. 0898/2560

#### 2. ขอบเขต

เอกสารฉบับนี้ ครอบคลุมตั้งแต่ การจัดเตรียมการทดสอบความจำ (Mini Mental State Examination: MMSE) อาสาสมัครเข้ามาพบผู้วิจัย ผู้วิจัยทำการชี้แจงก่อนการทำทดสอบ การทำแบบทดสอบความจำ การบันทึกผล และการจัดเก็บข้อมูลของอาสาสมัคร ในแต่ละครั้ง

#### 3. นิยามศัพท์

การทดสอบความจำ (Mini Mental State Examination: MMSE) หมายถึง การวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญว่ามีภาวะสมองเสื่อม โดยการประเมินจากแบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้นฉบับภาษาไทย Mini-Mental State Examination: Thai version (MMSE-Thai 2002)

โครงการวิจัยฯ หมายถึง โครงการวิจัยผลของน้ำพรมีสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอและหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers) , ซึ่งผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรแล้ว ตามหมายเลขโครงการวิจัยที่ IRB No. 0898/2560

อาสาสมัคร หมายถึง อาสาสมัครในโครงการวิจัยฯ

ผู้วิจัย หมายถึง ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัยฯ

สถานวิจัยฯ หมายถึง สถาบันวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ชั้น 3 อาคารมหาธรรมราชา ไซน A ซึ่งใช้เป็นสถานที่ในการทดสอบทางคลินิกในโครงการวิจัยฯ

แบบคัดกรองอาสาสมัคร (Screening form) หมายถึง แบบฟอร์มที่ใช้บันทึกข้อมูลของอาสาสมัครที่มาคัดกรอง ก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัยฯ

แบบบันทึกข้อมูล (case report form) หมายถึง แบบฟอร์มที่ใช้บันทึกข้อมูลของอาสาสมัครที่มาร่วมโครงการวิจัยฯ

แบบทดสอบสภาพสมอง หมายถึง แบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้น ฉบับภาษาไทย : MMSE –Thai 2002 ซึ่งในปฏิบัติการนี้ แบบทดสอบสภาพสมองจะจัดอยู่และเป็นส่วนหนึ่งของแบบคัดกรองอาสาสมัคร และแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัคร

#### 4. ผู้รับผิดชอบ

1. นางสาวศุภิณี วิสุทธรธรรม ผู้วิจัย
2. นายณัฐกร คำแก้ว ผู้วิจัย

มีหน้าที่จัดเตรียมสถานที่ ที่ใช้ทดสอบความจำ (MMSE) โดยจะทำการทดสอบทางคลินิกกับอาสาสมัคร ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบทางคลินิก สถาบันวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ชั้น 3 อาคารมหาธรรมราชา โซน A (ซึ่งผู้ร่วมวิจัยได้ทำหนังสือขออนุญาตใช้ห้องปฏิบัติการดังกล่าว และประสานงานกับเจ้าหน้าที่สถานวิจัยฯ ผู้รับผิดชอบห้องปฏิบัติการทางคลินิก คือนางสาวณภัชดา ธีระกาญจน์ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว)

1. นางสาวศุภิณี วิสุทธรธรรม ผู้วิจัย
2. นางสาวอุษณา จัตรงค์ ผู้วิจัย

มีหน้าที่เตรียมสำเนาเอกสารแบบทดสอบความจำ (MMSE) ให้ครบตามจำนวนอาสาสมัคร และเตรียมอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดสอบ จัดเก็บแบบบันทึกข้อมูล (case report form) ทั้งหมดภายหลังการทดสอบความจำเสร็จสิ้น โดยทำการบันทึกผลการทดสอบความจำ จากแบบบันทึกข้อมูลลงในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (MS Excel) ที่ได้จัดเตรียมไว้ และจัดเก็บแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัครไว้ในตู้เอกสารของโครงการวิจัยฯ

1. พญ. พรรณวลัย ผดุงวณิชย์กุล ผู้วิจัย
2. พญ. ดวงนภา รุ่งพิบูลโสภิษฐ์ ผู้วิจัย
3. ผศ.ดร.จันทริจรา วสุนธราวัฒน์ ผู้วิจัย
4. ผศ.ดร.อรรระวี คงสมบัติ ผู้วิจัย

มีหน้าที่ใช้แบบทดสอบ MMSE ทดสอบความจำของอาสาสมัคร ให้คะแนนตามเกณฑ์ในแบบประเมิน MMSE โดยการเขียนคะแนนลงในแบบบันทึกข้อมูล (case report form)

#### 5. วัสดุ ครุภัณฑ์

- แบบบันทึกข้อมูล คือ แบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้นฉบับภาษาไทย Mini-Mental State Examination: Thai version (MMSE-Thai 2002) ซึ่งจะจัดอยู่และเป็นส่วนหนึ่งของ แบบคัด

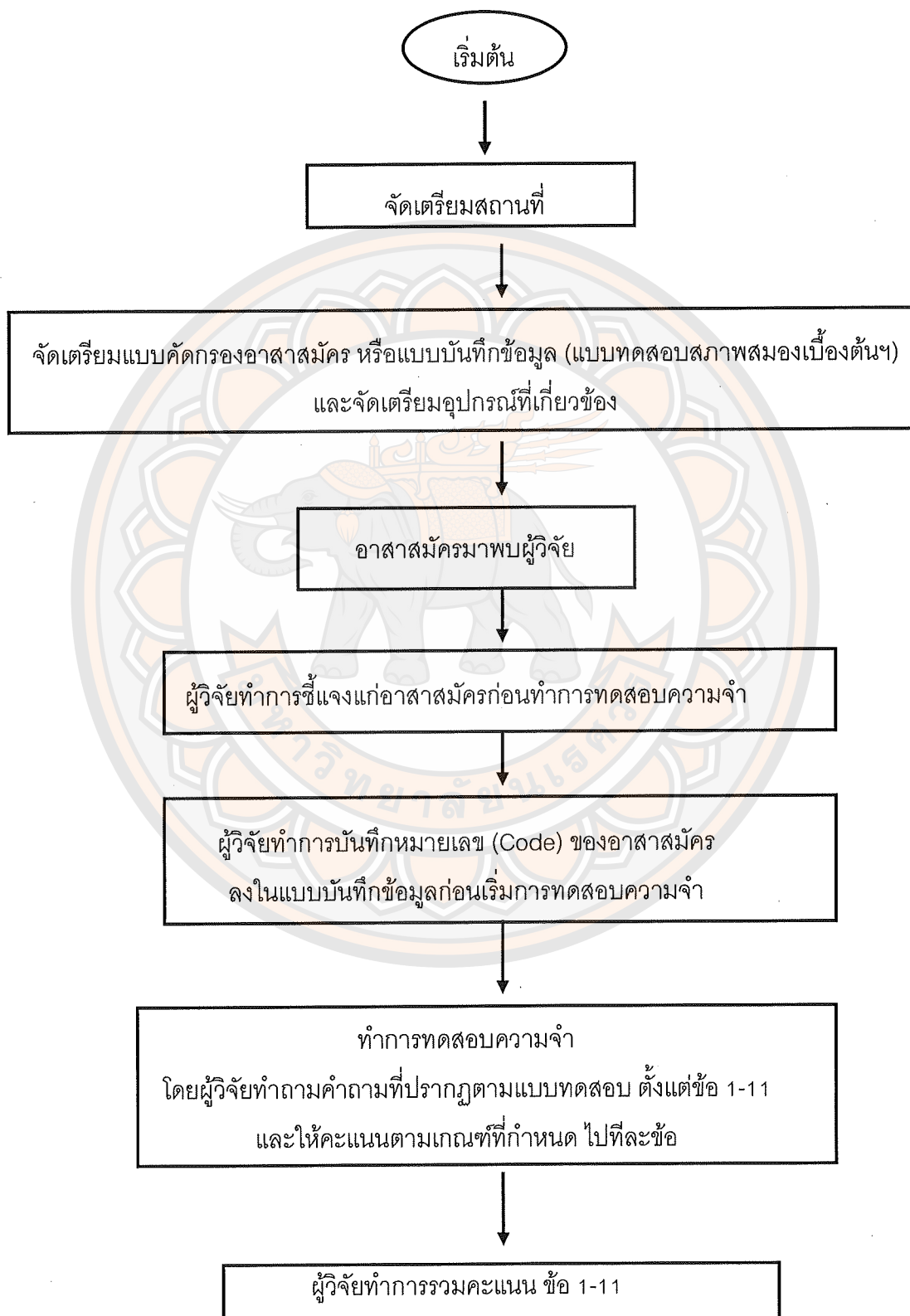
กรองอาสาสมัคร และแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัคร (สำเนาชุดเท่ากับจำนวนอาสาสมัครในแต่ละวัน)

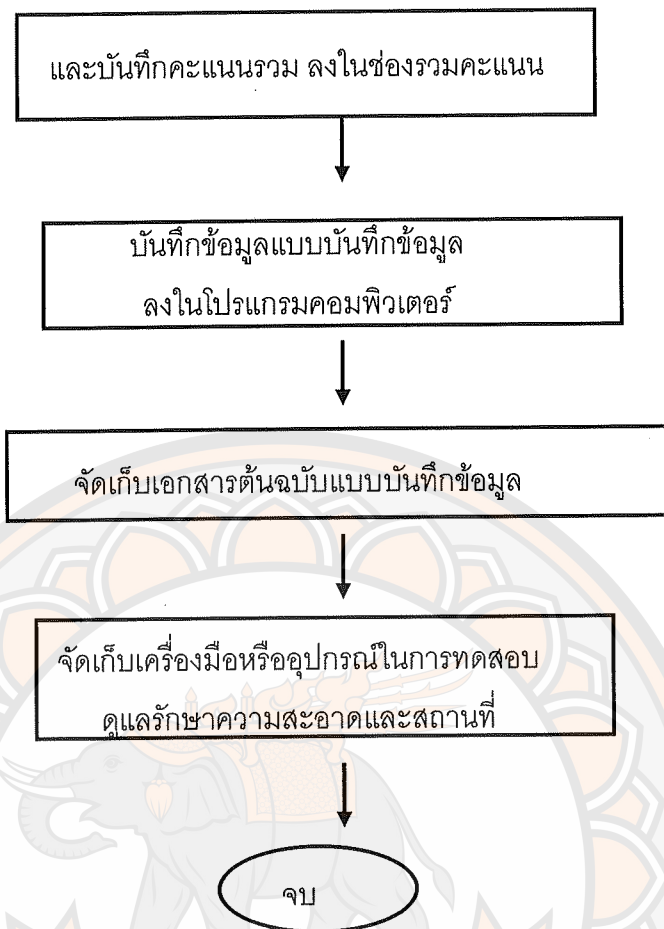
- ปากกา และดินสอ
- แฟ้มจัดเก็บเอกสาร
- กระดาษเปล่า
- นาฬิกาข้อมือ
- โต๊ะ 1 ตัว
- เก้าอี้ 2-3 ตัว



## 6. ขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติ

## 6.1 ขั้นตอนการปฏิบัติ





## 6.2 วิธีการปฏิบัติ

### 6.2.1 จัดเตรียมสถานที่

การปฏิบัติการทดสอบนี้ใช้สถานที่ ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบทางคลินิก สถาบันวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ชั้น 3 อาคารมหาธรรมราชา ไซน A

### 6.2.2 จัดเตรียมแบบบันทึกข้อมูล

การปฏิบัติการทดสอบนี้ ใช้แบบคัดกรองอาสาสมัครและแบบบันทึกข้อมูล ที่เป็นแบบทดสอบสภาพสมองเบื้องต้นฉบับภาษาไทย Mini-Mental State Examination: Thai version (MMSE-Thai 2002) (สำเนาชุดเท่ากับจำนวนอาสาสมัครในแต่ละวัน)

### 6.2.3 จัดเตรียมอุปกรณ์ในการทดสอบความจำ

การปฏิบัติการทดสอบนี้ ใช้อุปกรณ์คือ กระดาษเปล่า ปากกา นาฬิกา ไข่มือ ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ผู้ร่วมวิจัยต้องใช้เพื่อสอบถามหรือใช้ให้อาสาสมัครได้ตอบระหว่างทำการทดสอบ

#### 6.2.4 อาสาสมัครมาพบผู้วิจัย

ก่อนดำเนินการวิจัยและระหว่างการดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยทำการติดตามและนัดหมายกับอาสาสมัครล่วงหน้า และในวันที่อาสาสมัครมาทำการทดสอบทางคลินิกอาสาสมัครจะต้องมาพบผู้วิจัยเพื่อทำการทดสอบความจำ

#### 6.2.5 ผู้วิจัยทำการชี้แจงก่อนทำการทดสอบ

เมื่ออาสาสมัครมาพบผู้วิจัย ผู้วิจัยจะต้องทำการชี้แจงแก่อาสาสมัคร ก่อนทำการทดสอบความจำ เพื่อให้อาสาสมัครทราบถึงวัตถุประสงค์ในการทดสอบและข้อควรปฏิบัติในระหว่างทำการทดสอบ ดังนี้

1) อาสาสมัครมาพบผู้วิจัยในครั้งนี้ และในห้วงนี้เป็นปฏิบัติการทดสอบความจำของอาสาสมัคร เพื่อประเมินภาวะสมองเสื่อม ก่อนและหลังดื่มน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นตามระยะเวลาต่างๆ

2) ผู้วิจัยจะทำการทดสอบอาสาสมัครโดยการใช้แบบสอบถาม โดยให้อาสาสมัครให้ความร่วมมือ เช่นตอบคำถามหรือปฏิบัติตาม ในแต่ละข้อ

3) ให้อาสาสมัครทำใจให้สบาย ไม่ต้องตื่นเต้นหรือวิตกกังวล

#### 6.2.6 บันทึกหมายเลข (Code) ของอาสาสมัครก่อนเริ่มการทดสอบความจำ

ให้ผู้วิจัยสอบถาม Code ของอาสาสมัคร/หรือดูจากบัตรประจำตัวอาสาสมัคร และบันทึก Code ของอาสาสมัครที่มาทำการทดสอบ ลงในช่อง Patient Code ก่อนเริ่มทำการทดสอบ

#### 6.2.7 ทำการทดสอบความจำ

เมื่ออาสาสมัครพร้อม ผู้วิจัยทำการอ่านคำถามในแบบทดสอบสภาพสมองในแบบบันทึกข้อมูลที่ละข้อ และรอให้อาสาสมัครตอบคำถามหรือปฏิบัติตาม และทำการให้คะแนน โดยการเขียนลงในช่องสำหรับให้คะแนน

1) เพื่อทดสอบ Orientation for Time (การรับรู้เวลา) ในข้อ 1. ให้ผู้วิจัยถาม อาสาสมัครว่า...

- 1.1) วันนี้ วันที่เท่าไร
- 1.2) วันนี้ วันอะไร
- 1.3) เดือนนี้ เดือนอะไร
- 1.4) ปีนี้ ปีอะไร
- 1.5) ฤดูนี้ ฤดูอะไร

หากอาสาสมัครตอบถูก ให้คะแนน ข้อละ 1 คะแนน (รวม 5 คะแนน)

2) เพื่อทดสอบ Orientation for Place (การรับรู้สถานที่) ในข้อ 2. ให้ผู้วิจัยถาม อาสาสมัครว่า...

- 2.1) สถานที่ตรงนี้เรียกว่าอะไร และ.....ชื่อว่าอะไร
- 2.2) ขณะนี้อยู่ที่ชั้นเท่าไรของตัวอาคาร
- 2.3) ที่นี้อยู่ในอำเภออะไร-เขตอะไร
- 2.4) ที่นี้จังหวัดอะไร
- 2.5) ที่นี้ภาคอะไร

หากอาสาสมัครตอบถูก ให้คะแนน ข้อละ 1 คะแนน (รวม 5 คะแนน)

3) เพื่อทดสอบ Registration (การรับรู้ข้อมูลใหม่) ในข้อ 3. ให้ผู้วิจัยถามอาสาสมัครว่า...

ต่อไปนี้เป็น การทดสอบความจำ ผม (ดิฉัน) จะบอกชื่อของสามอย่าง คุณ (ตา,ยาย,...) ตั้งใจฟังให้ดีนะ เพราะจะบอกเพียงครั้งเดียว ไม่มีการบอกซ้ำอีก เมื่อ ผม (ดิฉัน) พูดจบ ให้คุณ (ตา,ยาย,...) พุดทบทวนตามที่ได้ยินให้ครบทั้งสามชื่อ แล้วพยายามจำไว้ให้ดี เดียวผม (ดิฉัน) จะถามซ้ำ

\*\* การบอกชื่อแต่ละคำให้ห่างกันประมาณ 1 วินาที ต้องไม่ช้าหรือเร็วเกินไป

( ) ดอกไม้ ( ) แม่น้ำ ( ) รถไฟ

( ) ต้นไม้ ( ) ทะเล ( ) รถยนต์

หากอาสาสมัครตอบถูก ให้คะแนน ข้อละ 1 คะแนน (รวม 3 คะแนน)

4) เพื่อทดสอบ Attention /Calculation (ความสนใจหรือการคำนวณ) ในข้อ 4. ให้เลือกทำข้อใดข้อหนึ่ง ให้ผู้วิจัยถาม อาสาสมัครว่า...

