



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

SH-SY5Y 배양 세포에서 케톤체의
신경세포 보호 기능

Neuroprotection by Ketone Body in SH-SY5Y Cells

울산대학교 대학원

의과학과

박수지

SH-SY5Y 배양 세포에서 케톤체의 신경세포 보호 기능

지도교수 이 주 영

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2021 년 02 월

울산대학교 대학원

의 과 학 과

박수지

박수지의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 황 은 유 (인)

심사위원 김 승 환 (인)

심사위원 이 주 영 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2021 년 02 월

감사의 글

대학원에 입학하면서 어려운 시간들이 있었지만 논문을 마칠 수 있도록 많은 격려와 도움을 주신 분들께 감사한 마음을 전하고자 합니다.

뇌과학을 공부하고 싶어 찾아간 연구실에서 아낌없는 가르침을 주신 이주영 교수님께 감사의 뜻을 전합니다. 연구하면서 겪는 어려움을 항상 헤아려주시고 도움을 주신 덕분에 연구에 즐거움을 느낄 수 있었습니다. 그리고 교수님의 학문적 가르침뿐 아니라 말씀하신 과학자로서의 소양과 마음가짐은 앞으로 연구자의 길을 걷게 될 제 삶에 기반이 될 것입니다. 정말 감사드립니다.

바쁘신 중에도 졸업 논문에 많은 관심을 주신 황운유 교수님과 김승환 교수님께 감사드립니다. 따뜻한 격려와 조언을 해주시고 연구자로서 세밀한 관찰력이 중요함을 알려주신 황운유 교수님께 감사한 마음을 전합니다. 논문을 세심하게 살펴보시며 연구의 방향과 더 나아가 그것이 갖는 의미를 스스로 생각할 수 있도록 진심어린 조언을 해주신 김승환 교수님께도 감사드립니다.

연구실 생활을 하는 동안 곁에서 응원해주고 즐겁게 연구할 수 있도록 도움을 준 최은하에게 고마움을 전하며 여러 연구실 선생님들께도 감사의 인사를 전합니다.

마지막으로 늘 변함없이 저를 믿고 아낌없이 응원해주시는 부모님께 감사드립니다. 공부할 수 있다는 것이 가장 큰 행복이라는 부모님의 격려가 있었기에 어려운 상황도 지혜롭게 이겨낼 수 있었습니다. 그리고 곁에서 묵묵히 지지해주는 동생에게도 고마움을 전합니다.

많은 분들의 관심과 도움으로 석사 졸업을 할 수 있었습니다. 평생 잊지 못할 것이며 앞으로 더 큰 발전을 할 수 있도록 노력하겠습니다. 감사합니다.

국문요약

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 뇌 안에 과량의 amyloid- β ($A\beta$)가 응집된 것이 특징인 퇴행성 뇌신경질환으로, 산화 스트레스(oxidative stress)나 흥분 독성(excitotoxicity) 등이 촉진되어 신경계 손상이 일어나 유발되는 것으로 알려졌다. 뇌는 굶주림(starvation) 등의 비상 상황에서 포도당(glucose) 대신 케톤체(ketone bodies)인 아세토아세트산(acetoacetate, AcAc)와 베타-하이드록시부틸산(β -hydroxybutyrate, B-HB)을 사용하여 빠르게 필요한 에너지를 생성할 수 있다. 이 연구에서는 여러 신경독성에 대해 케톤체가 신경보호 능력(neuroprotection)을 갖는지 조사하였다. 신경독성물질(neurotoxin)인 H_2O_2 , NaN_3 , hypoxia, $ZnCl_2$, kainic acid (KA), 혹은 $A\beta_{42}$ 에 노출된 사람 신경모세포종(neuroblastoma) 유래 SH-SY5Y 세포에 AcAc나 B-HB를 처리한 후 MTS 분석, 또는 CellTiter-glo 분석으로 세포 생존율을 측정하였다. 이와 별개로, 동일한 방법으로 케톤체와 독성물질을 처리한 세포를 Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)로 염색하여 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과를 평가하였다. 그 결과 특정 농도 범위 내의 AcAc 또는 B-HB를 처리한 세포는 독성물질만 처리한 세포보다 생존율이 증가하였다. AcAc (25 mM)는 H_2O_2 에 의한 세포 죽음을 효과적으로 억제하였고, NaN_3 에 대해선 B-HB (50 mM)가, hypoxia에 대해선 AcAc (100 mM)와 B-HB (50 mM), $ZnCl_2$ 에 대해선 AcAc (4 mM), kainic acid (KA)에 대해선 AcAc (10 mM)와 B-HB (10 mM), 마지막으로 $A\beta_{42}$ 에 대해선 AcAc (2 mM)와 B-HB (2 mM)가 세포 사멸을 억제하였다. Hoechst 33342와 PI로 염색한 결과 AcAc 또는 B-HB를 처리한 세포에서 독성물질 단독 처리군에 비해 PI로 염색된 죽은 세포가 줄어들었다. 이러한 결과는 케톤체 AcAc와 B-HB가 신경독성으로부터 세포를 보호할 수 있는 효능을 갖고 있어, 케톤체가 알츠하이머병 등 퇴행성 뇌신경질환의 예방과 치료제로 개발 가능성이 있음을 의미한다.

중심어: 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 아밀로이드-베타(amyloid- β , $A\beta$), 산화 스트레스(oxidative stress), 흥분 독성(excitotoxicity), 케톤체(ketone body), 아세토아세트산(acetoacetate), 베타-하이드록시부틸산(β -hydroxybutyrate), 피루브산(pyruvate), 신경보호(neuroprotection)

차례

국문요약	i
그림 목록	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
III. 결과	8
IV. 결론	22
V. 참고문헌	28
Abstract	36

그림 목록

Figure 1A. Ketone bodies	3
Figure 1B. Metabolic pathways of ketone bodies	3
Figure 2. Experimental procedure	7
Figure 3. Acetoacetate (AcAc) or β-hydroxybutyrate (B-HB) increases the cell viability in SH-SY5Y cells	9
Figure 4. Neuroprotection by AcAc or B-HB against oxidative stress in SH-SY5Y cells	11
Figure 5. Neuroprotection by AcAc or B-HB against NaN_3-induced cell death in SH-SY5Y cells	13
Figure 6. Neuroprotection by AcAc or B-HB against hypoxic damage in SH-SY5Y cells	15
Figure 7. Neuroprotection by AcAc or B-HB against ZnCl_2-induced cell death in SH-SY5Y cells	17
Figure 8. Neuroprotection by AcAc or B-HB against Kainic acid (KA)-induced cell death in SH-SY5Y cells	19
Figure 9. Neuroprotection by AcAc or B-HB against $\text{A}\beta_{42}$-induced cell death in SH-SY5Y cells	21

I . 서론

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 인지, 기억 장애가 나타나는 노인성 치매의 대표 질환으로 전체 노인성 치매의 70% 이상을 차지하는 퇴행성 뇌신경 질환이다.¹⁻³⁾ 알츠하이머병은 뇌에 다량 축적된, 비정상적 변형 단백질인 베타-아밀로이드($\text{amyloid-}\beta$, $\text{A}\beta$)가 신경세포를 손상시켜 발생하는데⁴⁾, 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 인한 산화 스트레스(oxidative stress), ATP 생산 저해, 또는 신경계 과잉 활성화로 인한 흥분 독성(excitotoxicity) 등이 관여한다고 알려졌다.⁵⁻⁸⁾ 그러나 알츠하이머병의 정확한 발병 기전은 여전히 불분명하고 치료제 개발도 더디게 이뤄지는 중이다.

최근 고혈압, 당뇨와 같은 대사증후군(metabolic syndrome) 환자에게 알츠하이머병을 비롯한 치매 질환이 발생할 위험이 높다는 역학적 연구가 보고되었다.⁹⁾ 이는 뇌 안의 에너지 대사 기능 저하나 교란이 알츠하이머병 등 치매 발병에 연관됨을 암시한다.¹⁰⁾

뇌는 기본적으로 포도당(glucose)을 이용한 에너지 대사를 통해 필요한 에너지 ATP를 얻는다. 세포에 흡수된 포도당이 해당과정(glycolysis)을 거쳐 피르부산(pyruvate)으로 전환되고, 이것이 미토콘드리아의 시트르산 회로(citric acid cycle)와 전자전달계(electron transport chain, ETC)를 거쳐 ATP가 생성된다. 그런데 오랫동안 굶주리거나 과도한 운동, 또는 저탄수화물(low carbohydrate) 함유 식단 등으로 인해 뇌세포 내 포도당이 고갈되면 뇌는 긴급하게 다른 대체 에너지원(alternative energy sources)을 이용하여 ATP를 얻는다.¹¹⁾

케톤체(ketone bodies)는 이러한 대체 에너지원의 일종으로, 케톤기(R1-C=O-R2)를 갖는 단일 카르복실산 화합물(monocarboxylates)이다.¹¹⁾ 뇌에 포도당이 부족하면 간세포(hepatocytes)는 지방산(fatty acids)을 분해하여 아세토아세트산(acetoacetate, AcAc)을 생성한다. AcAc는 여러 효소에 의해 베타-하이드록시부틸산(β -hydroxybutyrate, B-HB)과 아세톤(acetone)으로 변형되는데, AcAc와 B-HB, 그리고 acetone을 케톤체라고 한다(Fig. 1A). 이 중 아세톤은 휘발성이 강해 폐로 방출되지만 AcAc와 B-HB는 혈액에 녹아 뇌로 전달된다.¹²⁾ 뇌혈관을 따라 운반된 AcAc와 B-HB가 신경세포의 단일 카르복실산 수송체(monocarboxylic acid

transporters, MCTs)에 의해 신경세포 내로 이동하고, 미토콘드리아 피루브산 수송체(mitochondrial pyruvate carriers, MPCs)를 통해 미토콘드리아 안으로 운반된다. 이 후 B-HB는 β -hydroxybutyrate dehydrogenase(B-HBDH)에 의해 AcAc로 전환되고, AcAc는 일련의 과정을 거쳐 acetyl-CoA로 되어 시트르산 회로에 합류한 후 에너지 대사 과정을 거쳐 최종적으로 ATP가 생산된다(Fig. 1B).¹²⁾ 신경세포는 포도당을 이용하여 직접 ATP를 생산하기도 하지만 주변의 성상세포(astrocytes)로부터 피루브산을 얻거나, 앞서 언급한 MCTs를 통해 케톤체를 공급받아 ATP를 생성하는데, 이러한 과정이 해당과정(glycolysis) 경우 포도당 대사에 비해 에너지 대사 효율이 훨씬 높다고 알려졌다.^{12, 13)}

세포(in vitro)와 동물(in vivo)을 이용한 연구에서 퇴행성 뇌신경 질환과 관련해 피루브산의 탁월한 신경세포 보호 능력이 널리 알려졌다. 여러 연구에 따르면 알츠하이머병 동물 모델에서 피루브산이 인지 기능과 행동 장애를 개선하였으며¹⁴⁾, 세포 모델에서도 피루브산에 의해 각종 신경독성으로 인한 신경세포 죽음이 억제되는 것을 확인하였다.^{15, 16)} 피루브산($\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H}$)은 화학적으로 케톤기를 갖는 단일 카르복실산 유기화합물이므로 유사한 구조인 단일 카르복실산 유기화합물 케톤체도 산화 스트레스나 비정상적 단백질로 인한 신경세포의 사멸을 억제할 수 있을 것이라 기대한다.¹⁷⁻²¹⁾

따라서 이 연구에서는 알츠하이머병의 다양한 발병 기전 중 활성산소종, 에너지 대사 교란, 흥분독성 유도 화합물, 아연(zinc), 베타-아밀로이드(amyloid- β , A β) 등 신경독성에 대한 케톤체의 억제 능력, 즉 신경보호(neuroprotection) 효능을 사람 신경모세포종(neuroblastoma) 유래 SH-SY5Y 세포에서 확인하였다.

