

# 산화질소 대사체 함유 마늘 발효 추출물 이용 혈관성 치매 흰쥐 모델의 기억력 및 신경가소성 장애 개선 효과

장소영<sup>1</sup> · 문세진<sup>1</sup> · 김유지<sup>1</sup> · 정선오<sup>1</sup> · 김민선<sup>1,2\*</sup>

1: 원광대학교 의과대학 생리학교실, 2: 원광대학교 의과대학 산화질소 대사체 연구센터

## Effect of Fermented Garlic Extract Containing Nitric Oxide Metabolites on Impairments of Memory and of Neural Plasticity in Rat Model of Vascular Dementia

Xiaorong Zhang<sup>1</sup>, Moon Se Jin<sup>1</sup>, Yoo Ji Kim<sup>1</sup>, Sun Oh Jeong<sup>1</sup>, Min Sun Kim<sup>1,2\*</sup>

1: Department of Physiology, School of Medicine, Wonkwang University,

2: Research Center for Nitric Oxide Metabolites, School of Medicine, Wonkwang University

Rodent model for chronic cerebral hypoperfusion caused by bilateral carotid artery occlusion (BCAO) show clinically relevant evidences for vascular dementia and impairments of synaptic plasticity in the hippocampus. The purpose of this study was to evaluate effect of fermented garlic (F-Garlic) extract with NO metabolites on cognitive behaviors, synaptic plasticity, and molecular events in the hippocampus following BCAO. Adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided three experimental groups into: control+water; BCAO+water; BCAO+F-Garlic. Animals were treated with oral administration of F-Garlic in tap water as a drinking water after surgery for 4 weeks. On passive avoidance test and Y-maze test, BCAO+water showed a significant decrease in step-through latency and spontaneous alteration, indicating deficit of hippocampal memory formation but the treatment of F-Garlic significantly increased these cognitive behaviors. In control+water, a robust increase in the amplitude of evoked field excitatory postsynaptic potentials was observed by theta burst stimulation to hippocampal neural circuit indicating formation of long-term potentiation (LTP) in the hippocampal CA1. BCAO+water showed a highly significant deficit in LTP induction 4 weeks after BCAO. On other hand, daily oral administration of F-Garlic extract caused the marked preservation of LTP induction. Moreover, parvalbumin was markedly reduced in the CA1, especially, in the stratum radiatum of BCAO+water. In contrast, BCAO+F-Garlic mitigate a significantly reduction of the parvalbumin. In summary, these results suggest that daily oral administration of F-Garlic extract can ameliorate cognitive memory deficit through the preservation of synaptic plasticity and interneurons integrity in the hippocampus in rodent model of chronic cerebral hypoperfusion.

keywords : Vascular dementia, Fermented garlic extract, Nitrite, Cognition, Long-term Potentiation, Parvalbumin

### 서 론

뇌는 우리 몸의 전체 혈액 중 약 15% 이상의 많은 혈액을 공급받는 단일 장기로 가장 많은 에너지 소모하는 장기이다. 따라서 원활한 혈류공급에 의한 에너지 공급은 뇌기능의 유지에 필수적이며, 뇌의 혈류공급을 저하시키는 노인성 혈관질환은 뇌 기능의 저하와 밀접한 관련이 있다. 즉, 만성적으로 뇌의 혈류저하가 장기간 지속된다면 인지기능 장애는 물론 혈관성 치매나 알츠하이머 치매를 유발하는 중요 원인 중의 하나로 간주되고 있다<sup>1)</sup>.

흰쥐를 대상으로 양측 총경동맥의 영구적인 폐쇄 (bilateral common carotid arteries occlusion, BCAO)로 만성 저관류 뇌 손상 (chronic hypoperfusion brain injury)을 유발하여 기억 및 인지기능 장애를 초래한 BCAO에 의한 뇌 손상 모델은 혈관성 치매 연구에 널리 사용되는 실험모델이다<sup>2)</sup>. BCAO에 의한 만성 저관류성 뇌 손상은 대뇌 피질, 해마, 및 백질에서 에너지 대사 감소에 의한 산화성 손상, 신경성 독소물질 및 염증물질의 증가와 신경교 세포들의 활성화에 의해 기인한다.

산화질소(nitric oxide, NO)는 반감기가 매우 짧은 기체분자로 다양한 근세포, 신경세포, 혈구세포 및 면역 세포 등에서 cGMP 신호전달계를 활성화하여 다양한 생리적 기능을 유지한다. 인체에서 NO 생성의 감소는 대사성 질환을 초래하고 혈소판기능 및 면역기능 저하, 성기능 저하 등을 초래한다. 특히 산화질소의 생성 감소는 인지기능의 감소와 관련되어 있으며 치매 발병과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다<sup>3)</sup>. 신경세포, 내피세포 및 지방세포 등

에서 NO 합성효소(nitric oxide synthase)에 의해 L-arginine 아미노산으로부터 NO가 생성되는 고전적 경로가 잘 알려져 있다. 최근 nitrate (NO<sub>3</sub>-)/nitrite (NO<sub>2</sub>-)은 환원효소 및 금속이온 항산화제 등에 의하여 NO로 환원될 수 있으며, 이러한 NO 생성 경로를 NO<sub>3</sub>--NO<sub>2</sub>--NO 합성계라 한다. 따라서 우리 신체에 NO 생성을 증가시키는 방법은 arginine을 섭취하거나 다양한 야채 및 해조류에 함유된 NO 대사체인 nitrate/nitrite를 섭취하는 방법이 있다<sup>4)</sup>.

마늘 (Allium sativum L, Garlic)은 백합과(Liliaceae)의 부추속(Allium L.)에 속하는 식물로 한약재로는 대산(大蒜)이라고 하며 비위를 튼튼하게 하고 정장(整腸)작용을 한다<sup>5)</sup>. 또한 마늘은 유기황 화합물과 다양한 페놀 및 플라보노이드 화합물을 함유하고 있어 항산화, 항염증, 항암 등의 유효한 약리 효능들을 가지고 있다<sup>6)</sup>. 발효한 마늘은 생마늘과 비교하여 항산화 효과가 보다 높고, 동맥 내피 세포에서 NO 생성을 더욱 촉진한다. Chun (2014)<sup>7)</sup>은 고초균 (bacillus subtilis)을 이용하여 마늘을 액상 발효하는 과정에서 NO 대사체인 NO<sub>2</sub>- 이 생성되고 장시간 액상상태로 유지되는 NO 대사체 생성 및 안정화하는 기술을 개발하여 인공위액조건(pH <2)에서 마늘 발효(fermented garlic)추출물로부터 NO가 생성됨을 확인하여 인체에서 마늘 발효추출물이 NO를 생성할 수 있음을 제시하였다. 마늘 에탄올 추출물 및 마늘의 주요성분인 S-allyl-L-cysteine (SAC)성분은 배양된 신경세포에서 항산화 효과가 있으며, 다양한 뇌 질환 모델에서 인지 기억력의 감소를 억제하고, 뇌조직에서 항산화 관련 신호전달계의 활성화, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, Ca<sup>2+</sup> ATPase, 효소계의 활성을 통해 세포 스트레스 감소 억제 효과를 보였다<sup>8)</sup>.