ข้อนี้เป็นการคิดเลขในใจ เพื่อทดสอบสมาธิ คุณ (ตา,ยาย...) คิดเลขในใจเป็นไหม?

\* ถ้าตอบคิดเป็นให้ตอบข้อ 4.1

\* ถ้าตอบคิดไม่เป็นหรือไม่ตอบ ให้ตอบข้อ 4.2

4.1) "ข้อนี้คิดในใจ เอา 100 ตั้ง ลบออกทีละ 7 ไปเรื่อยๆ ได้ผลลัพธ์เท่าไรบอกมา" บันทึกตัวเลขไว้ทุกครั้ง (ทั้งคำตอบที่ถูกหรือผิด) ทำทั้งหมด 5 ครั้ง ถ้าลบได้ 1, 2 หรือ 3 แล้วตอบไม่ได้ ให้คิดคะแนนเท่าที่ทำได้ โดยไม่ต้องย้ายไปทำข้อ 4.2

4.2) "ผม (ดิฉัน) สะกดคำว่ามะนาว ให้คุณ (ตา, ยาย, ...) ฟัง แล้วให้คุณ (ตา, ยาย, ...) สะกดถอยหลังจากพยัญชนะตัวหลังไปตัวแรก" คำว่า มะนาว สะกดว่า มอม้า-สระอะ-นอหนู-สระอา-วอแหวน ไหนคุณ (ตา, ยาย, ...) สะกดถอยหลังให้ฟังซิ (เช่น วอแหวน-สระอา-นอหนู-สระอะ-มอม้า)

หากอาสาสมัครตอบถูกทั้งหมด ให้คะแนน 5 คะแนน หากตอบถูกเพียงบางส่วน ให้ลดคะแนนตามสัดส่วนที่อาสาสมัครตอบได้ (รวม 5 คะแนน)

5) เพื่อทดสอบ Recall (การระลึกข้อมูล) ในข้อ 5. ให้ผู้วิจัยถามอาสาสมัครว่า...

"เมื่อสักครู่นี้ให้จำของ 3 อย่าง จำได้ไหม มีอะไรบ้าง"

( ) ดอกไม้ ( ) แม่น้ำ ( ) รถไฟ

( ) ต้นไม้ ( ) ทะเล ( ) รถยนต์

หากอาสาสมัครตอบถูก ให้คะแนน ข้อละ 1 คะแนน (รวม 3 คะแนน)

6) เพื่อทดสอบ Naming (การรับรู้ชื่อ) ในข้อ 6. ให้ผู้วิจัยถามอาสาสมัครว่า...

6.1. ยื่นดินสอให้อาสาสมัครแล้วถามว่า "ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร"

6.2. ชี้นำพิก้าข้อมือให้ผู้สูงอายุแล้วถามว่า "ของสิ่งนี้เรียกว่าอะไร"

หากอาสาสมัครตอบถูก ให้คะแนน ข้อละ 1 คะแนน (รวม 2 คะแนน)

7) เพื่อทดสอบ Repetition (การลอกเลียน) ในข้อ 7. ให้ผู้วิจัยถามอาสาสมัครว่า...

"ตั้งใจฟังผม (ดิฉัน) นะ เมื่อผม (ดิฉัน) ให้คุณ (ตา, ยาย, ...) พูดยตามผม (ดิฉัน) จะบอกเพียงเที่ยวเดียว" "ใคร ใคร ชาย ไก่ ไช้"

หากอาสาสมัครพูดยตามได้ถูกต้อง ให้ 1 คะแนน (รวม 1 คะแนน)

8) เพื่อทดสอบ Verbal command (การทำตามคำสั่ง: ฟังเข้าใจ ความหมายและทำตามทีบอกได้) ในข้อ 8. ให้ผู้วิจัยถามอาสาสมัครว่า...

"ฟังดีดีนะ เดี่ยวผม (ดิฉัน) จะส่งกระดาษให้ แล้วคุณ (ตา, ยาย, ...) รับด้วยมือขวา พับครึ่งแล้ววางที่..... (พื้น, โต๊ะ, เติง) และผู้วิจัยส่งกระดาษเปล่าขนาด A4 ไม่มีรอยพับให้ผู้สูงอายุ

( ) รับด้วยมือขวา ( ) พับครึ่ง ( ) แล้ววางที่.... (พื้น, โต๊ะ, เติง)



หากอาสาสมัครทำตามคำสั่งได้ถูกต้อง ให้ข้อละ 1 คะแนน (รวม 3 คะแนน)

9) เพื่อทดสอบ Written command (การทำตามทีเขียนสั่ง: อ่านเข้าใจ ความหมายและสามารถทำตามได้) ในข้อ 9. ให้ผู้วิจัยถาม อาสาสมัครว่า...

ต่อไปนี้เป็นคำสั่งที่เขียนเป็นตัวหนังสือ ต้องการให้คุณ (ตา, ยาย, ...) อ่านแล้วทำตาม คุณ (ตา, ยาย, ...) จะอ่านออกเสียงหรือในใจก็ได้ และผู้วิจัยแสดงกระดาษให้ผู้สูงอายุดู...โดยคำสั่งที่เขียนเป็นตัวหนังสือในกระดาษ คือ "หลับตา" แล้วดูอาสาสมัครปฏิบัติตาม

หากอาสาสมัครทำตามได้ ให้ 1 คะแนน (รวม 1 คะแนน)

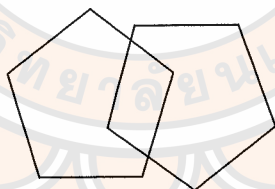
10) เพื่อทดสอบ Writing (การเขียน: การเขียนภาษาได้อย่างมีความหมาย) ในข้อ 10. ให้ผู้วิจัยถาม อาสาสมัครว่า...

ข้อความนี้เป็นคำสั่งให้คุณ (ตา, ยาย, ...) เขียนข้อความอะไรก็ได้ ที่อ่านแล้วรู้เอง หรือมีความหมายมา 1 ประโยค

หากอาสาสมัครเขียนได้ ให้ 1 คะแนน (รวม 1 คะแนน)

11) เพื่อทดสอบ Visuo-construction (วาดรูปโครงสร้าง: ทดสอบการวาดภาพทรงเรขาคณิต) ในข้อ 11. ให้ผู้วิจัยถาม อาสาสมัครว่า...

ข้อนี้เป็นคำสั่ง "จงวาดให้เหมือนภาพตัวอย่าง" ในที่ว่างด้านข้างของภาพตัวอย่าง



โดยรูปห้าเหลี่ยมต้องมีมุม 5 มุม ตามภาพตัวอย่าง การตัดกันต้องเกิดรูปสี่เหลี่ยมด้านใน

หากอาสาสมัครทำตามได้ทั้งหมดจึงจะได้ 1 คะแนน (รวม 1 คะแนน)

#### 6.2.8 การรวมคะแนน

เมื่อทำการทดสอบเสร็จให้ผู้วิจัยทำการรวมคะแนนข้อ 1-11 และเขียนคะแนนรวมไว้ในช่องคะแนนรวม และเก็บเอกสารเข้าแฟ้มเก็บเอกสาร และเตรียมเอกสารของอาสาสมัครคนถัดไป

### 6.2.9 บันทึกข้อมูล

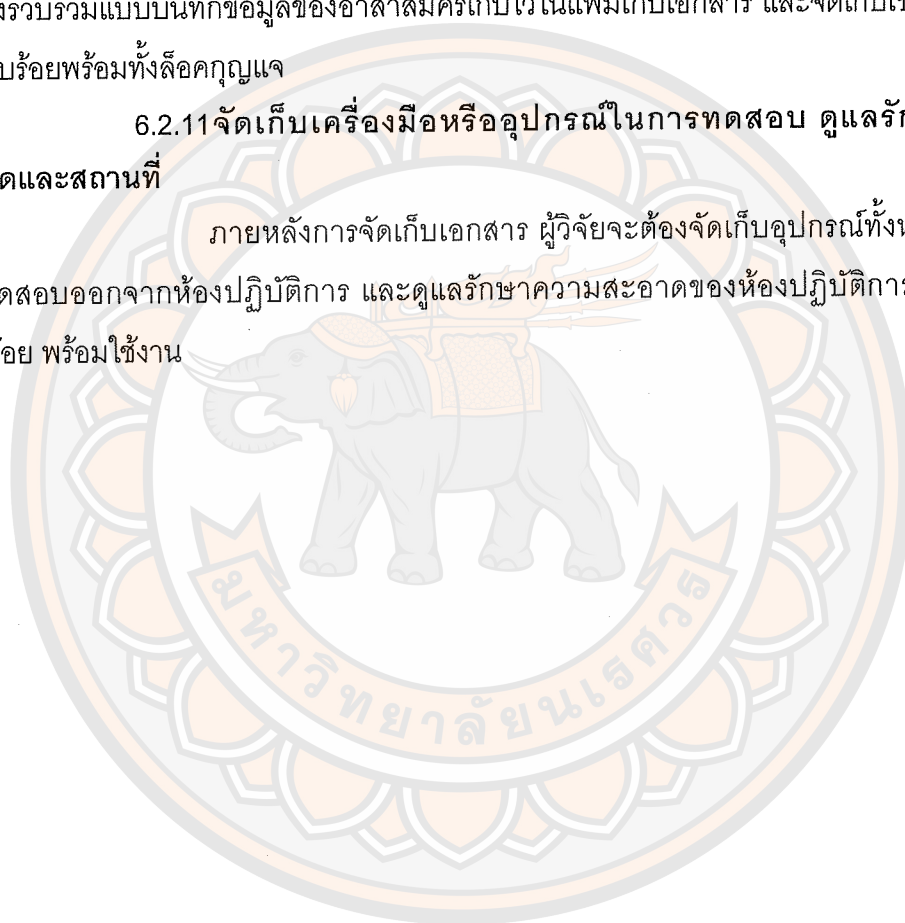
ภายหลังจากทำการทดสอบความจำอาสาสมัครเสร็จสิ้นในวันนั้นๆ ผู้วิจัยเก็บรวบรวมแบบบันทึกข้อมูลจากแฟ้มเก็บเอกสาร และนำไปลงข้อมูลในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (MS excel) ที่เตรียมไว้

### 6.2.10 จัดเก็บเอกสารต้นฉบับแบบบันทึกข้อมูล

ภายหลังจากทำการบันทึกข้อมูลลงโปรแกรมคอมพิวเตอร์เสร็จสิ้น ผู้วิจัยจะต้องรวบรวมแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัครเก็บไว้ในแฟ้มเก็บเอกสาร และจัดเก็บเข้าตู้เอกสารให้เรียบร้อยพร้อมทั้งล็อกกุญแจ

### 6.2.11 จัดเก็บเครื่องมือหรืออุปกรณ์ในการทดสอบ ดูแลรักษาความสะอาดและสถานที่

ภายหลังจากการจัดเก็บเอกสาร ผู้วิจัยจะต้องจัดเก็บอุปกรณ์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบออกจากห้องปฏิบัติการ และดูแลรักษาความสะอาดของห้องปฏิบัติการให้สะอาดเรียบร้อย พร้อมใช้งาน



## APPENDIX R SOPs OF COGNITIVE BATTERY TEST

การทดสอบความจำ (Cognitive battery test)

### 1. วัตถุประสงค์

การจัดทำคู่มือการปฏิบัติงานนี้ ทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการปฏิบัติการทดสอบความจำ (Cognitive battery) กับอาสาสมัคร ในโครงการวิจัยผลของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอและหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers), IRB No. 0898/2560

### 2. ขอบเขต

เอกสารฉบับนี้ ครอบคลุมตั้งแต่ การจัดเตรียมการทดสอบความจำ (Cognitive battery) อาสาสมัครเข้ามาพบผู้วิจัย ผู้วิจัยทำการชี้แจงก่อนการทำทดสอบ การทำแบบทดสอบความจำ การบันทึกผล และการจัดเก็บข้อมูลของอาสาสมัคร ในแต่ละครั้ง

### 3. นิยามศัพท์

การทดสอบความจำ (Cognitive battery) หมายถึง การประเมินหรือวัดความจำ (memory) และสมาธิจดจ่อ (attention) เพื่อประเมินผลความจำระยะสั้นที่ใช้ในการทำงาน (working memory) ของอาสาสมัคร ซึ่งจะแปลผลได้เป็น 4 domain ได้แก่ power of attention, continuity of attention, quality of memory และ speed of memory โดยการใช้โปรแกรม cognitive computerized battery test

โครงการวิจัยฯ หมายถึง โครงการวิจัยผลของน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นต่อความจำ การไหลของเลือดในหลอดเลือดแดงบริเวณคอและหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัคร (Effects of Brahmi concentrated essence on memory, carotid and peripheral blood flows in the volunteers), ซึ่งผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร แล้ว ตามหมายเลขโครงการวิจัยที่ IRB No. 0898/2560

อาสาสมัคร หมายถึง อาสาสมัครในโครงการวิจัยฯ

ผู้วิจัย หมายถึง ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัยฯ

สถานวิจัยฯ หมายถึง สถาบันวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ชั้น 3 อาคารมหาธรรมราชา โซน A ซึ่งใช้เป็นสถานที่ในการทดสอบทางคลินิกในโครงการวิจัยฯ

โปรแกรมทดสอบ หมายถึง โปรแกรม cognitive computerized battery test ที่ใช้ในการประเมินความจำของอาสาสมัคร (ซึ่งโปรแกรมทดสอบในโครงการวิจัยฯนี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. จินตนาภรณ์ วัฒนธร ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

แบบบันทึกข้อมูล (case report form) หมายถึง แบบฟอร์มที่ใช้บันทึกข้อมูลของอาสาสมัครที่มาร่วมโครงการวิจัยฯ

แบบประเมินความจำ หมายถึง แบบบันทึกผลข้อมูลจากการประเมินความจำของอาสาสมัคร โดยใช้โปรแกรมทดสอบฯ ซึ่งแบบประเมินความจำนี้จัดอยู่และเป็นส่วนหนึ่งของ แบบคัดกรองอาสาสมัคร และแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัคร

#### 4. ผู้รับผิดชอบ

ศ.ดร. จินตนาภรณ์ วัฒนธร ผู้วิจัย

นางสาวอุษณา จัตรงค์ ผู้วิจัย

นางสาวงามรยุ งามดอกไม้ ผู้วิจัย

1. มีหน้าที่จัดเตรียมสถานที่ ที่ใช้ทดสอบความจำ (Cognitive battery) โดยจะทำการทดสอบทางคลินิกกับอาสาสมัคร ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบทางคลินิก สถาบันวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ชั้น 3 อาคารมหาธรรมราชา โซน A (ซึ่งผู้ร่วมวิจัยได้ทำหนังสือขออนุญาตใช้ห้องปฏิบัติการดังกล่าว และประสานงานกับเจ้าหน้าที่สถานวิจัยฯ ผู้รับผิดชอบห้องปฏิบัติการทางคลินิก คือนางสาวณภัชดา ธีระกาญจน์ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว)