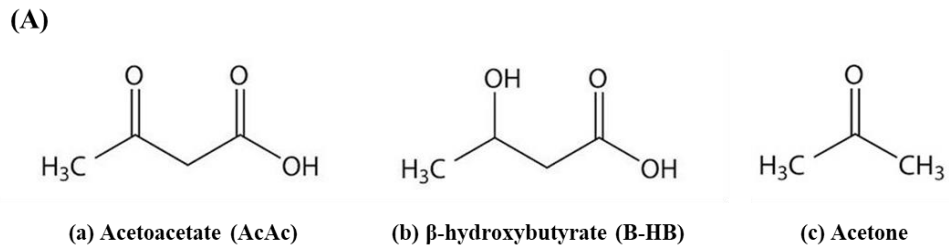


Fig. 1A. Ketone bodies

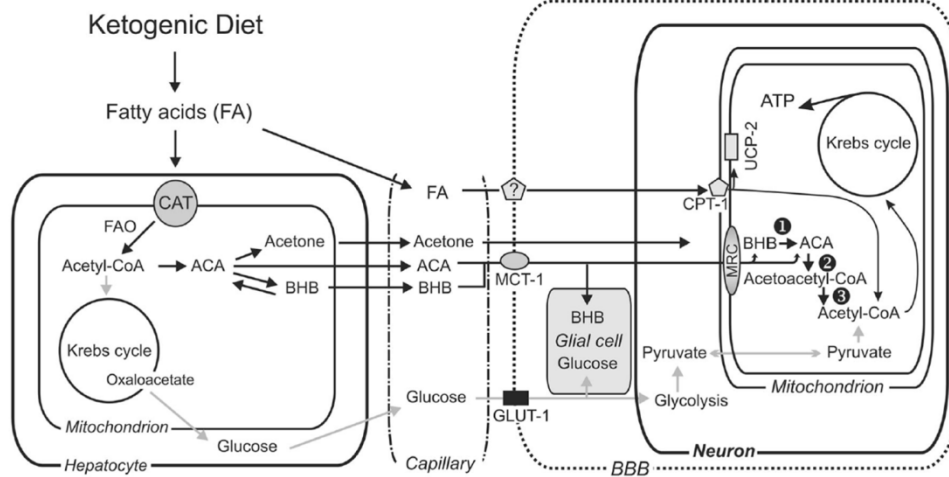


Fig. 1B. Metabolic pathways of ketone bodies (Simeone et al, 2017)

II. 재료 및 방법

1. 시약

케톤체 화합물 lithium acetoacetate (AcAc), sodium-DL-3-hydroxybutyrate (B-HB)는 TCI (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA (0.25%), hydrogen peroxide (H_2O_2), sodium azide (NaN_3), zinc chloride ($ZnCl_2$), Hoechst 33342 (trihydrochloride, trihydrate), propidium iodide, sodium pyruvate (SPY)는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Kainic acid (KA)는 Tocris (Bristol, UK), amyloid- β (1-42) (HFIP-treated)는 Bachem (Bubendorf, Switzerland)에서 구입하였다. 세포생존을 측정에 사용된 MTS 시약과 CellTiter-glo 시약은 각각 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent와 CellTiter-Glo[®] Luminescent Reagent를 사용하였고, 모두 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 실험

1) 세포배양

이 연구에서는 사람의 신경모세포종(neuroblastoma)에서 유래한 SH-SY5Y 세포를 사용했다. SH-SY5Y 세포는 37°C, 5% CO_2 에서 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 units/mL streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였으며, 이틀마다 Trypsin-EDTA를 이용하여 계대 배양하였다.

2) 약물 처리 및 세포 생존율 측정 (Fig. 2)

AcAc 및 B-HB의 세포독성 정도를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 밀도로 옮기고 24시간동안 배양한 후 AcAc나 B-HB를 세포에 각각 1-100 mM 농도로 처리하였다. 다시 24시간 후 MTS 시약을 2시간 동안 처리하고 microplate reader (Bio-Tek, Winooski, UT, USA)를 이용, 490 nm 파장에서 흡광도를 측정해 세포 생존율을 평가했다.

세포독성을 유도하기 위해 SH-SY5Y 세포에 H_2O_2 , NaN_3 , $ZnCl_2$, KA, 또는 $A\beta_{42}$ 를 처리하였고, 이들 독성물질에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과를 확인하

기 위하여 AcAc 또는 B-HB를 동시에 세포에 처리하여 8-24시간동안 배양하였다.

저산소증(hypoxia)으로 인한 세포 죽음을 AcAc나 B-HB가 억제할 수 있는지 알아보기 위해 SH-SY5Y 세포에 AcAc, B-HB를 처리하고 1% 농도로 산소가 유지되는 VS-2050C0 CO₂/O₂ incubator (VISION SCIENTIFIC, Daejeon, Korea)에서 8시간 배양하였다. 대조군은 AcAc나 B-HB를 처리하지 않고 21% 농도로 산소가 유지되는 incubator에서 동일 시간 동안 배양하였다.

별도의 대조 시험을 위해 각 독성물질에 대한 SPY (10 mM)의 세포 보호 효능을 AcAc와 B-HB의 세포보호 효능과 비교하였다.

MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소의 활성에 의해 MTS가 비수용성의 자주색을 띠는 formazan으로 전환되는 원리를 이용하여 세포의 증식 및 사멸도 변화를 측정하는 방법이다. SH-SY5Y 세포에 8-24시간 동안 AcAc, B-HB 또는 SPY를 처리 후 MTS (5 mg/mL) 용액 20 µL를 각 well에 첨가하고 2시간 동안 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 반응시킨 후 490 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(cell viability)은 대조군 흡광도 대비 실험군 흡광도를 상대치로 환산하고 백분율로서 표시하였다 [Cell Viability = 실험군 / 대조군 × 100 (%)].

CellTiter-glo assay는 luciferin이 ATP에 의해 oxyluciferin으로 산화될 때 발생하는 발광을 측정하는 방법으로, 대사가 활발한 세포에서 발광이 증가한다는 원리를 이용하여 세포의 증식을 측정하는 방법이다. 세포에 산소가 부족할 때 갑자기 고농도의 산소가 유입되면 세포 손상이 일어난다고 알려져 있다. 따라서 저산소증에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과를 확인하는 조건에서는, CellTiter-glo assay로 세포 생존율을 측정하였다. 1% O₂ 조건에서 AcAc, B-HB 또는 SPY를 처리하고 8시간 후에 각 well에 CellTiter-glo reagent 100 µL를 첨가하고 12분동안 상온에서 반응시킨 후 microplate reader로 560 nm 파장에서 발광을 측정하였다. 세포 생존율(cell viability, %)은 대조군의 발광 값 대비 실험군의 발광 값을 상대치로 환산하고 백분율로 표시하였다. [Cell Viability = 실험군 / 대조군 × 100(%)]

3. Hoechst 33342와 propidium iodide (PI) 염색 및 평가

Hoechst 33342는 세포의 핵 내 DNA에 결합하여 청색 형광을 나타내는 것으로 모든 세포를 염색한다. Propidium iodide (PI)도 핵 내의 DNA에 결합하여 형광을 나타내나 살아있는 세포의 막을 투과하지 못해 죽은 세포만 염색하여 빨간 형광을 나타낸다. 위 각종 화합물로 처리한 SH-SY5SY 세포에 Hoechst 33342와 PI (각 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 용액 2 μL 를 처리하고 37°C, 차광 상태에서 15분간 염색하였다. 염색 후 형광현미경(Evos[®] cell imaging system; Thermo Fisher)을 이용하여 각각 DAPI와 RFP 필터에서 관찰하고 100 \times 배율의 사진에서 Image J (NIH, Bethesda, MD, USA)로 염색된 세포의 수를 셸다. 실험군은 대조군과 비교하여 Hoechst 33342 대비 PI로 염색된 세포의 수를 백분율로서 표시하였다.

4. 통계처리

Data는 Student's t-test 또는 Turkey one-way analysis of variance (Turkey-ANOVA)를 사용하여 비교 분석하였다. Data는 최소 3번 이상의 독립적인 실험에서 구해진 평균값 \pm 표준오차로 표현하였다. $P < 0.05$ 일 때 비교 그룹 간 유의적인 차이를 보이는 것으로 판단하였다.

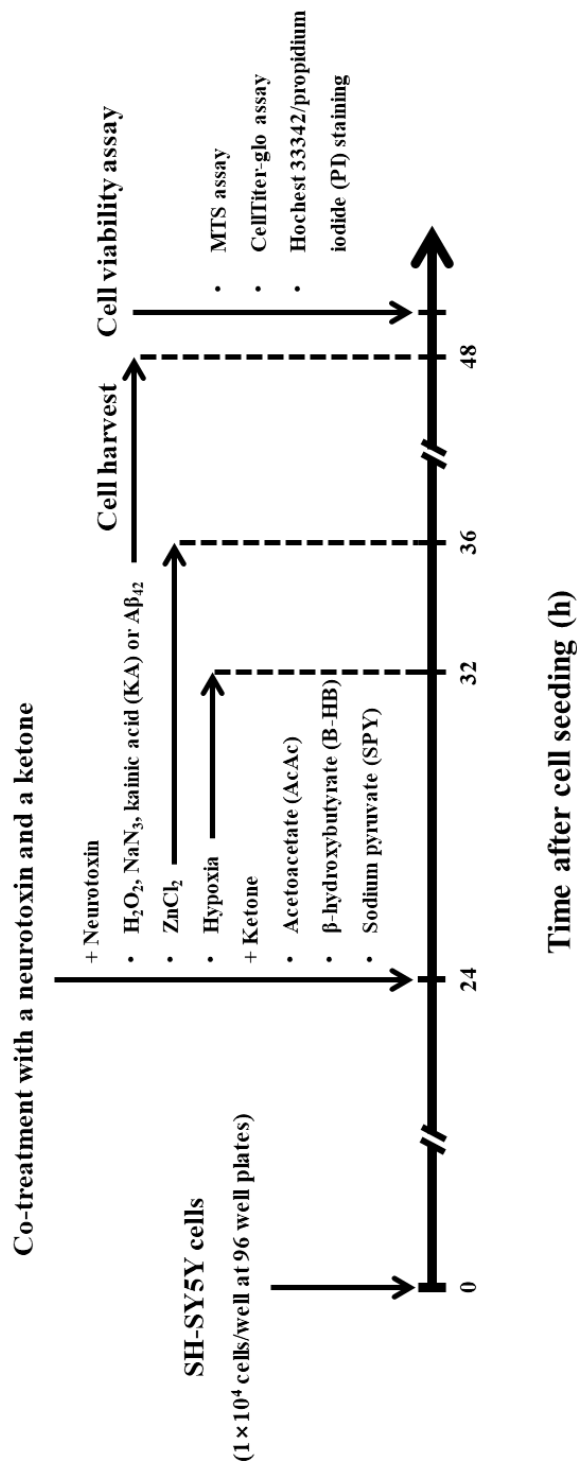


Figure 2. Experimental procedure

SH-SY5Y cells were seeded at density of 1×10^4 cells/well in 96-well culture plates and incubated for 24 hours at $37^\circ C$ in 5% CO_2 incubator. After incubation, the cells were co-treated with a neurotoxin and a ketone (AcAc, B-HB, or SPY), and then the cell viability was evaluated by MTS assay, CellTiter-glo assay, or Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining.