Min Sun Kim, Department of Physiology, School of Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk Republic of Korea

·E-mail : mskim@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6779

·Received : 2022/03/23 ·Revised : 2022/04/19 ·Accepted : 2022/04/25

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2022.04.36.2.59

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

따라서 본 연구에서는 인지기능과 관련되어 있는 NO 대사체 및 SAC 성분이 함유된 마늘 발효추출물을 BCAO 흰쥐모델에서 단독 투여시 인지기능 및 해마 기능의 감소를 보호하는 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

Sprague-Dawley계 쥐(~250g)(n=20)(Samtako, Osan, Korea)를 실험동물로 사용하였으며, 실험 1주일 전부터 실험실 환경에 적응시켜 환경변화에 따른 영향을 최소화하였다. 모든 동물실험은 원광대학교 실험동물관리위원회 규정에 의거하여 시행하였다(WKU20-12). 사육실의 평균온도는  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는 55%로 유지하였으며 12시간 간격으로 조명을 조절하여 7~15시까지 조명을 제공하였고, 물(membrane filtered purified water) 섭취는 제한하지 않았다. 실험군은 대조군(control) (n=10), BCAO+water 군(n=13), BCAO+F-Garlic 군(n=10)으로 구분하였다.

### 2. 마늘 발효추출물의 제조 및 투여

본 연구에서 사용한 마늘 발효추출물은 선행 연구와 유사한 휴먼에노스사(Wanju-gun, Korea)에서 제작 공급받았으며<sup>9)</sup>, 대략적인 제조과정은 생마늘의 껍질을 제거한 다음 세척하여 멸균하고 분쇄기로 생마늘을 분쇄하여 24시간 후에 물에 일정한 비율로 희석하였다(1:9, w/v). 이 곳에 활성화된 *Bacillus subtilis* 균주를 넣고  $37^\circ\text{C}$  환경에서 1개월간 호기 발효하였다. 발효추출물에  $\text{NO}_2^-$ 를 측정하여 100 ppm 이상 농도에 도달하였을 때 발효를 중단하였다. 원심분리기로 부유물로부터 상층액을 분리하여 농축기를 이용하여  $\text{NO}_2^-$  농도가 2,000 ppm 이상이 되도록 마늘 발효추출물을 농축하였다.

BCAO+F-Garlic 실험군은 마늘 발효추출물을  $\text{NO}_2^-$  농도가 100 ppm이 되도록 음용수에 희석하여 BCAO 실시 5일전부터 BCAO 실시 후 4주까지 실험동물이 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 한편 control+water 군과 BCAO+water 군은 BCAO 실시 후 마늘발효 희석액 대신 정상적인 음용수로 섭취하도록 하였다.

### 3. 대뇌피질에서 뇌 혈류 측정

BCAO+water 군 (n=3)의 대뇌피질에서 뇌 혈류 측정은 선행 연구에서 실시했던 레이저 도플러 혈류계를 이용하였다. 즉, 실험동물을 전신 마취시키고 두부를 뇌정위장치(Narishige Co., Tokyo, Japan)에 고정시키고 수술현미경하에서 미세 전동드릴을 이용하여 두정골 절개(craniotomy)를 시행하였다. 레이저 도플러 혈류계(Laser-Doppler flowmeter system, Moor Instrument, London, UK)의 탐침봉을 두정엽 피질 표면에 위치시켰다. 근접시켰으며 이때 현미경하에 큰 혈관들이 없는 곳에 위치하였다. 레이저 도플러 혈류계에서 발생한 혈류에 대한 전기신호를 A/D 변환기(CED 1401, Cambridge Research, London UK)로 디지털화하고, 디지털 신호를 기록 및 분석 프로그램(Spike2 version 4, Cambridge Research Ltd, London UK)에 저장하였다.

### 4. 양측 총경동맥 폐쇄(bilateral common carotid arteries occlusion, BCAO)모델의 제작

실험동물은 엔플르란 (JW Pharmaceutical, Korea)으로 가스 마취하고 수술 현미경하에서 목 중앙 피부를 절개하여 총경동맥을 노출 후 미주신경을 총경동맥으로 분리시켰다. 봉합사(4.0)를 사용하여 양측 총경동맥을 영구적으로 결찰하고 수술부위를 봉합하였다. 감염 방지를 위해 3일간 gentamicin sulfate 5 mg/kg을 둔부 근육에 주사하였고, 이후 실험동물은 4주 동안 조절된 환경에서 사육되었다. 한편 대조군은 모든 수술적 조치는 시행하였으나 양측 총경동맥은 결찰하지 않았다

### 5. 수동회피 검사 (Passive avoidance test)

BCAO 시술 4주 후 수동회피검사는 LeDoux 고안 방법을 응용하여 시행하였다. 학습 훈련시도는 2개의 구획(25 x 25 x 30cm)으로 구성된 수동회피 검사장치 (Scitech Korea Inc, Korea)의 밝

은 좌측 구획에 실험동물을 30초간 위치시키고 guillotine door를 열어 어두운 우측 구획으로 이동할 수 있게 하였다. 3초 이내에 바닥 격자 동선을 통해 강한 전기충격(0.3 mA, 3sec)을 가하여 실험동물이 전기충격을 기억하게 하였다.

전기충격 시간 후에 실험동물을 밝은 좌측 구획에 넣고 30초간 탐색시간 후 어두운 구획으로 이동하여 실험동물의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(step-through latency time: 잠복시간)을 300초까지 측정하였다.

### 6. Y-maze 검사

BCAO 시술 4주 후 공간 인지 및 기억 능력 형성 정도를 관찰하기 위하여 Y-maze 검사를 실시하였다. Y-maze 검사 기구는 3개 통로(42 x 8 x 21cm)의 Y형 미로로 구성되었고 하나의 영역에 실험동물을 조심스럽게 놓고 8분간 자유롭게 움직이도록 한 다음, 동물의 이동을 영상카메라와 컴퓨터 프로그램(Ethovision 3.1, Nodulus, USA)을 이용하여 저장하였다. 결과의 분석은 8분간 흰쥐가 Y-maze의 각 arm을 통과한 총 횟수와 변경행동력(spontaneous alteration, %)을 평가하였다. 이때 세 곳의 다른 영역에 순차적으로 들어간 경우 1점 (실제 변경: actual alteration, 즉 ABC, BCA, CAB 등의 순서)으로 인정하였다. 연속되지 않아서 들어가지 않은 경우는 점수로 인정하지 않았다. 따라서 % 변경행동력 (% spontaneous alteration)은 = 총 alteration 수 / (총 입장 회수 - 2) x 100으로 산출하였다.