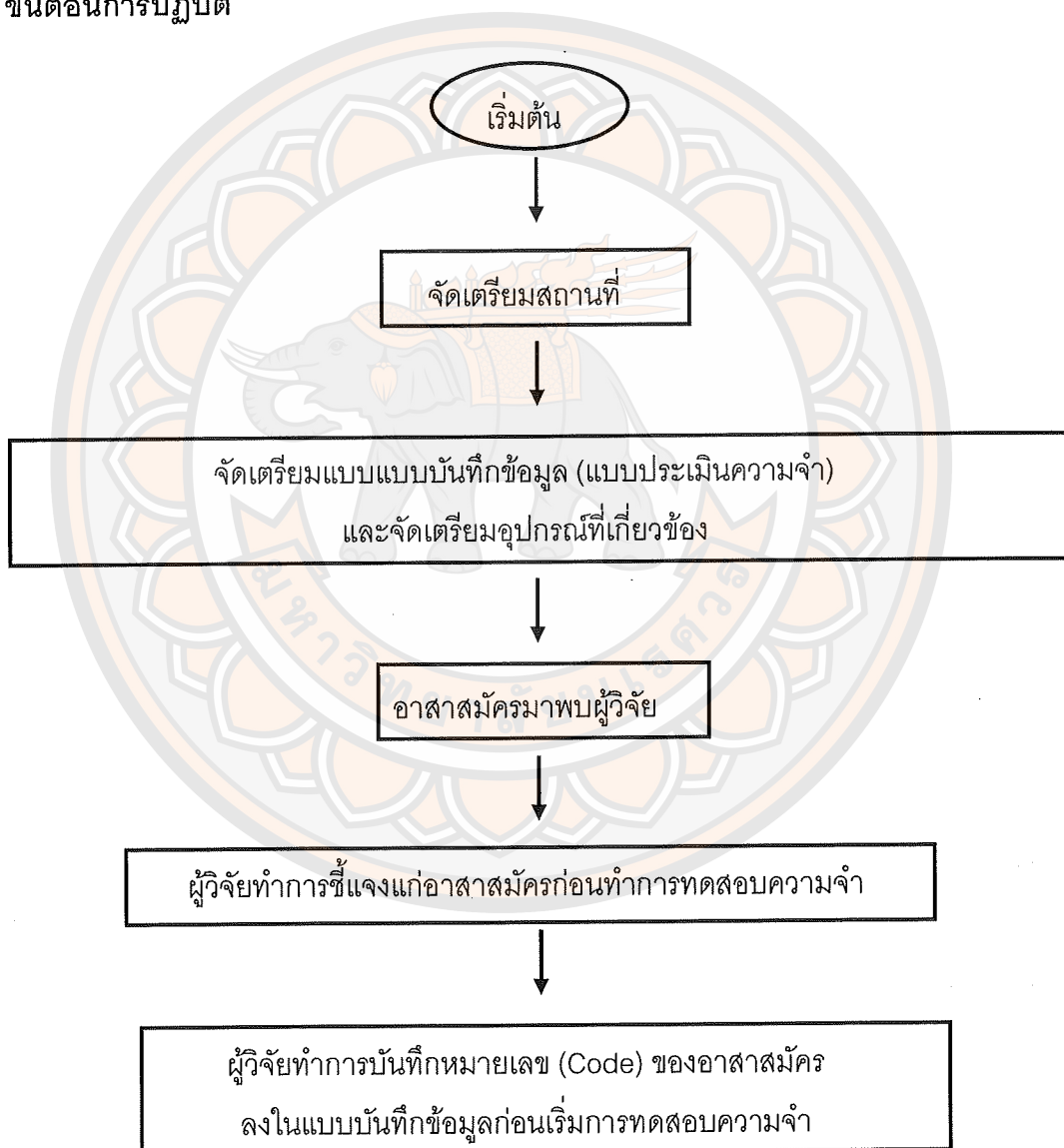
2. มีหน้าที่เตรียมสำเนาเอกสารแบบบันทึกข้อมูล (แบบประเมินความจำ) ให้ครบตามจำนวนอาสาสมัคร และเตรียมชุดอุปกรณ์คอมพิวเตอร์ โปรแกรมทดสอบฯ จัดเก็บแบบบันทึกข้อมูล (case report form) ทั้งหมดภายหลังการทดสอบความจำเสร็จสิ้น โดยทำการบันทึกผลการทดสอบความจำ จากแบบบันทึกข้อมูลลงในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (MS Excel) ที่ได้จัดเตรียมไว้ และจัดเก็บแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัครไว้ในตู้เอกสารของโครงการวิจัยฯ

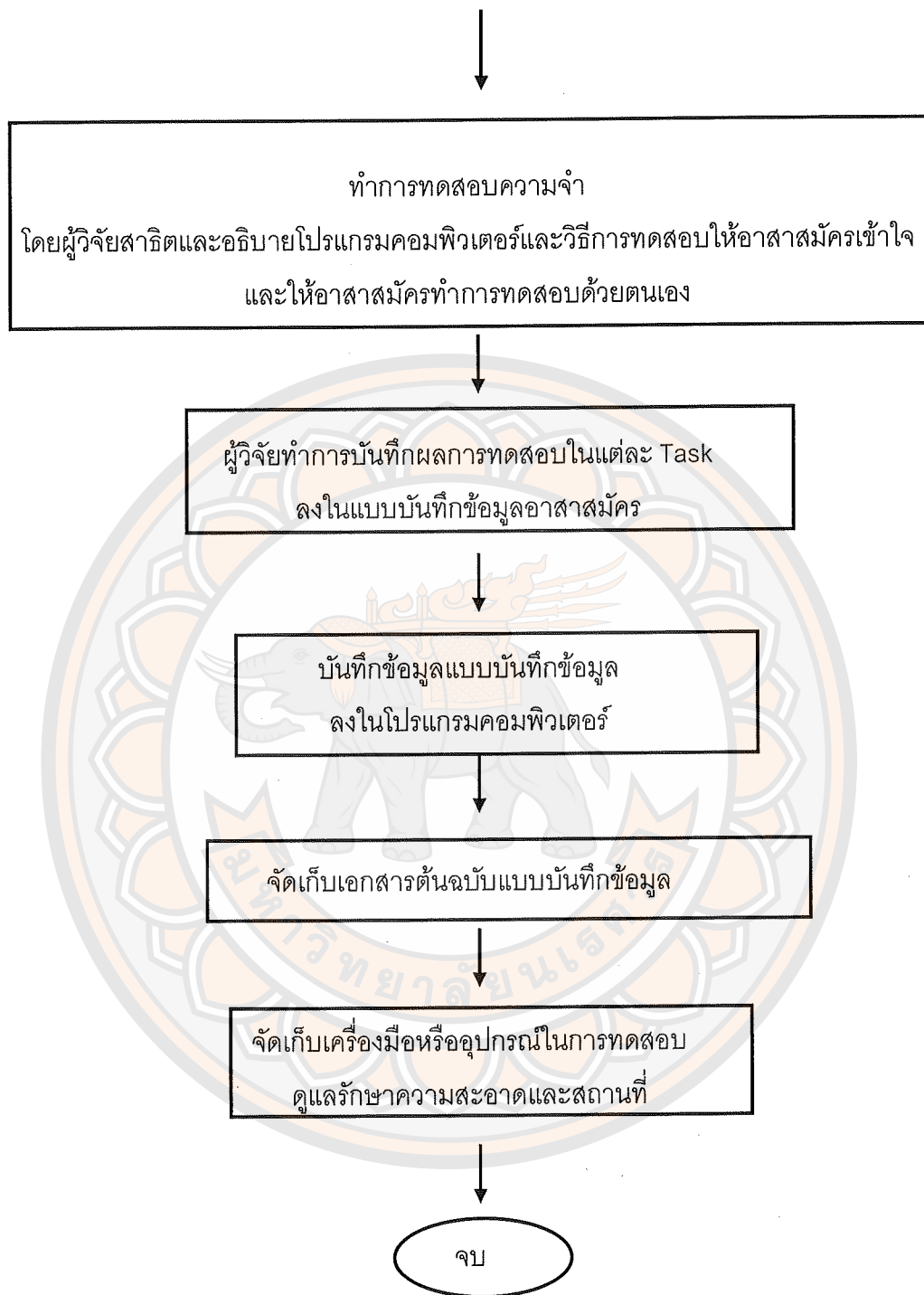
3. มีหน้าที่ให้คำแนะนำ สาธิตการประเมินความจำ และทำการประเมินความจำของอาสาสมัคร และบันทึกผลการทดสอบลงในแบบบันทึกข้อมูล (case report form)

## 5. วัสดุ ครุภัณฑ์

1. คอมพิวเตอร์ พร้อมชุดอุปกรณ์ 1 เครื่อง
2. โปรแกรม cognitive computerized battery test (\*\*โปรแกรมที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. จินตนาภรณ์ วัฒนธร ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

## 6. ขั้นตอนการปฏิบัติ





## 6.1 วิธีการปฏิบัติ

### 6.1.1 จัดเตรียมสถานที่

การปฏิบัติการทดสอบนี้ใช้สถานที่ ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบทางคลินิก สถาบันวิจัยเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ชั้น 3 อาคารมหาธรรมราชา โซน A

### 6.2.2 จัดเตรียมแบบบันทึกข้อมูล

การปฏิบัติการทดสอบนี้ ใช้แบบบันทึกข้อมูลการประเมินความจำ (สำเนาชุดเท่ากับจำนวนอาสาสมัครในแต่ละวัน)

### 6.2.3 จัดเตรียมอุปกรณ์ในการประเมินความจำ

การปฏิบัติการทดสอบนี้ ใช้อุปกรณ์คือ ชุดอุปกรณ์คอมพิวเตอร์ 1 ชุด ที่ลงโปรแกรมการประเมินความจำ cognitive computerized battery test

### 6.2.4 อาสาสมัครมาพบผู้วิจัย

ก่อนดำเนินการวิจัยและระหว่างการดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยทำการติดตามและนัดหมายกับอาสาสมัครล่วงหน้า และในวันที่อาสาสมัครมาทำการทดสอบทางคลินิก อาสาสมัครจะต้องมาพบผู้วิจัยเพื่อทำการประเมินความจำ

### 6.2.5 ผู้วิจัยทำการชี้แจงก่อนทำการทดสอบ

เมื่ออาสาสมัครมาพบผู้วิจัย ผู้วิจัยจะต้องทำการชี้แจงแก่อาสาสมัคร ก่อนทำการทดสอบความจำ เพื่อให้อาสาสมัครทราบถึงวัตถุประสงค์ในการทดสอบและข้อควรปฏิบัติในระหว่างทำการทดสอบ ดังนี้

1. อาสาสมัครมาพบผู้วิจัยในครั้งนี้ และในท้องนี้เป็นปฏิบัติการประเมินความจำของอาสาสมัคร เพื่อเป็นการประเมินหรือวัดความจำ (memory) และ ความตั้งใจหรือสมาธิจดจ่อ (attention) เพื่อประเมินผลของพรมมิต่อความจำระยะสั้นที่ใช้ในการทำงาน (working memory) ของอาสาสมัคร ก่อนและหลังดื่มน้ำพรมมิสกัดเข้มข้นตามระยะเวลาต่างๆ
2. ผู้วิจัยจะทำการทดสอบอาสาสมัครโดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ โดยให้อาสาสมัครให้ความร่วมมือ เช่น การจำคำ จำภาพ จำตัวเลข การใช้เมาส์คลิกตอบคำถาม ใช่ หรือ ไม่ใช่ โดยในช่วงแรกๆอาสาสมัครอาจยังไม่คุ้นเคยกับการใช้เมาส์ หรือโปรแกรมดังกล่าว ผู้วิจัยจะทำการสอนและทำการทดสอบให้ดูเป็นตัวอย่าง และให้อาสาสมัครพยายามทำการทดสอบด้วยตนเองก่อน การประเมินความจำในปฏิบัติการนี้มีหลายวิธีการทดสอบและใช้เวลานาน แต่หากคุ้นชินก็จะสามารถทำได้ดีขึ้น
3. ให้อาสาสมัครทำใจให้สบาย ไม่ต้องตื่นเต้นหรือวิตกกังวลหรือเครียดจนเกินไป

### 6.2.6 บันทึกหมายเลข (Code) ของอาสาสมัครก่อนเริ่มการทดสอบความจำ

ให้ผู้วิจัยสอบถาม Code ของอาสาสมัคร/หรือดูจากบัตรประจำตัวอาสาสมัคร และบันทึก Code ของอาสาสมัครที่มาทำการทดสอบ ลงในช่อง Patient Code ก่อนเริ่มทำการทดสอบ

### 6.2.7 รายละเอียดและวิธีการประเมินความจำ

โปรแกรม cognitive computerized battery test ในการประเมินความจำของอาสาสมัคร เป็นการประเมินหรือวัดความจำ (memory) และ ความตั้งใจหรือสมาธิจดจ่อ (attention) เพื่อประเมินผลของการดื่มน้ำพรมิตต่อความจำระยะสั้นที่ใช้ในการทำงาน (working memory) ของอาสาสมัคร ซึ่งจะแปลผลเป็น 4 domain ได้แก่

Domain 1: Power of attention หมายถึง พลังความตั้งใจ

Domain 2: Continuity of attention หมายถึง ความต่อเนื่องของความตั้งใจ

Domain 3: Quality of memory หมายถึง คุณภาพของความจำ

Domain 4: Speed of memory หมายถึง ความเร็วของความจำ

โดยโปรแกรมดังกล่าว แบ่งเป็น 7 วิธีการทดสอบ โดยมีรายละเอียด วิธีการทดสอบ ประเด็นการประเมิน และการแปลผล ดังตาราง 1

Task	วิธีการ	ประเด็นประเมิน	ใช้สำหรับแปลผล
<u>1. Word recognition</u>	การจำคำศัพท์ภาษาไทย (มีทั้งหมด 15 คำ) แล้วเมื่อปรากฏคำนั้นอีกครั้ง ให้กดปุ่ม (ใช่/ไม่ใช่) ให้ถูกต้องและเร็วที่สุด	- Number of correct answers - Number of incorrect answers - Accuracy (%) - Average response time (correct) (ms) - Average response time (incorrect) (ms)	- <u>quality of memory</u> - <u>speed of memory</u>
<u>2. Picture recognition</u>	การจำภาพ (มีทั้งหมด 20 ภาพ) แล้วเมื่อปรากฏภาพนั้นอีกครั้ง ให้กดปุ่ม (ใช่/ไม่ใช่) ให้ถูกต้องและเร็วที่สุด	- Number of correct answers - Number of incorrect answers - Accuracy (%) - Average response time (correct) (ms) - Average response time (incorrect) (ms)	- <u>quality of memory</u> - <u>speed of memory</u>



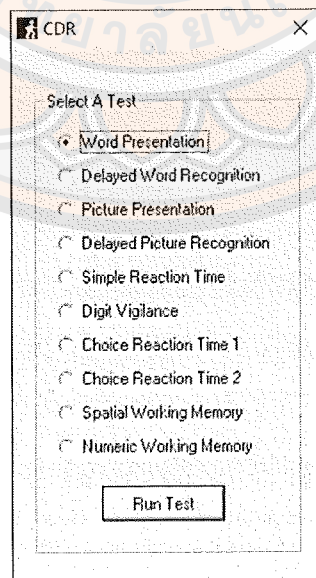
Task	วิธีการ	ประเด็นประเมิน	ใช้สำหรับแปลผล
<u>3. Simple reaction time</u>	เมื่อคำว่า "ใช่" ปรากฏ ให้กดปุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด	- Average reaction time (ms)	<u>power of attention</u>
<u>4. Digit vigilance task</u>	"ตัวเลขเป้าหมาย" แสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ทางด้านขวา จากนั้นจะมีลำดับตัวเลขปรากฏที่ละตัวเลขตรงกลางจอคอมพิวเตอร์ เมื่อมีตัวเลขตรงกลางจอตรงกับตัวเลขเป้าหมาย ให้กดปุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด	- Average reaction time (ms) - Accuracy (%) - Number of false alarms (times)	- <u>power of attention</u> - <u>continuity of attention</u>
<u>5. Choice reaction time</u>	เมื่อคำว่า "ใช่" ปรากฏ ให้กดปุ่ม (ใช่) หรือ คำว่า "ไม่ใช่" ปรากฏ ให้กดปุ่ม (ไม่ใช่) ให้เร็วที่สุด	- Average reaction time (ms) - Accuracy (%)	- <u>power of attention</u> - <u>continuity of attention</u>
<u>6. Spatial working memory</u>	มีห้องหน้าต่างบ้าน 9 บาน ซึ่งปรากฏแสงสว่าง 4 บาน (ตำแหน่ง) จากนั้นหน้าต่างหนึ่งบานจะปรากฏแสง ถ้าตรงกับตำแหน่งแรก ให้กดปุ่ม (ใช่) ถ้าไม่ตรงกับตำแหน่งแรก ให้กดปุ่ม (ไม่ใช่) ให้เร็วที่สุด	- Number of correct answers - Number of incorrect answers - Accuracy (%) - Average response time (correct) (ms) - Average response time (incorrect) (ms)	- <u>quality of memory</u> - <u>speed of memory</u>
<u>7. Numeric working memory</u>	มีลำดับตัวเลขปรากฏ 5 ตัวเลข จากนั้น หนึ่งตัวเลขจะปรากฏ ถ้าตรงกับตัวเลขแรก ให้กดปุ่ม (ใช่) ถ้าไม่	- Number of correct answers - Number of incorrect answers - Accuracy (%)	- <u>quality of memory</u> - <u>speed of memory</u>

Task	วิธีการ	ประเด็นประเมิน	ใช้สำหรับแปลผล
	ตรงกับตัวเลขแรก ให้กดปุ่ม (ไม่ใช่)	- Average response time (correct) (ms)	

### 6.2.8 ทำการทดสอบความจำ

1) ผู้วิจัยทำการเปิดโปรแกรม cognitive computerized battery test (ชื่อย่อที่ปรากฏในคอมพิวเตอร์คือ CDR) จะปรากฏดังรูปที่ 1 โดยการทดสอบจะแบ่งเป็น 10 หัวข้อย่อย คือ