Ⅲ. 결과

1. Acetoacetate (AcAc)와 β -hydroxybutyrate (B-HB)가 SH-SY5Y 세포에 미치는 영향

AcAc 또는 B-HB를 SH-SY5Y 세포에 1-100 mM 농도로 단독 처리하고 세포 생존율의 변화를 관찰하였다. AcAc나 B-HB를 24시간 처리할 때, 처리한 모든 농도에서 생존율이 줄지 않아 이 농도 범위에서 AcAc나 B-HB는 세포독성이 없는 것으로 평가했다. 오히려 AcAc를 처리한 세포는 농도 의존적으로 생존율이 증가하였고(Fig. 3A), B-HB를 처리한 경우 1 mM의 농도에서 생존율이 유의적으로 증가했으며 다른 농도에서도 비록 통계적 유의성은 부족했지만 늘어나는 경향을 보였다(Fig. 3B).

이 결과는 AcAc와 B-HB가 SH-SY5Y 세포에 유해한 독성을 갖지 않고 오히려 세포의 활성화나 생존에 유익하게 기능함을 의미한다.

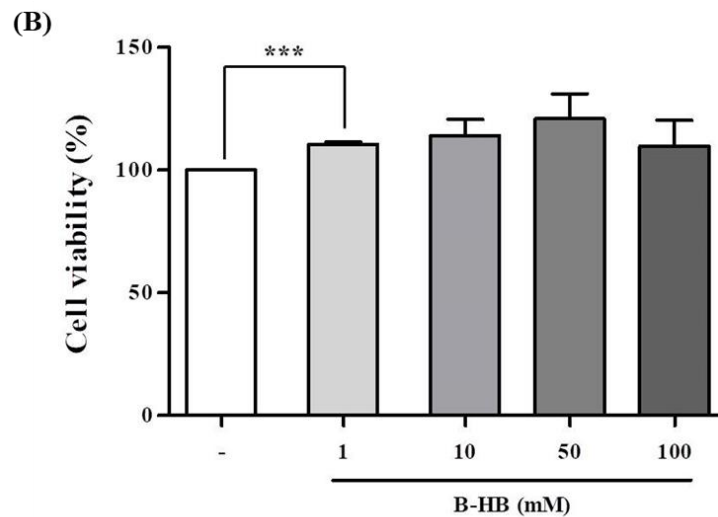
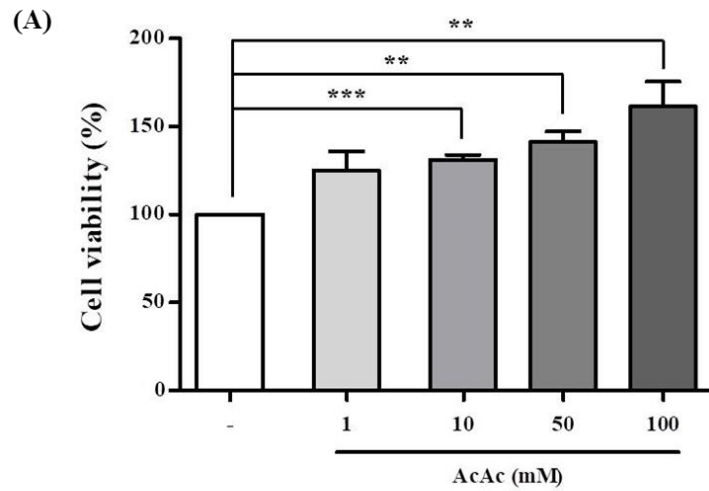


Fig. 3. Acetoacetate (AcAc) or β -hydroxybutyrate (B-HB) increases the cell viability in SH-SY5Y cells.

Twenty four hours after SH-SY5Y cells (1×10^4 cells/well) were incubated in the addition of AcAc (A; as Li-AcAc) or B-HB (B; as Na-B-HB), the cell viability was measured by MTS assay. At the concentrations of 1-100 mM, AcAc showed a concentration-dependent increase in cell viability (A), whereas B-HB did only a small increase (B). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) (n=3). Statistical comparisons between groups were performed using t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$.

2. 산화 스트레스에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과

산화 스트레스에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과를 조사하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 100 μ M H₂O₂를 AcAc (10-100 mM) 또는 B-HB (10-100 mM)와 함께 처리하였고, 양성 대조 실험을 위해 이미 강력한 항산화 작용으로 세포보호 능이 뛰어나다고 알려진 피루브산(sodium pyruvate, SPY) (10 mM)를 100 μ M H₂O₂와 동시에 세포에 처리하였다. 24시간 처리 후 MTS 분석으로 세포 생존율을 측정된 결과, H₂O₂만 처리한 세포는 생존율이 크게 줄었으나(비처리 세포군 대비 49.5 \pm 3.2%; Fig. 4A-B), 25 mM AcAc를 처리한 세포는 생존율이 20.3% 증가하였다 (Fig. 4A). 하지만 B-HB를 처리한 세포에서는 생존율이 그다지 바뀌지 않았고, 오히려 100 mM를 처리한 경우 H₂O₂만 처리한 세포보다 생존율이 감소하였다 (Fig. 4A-B). 반면에 10 mM SPY는 H₂O₂에 의한 세포 죽음을 40.5% 억제하였다 (Fig. 4B).

100 μ M H₂O₂에 노출된 세포에 가장 효과적 사멸 억제를 보이는 농도의 AcAc (25 mM), B-HB (10 mM), 또는 SPY (10 mM) 각각을 동시에 처리하고 24시간 후에 Hoechst 33342와 PI로 세포를 염색하였다. 대조군 세포의 핵은 둥글고 큰 반면에 100 μ M H₂O₂를 처리한 세포는 응축되고 염색체가 분절되었으며 PI로 매우 강하게 형광염색을 띠었다. AcAc (25 mM)나 SPY (10 mM)를 함께 처리한 세포에서는 H₂O₂ 단독 처리군보다 PI로 염색된 세포가 상당히 감소하였고, B-HB (10 mM) 처리군에서는 PI로 염색된 수준이 감소했지만 AcAc (25 mM)나 SPY (10 mM) 처리 세포에 비하면 줄어드는 정도가 매우 약했다(Fig. 4C).

AcAc는 SPY에 비해 산화 스트레스로 인한 SH-SY5Y 세포의 사멸을 억제하는 효능이 약하지만, 특정 범위 농도에서 신경보호 기능을 발휘하는 것으로 보인다. 하지만 산화 스트레스에 대한 B-HB의 SH-SY5Y 세포보호 효과는 나타나지 않았다.

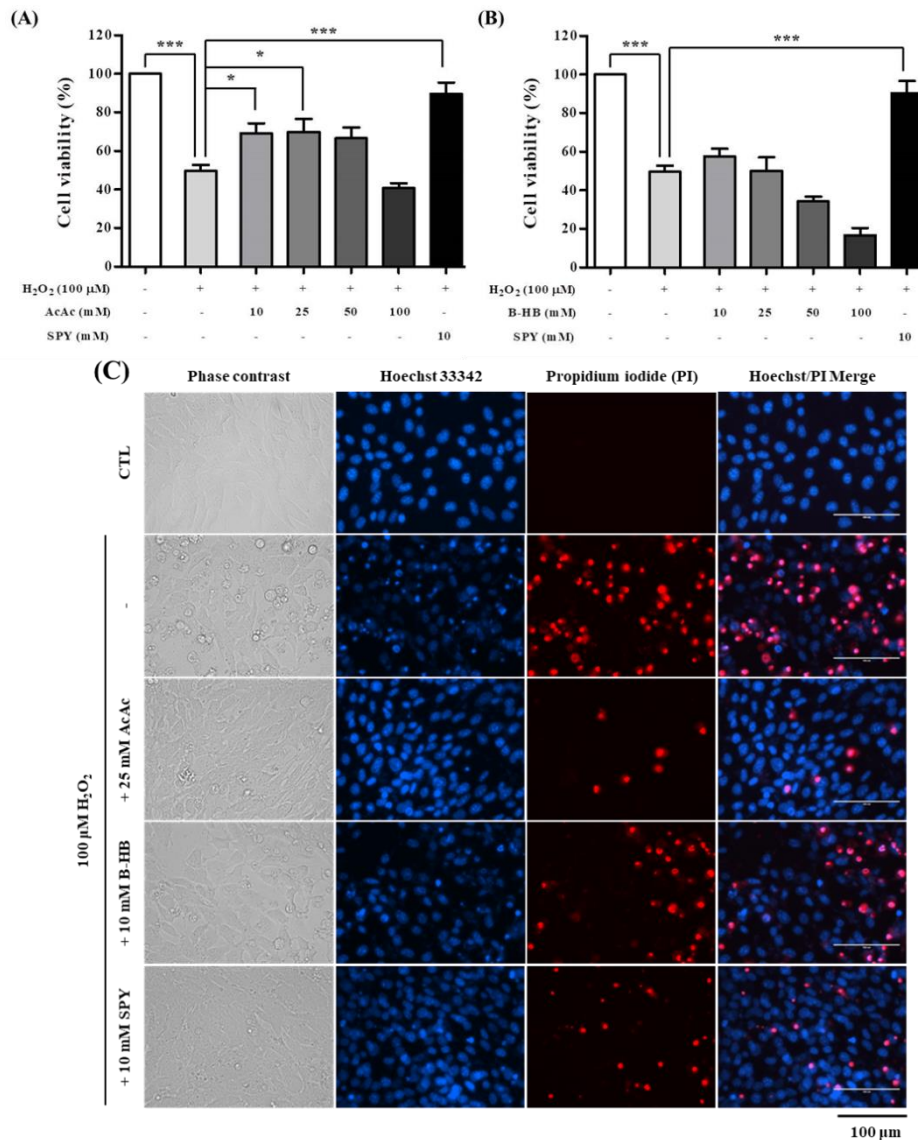


Fig. 4. Neuroprotection by AcAc or B-HB against oxidative stress in SH-SY5Y cells.

While SH-SY5Y cells were exposed to 100 μ M H_2O_2 , AcAc (10-100 mM, as Li-AcAc; A and C), B-HB (10-100 mM, as Na-B-HB; B and C) or pyruvate (SPY; 10 mM as sodium pyruvate; A-C) was treated for 24 hours and then the cell viability was evaluated by MTS assay (A and B) or Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining (C, scale bars = 100 μ m). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) (n=3). Statistical comparisons between groups were performed using Turkey-ANOVA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$.