### 7. 해마 신경망에서 LTP의 유발 및 기록

실험동물을 urethane (1.2g/kg)으로 전신마취 후 뇌 고정장치(Narishige, Japan)에 머리를 고정하였다. 수술현미경하에서 치과용 드릴로 우측 두개골을 절제하여 우측 뇌를 개방하고 해마 Cornus ammons 1 (CA1) 영역에(AP2.5 - 3.5mm, ML 1.5 -2.5mm, DV 2.5mm from bregma) 서 기록용 텅스텐 전극 (impedance 5M $\Omega$ , WPI, USA)을 삽입하고, 자극용 양극성 금속전극 (WPI, USA)을 미세조작기를 이용하여 CA3 영역 (AP4.0mm, ML 3.5mm, DV 3.5mm from bregma)에 삽입하고 CA3 영역을 전기 자극하여 CA1 영역에서 유발성 후시냅스 전위(evoked field excitatory postsynaptic potentials, fEPSPs)를 기록하였다. 이때 fEPSPs는 신호증폭기(preamplifier, Cyber Amp 320, axon instrument)와 analog/digital (A/D) 변환기 (CED 1401, UK)를 경유하여 Signal 프로그램 (Cambridge Electronic Design Co., UK)을 이용하여 fEPSPs를 컴퓨터에 저장하였다. 기저기록 (baseline recording)은 fEPSPs를 2분 간격으로 20분간 기록한 다음 LTP를 유발하기 위하여 CA3 영역에 theta burst 패턴의 전기자극을 1분 간격으로 3회 실시하고 추가적으로 60분간 기록하였다.

LTP 분석은 Signal (CED, UK)과 EXCEL (Microsoft, USA) 프로그램을 사용하였으며 기저기록으로부터 fEPSPs의 평균 진폭값을 산출한 다음(baseline mean amplitude), theta burst 자극 후 기록된 fEPSPs의 진폭값을 기저 fEPSPs 평균 진폭값의 비(ratio)을 산출, %로 환산하였다. 즉, LTP(%) = fEPSPs amplitude after theta burst/baseline fEPSPs mean amplitude x 100.

한편 기록이 끝나고 후 직류 조직 손상기 (D.C. LM5A, GRASS, USA)를 이용하여 기록전극에 통전시켜 CA1 영역에 병변을 심장관류로 뇌를 고정한 다음 뇌절편을 제작하여 Cresyl-violet 조직학적 검사를 통하여 기록 전극의 위치를 확인하였다.

### 8. 면역조직화학검사 및 Cresyl-violet 염색

각 실험군의 실험동물 5마리를 대상으로 LTP 기록이 종료된 후 과량의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)와 4 % paraformaldehyde (PFA)로 용액을 심장을 관류하여 뇌를 고정한다. 다음 박리 후 4 % PFA 용액에 추가 고정하고 30 % sucrose에서 2일 이상 방치하였다. Cryostat (Leica, Germany)를 이용하여 뇌 절편(40  $\mu\text{m}$ )을 제작 후 면역조직화학 염색을 실시하였다. 즉, 1% 정상 염소혈청 용액을 실온에서 30분간 처리한 1차항체 (Parvalbumin, 1:1000, Abcam, USA.)을 하룻밤 동안 반응시킨 2차항체인 Polymer HRP anti-rabbit IgG (GBL Labs, USA)을 처리하고 chromogen인 0.05% diaminobenzidine+0.1% nickle 용

액으로 발색하였다. 슬라이드 글라스에 부착하여 건조하고 탈수과정을 거쳐 커버 글라스를 덮어 광학현미경하에서 암갈색의 면역 양성 반응을 관찰하고 디지털 카메라로 그 영상을 컴퓨터에 저장하였다. 해마 영역이 포함된 뇌 절편은 조직학적 평가를 하기 위한 가장 기본적인 염색법인 Cresyl-violet 염색을 실시하였다.

9. Western blot 검사법

각 실험군의 5마리에서 실험동물을 각각 과량의 마취제로 희생한 다음 해마영역을 선택적으로 분리하여 분쇄 완충용액(20mM Tris-HCl(pH7.5), 1% Triton× 100, 150mM NaCl, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM EDTA, 5µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF)에서 유리분쇄기를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄액을 원심 분리하여 상층액을 취하여 2X sample 완충용액(2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.025% BPB, 60mM Tris, pH 6.8)을 가한 후 100°C heating block에서 5분간 가온한 후에 4°C에 보관하여 사용하였다. BCA 단백질 분석기법으로 분쇄액의 단백질을 측정하고 각 샘플 총 단백질(15µg)을 전기영동 후, nitrocellulose 막에 이동시켜 nitrocellulose(Schleicher & Schuell, Germany)에 이동 고정하였다. 5% 탈지분유용액(.1% Tween-20 in 0.02 M Tris-buffered saline, TTBS)으로 비특이적 면역반응을 억제 후 일차항체(GFAP, 1:2000; Parvalbumin, 1:1000; Abcam, USA.)를 24시간 동안 반응하고 이차항체(1:1000)을 반응시켰다. ECL Western blotting detection reagents(Amersham, England)를 디지털 영상장치를 이용하여 컴퓨터에 영상을 저장하고 densitometer 프로그램을 이용하여 정량분석을 실시하였다.

10. 통계분석

실험결과와 통계분석은 분산분석 (Analysis of variance, ANOVA)을 이용하였고 Turkey's test를 이용하여 사후검정을 실시하였다. 통계분석 값은 평균 (means) ± 표준편차 (SD)로 나타내었으며, p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. BCAO 후 마늘 발효추출물 경구 투여의 뇌혈류 변화

BCAO 실험 모델 3마리에서 레이저 도플러 기기의 탐침봉을 노출된 대퇴피질(AP - 3mm)의 경막에 위치한 다음 마늘 발효추출물(150ppm)과 생리식염수를 1.5ml투여하였다. 마늘 발효추출물을 경구투여 하였을 때 투여 10분부터 뇌 혈류가 증가하였으며, 30분에 최대로 증가하였고 이후 감소하면서 투여 2시간이내에 정상으로 회복되었다(Fig. 1).

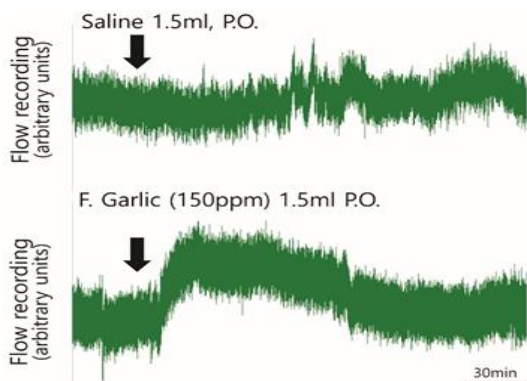


Fig. 1. Representative diagrams showing changes of blood flow recorded by a laser Doppler flow meter from cerebral cortex following the oral administration of either saline or F Garlic extract. Arrow head indicates the time point of ether saline or F garlic extract treatment

2. BCAO 후 수동회피 학습에 대한 마늘 발효추출물의 효과

수동회피 기억력의 변화를 관찰하기 위해 수동회피 학습 훈련 시도 24시간 후에 수동회피 검사를 실시하였으며, BCAO를 실시하지 않은 대조군에서 밝은 공간에서 어두운 공간으로 이동하는 시간인 잠복시간은 280.5 ± 25초로 관찰되어 수동회피 기억이 생성되

었다. 그러나 BCAO+water 군(n=10)의 잠복기 시간은 155.2 ± 15 초로 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소(\*\*p<0.01)하였으며, BCAO+F-Garlic 군 (n=10)의 잠복기는 220.5 ± 19.3초로 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였으나(\*p<0.05), BCAO+water 군과 비교하여 유의하게 증가하였다(#p<0.05)(Fig. 2).