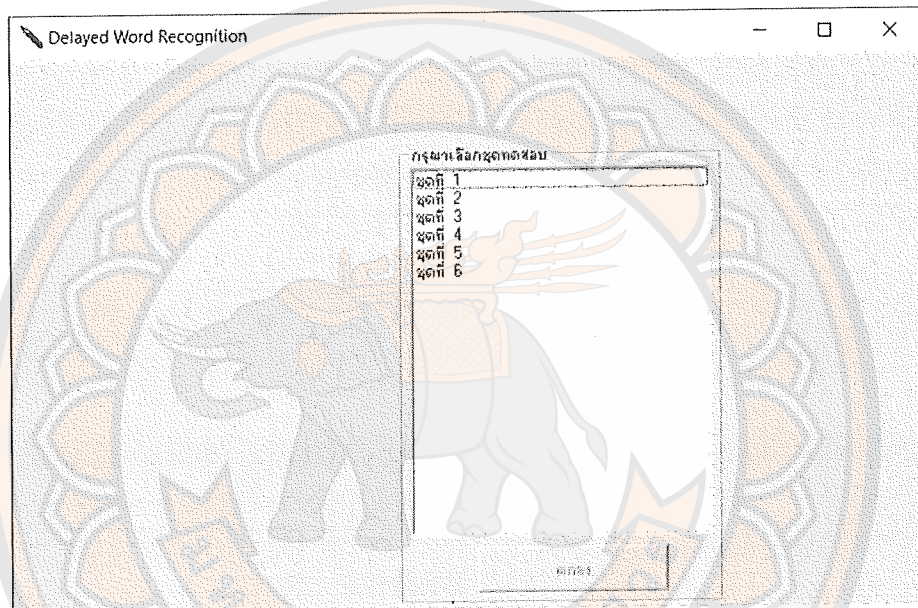
- (1) Word presentation
- (2) Delayed word recognition
- (3) Picture presentation
- (4) Delayed picture recognition
- (5) Simple Reaction Time
- (6) Digit Vigilance
- (7) Choice Reaction time 1
- (8) Choice Reaction time 2
- (9) Spatial Working Memory
- (10) Numeric Working Memory



รูปที่ 1 เปิดโปรแกรม CDR

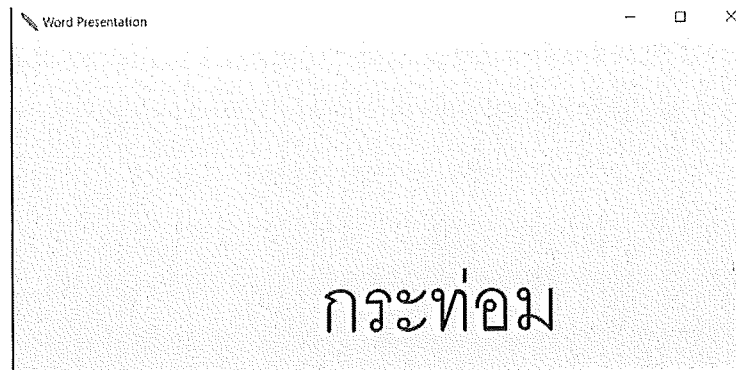
2) Task ที่ 1 การทดสอบ Word recognition (การจำคำศัพท์) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (1)-(2)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยแรก โปรแกรมจะแสดงคำถามให้เลือกชุดคำถาม ดังรูปที่ 2 ผู้วิจัยจะต้องเลือกชุดคำถามให้อาสาสมัครและบันทึกไว้ ให้อาสาสมัครทำการทดสอบชุดที่เท่าไร และการมาของอาสาสมัครในครั้งถัดไป ผู้วิจัยจะต้องเลือกชุดคำถามแบบทดสอบชุดที่ไม่ซ้ำกับแบบทดสอบที่อาสาสมัครเคยทำการทดสอบไว้



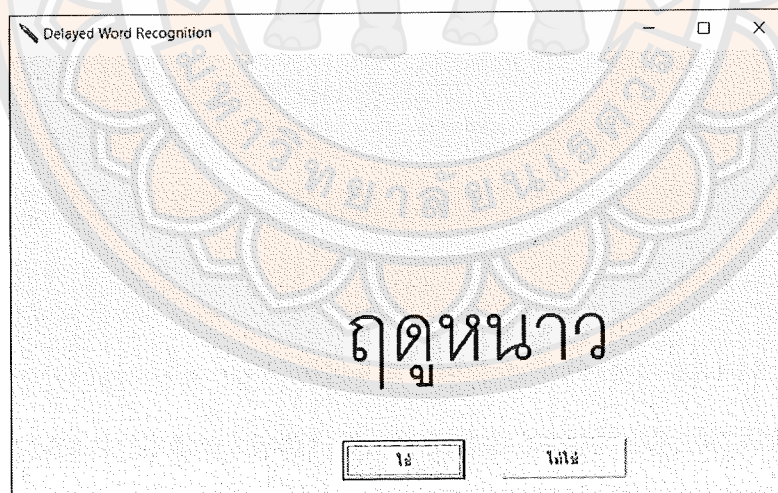
รูปที่ 2 โปรแกรมจะให้เลือกชุดทดสอบในแต่ละหัวข้อการทดสอบ

จากนั้นเมื่อเลือกชุดทดสอบแล้ว โปรแกรมจะทำการแสดงคำศัพท์ จำนวน 15 คำ เรียงต่อเนื่องกันจนครบ ดังตัวอย่างในรูปที่ 3



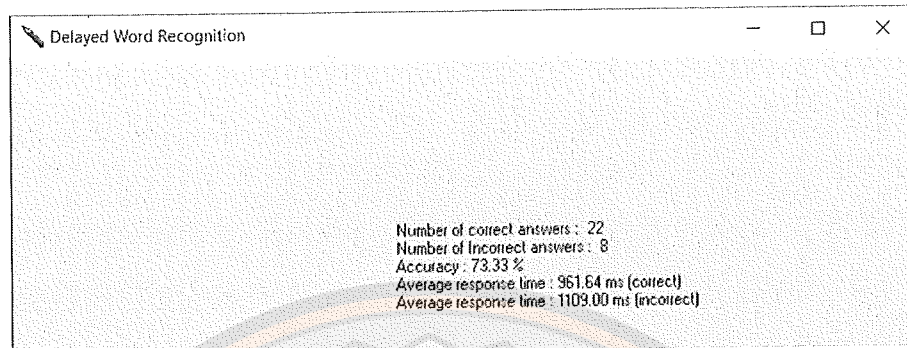
รูปที่ 3 การแสดงผลคำศัพท์ ในหัวข้อย่อยที่ 1 Word presentation

เมื่อโปรแกรมทำการแสดงผลคำศัพท์ครบแล้ว คลิกปิดโปรแกรม จะออกจากหน้าต่างหัวข้อย่อยที่ 1 ผู้วิจัยจะต้องทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 2 Delayed word recognition เมื่อเลือกหัวข้อย่อยดังกล่าว จะมีหน้าต่างแสดงผลคำศัพท์แสดงผลบนจออีกครั้ง พร้อมปุ่มกด 2 ปุ่ม แสดงคำว่าใช่และไม่ใช่ เมื่อปรากฏคำนั้นอีกครั้ง (15 คำที่แสดงไปในหัวข้อย่อยแรก) ให้อาสาสมัครกดปุ่ม (ใช่/ไม่ใช่) ให้ถูกต้องและเร็วที่สุด ดังตัวอย่างในรูปที่ 4



รูปที่ 4 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 2 Delayed word recognition (ขณะทำการทดสอบ)

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 5

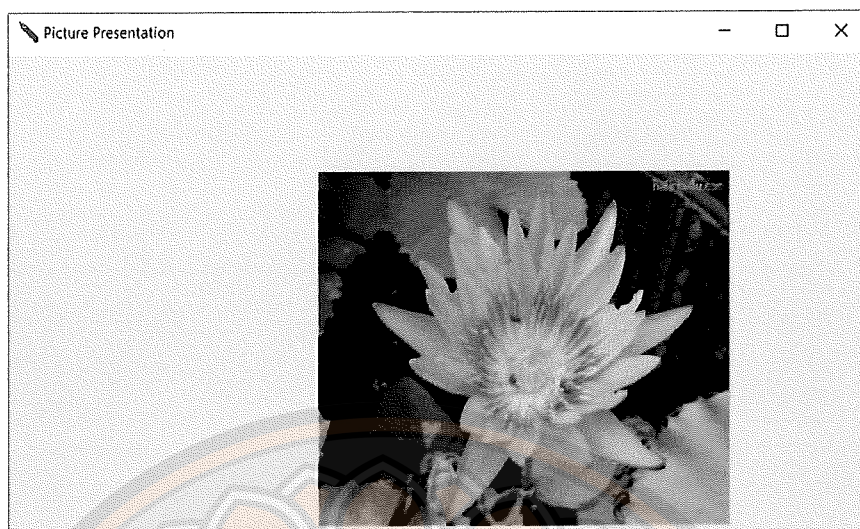


รูปที่ 5 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 2 Delayed word recognition  
(ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผลในแต่ละ parameters ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 2/11 ข้อ 1

3) Task ที่ 2 การทดสอบ Picture recognition (การจำภาพ) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (3)-(4)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 3 โปรแกรมจะแสดงคำถามให้เลือกชุดทดสอบ ผู้วิจัยจะต้องเลือกชุดคำถามให้อาสาสมัครและบันทึกไว้ ให้อาสาสมัครทำการทดสอบชุดที่เท่าไร และการมาของอาสาสมัครในครั้งถัดไป ผู้วิจัยจะต้องเลือกชุดคำถามแบบทดสอบชุดที่ไม่ซ้ำกับแบบทดสอบที่อาสาสมัครเคยทำการทดสอบไว้จากนั้นเมื่อเลือกชุดทดสอบแล้ว โปรแกรมจะทำการแสดงภาพต่าง ๆ จำนวน 20 ภาพ เรียงต่อเนื่องกันจนครบ ดังตัวอย่างในรูปที่ 6



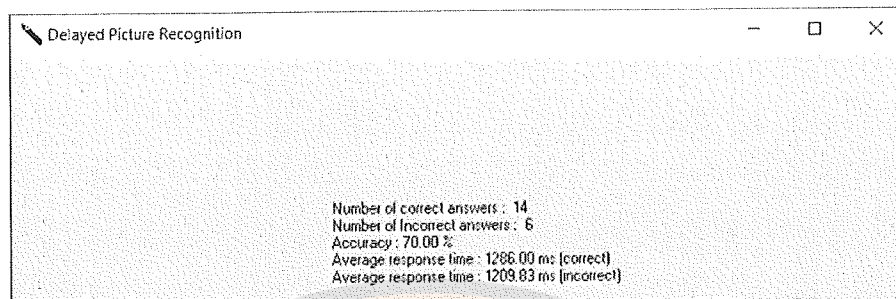
รูปที่ 6 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 3 Picture presentation

เมื่อโปรแกรมทำการแสดงภาพครบแล้ว คลิกปิดโปรแกรม จะออกจากหน้าต่างหัวข้อย่อยที่ 3 ผู้วิจัยจะต้องทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 4 Delayed picture recognition เมื่อเลือกหัวข้อย่อยดังกล่าว จะมีหน้าต่างแสดงภาพแสดงผลบนจออีกครั้ง พร้อมปุ่มกด 2 ปุ่ม แสดงคำว่าใช่และไม่ใช่ เมื่อปรากฏภาพนั้นอีกครั้ง ให้อาสาสมัครกดปุ่ม (ใช่/ไม่ใช่) ให้ถูกต้องและเร็วที่สุด ดังตัวอย่างในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 4 Delayed picture recognition (ขณะทำการทดสอบ)

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 8

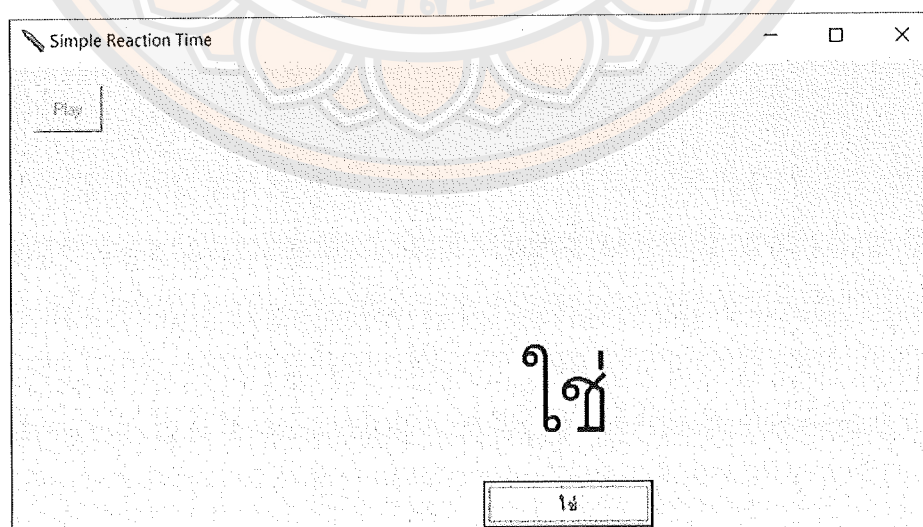


รูปที่ 8 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 4 Delayed word recognition  
 (ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผลในแต่ละ parameters ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 2/11 ข้อที่ 2

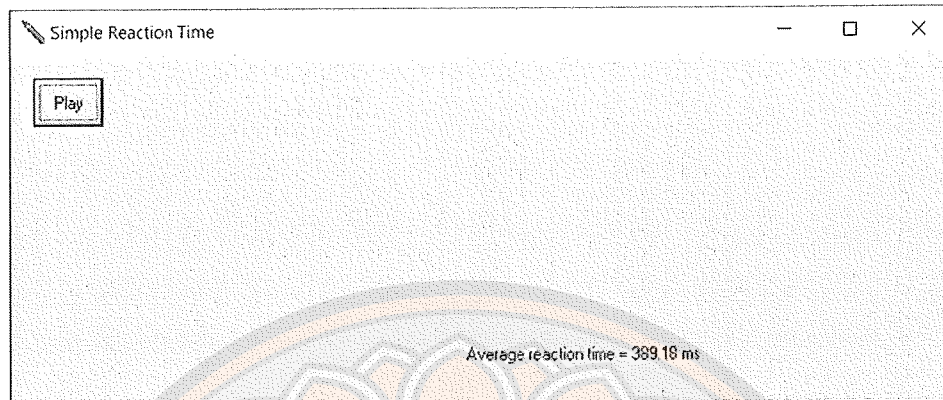
4) Task ที่ 3 การทดสอบ Simple reaction time (ความตั้งใจและสมาธิจดจ่อ) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (5)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 5 โปรแกรมจะแสดงคำว่าใช่ ขึ้นมา และปุ่มกด คำว่าใช่ ดังตัวอย่างในรูปที่ 9 โดยจะสุ่มแสดงคำว่าใช่ จำนวน 50 ครั้ง มีความซ้ำ เร็วแตกต่างกัน เมื่อคำว่า "ใช่" ปรากฏ ให้อาสาสมัคร กดปุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด



รูปที่ 9 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 5 Simple reaction time (ขณะทำการทดสอบ)

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 10



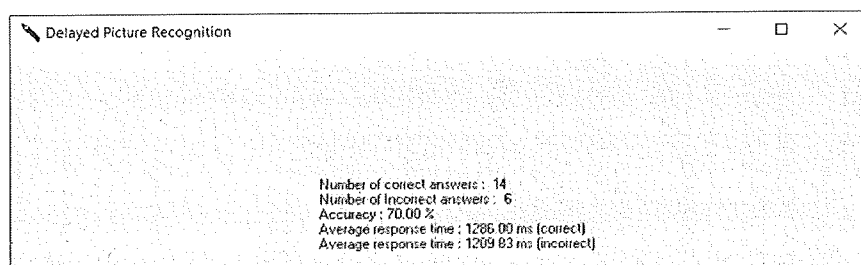
รูปที่ 10 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 5 sample reaction time  
(ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผล ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 2/11 ข้อที่ 3

5) Task ที่ 4 การทดสอบ Digit vigilance task (การจำตัวเลข) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (6)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 6 โปรแกรมจะแสดงตัวเลข 1 ตัว (ตัวเลขเป้าหมาย) แสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ทางด้านขวา จากนั้นจะมีลำดับตัวเลขปรากฏทีละตัวเลขตรงด้านซ้ายของคอมพิวเตอร์ และเปลี่ยนไปเรื่อยๆ เมื่อเห็นตัวเลขด้านซ้ายตรงกับตัวเลขเป้าหมายให้อาสาสมัครกดปุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด ดังตัวอย่างในรูปที่ 11

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 11



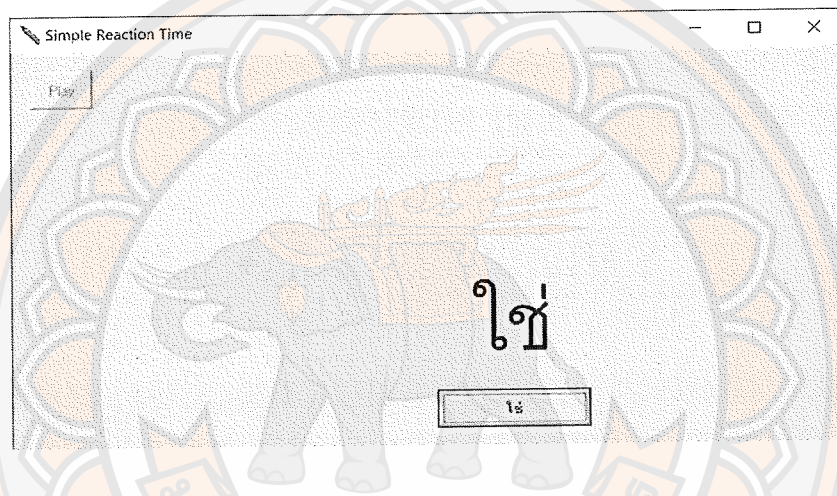
รูปที่ 11 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 4 Delayed word recognition  
(ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)



จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผลในแต่ละ parameters ลงในแบบบันทึก ข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 2/11 ข้อที่ 2

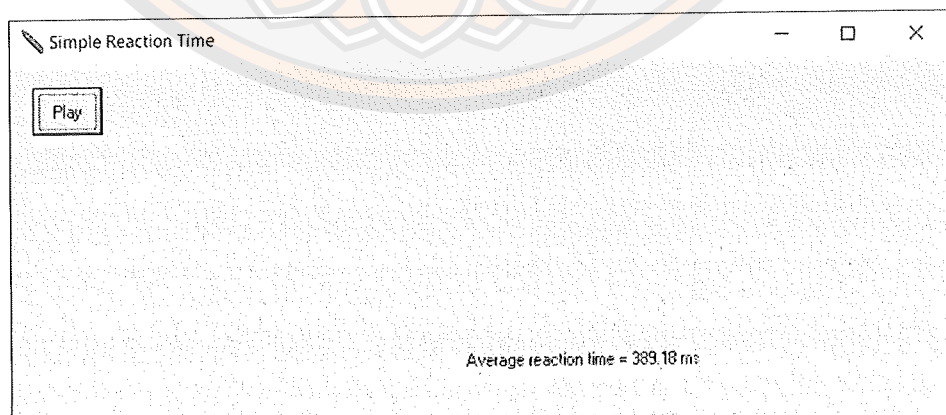
4) Task ที่ 3 การทดสอบ Simple reaction time (ความตั้งใจและสมาธิจดจ่อ) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (5)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 5 โปรแกรมจะแสดงคำว่าใช่ ขึ้นมา และ ปุ่มกด คำว่าใช่ ดังตัวอย่างในรูปที่ 9 โดยจะสุ่มแสดงคำว่าใช่ จำนวน 50 ครั้ง มีความช้า เร็ว แตกต่างกัน เมื่อคำว่า "ใช่" ปรากฏ ให้อาสาสมัคร กดปุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด



รูปที่ 12 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 5 Simple reaction time (ขณะทำการทดสอบ)

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 13

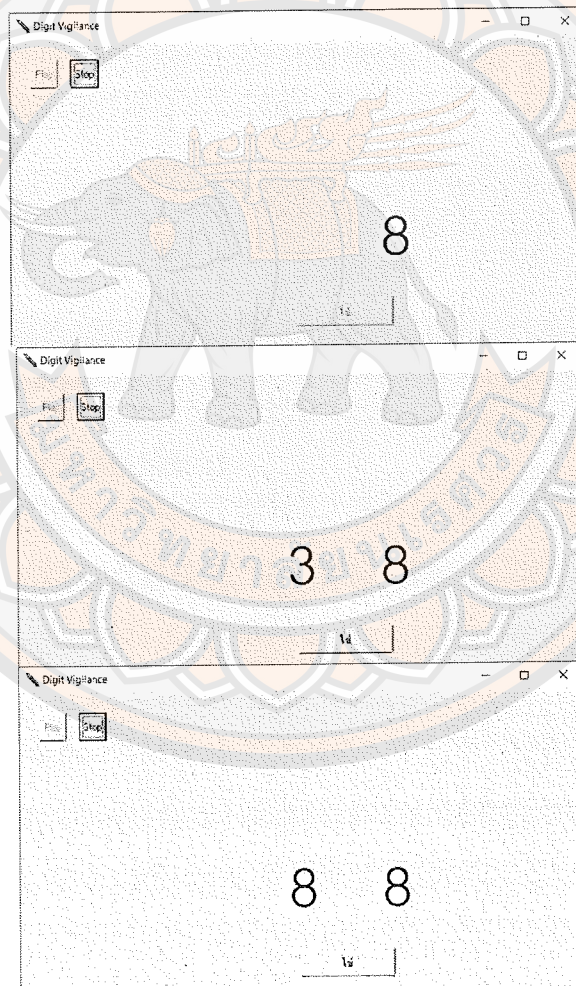


รูปที่ 13 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 5 sample reaction time (ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผล ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 2/11 ข้อที่ 3

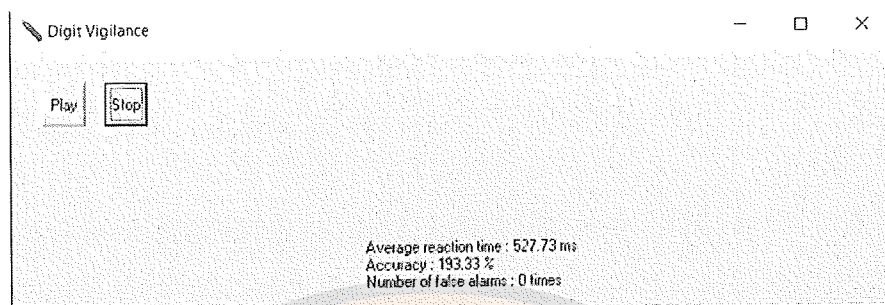
5) Task ที่ 4 การทดสอบ Digit vigilance task (การจำตัวเลข) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (6)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 6 โปรแกรมจะแสดงตัวเลข 1 ตัว (ตัวเลขเป้าหมาย) แสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ทางด้านขวา จากนั้นจะมีลำดับตัวเลขปรากฏที่ละตัวเลขตรงด้านซ้ายของคอมพิวเตอร์ และเปลี่ยนไปเรื่อยๆ เมื่อเห็นตัวเลขด้านซ้ายตรงกับตัวเลขเป้าหมายให้อาสาสมัครกดปุ่ม (ใช่) ให้เร็วที่สุด ดังตัวอย่างในรูปที่ 14



รูปที่ 14 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 5 Digit vigilance task (ขณะทำการทดสอบ)

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 15

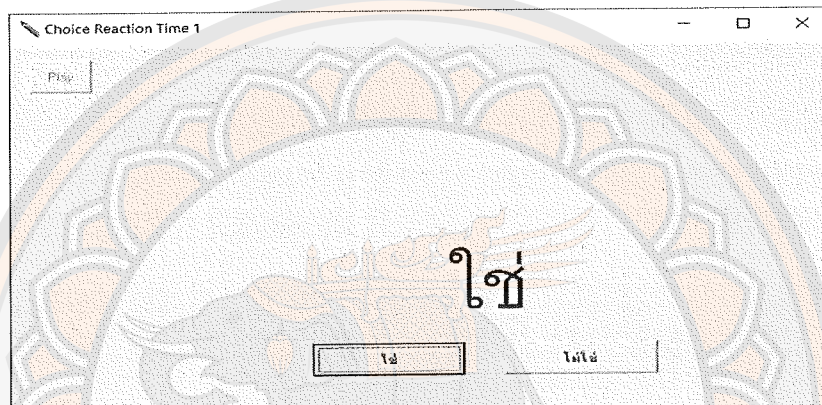
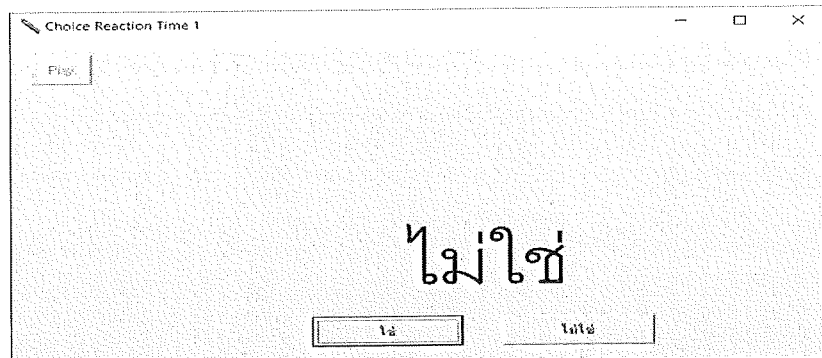


รูปที่ 15 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 6 Digit Vigilance (ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผลในแต่ละ parameters ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 2/11 ข้อที่ 4

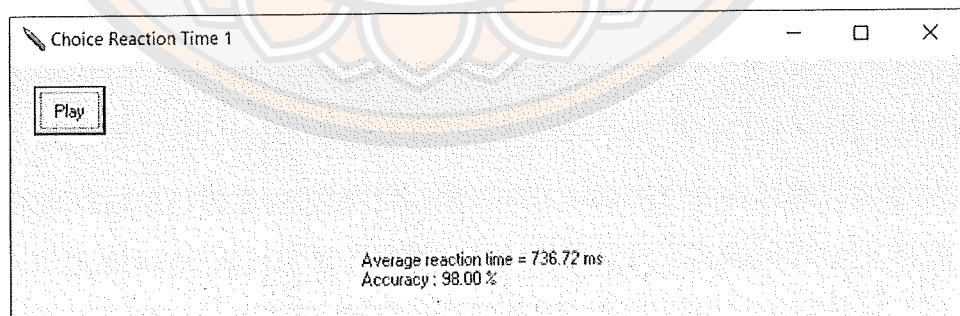
6) Task ที่ 5 การทดสอบ Choice reaction time (การตัดสินใจ ตั้งใจ และสมาธิจดจ่อ) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (6) หรือ (7)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ (6) หรือ (7) โปรแกรมจะแสดงคำว่าใช่ หรือไม่ใช่ ขึ้นมา เมื่อคำว่า "ใช่" ปรากฏให้กดปุ่ม (ใช่) หรือ คำว่า "ไม่ใช่" ปรากฏให้กดปุ่ม (ไม่ใช่) ให้เร็วที่สุด ตามตัวอย่างในรูปที่ 16



รูปที่ 16 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 6 หรือ 7 Choice reaction time (ขณะทำการทดสอบ)

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 17



รูปที่ 17 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 6 หรือ 7 Choice reaction time (ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผล ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 2/11 ข้อที่ 5

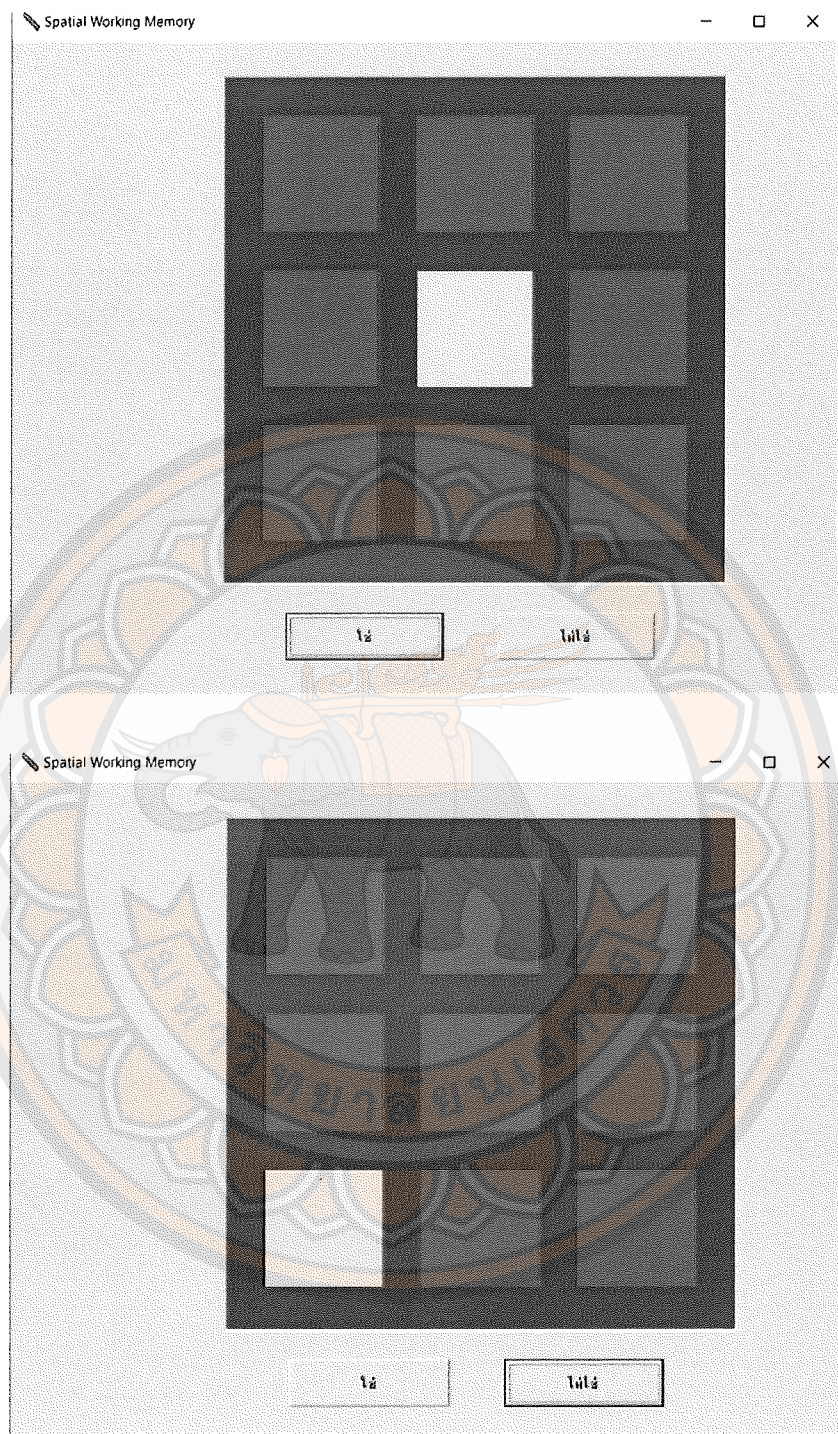
7) Task ที่ 6 การทดสอบ Spatial working memory จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (9)

เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 9 โปรแกรมจะแสดงข้อความ “จากหน้าต่าง 9 บาน จงพยายามจำหน้าต่างบานสีเหลือง” จากนั้นจะมีหน้าต่างปรากฏขึ้นมา โดยมีหน้าต่างทั้งหมด 9 ช่อง ปรากฏสีเหลืองจำนวน 4 ช่อง และหน้าต่างที่เหลือจะปรากฏสีแดง ดังตัวอย่างรูปที่ 18



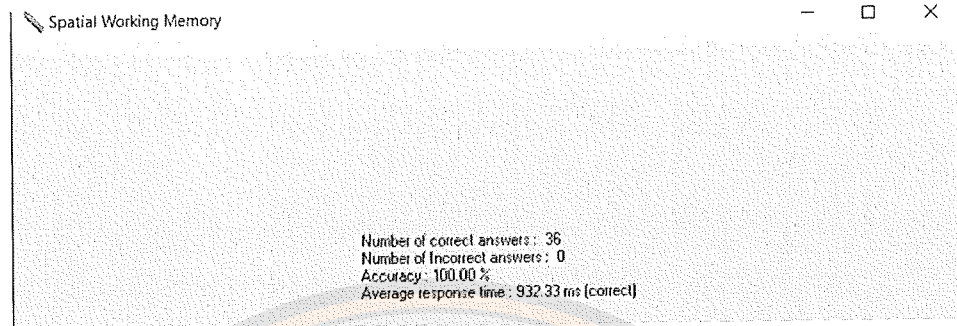
รูปที่ 18 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 9 Spatial working memory (ก่อนทำการทดสอบ)

จากนั้นหน้าต่างที่แสดงจะปิดการแสดงผลไป และปรากฏเป็นหน้าต่าง 9 บาน ขึ้นมาอีก โดยมีหน้าต่างสีเหลืองเพียงแค่ 1 ช่องเท่านั้น หากหน้าต่างสีเหลืองที่ปรากฏ ตรงกับตำแหน่งที่เคยแสดง ให้กดปุ่ม ใช่ ถ้าไม่ตรงกับตำแหน่งที่เคยแสดง ให้กดปุ่ม ไม่ใช่ ให้เร็วที่สุด ดังตัวอย่างในรูปที่ 19



รูปที่ 19 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 9 Spatial working memory (ขณะทำการทดสอบ)

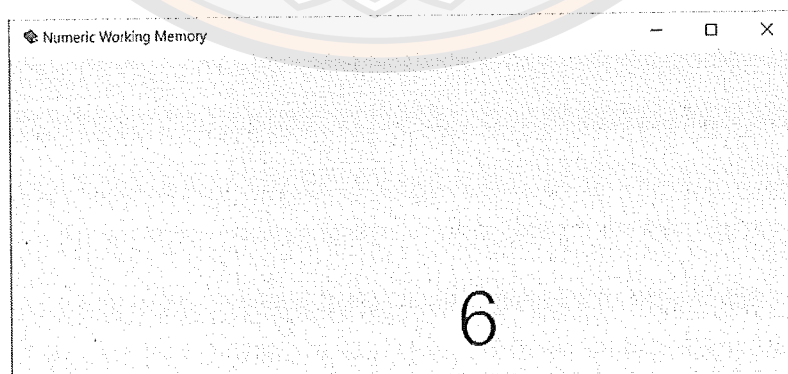
เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 20