3. 에너지 대사 저해에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과

미토콘드리아의 에너지 대사를 방해하는 것으로 알려진 아지드화 나트륨(NaN_3)에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과를 검사하기 위해, NaN_3 (3 mM)를 AcAc (10-100 mM) 또는 B-HB (10-100 mM)와 혼합 후 SH-SY5Y 세포에 동시 처리하였다. 그리고 세포호흡을 증가시켜 NaN_3 로 인해 저해된 대사를 회복시키는 것으로 알려진 SPY (10 mM)를 AcAc와 B-HB의 효과에 대한 비교군으로 사용하였다. 24시간 처리 후 MTS 분석으로 세포 생존율을 측정된 결과, NaN_3 단독 처리군은 그렇지 않은 대조군에 비해 세포 생존율이 57.7% 감소하였다(Fig. 5A-B). 하지만 50 mM B-HB를 함께 처리한 세포에서는 71.1%의 생존율이 나타났다(Fig. 5B). 또한 10 mM SPY 처리군에서는 NaN_3 에 의한 세포 죽음을 29.8% 억제하였다(Fig. 5A-B). 그러나 AcAc의 경우 처리한 어떠한 범위에서도 NaN_3 자극에 대한 세포사멸 억제 효과가 나타나지 않았다(Fig. 5A).

이러한 결과를 토대로 NaN_3 독성에 대한 B-HB의 세포보호 효과를 현미경으로 관찰하였다. 세포에 3 mM NaN_3 와 B-HB를 24시간 동시 처리하고 Hoechst 33342와 PI로 세포를 염색하였다. NaN_3 단독 처리군에서 PI 형광 염색을 띠는 세포가 대조군에 비해 늘어났고 B-HB (50 mM) 처리군에서 그 수가 현저히 줄어들었다(Fig. 5C).

AcAc는 NaN_3 의 세포독성에 대한 보호 효과가 관찰되지 않았으나, 50 mM B-HB는 10 mM SPY와 유사한 수준으로 NaN_3 에 의한 세포 죽음을 억제하였다.

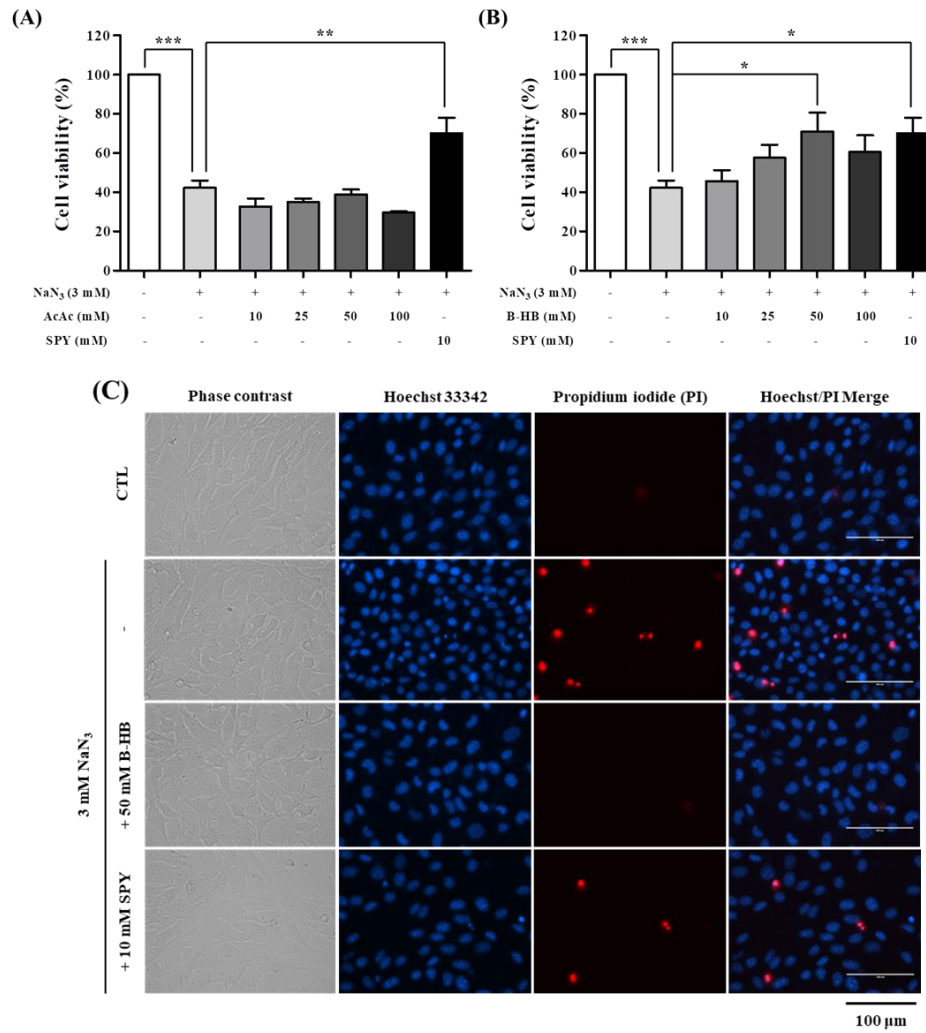


Fig. 5. Neuroprotection by AcAc or B-HB against NaN₃-induced cell death in SH-SY5Y cells.

While SH-SY5Y cells were exposed to 3 mM NaN₃, AcAc (10-100 mM, as Li-AcAc; A), B-HB (10-100 mM, as Na-B-HB; B and C) or pyruvate (SPY; 10 mM as sodium pyruvate; A-C) was treated for 24 hours and then the cell viability was evaluated by MTS assay (A and B) or Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining (C, scale bars = 100 μm). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) (n=3). Statistical comparisons between groups were performed using Turkey-ANOVA **P* < 0.05, ***P* < 0.01, or ****P* < 0.001.

4. 저산소증에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과

저산소증(hypoxia)은 세포에 산화기전을 활성화시켜 세포 사멸을 야기한다. 케톤체 AcAc와 B-HB가 저산소증의 세포에 어떠한 효과가 있는지 확인하기 위해 SH-SY5Y 세포에 AcAc (1-100 mM)나 B-HB (1-100 mM)를 처리하고 1% O₂ 환경에서 8시간 동안 배양하였다. 별도로 케톤체 처리군에 대한 비교군으로, SPY (10 mM)를 처리하였다. 처리 후 CellTiter-glo 분석 결과, 정상적으로 산소(21% O₂)가 공급된 대조군에 비해 1% O₂에 노출된 세포의 생존율이 36.3% 만큼 감소하였다(Fig. 6A-B). 그러나 AcAc 또는 B-HB를 처리한 세포에서는 농도가 증가함에 따라 생존율이 증가하는 경향을 보였다. 특히 100 mM AcAc 또는 50 mM B-HB 처리군은 각각 $117.6 \pm 2.0\%$ 또는 $111.8 \pm 8.2\%$ 의 세포 생존율로, 대조군보다 생존율이 증가하였다(Fig. 6A-B). 10 mM SPY를 처리한 경우 1% O₂에 의한 세포 죽음을 38.9% 억제하였다(Fig. 6A-B).

위의 저산소증에 대한 AcAc와 B-HB의 세포 생존율 분석을 통해, 가장 유의성이 있는 보호효과를 보이는 AcAc (100 mM)와 B-HB (50 mM), 또는 SPY (10 mM)를 세포에 처리하고 1% O₂에 8시간 방치하였다. 이 후 Hoechst 33342와 PI로 세포를 염색한 결과, 1% O₂에 노출된 경우 찌그러지고 분리된 핵이 다수 관찰되었으며 PI로 강하게 염색되었다. 하지만 AcAc (100 mM), B-HB (100 mM), 또는 SPY (10 mM)를 처리한 경우 PI로 염색된 세포가 거의 관찰되지 않았으며 생존율 결과(Fig. 6A-B)와 마찬가지로 대조군에 비해 죽은 세포를 관찰할 수 없었다(Fig. 6C).

이상 결과는 케톤체 AcAc와 B-HB가 이미 효능이 잘 알려진 SPY 못지 않게 저산소증으로부터 세포를 보호하는 능력이 뛰어난 것을 입증한다.

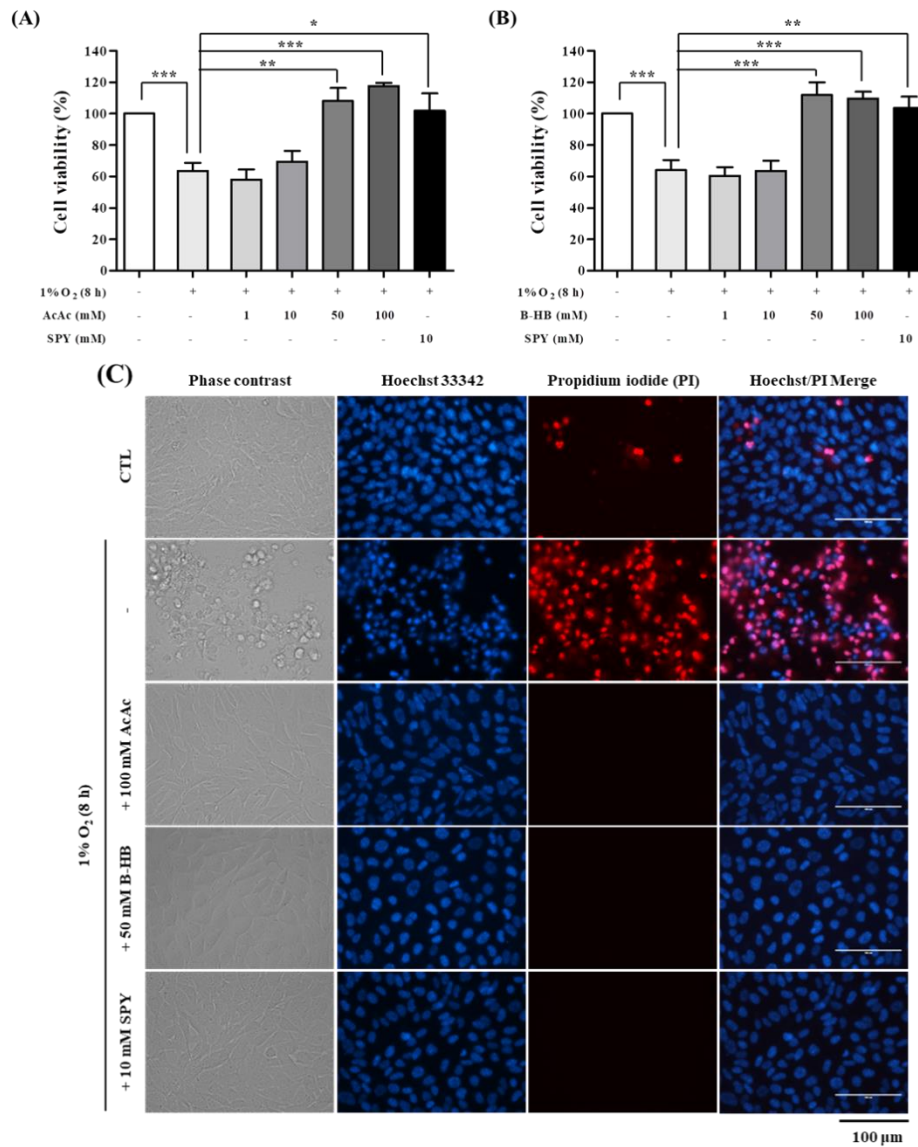


Fig. 6. Neuroprotection by AcAc or B-HB against hypoxic damage in SH-SY5Y cells.

While SH-SY5Y cells were exposed to 1% O₂, AcAc (1-100 mM, as Li-AcAc; A and C), B-HB (1-100 mM, as Na-B-HB; B and C) or pyruvate (SPY; 10 mM as sodium pyruvate; A-C) was treated for 8 hours and then the cell viability was evaluated by CellTiter-Glo assay (A and B) or Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining (C, scale bars = 100 μm). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) (n=5). Statistical comparisons between groups were performed using Turkey-ANOVA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$.