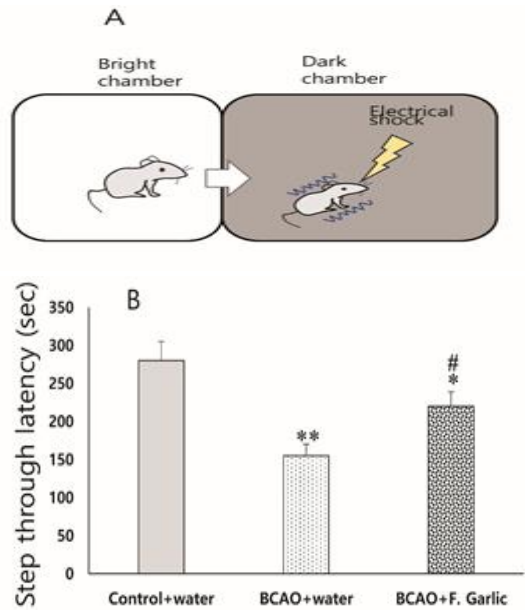


Fig. 2. Changes of passive avoidance performance in three experimental groups. A. Schematic diagram of passive avoidance apparatus in which electrical direct current shock (0.3mA, 3sec) was given to foot of animal in order to formation of memory. Step through latency as a retention memory ability was measured 24 hours after post-training. Values are mean ± S.D. of 10 in each group \*significant difference between control+water and BCAO+water or BCAO+F Garlic (\*p<0.05, \*\*p<0.01). # significant difference between BCAO+water and BCAO+F Garlic (#p<0.05)(one way ANOVA, Turkey's post hoc test).

3. BCAO 후 Y-maze 학습에 대한 마늘 발효추출물의 효과

BCAO 시술 4주 후 공간 기억력에 관한 학습능력을 확인하기 위하여 8분간 Y-maze 검사를 실시하였을 때 3개의 arm을 통과한 총 횟수는 대조군은 20.2회, BCAO+water 군은 17.5 회 BCAO+F-Garlic 군은 19.2회로 실험군 간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 주변의 단서를 파악하여 순차적으로 미로를 들어가는 상대적 빈도를 측정한 변경 행동력 점수(spontaneous alteration %)에서 대조군은 71.5 ± 5.5%, BCAO+water 군은 58.2 ± 3.5%, BCAO+F-Garlic 군은 64.5 ± 3.7%으로 대조군의 변경 행동력 점수와 비교하여 BCAO+water 군(p<0.01), BCAO+F-Garlic 군(p<0.05)의 점수에서 유의한 감소를 보였다. 그러나 BCAO+F-Garlic 군의 변경 행동력 점수는 BCAO+water 군의 점수보다 유의하게 증가여(p<0.05) Y-maze 학습능력의 향상을 보였다(Fig. 3)

4. BCAO 후 해마 CA1 영역에서 장기강화(LTP) 현상에 대한 마늘 발효추출물의 효과

해마 CA1 영역에서 장기강화(LTP) 현상은 기억형성에 관여하는 중요한 신경가소성 현상이며 신경세포의 손상 및 기능장애에 의하여 LTP 현상이 감소된다. Schaffer 측지들을 theta burst 유형으로 전기자극을 실시하면 fEPSPs의 진폭이 커지고 이러한 증가는 60분 이상 지속되는 LTP 현상이 관찰되었다 대조군 군(n=5)에서 theta burst 자극 전 fEPSPs의 진폭과 비교하여 theta burst 자극 5, 60분 후에 fEPSPs의 진폭이 각각 160.3 ± 10 %, 145.4 ± 7% 로 증가되었다. BCAO+water 군(n=5)의 fEPSPs 의 진폭은 theta burst 자극 직후 109.5 ± 5 % 였으며, 자극 60분 후에 각각 105.5 ± 3%로 LTP가 기록되었다. BCAO+F-Garlic 군 (n=5)에서는 fEPSPs의 진폭은 자극직후 130.5 ± 6% 였으며 자극 60분 후에 각각 125.3 ± 4% 로 LTP가 관찰되었다. 각 실험군의 LTP 발생 정도를 theta burst 자극 60분에서 fEPSPs 진폭 변화를 통계적으로 분석하였을 때 대조군+water 군과 BCAO+water 군 간에 유의한 차이가보여(p<0.01), 양측 경동맥 폐쇄에 의한 4주간 만성 저혈류 장애에 의해 해마 신경망의 기능적 손상이 초래되어 해마 CA1영역에서 LTP 현상이 억제되는 것으로 관찰되었다. 한편



BCAO+F-Garlic 군의 LTP 발생 정도는 대조군+water 군과 비교하여 유의한 감소를 보였으나( $p < 0.05$ ), BCAO+water 군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를( $p < 0.05$ )을 보였다. 따라서 이러한 결과는 마늘 발효추출물의 섭취가 만성 저혈류성에 의한 해마 신경망의 기억과 관련된 신경가소성의 저해를 감소하는 효과를 보였다 (Fig. 4 & 5).

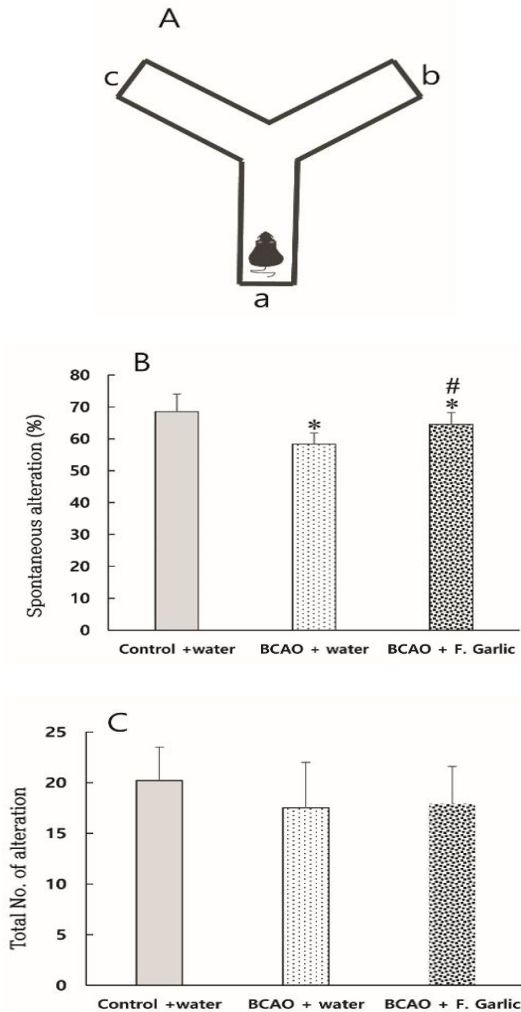


Fig. 3. Changes in working memory performance in Y-maze test following BCAO. A. Schematic diagram of Y-maze apparatus consisting of three identical plastic arms B. Spontaneous alteration (%) was calculated as follows. Spontaneous alteration (%) = total number of alteration / (total number of arm entry - 2) x 100. Other notations are the same as in Fig. 2.