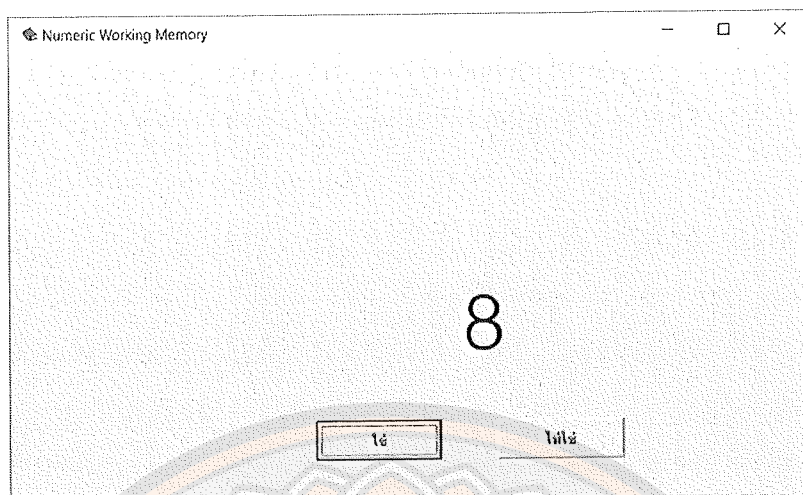
รูปที่ 20 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 9 Spatial working memory  
(ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผลในแต่ละ parameters ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 3/11 ข้อที่ 6

8) Task ที่ 7 การทดสอบ Numeric working memory (การจดจำลำดับเลข) จะต้องทำในหัวข้อย่อยที่ (10) เมื่อผู้วิจัยทำการเลือกหัวข้อย่อยที่ 10 โปรแกรมจะแสดงข้อความให้เลือก ระหว่าง “ไม่จำกัดเวลา” หรือ “จำกัดเวลา” ให้กดเลือก “ไม่จำกัดเวลา” จากนั้นจะมีลำดับตัวเลขแสดงตรงกลางจอคอมพิวเตอร์ ทีละตัว เป็นลำดับต่อเนื่อง ติดกัน 5 ตัวเลข เช่น 9 5 8 6 0 จากนั้นจะจบการแสดงผลไป และมีตัวเลขปรากฏขึ้นใหม่ หากมีตัวเลขตรงกับตัวเลขที่เคยแสดงผลไป ให้กด “ใช่” หากเป็นตัวเลขที่ไม่ตรงกับที่เคยแสดงผลไป ให้กด “ไม่ใช่” ให้ถูกต้องและเร็วที่สุด “ดังตัวอย่างรูปที่ 21-22

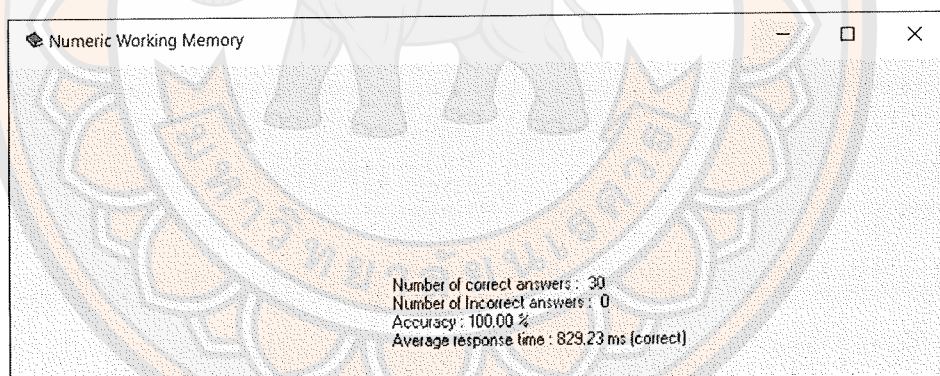


รูปที่ 21 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 10 Numeric working memory (โปรแกรมจะแสดงลำดับตัวเลข ทีละตัว ต่อเนื่องกัน 5 ตัวเลข)



รูปที่ 22 การแสดงภาพ ในหัวข้อย่อยที่ 10 Numeric working memory  
(ขณะทำการทดสอบ)

เมื่ออาสาสมัครทำการทดสอบเสร็จสิ้น จะมีการแสดงผล ดังตัวอย่างในรูปที่ 23



รูปที่ 24 การแสดงผลในหัวข้อย่อยที่ 10 Numeric working memory  
(ภายหลังการทดสอบเสร็จสิ้น)

จากนั้นผู้วิจัยจะต้องทำการบันทึกผลในแต่ละ parameters ลงในแบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (Case report form) แบบประเมินความจำ หน้า 3/11 ข้อที่ 7

#### 6.2.9 การเก็บแบบบันทึกข้อมูล

เมื่อทำการทดสอบเสร็จให้ผู้วิจัยทำเก็บแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัครเข้าแฟ้มเก็บเอกสาร และเตรียมเอกสารของอาสาสมัครคนถัดไป



#### 6.2.10 บันทึกข้อมูล

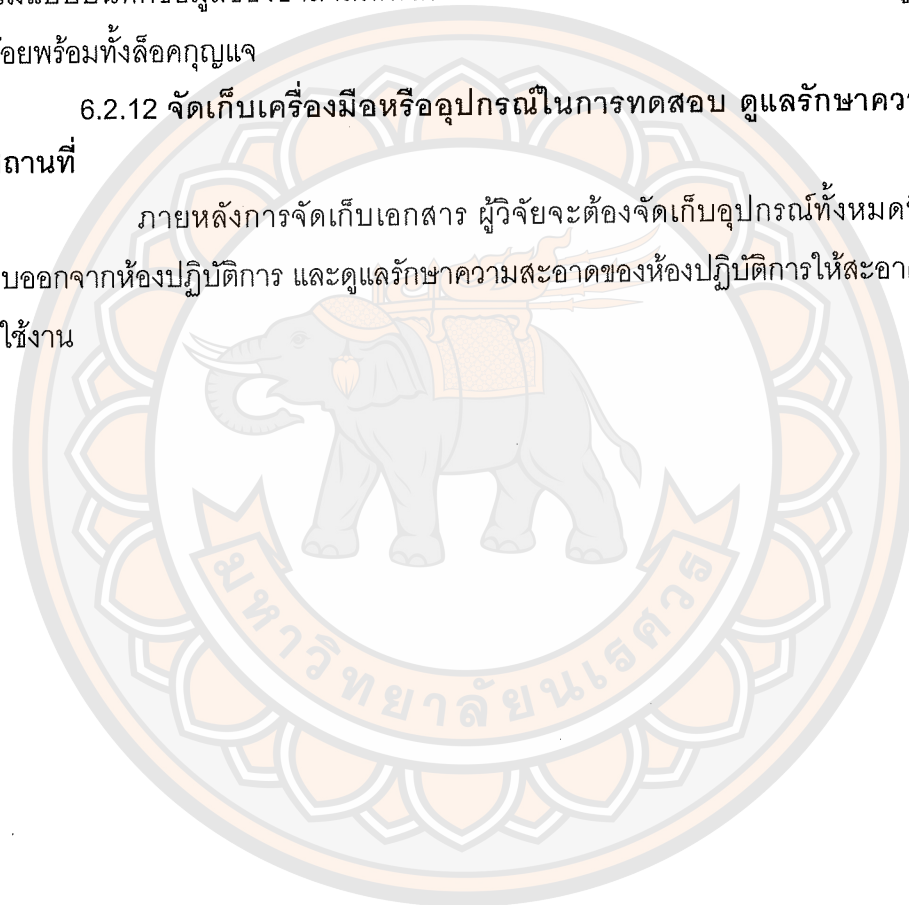
ภายหลังจากทำการประเมินความจำอาสาสมัครเสร็จสิ้นในวันนั้น ๆ ผู้วิจัยเก็บรวบรวมแบบบันทึกข้อมูลจากแฟ้มเก็บเอกสาร และนำไปลงข้อมูลในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (MS excel) ที่เตรียมไว้

#### 6.2.11 จัดเก็บเอกสารต้นฉบับแบบบันทึกข้อมูล

ภายหลังจากทำการบันทึกข้อมูลลงโปรแกรมคอมพิวเตอร์เสร็จสิ้น ผู้วิจัยจะต้องรวบรวมแบบบันทึกข้อมูลของอาสาสมัครเก็บไว้ในแฟ้มเก็บเอกสาร และจัดเก็บเข้าสู่ตู้เอกสารให้เรียบร้อยพร้อมทั้งล็อกกุญแจ

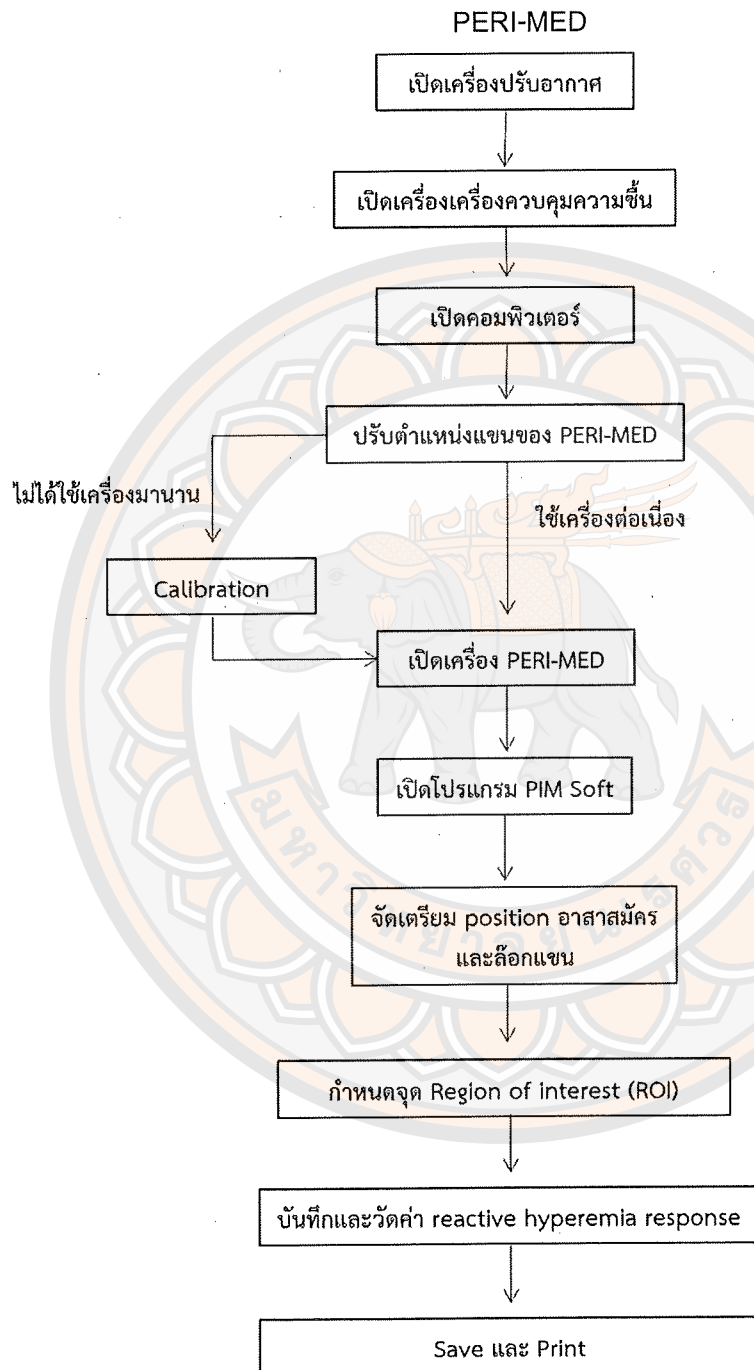
#### 6.2.12 จัดเก็บเครื่องมือหรืออุปกรณ์ในการทดสอบ ดูแลรักษาความสะอาด และสถานที่

ภายหลังจากการจัดเก็บเอกสาร ผู้วิจัยจะต้องจัดเก็บอุปกรณ์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบออกจากห้องปฏิบัติการ และดูแลรักษาความสะอาดของห้องปฏิบัติการให้สะอาด เรียบร้อย พร้อมใช้งาน



## APPENDIX S SOPS OF PERI-MED

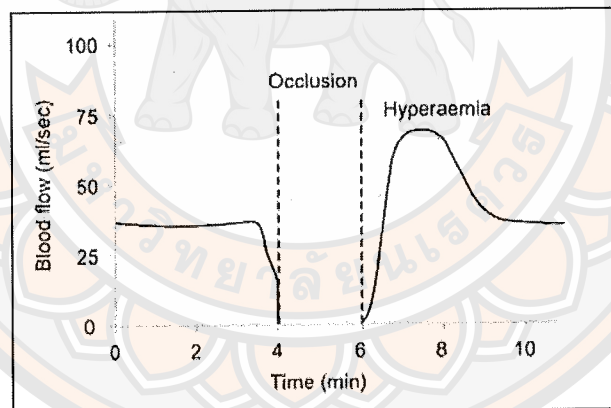
FLOW CHART วัดการไหลของเลือดในหลอดเลือดส่วนปลายของอาสาสมัครด้วยเครื่อง



### หลักการใช้เครื่อง PERI-MED เพื่อทดสอบ Reactive hyperemia

การวัดการเปลี่ยนแปลงของ blood flow บริเวณแขนจากภาวะ reactive hyperemia หลังจากรัดแขนส่วนบนด้วย cuff โดยใช้เครื่องมือ คือ peri-med หรือ real-time microcirculation imaging peri-cam PSI system ที่สามารถแสดงเป็นภาพสะท้อนให้เห็นถึงการไหลเวียนเลือด (blood perfusion) ถ้าหลอดเลือดมีการทำงานที่ดีจะเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า reactive hyperemia ซึ่งหมายถึงการเพิ่มขึ้นของ blood flow แบบชั่วคราวเมื่ออวัยวะได้รับเลือดมาเลี้ยงอีกครั้งหลังจากที่ขาดเลือด (ischemia) โดยการรัดแขนส่วนบนด้วย cuff ชั่วคราว เนื่องจากการรัดแขนส่วนบนจะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณที่ต่ำลงมาเกิดภาวะ hypoxia จึงกระตุ้นให้เซลล์หลั่ง local metabolites และ waste product รวมถึง nitric oxide ซึ่งหลังจาก endothelium ทำให้หลอดเลือดบริเวณนั้นคลายตัวแล้วมีผลเพิ่ม blood flow (กรองกาญจน์ ชูทิพย์, 2559)

ถ้าเซลล์ endothelium เสียหาย หรือเกิดภาวะ endothelial dysfunction จะส่งผลให้การหลั่งของ endothelial vasodilators โดยเฉพาะ nitric oxide ลดลง หากวัดการไหลของเลือดจากภาวะ reactive hyperemia จะพบการลดลงของการไหลของเลือดในบริเวณที่วัด ดังนั้น การวัดการไหลของเลือดจากภาวะ reactive hyperemia จึงบ่งชี้ endothelial function ได้



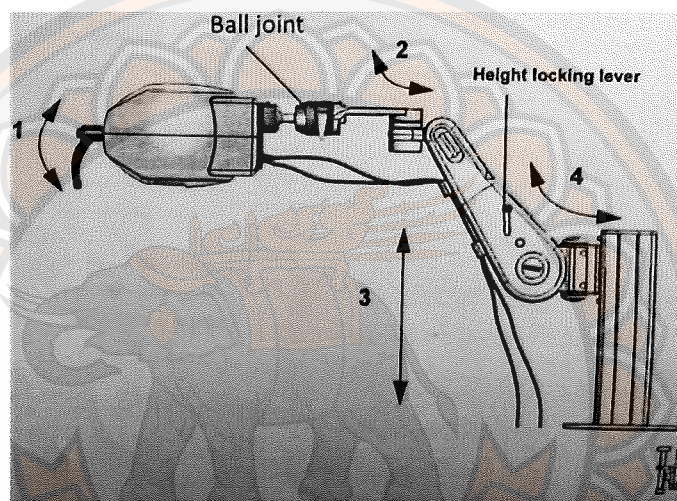
### รูป ปรากฏการณ์ reactive hyperaemia โดยการเพิ่ม blood flow หลังจาก ischemia

การศึกษานี้ จะใช้ Peri-Med เพื่อวัด reactive hyperaemic blood flow หรือ post occlusive reactive hyperemia (PORH) ซึ่งนำมาใช้ประเมินการทำงานของ endothelium ของหลอดเลือด ซึ่งการทดสอบนี้ประกอบด้วยการวัดการไหลของเลือด (blood perfusion) ทั้งก่อนระหว่าง และหลังการอุดกั้นการไหลของเลือด (occlusion) โดยใช้ Peri-Med พร้อมด้วย standard laser Doppler probe และ cuff เพื่อใช้ตรวจหา reactive hyperaemic blood flow โดยวาง laser Doppler probe ไว้บริเวณมือหรือแขน