5. 아연독성(ZnCl₂)에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과

고농도의 아연(zinc)은 미토콘드리아의 에너지 대사를 억제하거나 활성산소종을 유발하여 세포 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 아연독성에 대하여 케톤체 AcAc와 B-HB가 세포에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보았다. 먼저 1-100 mM의 AcAc, 또는 B-HB에서 아연독성에 대한 세포 생존율을 측정한다. 결과, 1-8 mM 범위의 AcAc 또는 B-HB 처리군에서 급격한 생존율 감소 없이 생존율이 유지되거나 또는 증가하는 경향을 보여, 아연독성 조건에서는 1-8 mM 농도 수준에서 케톤체의 효과를 조사하였다. SH-SY5Y 세포에 50 µM ZnCl₂를 AcAc (1-8 mM), 또는 B-HB (1-8 mM)와 함께 12시간 처리하였고, 별개로 SPY (10 mM)를 50 µM ZnCl₂와 함께 세포에 동일 시간 처리하였다. 이 후에 MTS 시약을 첨가하고 세포 생존율을 측정한다. 결과, 50 µM ZnCl₂만 처리할 때 세포 생존율이 대조군 대비 75.8% 감소했다(Fig. 7A-B). 50 µM ZnCl₂와 함께 4 mM AcAc를 동시에 처리한 세포는 세포 사멸이 37.1% 만큼 줄었으나(Fig. 7A), B-HB는 처리한 모든 농도에서 ZnCl₂의 세포 독성을 억제하지 못했다(Fig. 7B). 반면에 10 mM SPY를 ZnCl₂와 함께 처리하면 생존율이 146.9%에 이르러 ZnCl₂에 의한 세포 사멸을 완벽히 억제하였다(Fig. 7A-B).

위의 생존율 분석으로 효과가 확인된 AcAc (4 mM) 또는 SPY (10 mM)를 50 µM ZnCl₂와 세포에 동시에 처리하고 12시간 후 Hoechst 33342와 PI로 세포를 염색하였다. 그 결과, 50 µM ZnCl₂에만 노출된 세포는 Hoechst 33342로 염색했을 때 핵이 응축되고 세포간 간극이 벌어졌으며 PI로 염색된 세포가 증가했으나, 4 mM AcAc를 같이 처리한 세포에서는 건강한 세포가 관찰되었고, PI 형광염색도 ZnCl₂ 단독 처리군에 비해 감소하였다. 이에 비해 10 mM SPY 처리군은 PI로 염색된 세포가 거의 관찰되지 않았으며 아무런 약물을 처리하지 않은 대조군 세포와의 형태가 유사하였다(Fig. 7C).

따라서 특정 농도의 AcAc는 세포에 유해한 아연(zinc)으로부터 세포보호 효과를 갖는데 반해, 이 연구에서 사용한 농도 범위에서 B-HB는 효과가 없는 것으로 나타났다.

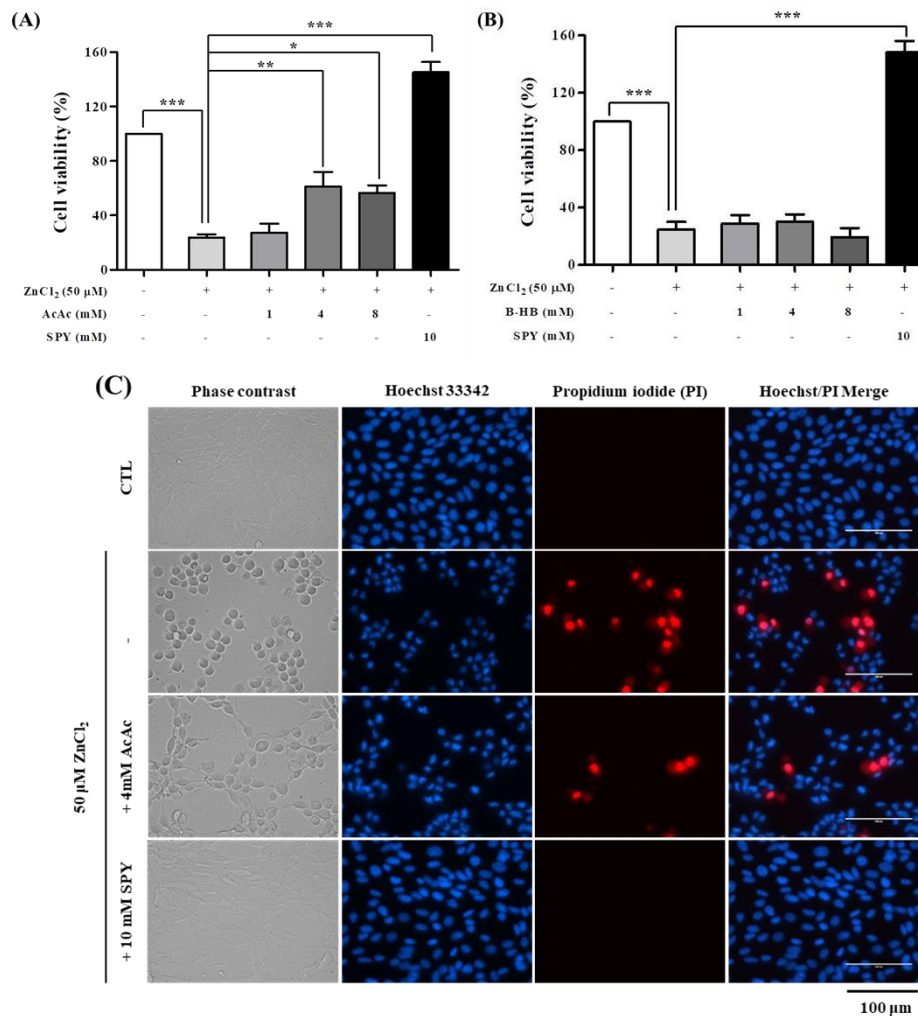


Fig. 7. Neuroprotection by AcAc or B-HB against ZnCl₂-induced cell death in SH-SY5Y cells.

While SH-SY5Y cells were exposed to 50 μM ZnCl₂, AcAc (1-8 mM, as Li-AcAc; A and C), B-HB (1-8 mM, as Na-B-HB; B) or pyruvate (SPY; 10 mM as sodium pyruvate; A-C) was treated for 12 hours and then the cell viability was evaluated by MTS assay (A and B) or Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining (C, scale bars = 100 μm). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) (n=5). Statistical comparisons between groups were performed using Turkey-ANOVA. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, or ****P* < 0.001.

6. Kainic acid (KA) 독성에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과

동물모델에서 뇌전증(epilepsy)을 유도하는 kainic acid (KA)는 신경세포의 AMPA/Kainate 수용체에 결합하여 흥분독성(excitotoxicity)을 일으키고 활성산소종의 축진 등 사멸 기전을 활성화시켜 신경 손상을 일으킨다. 본 연구에서는 이미 뇌전증(epilepsy) 치료에 쓰이는 케톤체가 KA 유발 흥분독성으로부터 세포를 보호할 수 있는 지 확인하였다. SH-SY5Y 세포에 15.625 mM KA를 처리하고, 동시에 AcAc (1-100 mM) 또는 B-HB (10-50 mM)를 첨가하였다. 그리고 KA에 대해 신경보호기능을 갖는 SPY (10 mM)를 동일 농도의 KA와 함께 세포에 처리하여, 사용한 케톤체에 대한 비교군으로 설정하였다. 24시간 처리 후 MTS 분석 결과, KA 단독 처리군은 대조군 대비 48.8% 만큼 세포 치사율을 보였다(Fig. 8A-B). 하지만 10 mM AcAc를 함께 처리한 세포에서는 KA 단독 처리군보다 49.6%만큼 생존율이 증가하여, 대조군 수준으로 생존율이 증가하였다(Fig. 8A). 10 mM SPY를 처리한 경우 81.5%의 생존율을 보여 10 mM AcAc보다 다소 낮은 수치를 나타냈다(Fig. 8A-B). 그러나 B-HB 처리군에서는 25, 50 mM에서 생존율이 도리어 감소하였다(Fig. 8B).

위의 세포 생존율 분석을 기반으로 SH-SY5Y 세포에 AcAc (10 mM)를 15.625 mM KA와 함께 24시간 처리하고 Hoechst 33342와 PI로 염색하였다. B-HB에 관한 MTS 분석 결과, 10 mM B-HB에서 유의성은 없으나 생존율이 일부 증가한 것이 확인되어 Hoechst 33342와 PI로 KA에 대한 B-HB (10 mM)의 효과를 관찰하였다. 별도로 동일한 방법으로 세포에 SPY (10 mM)와 KA를 처리하고 염색하였다. KA 단독 처리군에서 PI로 염색된 세포가 현저히 증가하였으나, AcAc (10 mM)나 SPY (10 mM)를 처리한 세포에서는 KA 단독 처리군보다 PI 형광 염색을 띤 세포가 크게 감소했다. B-HB (10 mM)의 경우 전체 세포 대비 PI로 염색된 세포 비율이 AcAc (10 mM)와 SPY (10 mM)에 비해선 높았으나 KA 단독 처리군과 비교했을 때 감소했다(Fig. 8C-D).

따라서 AcAc와 B-HB는 특정 농도로 처리할 때 KA에 의한 세포 손상에 대해 유효한 보호 효과를 가지는 것으로 나타났다.

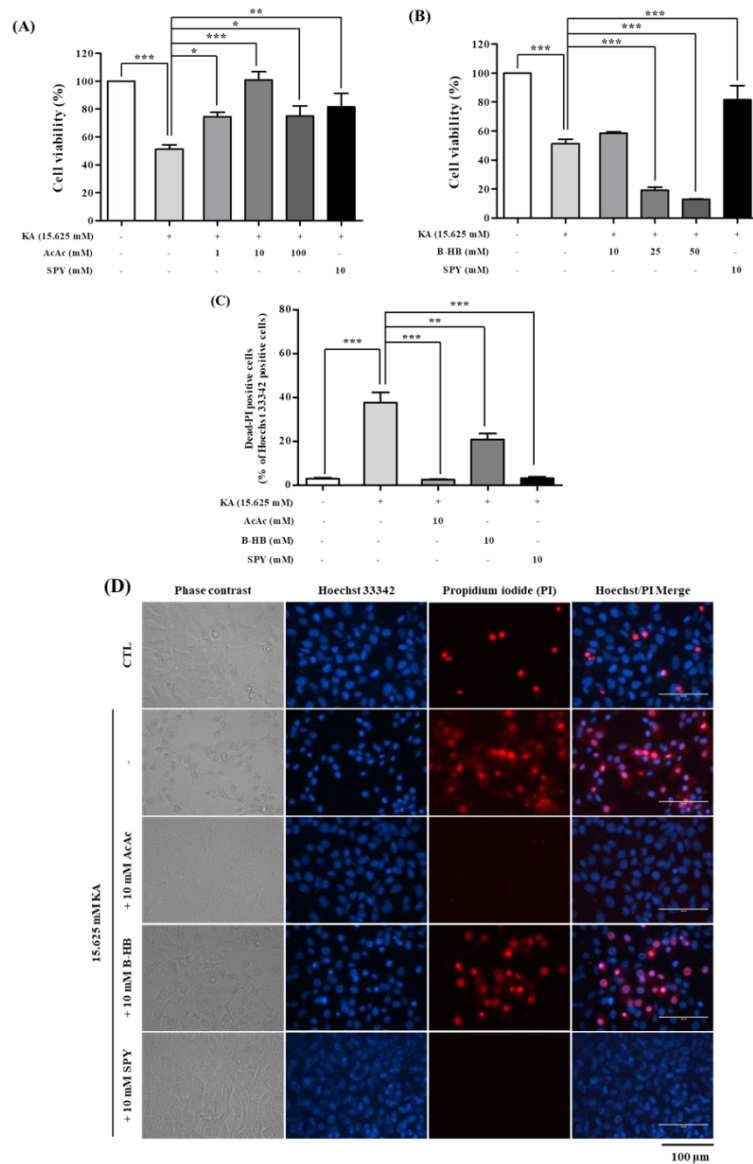


Fig. 8. Neuroprotection by AcAc or B-HB against Kainic acid (KA)-induced cell death in SH-SY5Y cells.