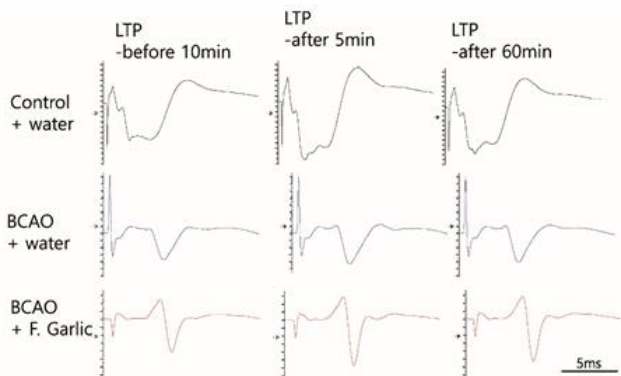


Fig 4. Representative examples for potentiation of fEPSP traces from hippocampal CA1 area following theta burst stimulation of Schaffer collateral axons in CA3 area of three experimental groups. LTP was evoked by three theta bursts that consisted of 5 trains of 5 pulses at 100 Hz delivered at 200ms intervals.

##### 5. BCAO에 의한 해마 CA1 영역은 피라미드세포의 세포체 손상에 대한 마늘 발효추출물의 효과

해마(hippocampus)의 CA1 영역은 피라미드세포의 세포체가 밀집된 피라미드층(stratum pyramidale, SP층), 기저수상가지(basal dendrite)들이 밀집한 지행층(stratum oriens, SO층), 첨부수상가지(apical dendrite)의 원위부와 중앙부가 밀집한 방사층(stratum radiatum, SR층)과 첨부수상가지의 종단이 밀집한 소상-분자층(stratum lacunosum-moleculare, SM층)들로 구성된다. Cresyl-violet 염색에서 대조군의 해마 CA1 영역의 피라미드세포

층에서 신경세포의 세포체 층이 균일하고 신경세포의 핵에서 염색이 균일하게 관찰되었다. BCAO+water 군의 실험동물의 피라미드 세포층에서 BCAO 4주 후 신경세포 손상에 의한 핵 응축 및 분절로 인하여 Cresyl-violet 염색이 진한 세포체( $100.3 \pm 12.3$ 개)들이 관찰되었다. BCAO+F-Garlic실험군에서 신경세포 손상에 관한 조직학적 변화가 관찰되었으나( $75.2 \pm 11.5$ 개). BCAO+water 군과 비교하여 신경세포의 손상이 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 6).

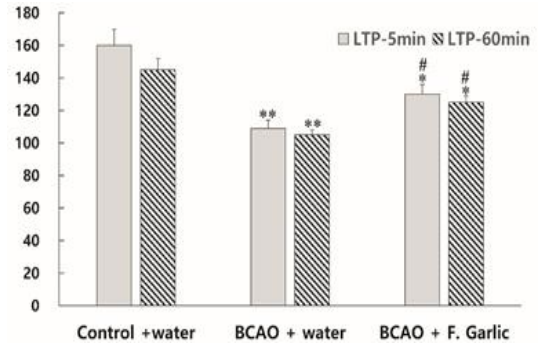


Fig. 5. Changes in LTP induction in hippocampal CA1 area following BCAO. The columns in graph show the percent changes of amplitude of fEPSP recorded during 5min and last 60min following theta burst stimulation to the that of fEPSP recorded during baseline. Values are mean  $\pm$  S.D. of 5 in each group \*significant difference between control+water and BCAO+water or BCAO+F Garlic (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). Other notations are the same as previous figures.

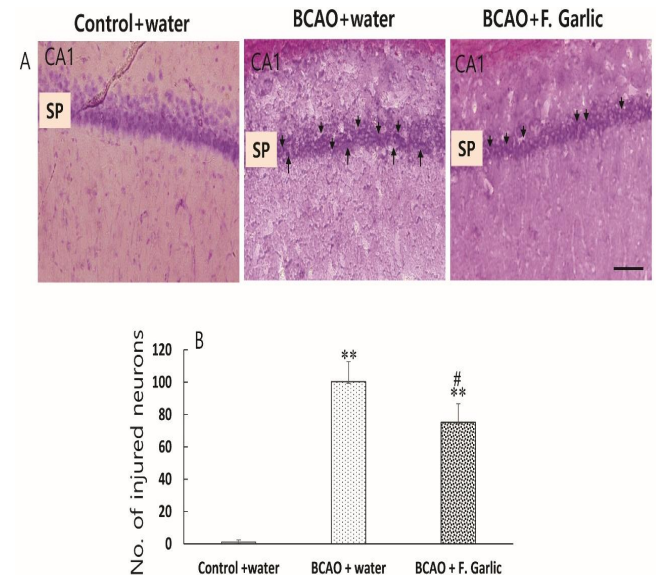


Fig. 6. histopathological changes in pyramidal cellular layer (SP) of hippocampal CA1 area following BCAO. A, Arrows indicates chromatic condensation of damaged neurons injured by BCAO on Cresyl violet staining producer. B. The columns in graph represent the number of injured neurons analyzed with image software. SP, stratum pyramidale. Other notations are the same as in Fig. 3. Scale bar: 100mm

##### 6. BCAO에 의한 해마 CA1 영역의 parvalbumin (PV) 단백질 발현에 대한 마늘 발효추출물의 효과

면역조직 화학 검사 상 대조군의 해마의 CA1 영역에서 PV 단백질 면역 양성 반응은 SO층에서 전반적을 강하게 관찰되었으며 특히 SO층 주변에 세포 크기가 작은 뉴론들의 원형질에서 강하게 관찰되었다. 그리고 SR 층에서 첨부수상가지에서 PV 단백질의 강한 면역양성반응을 보였다. 대조군과 비교하여 BCAO+water 군의 해마 CA1영역 전반에서 PV 단백질 면역양성 반응이 현저하게 감소하였는데, 특히 SO 층과 SR 층에서도 첨부수상가지에서 PV 단백질 면역양성이 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). BCAO+F-Garlic실험군의 CA1 영역에서 PV 단백질 면역양성 반응이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으나 BCAO+water 군과 비교하여 유의하게 증가하였다(Fig. 7). 한편 Western blot 검사를 통하여 각 실험군의 해마에서 PV 단백질에 대한 발현량을 정량 분석하였다. 대조군의 PV 단백질 발현량( $100\%$ )과 비교하여 과 비교하여 BCAO+water 군의 PV 단백질 발현량은  $61.5 \pm 5.5\%$ , BCAO+F-Garlic실험군의 PV 단백질 발현량은  $78.1 \pm 7.9\%$ 로 대조군과 비교하여 BCAO+water 군( $p < 0.01$ )과 BCAO+F-Garlic실험군( $p < 0.01$ )로 유의한 차이를 보였다. 그러나 BCAO+water 군과 BCAO+F-Garlic실험군 간에도 PV 단백질 발현에도 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 8)