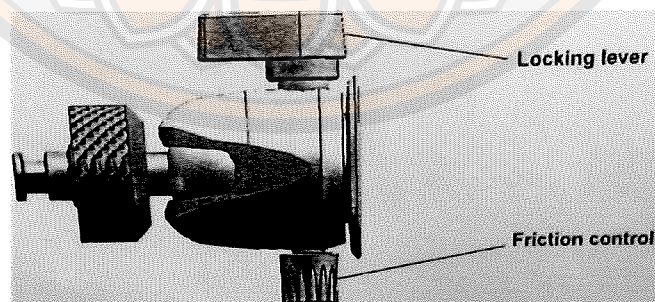
### การปรับตำแหน่งแขนของ PERI-MED

ส่วนหัวของตัว PeriCam สามารถปรับเปลี่ยนตำแหน่งได้ด้วย 5 วิธี ดังนี้

1. เปลี่ยนมุมของส่วนหัว (หมายเลข 1) (Head) ปรับบริเวณจุดหมุนข้อต่อ
2. ปรับแขนส่วนบนขึ้น ในส่วนที่สัมพันธ์กับ main part (2)
3. ปรับความสูง (3) คลายคานสำหรับล็อก (height locking lever) ก่อนที่จะปรับความสูง หลังจากนั้นล็อกคานให้แน่นให้ได้ตำแหน่งที่ต้องการ
4. การหมุนแกนของแขนในส่วนที่สัมพันธ์กับแท่นยึด (4)



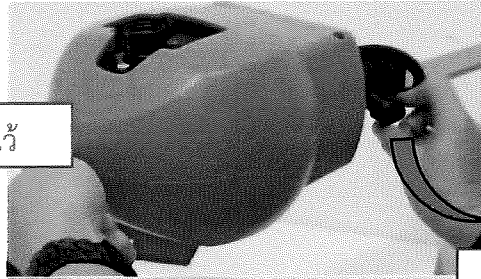
5. ทำการปรับ ball joint ของส่วนหัวให้แน่น จะมีคานสำหรับล็อก (locking lever) ข้อต่อให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการ สำหรับ friction control สำหรับความฝืดของข้อต่อ



## วิธีการปรับตำแหน่งหัวและแขนของ PERI-MED

1. ปรับหัวหงาย-คว่ำ โดยการคลายล็อก แล้วปรับหมุน จากนั้นหมุนล็อกตามเดิม

มือซ้ายจับคานไว้



หมุนเพื่อปลดคลายล็อก

มือซ้ายจับคานไว้



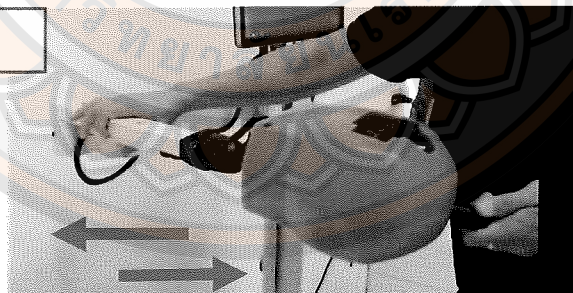
หมุนเพื่อล็อก

ล็อก

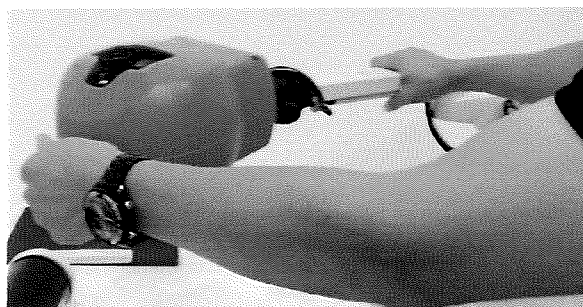


2. ปรับแขนซ้าย-ขวา

มือขวาจับแขนไว้

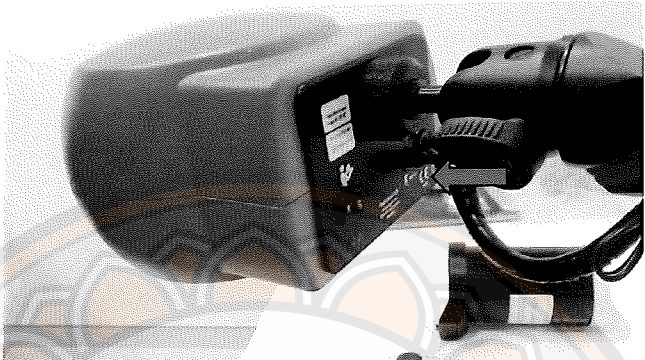


มือซ้ายจับคานไว้ โยกทางซ้าย-ขวา

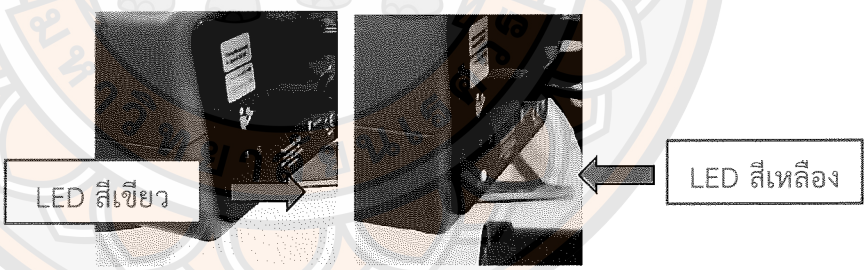


### การเปิดเครื่อง PERI-MED

1. เปิด switch ด้านหลัง (ON = เปิด , OFF = ปิด)

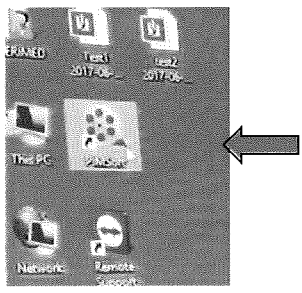


2. ไฟ LED สีเขียวจะกะพริบ 6 ครั้ง (แสดงถึงเริ่มเปิดใช้งาน)
3. จากนั้น ไฟ LED สีเขียวและสีเหลืองจะกะพริบสลับกัน ประมาณ 5 นาที (แสดงถึงกำลังอุ่นเครื่อง)
4. จากนั้น ไฟ LED สีเหลืองหยุดนิ่ง สว่างต่อเนื่อง (แสดงถึงเลเซอร์พร้อมใช้งาน)

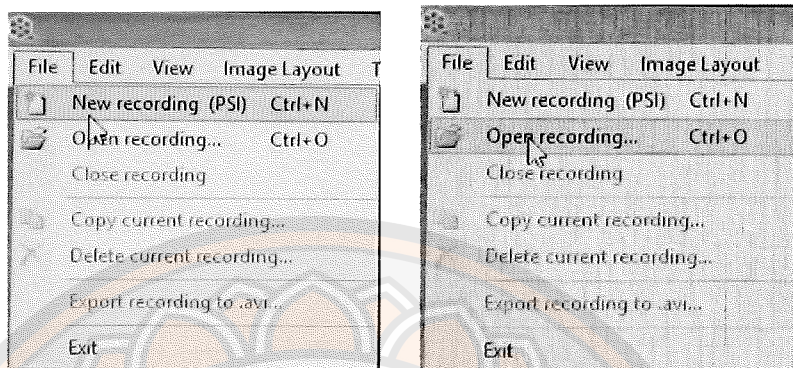


### การเปิดใช้งานโปรแกรม PIMSoft

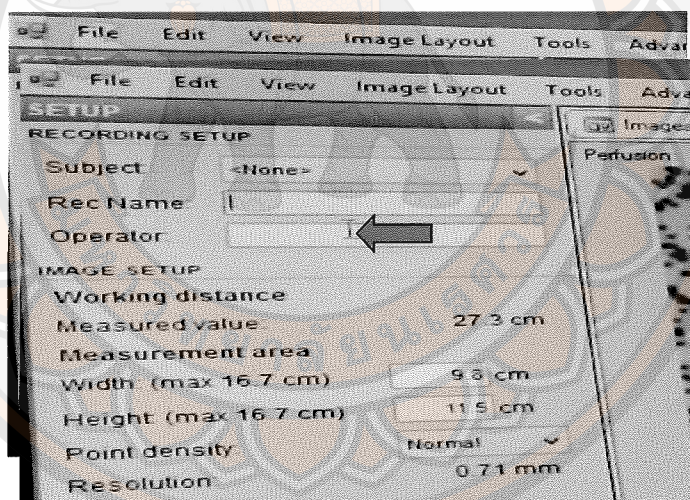
1. บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ เลือกโปรแกรม PIMSoft (double click แล้วรอโปรแกรม run สักครู่)



2. เลือก file และคลิกเลือก New recording (กรณีอาสาสมัครคนใหม่)  
หรือ คลิกเลือก Open recording (กรณีอาสาสมัครคนเดิม)

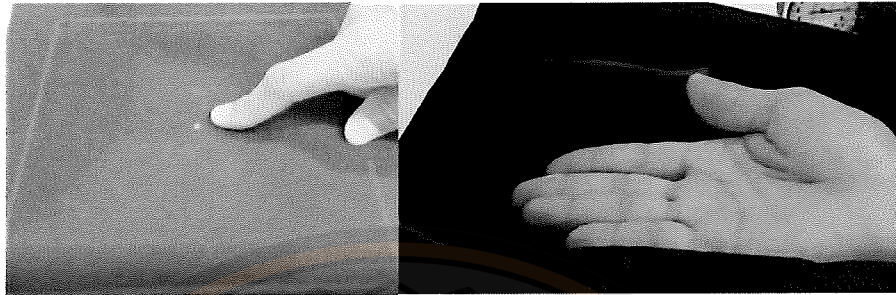


3. เมื่อคลิก New recording จะขึ้นหน้าต่าง Set up ให้ตั้งชื่อ Subject (เช่น BMEs 0001)



4. ตั้งชื่อ operator หรือผู้กรอกข้อมูล (เช่น Natakorn)

5. ปราบกฎเซนเซอร์ เพื่อจะทำการวัดระยะการวางกล้องหรือระยะห่างระหว่างหัวกล้อง และวัตถุที่จะวัด

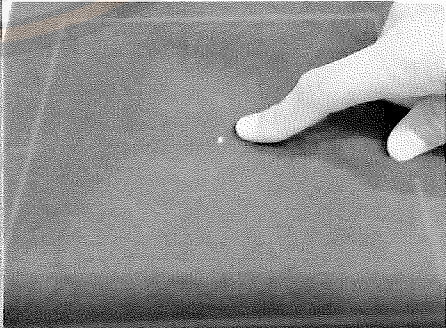


6. ระยะความสูงของหัวเลเซอร์และวัตถุที่วัดหรือมือของอาสาสมัคร สังเกตจาก Working distance: เช่น ตัวอย่างในรูปมีระยะความสูง measured value เท่ากับ 27.3 cm  
หมายเหตุ: ควรปรับ Working distance ให้เท่ากันทุกครั้งทีวัด

IMAGE SETUP	
Working distance	
Measured value:	27.3 cm
Measurement area	
Width: (max 16.8 cm)	7.6 cm
Height: (max 16.8 cm)	7.2 cm

7. ขนาดพื้นที่ กว้าง x ยาว ที่ต้องการวัด (กรอบสี่เหลี่ยมสีแดง) สังเกตจาก Measurement area Width คือ ขนาดด้านกว้าง และ Height คือ ขนาดด้านยาว หน่วยเป็น cm

IMAGE SETUP	
Working distance	
Measured value:	27.3 cm
Measurement area	
Width: (max 16.8 cm)	7.6 cm
Height: (max 16.8 cm)	7.2 cm
Point density:	Normal
Resolution:	0.71 mm



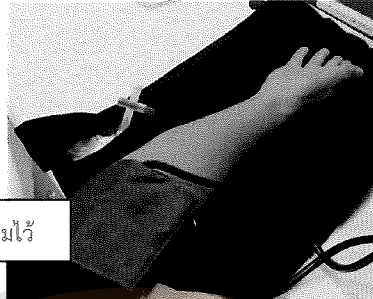


การจัดเตรียม position อาสาสมัคร และการล็อกแขน

1. ให้อาสาสมัครนั่งเก้าอี้ หันหน้าออกนอกจอคอมพิวเตอร์

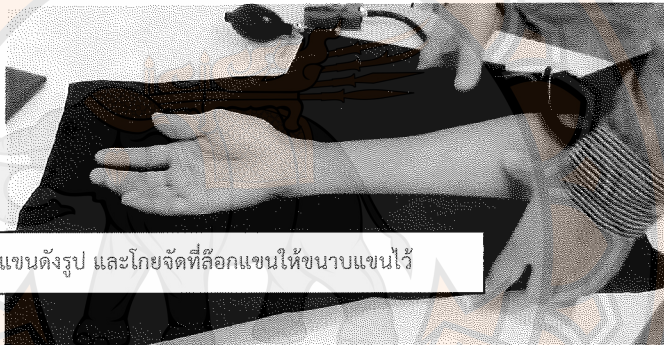


## 2. พัน cuff เตรียมไว้



พัน cuff เตรียมไว้

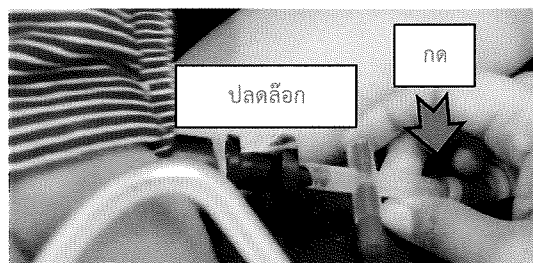
## 3. ติดตั้งตัวล็อกแขน โดยต่อตัวปั๊ม ปลดล็อก แล้วบีบที่ปั๊ม จากนั้นล็อกกันลมออก แล้วถอดที่ปั๊ม



จัดตำแหน่งที่ล็อกแขนตั้งรูป และไขว้จัดที่ล็อกแขนให้ขนานแขนไว้

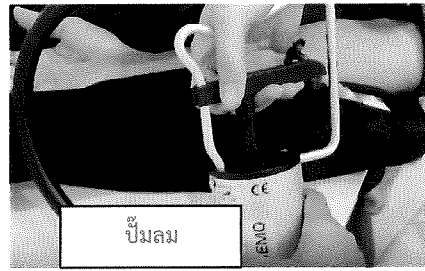


ต่อตัวปั๊มลม



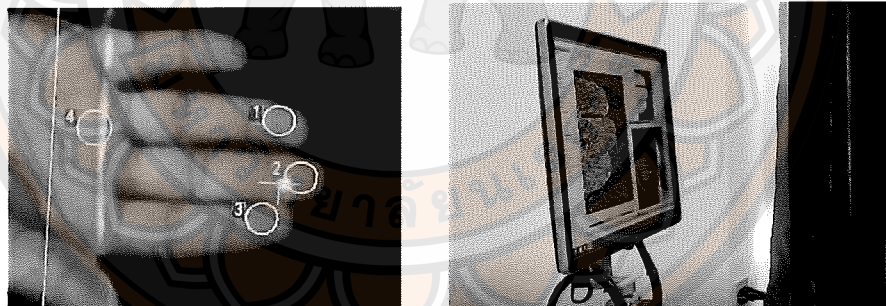
ปลดล็อก

กด



กำหนดจุด Region of interest (ROI)

กรณีวัดการไหลเวียนเลือดที่หลอดเลือดส่วนปลายบริเวณมือ ให้ปลายนิ้วเหยียด กำหนดจุด region of interest (ROI) ที่ต้องการวัด ดังนี้

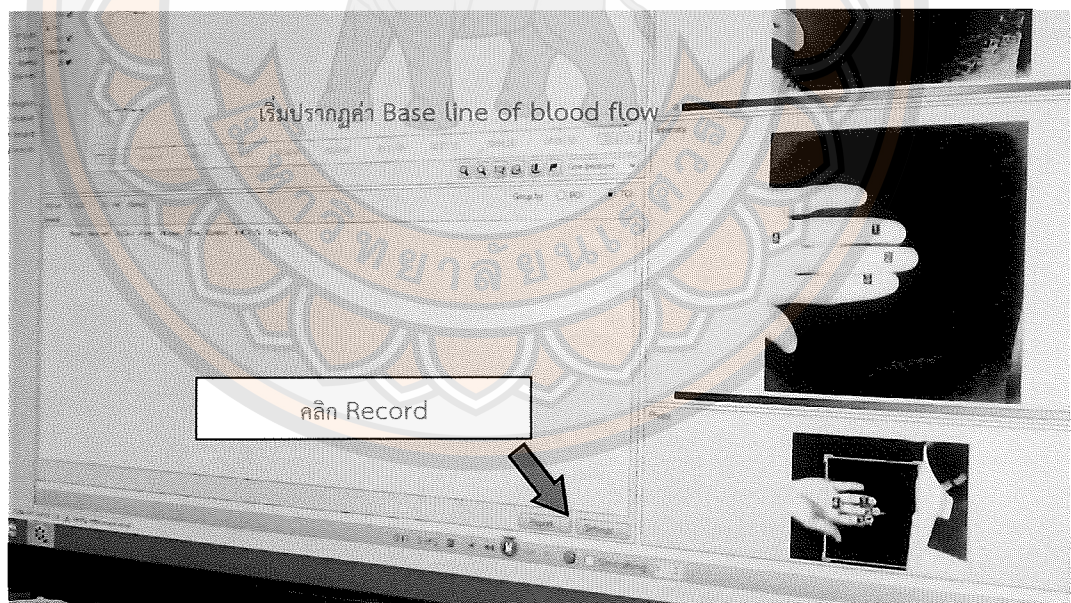


- จุดที่ 1 (ROI 1) อยู่ที่นิ้วนาง
- จุดที่ 2 (ROI 2) อยู่ที่นิ้วกลาง
- จุดที่ 3 (ROI 3) อยู่ที่นิ้วชี้
- จุดที่ 4 (ROI 4) อยู่ที่ฝ่ามือ