While SH-SY5Y cells were exposed to 15.625 mM KA, AcAc (1-100 mM, as Li-AcAc; A, C and D), B-HB (10-50 mM, as Na-B-HB; B, C and D) or pyruvate (SPY; 10 mM as sodium pyruvate; A-D) was treated for 24 hours and then the cell viability was evaluated by MTS assay (A and B) or Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining (C and D, scale bars = 100 μ m). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) (n=6). Statistical comparisons between groups were performed using Turkey-ANOVA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$.

7. A β ₄₂ 세포독성에 대한 AcAc와 B-HB의 세포보호 효과

Amyloid- β (A β)는 알츠하이머병의 가장 대표적인 병인이다. 세포 수준에서 AcAc와 B-HB의 A β 에 의한 세포사멸 억제 효과를 조사하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 활성화된 1 μ M A β ₄₂와 AcAc (2-200 mM) 또는 B-HB (2-200 mM)를 동시 처리하였다. 그리고 A β ₄₂에 대한 세포보호 효과가 입증된 2 mM의 SPY를 1 μ M A β ₄₂와 함께 세포에 처리하였다. 24시간 처리하고 MTS 분석으로 세포 생존율을 측정된 결과, 1 μ M A β ₄₂만 처리한 세포는 58.7%의 생존율로, 대조군의 41.3%만큼 생존율이 감소하였다(Fig. 9A-B). 2 mM AcAc 또는 2 mM B-HB를 함께 처리한 세포에서는 생존율이 각각 70.1%와 79.3%로, A β 에 의한 세포 죽음을 AcAc의 경우 11.4%, B-HB의 경우 20.6% 억제하였다(Fig. 9A-B). 그러나 AcAc나 B-HB 모두 농도 의존적인 세포보호 효과는 없었으며, 오히려 200 mM AcAc 또는 200 mM B-HB 처리군에서 A β ₄₂ 단독 처리군에 비해 생존율이 감소했다(Fig. 9A-B). 10 mM SPY를 처리한 경우 75.3%의 생존율을 보여, A β ₄₂에 의한 세포 죽음을 16.6% 억제하였다(Fig. 9A-B).

1 μ M A β ₄₂에 노출된 세포가 AcAc 또는 B-HB에 의해 보호되는 효과를 세포 염색을 통해 확인하였다. SH-SY5Y 세포에 1 μ M A β ₄₂를 처리하고, 동시에 AcAc (2 mM) 또는 B-HB (2 mM)를 24시간 처리하였다. 그리고 AcAc와 B-HB의 비교군으로 SPY (2 mM)를 1 μ M A β ₄₂와 함께 세포에 동일 시간 처리하였다. 이 후 Hoechst 33342와 PI로 각각의 세포를 염색한 결과, 1 μ M A β ₄₂ 단독 처리군은 대조군에 비해 죽은 세포가 늘어나 PI로 강하게 염색되었으나, AcAc (2 mM) 또는 B-HB (2 mM) 처리군은 PI 형광이 줄어들어, A β ₄₂에 의한 세포 죽음이 억제됐다. 또한 비교 목적의 SPY (2 mM) 처리군도 A β ₄₂ 단독 처리군 대비 PI로 염색된 죽은 세포가 감소하였다(Fig. 9C-D).

리튬(Li⁺)이 산화 스트레스로부터 신경세포를 보호한다고 알려져 있다.²²⁾ 본 연구에 사용한 AcAc는 리튬이 결합된 구조로, Li-AcAc의 세포보호 효과가 AcAc에 의한 것인지 확인하기 위해, Fig. 4-9에 처리한 AcAc와 같은 농도로 LiCl를 각각의 독성물질에 노출된 세포에 처리하고 각 실험에 사용한 방식으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, LiCl가 처리된 세포가 각각의 독성물질 단독 처리군과 유사한 생존율을 보여, 사용한 AcAc의 효과가 리튬에 의한 것이 아님을 확인하였다(data not shown).

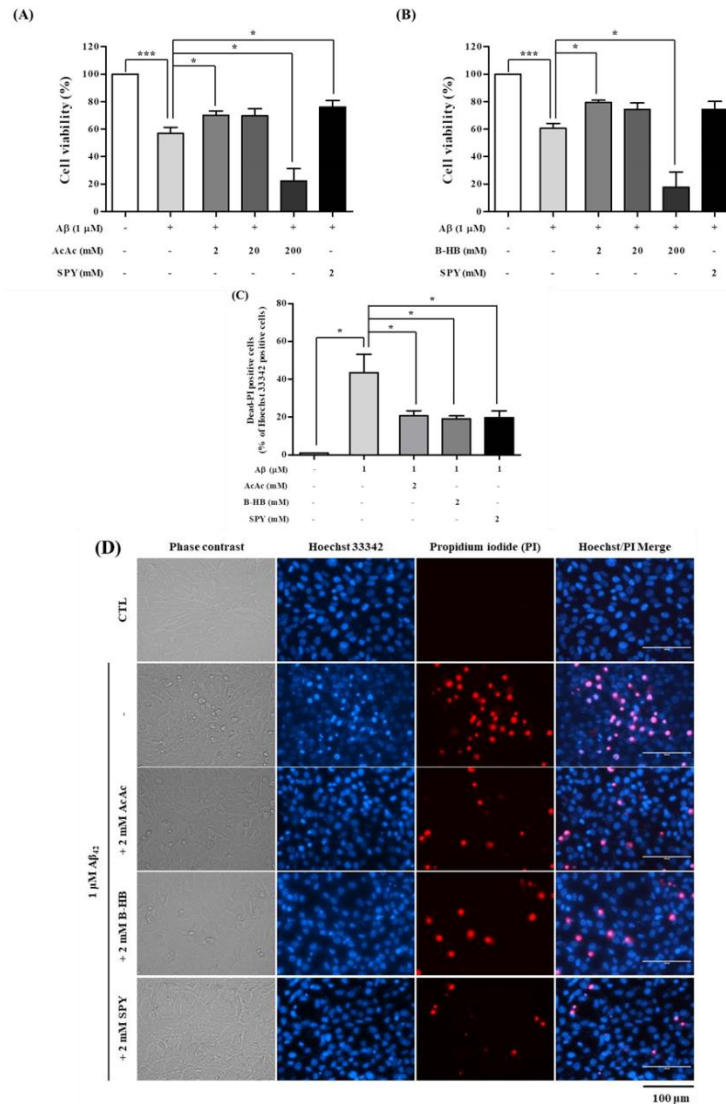


Fig. 9. Neuroprotection by AcAc or B-HB against Aβ₄₂-induced cell death in SH-SY5Y cells.

While SH-SY5Y cells were exposed to 1 μM Aβ₄₂, AcAc (2-200 mM, as Li-AcAc; A, C and D), B-HB (2-200 mM, as Na-B-HB; B, C and D) or pyruvate (SPY; 10 mM as sodium pyruvate; A-D) was treated for 24 hours and then the cell viability was evaluated by MTS assay (A and B) or Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining (C and D, scale bars = 100 μm). Error bars represent the standard error of the mean (SEM) (n=5). Statistical comparisons between groups were performed using Turkey-ANOVA. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, or ****P* < 0.001.

IV. 결론

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 신경세포의 소실로 인해 발생하는 퇴행성 뇌신경 질환이다. 이는 여러 기전에 의해 발생하는데, 신경세포에 활성산소종을 포함한 산화 스트레스가 유발되거나, 또는 에너지 대사에 관여하는 효소 기능이 저해되어 일어난다. 또한 아연(zinc)이나 카인산(kainic acid, KA)과 같은 신경자극을 비롯해 뇌에 과량 축적된 A β 로 인해 신경계 손상이 일어나 알츠하이머병이 유발된다고 한다. 이 연구에서는 이런 신경계 병인에 대해 뇌에서 대체 에너지원으로 사용하는 케톤체 AcAc와 B-HB가 SH-SY5Y 세포에 신경 보호 효과를 발휘하는지 조사하였다.

1-100 mM 농도 범위의 AcAc나 B-HB를 SH-SY5Y 세포에 단독 처리할 때 아무런 독성 효과가 나타나지 않았고, 오히려 AcAc와 B-HB에 의해 세포 생존율이 증가하였다. 이는 케톤체가 기본적으로 SH-SY5Y 세포의 성장을 촉진하거나 활성을 강화하는 화합물로 작용함을 의미한다. 앞선 연구에 따르면 AcAc나 B-HB가 D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase나 acetoacetyl-CoA thiolase 등 C1300와 glioma C6 신경모세포종(neuroblastoma) 세포의 대사에 관여하는 효소의 활성을 촉진하여 세포의 성장을 유도하고 세포 배양에 유익하게 쓸 수 있다고 알려졌다.²³⁾

산화 스트레스는 알츠하이머병 등 각종 퇴행성 뇌신경 질환에서 신경손상을 입히는 가장 대표적 병인이다. 세포 내 활성화된 산화 기전으로 인해 H₂O₂, superoxide (O₂⁻), hydroxyl radical, nitric oxide (NO), peroxynitrite (ONOO⁻) 등의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데, SH-SY5Y 세포를 포함한 배양 세포와 일차 배양 신경세포(primary cultured neurons)는 물론, 각종 신경질환 동물 모델에서 이러한 활성 산소종이 세포 구성물이나 신호 분자(signal molecules)와 격렬하게 반응하여 세포나 조직을 사멸시킨다. 따라서 활성 산소종을 적절히 억제하는 항산화물(antioxidants)은 신경세포 보호 역할을 할 수 있으며 특히 사람 신경모세포종(neuroblastoma) 유래 SK-N-MC 세포에서 피루브산(pyruvate)이 H₂O₂에 의한 세포 자살(apoptosis)을 유발하는 PARP와 caspase 3의 활성을 억제시켜 세포를 보호한다.²⁴⁾ 이 피루브산을 비롯한 항산화물은 신경질환 치료제로 관심을 받고 있어 이에 이 연구에서는 피루브산과 유사 구조인 케톤체가 SH-SY5Y