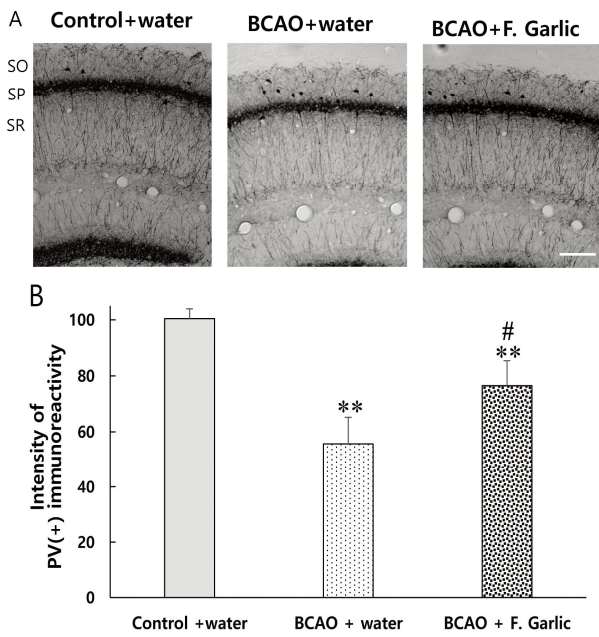


Fig. 7. Changes in PV(+) immunoreactivity in hippocampal region of 3 experimental groups. A. Representative sections of PV(+) immunostaining in hippocampal sections. B. The bar charts depicting changes in densitometric quantification of PV(+) immunoreactivities in the SR layer of hippocampus CA1 subfields. Values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 5 rats per group). Other notations are the same as previous figures. SO, stratum oriens; SP, stratum pyramidale; SR, stratum radiatum Scale bar: 100mm.

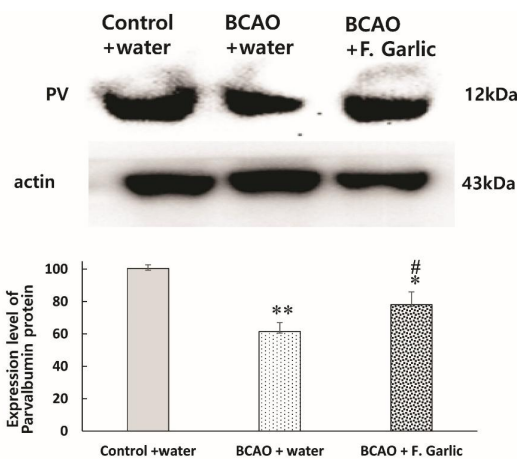


Fig 8. Western blot analysis of parvalbumin (PV) protein expression in the hippocampus of three experimental group. Other notations are the same as previous figures.

## 고찰

흰쥐 BCAA 모델의 뇌기능 장애는 해마 관련 공간 및 비 공간 기억력의 감소가 전형적인 증상으로 인간에서 만성 대뇌 저혈류 장애에 의한 임상 양상과 매우 흡사하여 흰쥐의 BCAA 모델은 만성 대뇌 저혈류 장애의 병태생리를 이해하고, 열공성 뇌경색 및 혈관성 치매의 잠재적 치료제로 사용될 수 있는 약물의 작용기전을 규명하는데 유용하다<sup>2)</sup>. BCAA 흰쥐모델의 뇌 혈류량이 양측 경동맥 결찰 3일 후까지 정상 값의 50% 이하로 감소되고 이후 4주 이상 낮게 유지되는데, 특히 모세혈관이 덜 발달된 해마 CA1 영역에서 저혈류 상태가 더욱 심하다. CA1 영역의 저혈류 상태는 ATP 생성이 감소되고 신경세포에서 산화성 스트레스 손상이 진행되어 BCAA 1주째부터 해마 CA1 영역에서 신경세포의 사멸과 관련된 병태조직학적 변화가 관찰되고, 4주 이내에 신경세포의 손상이 지속된다<sup>2)</sup>. 따라서 본 연구에서 BCAA 4주째에 조직학적 연구에서 해마 CA1 영역의 피라미드세포층에서 조직염색상 핵의 형태학적 변화, 즉 세포 손상이 관찰된 것은 선행연구와 일치하였다.

본 연구결과에서 BCAA 흰쥐 모델에 마늘 발효추출물 (150 ppm)을 1회 경구 투여로 10분부터 뇌혈류가 증가하였으며, 30분에 최대로 증가하였고 이후 감소하면서 투여 1시간이내에 정상으로 회복되었다. 선행연구<sup>10)</sup>에서 마늘 발효추출물을 대뇌 피질에 직접 투여하였을 때 30분이내로 최대로 증가하였다. 흰쥐를 대상으로 양측 경동맥과 추골동맥을 일시적으로 폐쇄하여 일과성 뇌 허혈손상을 유발한 다음 혈관내피세포에서 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성을 촉진하는

agmatine 약물을 투여하면 해마 CA1 영역의 피라미드세포의 사멸을 유의하게 감소시켰으며, eNOS 단백질은 증가시키고 iNOS 단백질 발현은 억제하였다<sup>11)</sup>.

야채에 존재하는 질산염(nitrate, NO<sub>3</sub>)을 섭취하면 구강 미생물의 nitrate reductase에 의해 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>으로 환원되고 다시 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>은 위에서 염산에 의해 환원되어 산화질소가 된다. 또한 혈액에 흡수된 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>은 헤모글로빈, 항산화제, 폴리브덴 함유 효소 등에 의하여 산화질소로 전환될 수 있다<sup>12)</sup>. 이러한 질산염-아질산이온-산화질소(nitrate-nitrite-nitric oxide) 합성 경로는 신체에 산화질소의 새로운 합성경로로 간주되고 있다. 신체에서 NO 생성을 촉진하고 NO 가용성을 증가시키는 nitrate가 많이 함유된 비트 주스를 노령인들이 섭취 하였을 때 뇌혈류가 전반에 증가되지 않고 뇌전두엽 및 대상피질(cingulate cortex)에서 선택적으로 증가되고 인지 수행능력이 향상되었다<sup>14)</sup>. 본 연구에서 사용된 마늘 발효 추출물은 고초균을 이용하여 마늘을 액상 발효하는 과정에서 NO 대사체인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>이 생성되고 장시간 액상상태로 유지될 수 있는 안정화된 NO 대사체를 가지고 있으며, 이 마늘 발효추출물은 인체에서 NO를 생성할 수 있음을 제시하였다<sup>7)</sup>.