### วิธีการบันทึก reactive hyperemia response

#### 1. คลิก Record



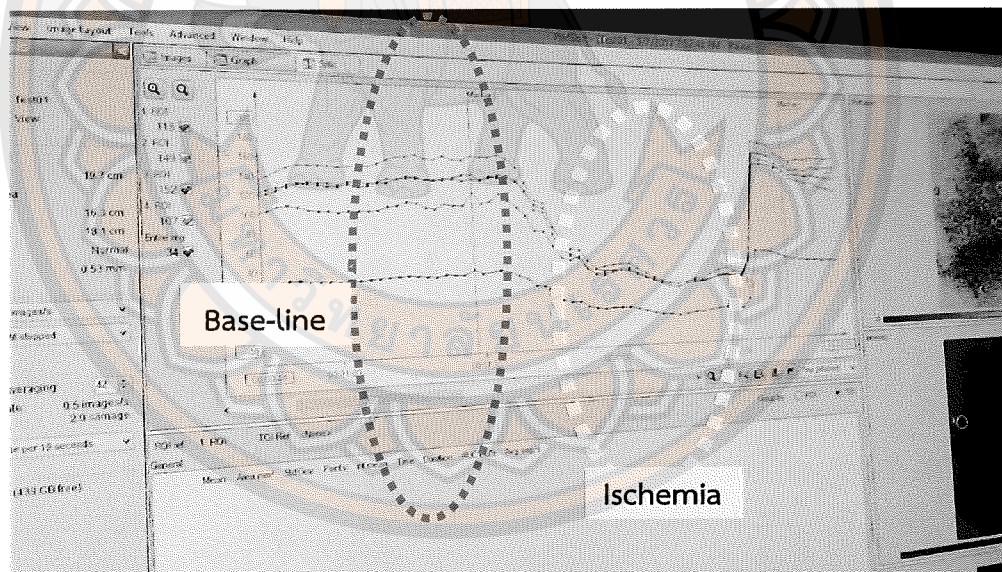
2. อาสาสมัครจะได้รับการวัดการเปลี่ยนแปลงของ blood ในทำนอง เป็นเวลา 3-5 นาที เพื่อเป็นค่า base line เริ่มจับเวลา

3. จากนั้นอาสาสมัครจะได้รับการรัดแขนส่วนบนชั่วคราวด้วย cuff ซึ่ง cuff จะถูกพันและรัดให้แน่น (inflated) โดยการเพิ่มความดันใน cuff ให้มากกว่า systolic blood pressure หรือ

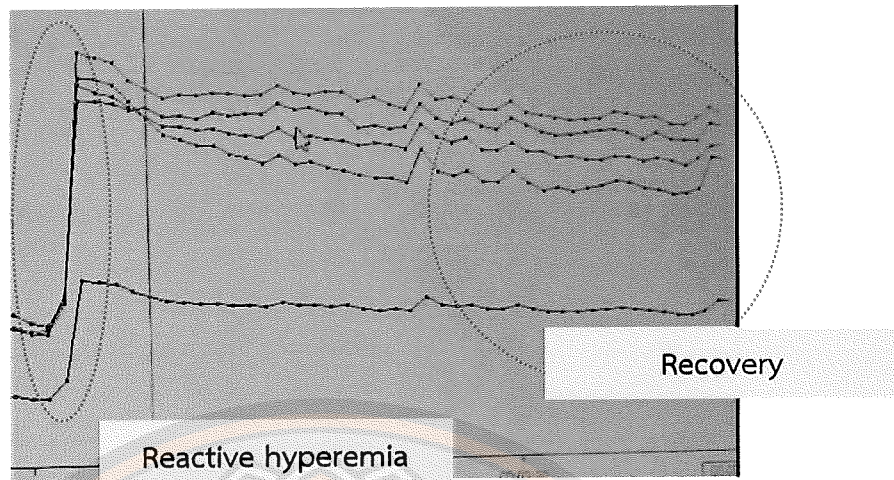
มากกว่า 120 mmHg และค้างไว้ชั่วคราวให้หลอดเลือด occlusion เป็นระยะเวลา 3 นาที วัดการเปลี่ยนแปลงของ blood flow ซึ่งมือหรือแขนจะอยู่ในภาวะขาดออกซิเจน (ischemia)



เมื่อเริ่มปंप cuff จะปรากฏ tracing ดังรูป แสดงถึงการไหลของเลือดลดลง หรือ เนื้อเยื่อขาดเลือด (ischemia)



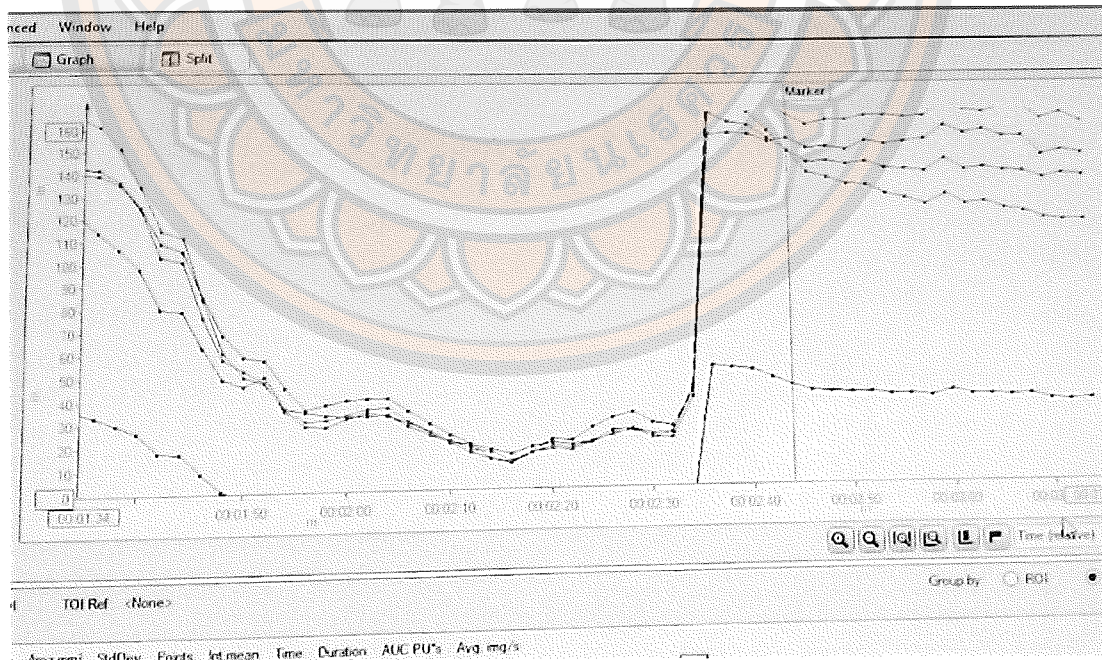
4. หลังจากปล่อย cuff ความดันใน cuff จึงลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของการไหลของเลือดจะถูกวัดต่อเนื่องตลอดเวลาด้วยสัญญาณจาก laser Doppler การเปลี่ยนแปลงของ blood flow จากภาวะ reactive hyperemia จะถูกวัดเป็นระยะเวลาต่อเนื่องอีก 5 นาที







5. คลิก stop (ด้านล่าง) เพื่อสิ้นสุดการ record



วิธีการวัดค่า reactive hyperemia response



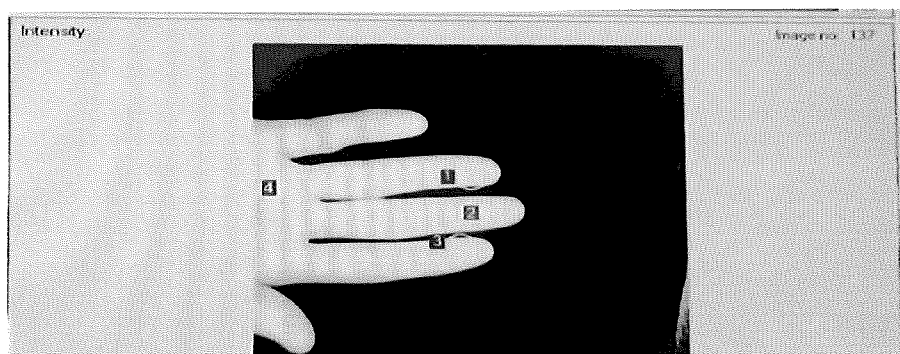
### วิธีการวัดค่ามี function ที่ควรใช้ ดังนี้

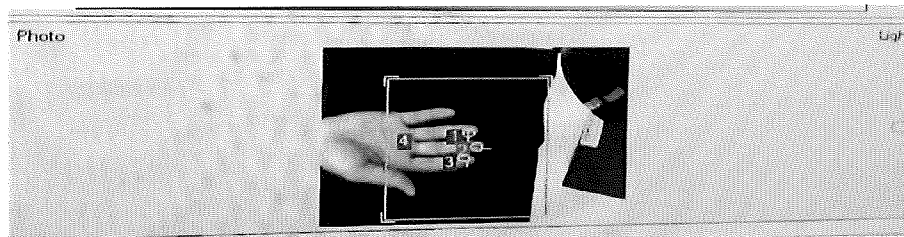
1. คลิก  เพื่อขยายซูม tracing
2. คลิก  เพื่อย่อ tracing ให้เห็นภาพรวม
3. เม้าส์คลิก  แล้วนำเม้าส์ ลาก drag and drop หรือกดปุ่มเลือกแถบช่วงที่ต้องการวัดค่า คลิกขวาที่แถบที่เลือก กด rename เพื่อตั้งชื่อแถบบริเวณนั้นบ่งชี้อะไร เช่น baseline
4. คลิก  แล้วคลิกตรง tracing ที่ต้องการ mark เพื่อวัดค่า ณ จุดๆ หนึ่ง

### Parameters ที่ประเมิน

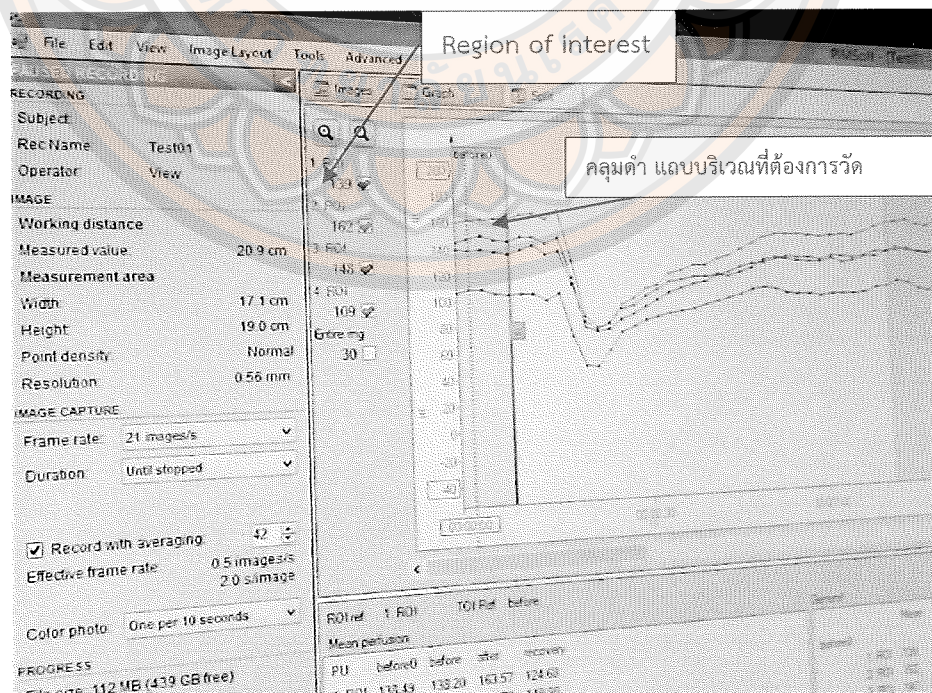
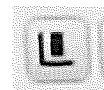
Parameters ที่ประเมิน ได้แก่ time to resting perfusion, time to half recovery, percentage change from baseline, maximum perfusion และ area under curve

หน้าแสดงผล ของโปรแกรม PIMSoft ขณะ Record (ด้านขวามือของหน้าจอ)



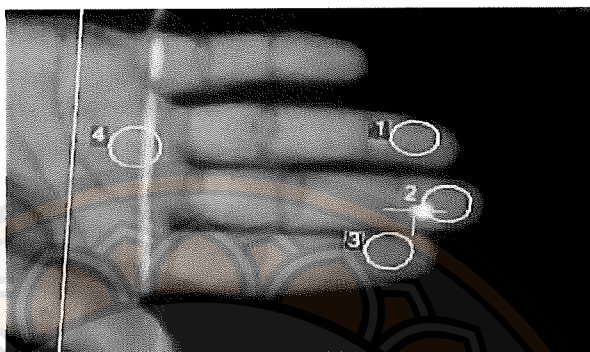


การวัดค่าการไหลของเลือดเฉลี่ย (mean perfusion) จาก tracing parameters คลิก

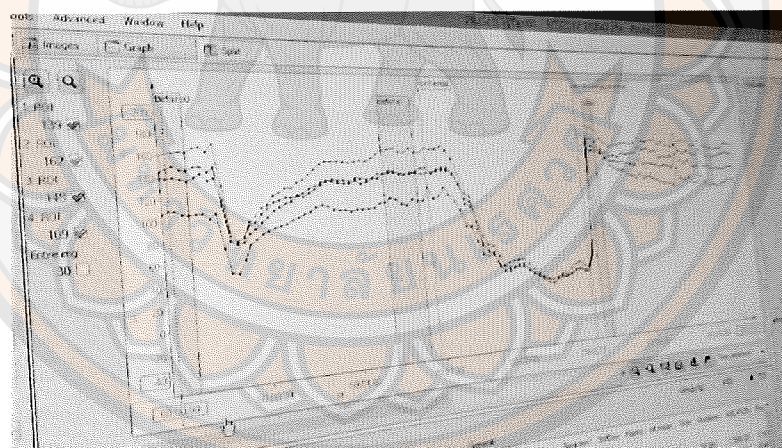




1. เลือก Region of interest (ROI) ที่ต้องการ โดย ✓ หน้า ROI (สังเกตจากสี ROI ซึ่งจะสอดคล้องกับสีของ tracing) แสดงถึงจุดหรือบริเวณที่ต้องการวัดค่า ที่กำหนดจุดไว้ก่อนหน้า ดังรูป



2. กดปุ่มเลือกช่วงบริเวณที่ต้องการวัด 3 บริเวณ ได้แก่ ช่วง Base-line (before), ช่วง Ischemia และ ช่วง Reactive hyperemia (after) ลักษณะเป็น over shoot หลังจากปล่อย cuff



3. การวัดค่าการไหลของเลือดเฉลี่ย (mean perfusion) จาก tracing มี parameters ที่แสดง ได้แก่

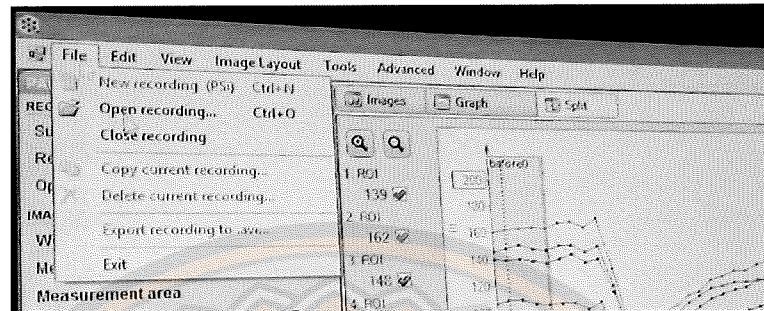
3.1 Mean perfusion เพื่อใช้ในการคำนวณค่า percentage change from baseline และค่า Maximum perfusion

3.2 Area ( $\text{mm}^2$ ) เพื่อหาค่า Area under curve

3.3 Time เพื่อหาค่าเวลาที่วัด หรืออาจหาค่า time to resting perfusion (recovery)

การ Print ข้อมูลที่ record

1. คลิก file เลือก open recording (ไฟล์บันทึกเป็น pdf.)



2. จากนั้นสั่ง print



APPENDIX T CERTIFICATE FOR THESIS & INDEPENDENT STUDY  
INNOVATION AWARDS 2020