배양세포를 산화 스트레스 공격으로부터 보호할 수 있는지 관찰하였다. H_2O_2 에 노출된 SH-SY5Y 세포에 10, 25 mM AcAc를 처리한 경우 H_2O_2 에 의한 세포 손상이 억제되었지만, B-HB에서는 어떠한 사멸 억제 효과를 관찰할 수 없었으며 오히려 높은 농도에서 세포 사멸을 증가시켰다. 앞서 언급한대로 피루브산의 강력한 항산화 효능을 재현하며 10 mM의 SPY는 H_2O_2 에 노출된 세포의 생존율을 크게 끌어 올렸다. 이 결과는 AcAc가 피루브산에 비해선 다소 낮으나, H_2O_2 로 인한 공격에 대해 항산화 기능과 세포 보호효능을 갖고 있음을 의미한다. 비록 PC12 세포에서 B-HB가 산화 스트레스 공격을 막는다는 보고가 있으나²⁵⁾, 이 연구에서는 B-HB가 세포보호 효과를 나타내지 않았는데 이에 관해서는 더욱 세밀한 분석이 필요하다. 대사 증후군과 퇴행성 뇌신경 질환과의 역학적 보고에 의하면⁹⁾, 당뇨병(diabetic mellitus) 환자는, 세포 내 포도당 흡수가 억제되어 간(liver)에서 케톤체의 생성이 증가하는데 혈중 케톤체의 농도가 정상을 넘어서면(ketoacidosis) 활성산소종의 생성이 촉진되어 신경 소실이 초래된다고 알려졌다.²⁶⁾ 본 연구의 50, 100 mM의 B-HB는 H_2O_2 에 의해 손상된 세포에 ketoacidosis와 같은 독성을 일으켜 세포 죽음을 유도할 가능성이 있는 것으로 보이나 AcAc의 경우 다른 효과를 보여 이에 관한 추가적인 연구가 필요하다. 최근 AcAc, B-HB 등 케톤체와 케톤 유도 화합물의 항산화 기능을 이용한 신경보호제 개발이 주목 받고 있다.^{27, 28)}

아지드화 나트륨(NaN_3)은 미토콘드리아 전자전달계(electron transport chain, ETC)의 구성 효소인 cytochrome c oxidase (complex IV)의 산화 인산화 반응(oxidative phosphorylation)을 억제해 세포 에너지 대사를 파괴하는 독성물질로, 저산소증 유사 화합물(hypoxia-mimetic chemical)로 널리 쓰인다.²⁹⁾ 피루브산은 NaN_3 와 유사한 작용을 하는 사이안화 칼륨(KCN)에 대하여 그 작용을 억제하고 cytochrome oxidase의 기능을 회복시키는 것으로 알려졌다.³⁰⁾ 전자전달계에 관한 케톤체의 작용과 관련하여, 외상성 뇌손상(traumatic brain injury, TBI)이 유발된 랫드가 케톤체를 섭취할 때 미토콘드리아에서 세포질로 방출된 cytochrome c의 농도가 감소하고 caspase-3의 활성이 저해돼 TBI에 의한 apoptosis가 억제되었다는 결과가 보고되었다.³¹⁾ 이 연구에서는 에너지 대사 저해에 대하여 앞선 연구에서 확인된 케톤체의 신경보호 효과를 SH-SY5Y 세포에서 확인하고 보호 효과가 입증된 피루브산과 비교하였다. 일차배양 신경세포에서와 마찬가지로⁶⁶⁾, 이 연구에서도 NaN_3 에 의해 SH-SY5Y 세포의 생존율이 크게 감소하였다. 하지만 50 mM B-HB

나 10 mM SPY에 의해 세포 생존율이 증가했고, 위 산화 스트레스 시험과는 반대로 AcAc는 NaN_3 에 의한 세포 죽음을 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 아지드화 나트륨(NaN_3)에 의한 세포독성에 대하여 B-HB와 피루브산이 세포보호 효과를 가지고 있으나, AcAc는 그 효력이 미미함을 의미한다. Cytochrome oxidase를 포함한 complex I~III는 미토콘드리아 내막에서 유기적으로 연결된 구조로, 일련의 산화 인산화 반응으로 ATP를 생성한다. 특히 Complex I과 II에선, 조효소 NAD가 전달한 전자(e^-)에 의해 산화 환원 반응이 일어나, ATP 생산이 촉진된다. 이러한 NAD는 B-HB가 세포의 β -hydroxybutyrate dehydrogenase (B-HBDH)와 반응할 때 증가되어, ATP 생성을 활성화시키는 것으로 알려졌다. C57BL/6 생쥐에 B-HB와 complex II의 작용을 억제하는 3-nitropropionic acid (3-NP)를 처리한 결과, B-HB에 의해 NADH가 증가하고 complex II의 기능이 회복되어, 세포 호흡과 ATP 생성이 개선되었다는 연구 결과가 있다.³²⁾ 이러한 연구를 기반으로 본 연구에서 확인한 NaN_3 에 대한 B-HB의 세포보호 효과는 처리한 B-HB에 의한 B-HBDH의 반응 촉진 및 그로 인한 에너지 대사 향상과 연관될 수 있음을 의미한다. 기전 연구를 통해 B-HB의 세포 보호 효과를 세밀하게 조사할 필요가 있다.

뇌에 공급되는 산소가 줄어들면 뇌세포가 소실되어 알츠하이머병을 포함한 퇴행성 뇌신경질환이 야기된다. 산소 결핍은 뇌신경세포에 급속한 포도당 고갈 및 에너지 대사 붕괴를 일으켜 결국 사멸을 일으킨다.³³⁻³⁵⁾ 케톤체는 이러한 긴급 상황에서 빠르게 뇌로 전달되어 에너지원으로 사용된다고 알려져 있으며^{36, 37)}, 저산소 상태(hypoxia)에 노출된 랫드의 해마 신경세포(hippocampal neurons)는 케톤체에 의해 PARP나 caspase 3의 활성화 및 cytochrome C의 유출이 억제되어 세포 죽음이 억제된다.³⁸⁾ 이에 본 연구에서는 케톤체가 SH-SY5Y 세포를 저산소증(hypoxia)에 의한 자극으로부터 보호할 수 있는지 조사하였다. SH-SY5Y 세포를 1% O_2 조건에서 배양하면서 AcAc 또는 B-HB와 SPY를 각각 처리하였다. 그 결과 예상한대로 1% O_2 에만 노출된 세포에 비해 AcAc 또는 B-HB와 SPY에 의해 세포 생존율이 크게 증가하였다. 이는 저산소증으로부터 신경세포 보호능력이 우수하다고 잘 알려진 피루브산 못지 않게³⁹⁾, 케톤체도 저산소로 인한 신경세포 손상을 효과적으로 막을 수 있는 것을 의미한다. 앞선 연구에서 생쥐와 랫드에 B-HB (50 mg/kg)를 전처리(pre-treatment)한 후 저산소증을 유도한 결과, B-HB를 처리한 그룹에서 그렇지 않은 그룹에 비해 생존시간(survival time)이 크게 늘어나고 뇌세포 내 ATP 생성이 증가했다.⁴⁰⁾

아연(zinc)은 세포 기능에 중요한 요소로, 핵 내 전사(transcription)를 활성화시키고 단백질 합성을 촉진하며, 시냅스에서의 신호전달(synaptic transmission)에 영향을 미친다.⁴⁹⁾ 특히 고농도의 아연은 시냅스 후 신경세포(postsynaptic neurons)에 존재하는 NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor)과 voltage-gated Ca^{2+} channels 등에 작용하여 시냅스 후 신경세포로 유입되거나 세포 내로 Ca^{2+} 을 다량 유입시킨다. 유입된 아연으로 인한 미토콘드리아의 에너지 대사 저해 또는 고농도의 Ca^{2+} 에 의한 산화 스트레스 및 세포 자살(apoptosis) 활성화로 인해 신경세포가 사멸하여⁴¹⁾, 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)과 알츠하이머병을 비롯한 퇴행성 뇌신경 질환이 유발된다.⁴²⁻⁴⁶⁾ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)와 TPEN [N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine]을 비롯한 아연 결합 화합물은 아연에 의한 신경 손상을 억제하는 것으로 알려졌는데, 동물모델 연구에 따르면 아연 결합 화합물 못지 않게 피루브산도 아연에 의한 신경독성과 신경질환을 억제할 수 있다.^{47, 48)} 따라서 본 연구에서는 피루브산처럼 케톤기를 갖는 케톤체도 아연 독성으로부터 세포를 보호할 수 있는 지 확인하였다. $ZnCl_2$ 에 노출된 SH-SY5Y 세포에 AcAc 또는 B-HB를 처리한 결과, 4 mM AcAc에서 유의적인 세포보호 효과가 있었고, B-HB의 경우 처리한 농도 범위 내에서 $ZnCl_2$ 에 의한 세포 죽음을 억제하지 못했다. SPY는 $ZnCl_2$ 공격을 완전히 차단함으로써 앞선 연구 결과를 재현하였다. 고농도 아연처럼 신경손상을 일으킨다고 알려진 글루탐산(glutamate)에 관한 연구에 따르면 AcAc와 B-HB가 glutamate 독성으로부터 HT22 세포(hippocampal cell line)와 일차 배양 해마 신경세포(primary hippocampal neuronal cultured cells)를 보호하고, 특히 AcAc가 glutamate로 인한 ROS 생성을 현저히 억제했다는 결과가 있다.⁵⁰⁾ 따라서 본 연구 결과는 AcAc가 아연에 의한 산화 스트레스나 세포 자살을 효과적으로 억제할 수 있음을 입증한다. SH-SY5Y 세포뿐 아니라 다양한 신경세포에서 아연에 대한 케톤체의 세포보호효능을 조사하고 각종 뇌신경질환 동물 모델에서도 그 효력을 평가할 필요가 있다.

신경세포 간 신호의 전달은, 신경세포의 말단에서 방출하는 신경전달물질(neurotransmitters)이 시냅스 후 신경세포에 결합하여 이루어진다. 흥분성 신경전달물질(excitatory neurotransmitters)이 지나치게 많으면 뇌전증(epilepsy), 알츠하이머병(Alzheimer's disease)을 비롯한 퇴행성 뇌신경 질환이 발병한다.^{51, 52)} Kainic acid (KA)는 흥분성 신경전달물질로, 시냅스 후 신경세포의 이온성 글루탐산 수용체(ionotropic glutamate receptors)의 일종인 AMPA/KA 수용체에 결합하여 수용체

를 활성화시킨다.⁵³⁾ 과도하게 활성화된 수용체에 의해 세포 내로 Ca^{2+} 이 다량 유입되고 이로 인해 세포 자살(apoptosis)이 촉진되어, 신경세포가 사멸한다.⁵⁴⁻⁵⁸⁾ 신경보호능이 우수한 피루브산은 KA의 신경독성을 효과적으로 억제할 수 있다. Spargue-Dawley (SD) 랫드에 KA (10 mg/kg)를 복강투여(intraperitoneal injection)해 간질(epileptic seizures)을 일으키고 sodium pyruvate (SPY; 500 mg/kg)를 주사하면 뇌에서 세포보호능을 갖는 HSP70 단백질(heat shock protein 70) 발현이 증가하고 해마체(hippocampus)와 시상(thalamus) 부위의 죽은 신경세포가 감소한다.⁵⁹⁾ 케톤체도 신경보호 효과를 유도하는지 알아보기 위해 SH-SY5Y 세포에 KA를 처리하고 케톤체 AcAc와 B-HB를 각각 처리한 결과, 10 mM AcAc를 처리한 세포에서 생존율이 크게 증가했다. B-HB 경우 MTS 분석상 10 mM 농도에서 유의성은 없으나 세포 사멸을 일부 억제하였고 이를 Hoechst 33342와 PI로 염색한 결과에서 세포 사멸도가 KA 단독 처리군에 비해 감소하였다. 이러한 결과는 세포 및 동물 모델에서 입증된 피루브산 만큼⁵⁹⁾, 케톤체, 특히 AcAc가 KA의 세포독성을 억제하는 능력이 뛰어난 것을 의미한다. 본 연구 결과를 토대로, 케톤체는 KA에 의한 수용체의 지나친 활성화 및 그로 인해 야기되는 신경 소실에 대하여 세포보호 기능을 가지며, 뇌전증(epilepsy) 치료에서 케톤체 또는 케톤체 식이요법(ketogenic diet)의 유용성이나 기전을 암시한다.