공간인지 및 기억력을 검사하는 y-maze와 본능적 회피에 대한 학습과 기억을 측정하는 수동회피 검사는 해마, 편도체, 및 내후각 피질 간 신경망의 신경가소성이 중요하다<sup>14)</sup>. 수동회피 검사의 잠복기 시간과 y-maze 검사의 변경 행동력 점수(spontaneous alteration %)에서 대조군과 비교하여 BCAA+water 군, BCAA+F-Garlic 군 모두 유의하게 감소하였으나 BCAA+F-Garlic 군이 BCAA+water 군 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 만성 대뇌 저혈류에 의해 수동회피 기억력 및 공간 인지 기억력의 감소가 있으며, 마늘 발효추출물의 투여가 수동회피 기억력 감퇴를 억제하는 효과를 가지고 있음을 보여주었다. 이러한 연구결과는 Xiong 등 (2006)<sup>15)</sup>이 BCAA 3주 후에 해마의 공간기억력 감소가 CA1 영역의 신경세포 손상과 같이 나타남을 보고하였으며, 수동회피 기억력의 저하를 보인 본 연구와 일치였다

수동회피 및 공간인지 기억과정에서 해마의 CA1 영역에서 fEPSPs의 지속적 증가가 유지되는 LTP 유사 현상이 관찰됨으로써 LTP 현상은 해마 영역에서 기억형성에 대한 신경가소성에 대한 전기생리학적 지표로 간주되고 있다<sup>16)</sup>. 뿐만 아니라 해마에서 LTP 발생 동안 나타나는 분자생물학적 현상들이 수동회피 검사에 의해서도 나타난다<sup>17)</sup>. 본 연구에서 각 실험군의 LTP 발생 정도를 통계적으로 분석하였을 때 대조군+water 군 비교하여 BCAA+water 군과 BCAA+F-Garlic 군의 LTP 발생 정도는 유의한 차이가(p<0.01) 있으나, BCAA+F-Garlic 군과 BCAA+water 군의 LTP 발생과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를(p<0.05)를 보였다. 선행연구들에서 BCAA을 유발하지 않은 실험군과 비교하여 BCAA 후 4주째에 CA1 영역에서 LTP는 40% - 77% 감소를 보였다<sup>18)</sup>. 본 연구의 결과는 BCAA 초기단계에서 CA1 영역의 LTP 감소 정도가 선행결과와 유사하다. 이러한 결과들을 종합하면 BCAA 초기단계에서 해마 CA1 영역의 신경가소성의 장애가 현저하게 진행되고 마늘 발효추출물의 섭취가 만성 저혈류성에 의한 해마 신경망의 기억과 관련된 신경 가소성의 형성장애를 감소시키는 효과가 있는 것으로 사료된다. 해마절편에서 NO 공여자 및 8-Br-cGMP를 처리하였을 때 약한 전기자극에 의하여 시냅스 전위의 크기가 장시간 증가되고 LTP 현상이 더욱 더 증가되었다. 그러나 NO 합성 효소(NOS) 억제제를 처리하면 시냅스 전위의 진폭이 감소하였다. Glutamate 수용체 길항제를 NO 공여자와 같이 투여하였을 때 LTP 현상이 관찰되지 않음으로써 NO의 LTP 강화현상은 흥분성 시냅스 신호전달계와 관련이 있었다<sup>19)</sup>.

최근 Nelissen등(2022)<sup>20)</sup>에 의하면 soluble guanylate cyclase (sGC) 자극제인 vericiguat 및 BAY-7을 노령 생쥐에 경구투여 하였을 때 혈압은 감소하나 뇌혈류량은 변화하지 않은 것을 보고하였다. 그러나 개체위치검사(object location test, OLT)에서 인지기억은 증가되었으며 해마절편에서도 LTP 현상이 증가되었다. 또한 해마에서 NMDA 수용체 단백질 발현량을 증가시킴으로써 뇌혈류와 무관하게 해마 내 신경세포의 신호전달계에 관여할 수 있음을 암시하였다. 더불어 중추신경계에 선택적으로 투과되는 sGC 흥분제인 CY6463에 대한 실험동물 연구에서 vericiguat와 유사하게

혈압은 감소되었고, 행동학적으로 인지 및 기억력이 향상되었으며, 해마 및 노령 쥐의 해마에서 신경세포의 수상가지돌기(dendrite spine)의 상실을 감소시켰고, 헌팅턴 질환 동물모델에서 LTP 현상을 증가시켰다<sup>21)</sup>. 이상의 선행연구결과들과 본 연구결과를 고려하였을 때 BCAA 모델에서 NO 대사체가 함유된 마늘 발효추출물이 신경세포 내 NO 신호전달계를 조절하여 기억력 감소와 신경가소성 장애를 억제할 수 있을 것으로 사료되며 추후 이와 관련된 기전연구가 필요해 보인다.

Parvalbumin (PV) 단백질은 대뇌 피질 및 해마의 억제성 중간 뉴런의 단백질 표지자로 인식되며, PV 양성 중간 뉴런은 전기생리학적으로 자발흥분성이 높아 에너지 소모가 많다. 평소 PV 양성 뉴런은 ATP 생성을 위해 미토콘드리아는 크기가 크고, 에너지 대사에 매우 중요한 cytochrome c oxidase의 활성이 높다. 저산소증과 같은 병태생리적 상황에서 PV 양성 뉴런이 미토콘드리아에서 ROS의 발생량을 현저하게 증가시키고, PV 뉴런의 손실을 초래할 수 있다<sup>22)</sup>. 많은 선행연구들에서 일과성 허혈 흰쥐 모델, 알츠하이머 질환, 혈관성 치매, 노화 및 경련 실험모델에서도 대뇌 피질 및 해마에서 PV 양성 뉴런의 수가 유의하게 감소하였다. 본 연구와 유사한 양측 경동맥 결찰에 의한 만성 저혈류성 허혈성 모델의 해마 CA1에서 경동맥 결찰 4주- 8주사이에 PV 면역양성 뉴런과 NPY 면역 양성 뉴런의 수가 유의하게 감소하였다. 본 연구에서 면역염색조직화학검사와 Western blot 검사를 이용하여 각 실험군의 해마에서 PV 단백질에 대한 발현량을 비교 분석하였는데 대조군의 PV 단백질 발현량(100%)과 비교하여 BCAA+water 군의 PV 단백질 발현량은 유의하게 감소하였으며 BCAA+F-Garlic 실험군의 발현량은 BCAA+water 군의 PV 단백질 발현량과 비교하여 유의하게 증가하였다. Lee 등(2017)<sup>23)</sup>은 배양된 H9c2 심장세포에서 본 연구와 같은 마늘 발효추출물이 허혈/재관류 손상에 의한 세포사망이 감소함을 보고하였다. 뇌 허혈-재관류손상 모델에서 NaNO<sub>2</sub>가 뇌경색에 의한 뇌 손상을 억제하였으며, 허혈 주변부에서 혈류증가 산화성 스트레스 억제를 유도하였는데, carboxy-PTIO인 NO 제거제를 투여한 결과 이러한 현상은 관찰되지 않았다. 따라서 NaNO<sub>2</sub>의 허혈-재관류 손상억제 효과는 혈관에서 eNOS 효소를 활성화시켜 NO 형성에 기인하는 것으로 알려져 있다<sup>24)</sup>. 최근 적정량의 아질산염 및 질산염의 섭취가 다양한 질환을 호전시킬 수 있으며, 급성 심정지 실험모델에서 수명을 연장시킬 수 있고, 심장 및 뇌에서 허혈-재관류 손상 모델에서 산화질소를 생성하여 산화성 손상을 억제하여 세포손상을 억제하여, 장기혈류를 증가시키는 것으로 보고되었다<sup>25)</sup>. 따라서 이상의 선행 연구결과들을 고려하였을 때 발효마늘에 함유된 다양한 유효성분들이 BCAA에 의한 PV 양성 중간 뉴런의 산화성 손상을 억제할 수 있을 것으로 사료되고 NO 대사체의 뇌 혈류증가와 항허혈 효과들이 시너지 효과를 보일 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 산화질소 대사체를 함유한 마늘 발효추출물을 이용하여 혈관성 치매 흰쥐모델에서 기억력 및 신경가소성 장애에 대한 효과를 확인하고자 하였다. 마늘 발효추출물의 일과성 투여는 해마 영역에서 기억형성이 저하된 혈관성 치매 흰쥐모델에서 인지기능을 향상시켰으며, 해마 CA1 영역의 신경 가소성의 형성장애를 감소시켰다. 또한 억제성 중간 뉴런의 단백질표지자인 parvalbumin 단백질은 해마의 CA1 영역 중 피라미드층에서 현저히 감소하였다. 이와 같은 결과는 마늘 발효추출물의 일과성 경구 투여가 만성 대뇌 관류저하 흰쥐 모델에서 해마의 신경가소성과 중간뉴런 온전성을 보존함으로써 인지 기억 결핍이 개선될 수 있음을 제시해 주고 있다.

## 감사의 글

이 논문은 2021년도 완주군 지역자원특화사업단의 지원을 받아 수행된 향토산업육성사업임

## References

1. Tsuda Y, Yamada K, Hayakawa T, Ayada Y, Kawasaki

S, Matsuo H. Cortical blood flow and cognition after extracranial-intracranial bypass in a patient with severe carotid occlusive lesions. A three-year follow-up study. *Acta neurochirurgica*. 1994;129(3-4):198-204.

2. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain research reviews*. 2007;54(1):162-80.

3. Bryan NS. Nitric oxide enhancement strategies. *Future science OA*. 2015;1(1):Fso48.

4. Amdahl MB, DeMartino AW. Inorganic nitrite bioactivation and role in physiological signaling and therapeutics. 2019;401(1):201-11.

5. Son O, Seo BI, Lee SH, Park SJ. The Study of DNA markers to identify of *Allium sativum* L. *Kor J Herbology*. 2014;29:7.

6. Ginter E, Simko V. Garlic (*Allium sativum* L.) and cardiovascular diseases. *Bratislavske lekarske listy*. 2010;111(8):452-6.

7. Chun HS. Manufacturing method of fermented garlic composition and the fermented garlic composition thereof. IPC A23L 1/212 C12P 1/04, AN 1020140048259, 2014. 4.22, Republic of Korea. 2014.

8. Baluchnejadmojarad T, Kiasalari Z, Afshin-Majd S, Ghasemi Z, Roghani M. S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. *European journal of pharmacology*. 2017;794:69-76.

9. Park BM, Cha SA, Kim HY, Kang DK, Yua K, Chun H, et al. Fermented garlic extract decreases blood pressure through nitrite and sGC-cGMP-PKG pathway in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*. 2016;22:10.

10. Yu H, Rong ZX, Koo H, Chun HS, Yoo SJ, Kim MS. Changes in Cerebral Blood flow Following Fermented Garlic Extract Solution with High Content of Nitrite. *The Physiological Society of Korean Medicine and The Society of Pathology in Korean Medicine* 2020:8.

11. Mun CH, Lee WT, Park KA, Lee JE. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anatomy & cell biology*. 2010;43(3):230-40.

12. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, et al. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nature chemical biology*. 2005;1(5):290-7.

13. Wightman EL, Haskell-Ramsay CF, Thompson KG, Blackwell JR, Winyard PG, Forster J, et al. Dietary nitrate modulates cerebral blood flow parameters and cognitive performance in humans: A double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Physiology & Behavior*. 2015;149:149-58.

14. Cimadevilla JM, Mendez-Lopez M, Mendez M, Arias JL. Interhippocampal transfer in passive avoidance task modifies metabolic activity in limbic structures. *Hippocampus*. 2011;21(1):48-55.

15. Xiong Z, Liu C, Wang F, Li C, Wang W, Wang J, et al. Protective effects of breviscapine on ischemic vascular dementia in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(9):1880-5.

16. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus.

- Science (New York, NY). 2006;313(5790):1093-7.
17. Kim DH, Kim JM, Park SJ, Lee S, Shin CY, Cheong JH, et al. Hippocampal extracellular signal-regulated kinase signaling has a role in passive avoidance memory retrieval induced by GABAA Receptor modulation in mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2012;37(5):1234-44.
  18. Luo P, Lu Y, Li C, Zhou M, Chen C, Lu Q, et al. Long-lasting spatial learning and memory impairments caused by chronic cerebral hypoperfusion associate with a dynamic change of HCN1/HCN2 expression in hippocampal CA1 region. *Neurobiology of learning and memory*. 2015;123:72-83.
  19. Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*. 1994;368(6472):635-9.
  20. Nelissen E, Possemis N, Van Goethem NP, Schepers M, Mulder-Jongen DAJ, Dietz L, et al. The sGC stimulator BAY-747 and activator runcaciguat can enhance memory in vivo via differential hippocampal plasticity mechanisms. *Scientific reports*. 2022;12(1):3589.
  21. Correia SS, Iyengar RR, Germano P, Tang K, Bernier SG, Schwartzkopf CD, et al. The CNS-Penetrant Soluble Guanylate Cyclase Stimulator CY6463 Reveals its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in pharmacology*. 2021;12:656561.
  22. Zhang H, Sun XR, Wang J, Zhang ZZ, Zhao HT, Li HH, et al. Reactive Oxygen Species-mediated Loss of Phenotype of Parvalbumin Interneurons Contributes to Long-term Cognitive Impairments After Repeated Neonatal Ketamine Exposures. *Neurotoxicity research*. 2016;30(4):593-605.
  23. Lee YJ, Lee D, Shin SM, Lee JS, Chun HS, Quan FS, et al. Potential protective effects of fermented garlic extract on myocardial ischemia-reperfusion injury utilizing in vitro and ex vivo models. *Journal of Functional Foods*. 2017;33:8.
  24. Carlstrom M, Montenegro MF. Therapeutic value of stimulating the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway to attenuate oxidative stress and restore nitric oxide bioavailability in cardiorenal disease. 2019;285(1):2-18.
  25. Dezfulian C, Kenny E, Lamade A, Misse A, Krehel N, St Croix C, et al. Mechanistic characterization of nitrite-mediated neuroprotection after experimental cardiac arrest. *J Neurochem*. 2016;139(3):419-31.