알츠하이머병의 대표 병인인 amyloid- β ($A\beta$)는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)이 β -secretase와 γ -secretase에 의해 분해되어 생성된 펩타이드(peptide)로, 주로 1-40 또는 1-42번째의 아미노산 서열을 갖는 $A\beta_{40}$ 과 $A\beta_{42}$ 로 구성된다. γ -secretase와 복합체를 이루는 presenilins에 문제가 있거나 APP 서열에 변이가 일어나면 $A\beta$ 가 다량 생성, 축적되어 신경세포를 공격해 알츠하이머병이 유발된다고 알려졌다.^{60, 61)} 특히 알츠하이머병 환자에서는 강한 신경독성을 갖는 $A\beta_{42}$ 의 비율이 높은 것으로 드러났다.^{62, 63)} 세포 연구와 치매 동물모델에서 케톤체가 신경계 손상 병인을 억제하여 알츠하이머병 치료에 도움을 줄 것이라는 보고가 주목을 받고 있다.^{64, 65)} APP에 돌연변이를 일으키는 형질전환 생쥐에 고지방과 저탄수화물로 구성된 식단(ketogenic diet)을 43일간 진행한 결과, 저지방 및 고탄수화물을 먹인 그룹보다 혈중 B-HB의 농도가 증가하고 뇌세포의 $A\beta$ 수준이 감소했다.⁶⁴⁾ 또한 B-HB의 효과를 in vitro와 in vivo에서 확인한 연구에 따르면 B-HB를 전처리한(pre-treatment) PC12 세포에서 세포 자살(apoptosis) 기전이 억제되고 세포 사멸이 감소했다. $A\beta$ 와 B-HB를 동시 주입한 랫드에서는

A β 로 인한 뇌신경 사멸이 줄어들었다.⁶⁵⁾ 본 연구는 A β_{42} 독성에 대한 케톤체의 보호 기능을 SH-SY5Y 세포에서 알아보았다. SH-SY5Y 세포에 A β_{42} 를 처리하고, 동시에 AcAc (2 mM) 또는 B-HB (2 mM)를 24시간 처리했을 때, A β_{42} 단독 처리군 대비 세포 생존율이 증가하였다. 또한 이를 염색했을 때 케톤체의 세포보호 효과가 극명했다. SPY 처리군에서도 세포 생존율이 향상하여 피루브산이 A β_{42} 의 독성을 낮추는 효과가 있음을 재확인했다. 이러한 발견은 AcAc와 B-HB가 알츠하이머병 병인인 A β_{42} 의 공격을 효과적으로 방어한다는 것을 의미한다. 최근 피루브산을 비롯한 케톤체를 알츠하이머병 치료제로 개발하려는 시도가 꾸준히 이뤄지고 있어 비록 세포 연구이긴 하나 이 연구는 케톤체의 퇴행성 뇌신경질환의 치료제로 개발 가능성을 지지하는 중요한 발견이다.

본 연구에서는, 알츠하이머병의 다양한 원인에 대하여 뇌에서 효과적으로 사용하는 에너지원인 케톤체 AcAc와 B-HB의 신경보호 효과를 세포 수준에서 확인하였다. 특이한 것은 여러 신경독성물질에 대해 같은 계열의 케톤체 AcAc와 B-HB가 서로 다른 양상의 효과를 보였다는 점이다. H₂O₂나 ZnCl₂에 의한 세포 손상은 B-HB보다 AcAc에 의해 더 잘 억제되었고, NaN₃의 세포독성은 AcAc보다 B-HB에 의해 더 많이 억제됐다. 저산소증(1% O₂)과 kainic acid (KA), A β_{42} 에 대해서 AcAc와 B-HB 모두 세포 죽음을 충분히 억제하였다. 케톤체의 여러 신경 독성 병인에 대한 보호 효과를 SH-SY5Y 세포를 비롯한 다양한 신경세포 모델과 동물 질환 모델에서 더 알아볼 필요가 있다.

비록 사람 신경모세포종양 유래 SH-SY5Y 세포를 이용한 연구이긴 하나 이 연구는 AcAc와 B-HB가 피루브산과 비슷하거나 또는 그 이상으로 산화 스트레스, 에너지 대사 교란, 흥분독성, 아밀로이드 독성 등 각종 퇴행성 신경질환 병인이나 독성 기전을 차단할 수 있음을 발견하였다. 뇌졸중(cerebral stroke), 뇌전증(epilepsy), 그리고 알츠하이머병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환 동물모델에서 케톤체의 신경 보호 기능을 평가하여 신경질환 치료제로 개발 가능성을 확인하는 연구가 진행돼야 할 것이다.

V . 참고문헌

1. Evans, Denis A., et al. "Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons: higher than previously reported." *Jama* 262.18 (1989): 2551-2556.
2. Prince, Martin, et al. "World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future." (2016).
3. Salmon, David P. "Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease." *Behavioral neurobiology of aging*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. 187-212.
4. Selkoe, Dennis J. "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiological reviews* (2001).
5. Atwood, Huang X. "Hartshorn MA. Multhaup G. Goldstein LE. Scarpa RC. Cuajungco MP. Gray DN. Lim J. Moir RD. Tanzi RE. Bush AI. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction." *Biochemistry* 38 (1999): 7609-7616.
6. Sudha, K., Ashalatha V. Rao, and Anjali Rao. "Oxidative stress and antioxidants in epilepsy." *Clinica Chimica Acta* 303.1-2 (2001): 19-24.
7. Sheline, Christian T., M. Margarita Behrens, and Dennis W. Choi. "Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD⁺ and inhibition of glycolysis." *Journal of Neuroscience* 20.9 (2000): 3139-3146.
8. Zuo, Yuanyi, et al. "Sodium azide induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells through Pgc-1 α -associated signaling pathway." *Molecular medicine*

- reports 19.3 (2019): 2211-2219.
9. 이애영. "대사증후군과 치매." *대한신경과학회지* 29.3 (2011): 159-164.
 10. Eckert, Anne, et al. "Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease." *Biochemical pharmacology* 66.8 (2003): 1627-1634.
 11. Sokoloff, L. O. U. I. S. "Metabolism of ketone bodies by the brain." *Annual review of medicine* 24.1 (1973): 271-280.
 12. Morris, A. A. M. "Cerebral ketone body metabolism." *Journal of inherited metabolic disease* 28.2 (2005): 109-121.
 13. Yang, Huajun, et al. "Ketone bodies in neurological diseases: focus on neuroprotection and underlying mechanisms." *Frontiers in neurology* 10 (2019): 585.
 14. Wang, Xiaonan, et al. "Systemic pyruvate administration markedly reduces neuronal death and cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease." *Experimental Neurology* 271 (2015): 145-154.
 15. Kim, Tae-Youn, et al. "Pyruvate protects against kainate-induced epileptic brain damage in rats." *Experimental neurology* 208.1 (2007): 159-167.
 16. Desagher, Solange, Jacques Glowinski, and Joël Prémont. "Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity." *Journal of Neuroscience* 17.23 (1997): 9060-9067.
 17. Noh, Hae Sook, et al. "Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity." *Journal of neuroscience research* 83.4 (2006): 702-709.
 18. Cheng, Baohua, et al. "D-β-Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H₂O₂ via inhibiting

- oxidative stress." *Neurochemistry international* 62.5 (2013): 620-625.
19. Masuda, R., J. W. Monahan, and Y. Kashiwaya. "D- β -hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures." *Journal of neuroscience research* 80.4 (2005): 501-509.
 20. Simeone, Timothy A., et al. "Do ketone bodies mediate the anti-seizure effects of the ketogenic diet?." *Neuropharmacology* 133 (2018): 233-241.
 21. Xie, Guanghong, et al. "The neuroprotective effects of β -hydroxybutyrate on A β -injected rat hippocampus in vivo and in A β -treated PC-12 cells in vitro." *Free radical research* 49.2 (2015): 139-150.
 22. Chuang, De-Maw, et al. "Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases." *Bipolar disorders* 4.2 (2002): 129-136.
 23. Patel, Mulchand S., Joseph J. Russell, and Howard Gershman. "Ketone-body metabolism in glioma and neuroblastoma cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78.11 (1981): 7214-7218.
 24. Jagtap, Jayashree C., et al. "Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC." *Journal of chemical neuroanatomy* 26.2 (2003): 109-118.
 25. Cheng, Baohua, et al. "D- β -Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H₂O₂ via inhibiting oxidative stress." *Neurochemistry international* 62.5 (2013): 620-625.
 26. Fedorovich, Sergei V., Polina P. Voronina, and Tatyana V. Waseem. "Ketogenic diet versus ketoacidosis: what

- determines the influence of ketone bodies on neurons?." Neural regeneration research 13.12 (2018): 2060.
27. Haces, María L., et al. "Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions." *Experimental neurology* 211.1 (2008): 85-96.
 28. Haces, María L., et al. "Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions." *Experimental neurology* 211.1 (2008): 85-96.
 29. Leary, Scot C., et al. "Chronic treatment with azide in situ leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation." *Journal of Biological Chemistry* 277.13 (2002): 11321-11328.
 30. Nůsková, Hana, et al. "Cyanide inhibition and pyruvate-induced recovery of cytochrome c oxidase." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 42.5 (2010): 395-403.
 31. Hu, Zhi Gang, et al. "Ketogenic diet reduces cytochrome c release and cellular apoptosis following traumatic brain injury in juvenile rats." *Annals of Clinical & Laboratory Science* 39.1 (2009): 76-83.
 32. Tieu, Kim, et al. "D-β-Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease." *The Journal of clinical investigation* 112.6 (2003): 892-901.
 33. Susin, Santos A., Naoufal Zamzami, and Guido Kroemer. "Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1366.1-2 (1998): 151-165.
 34. Mao, Ying, et al. "Focal cerebral ischemia in the mouse:

- description of a model and effects of permanent and temporary occlusion." *Molecular brain research* 63.2 (1999): 366-370.
35. Sims, Neil R., and Michelle F. Anderson. "Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke." *Neurochemistry international* 40.6 (2002): 511-526.
 36. Owen, O. E., et al. "Brain metabolism during fasting." *The Journal of clinical investigation* 46.10 (1967): 1589-1595.
 37. Cahill Jr, GEORGE F., and OLIVER E. Owen. "Starvation and survival." *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 79 (1968): 13.
 38. Masuda, R., J. W. Monahan, and Y. Kashiwaya. "D- β -hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures." *Journal of neuroscience research* 80.4 (2005): 501-509.
 39. Pan, Rui, et al. "Sodium pyruvate reduces hypoxic-ischemic injury to neonatal rat brain." *Pediatric research* 72.5 (2012): 479-489.
 40. Suzuki, Motohisa, et al. "Effect of β -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats." *Japanese journal of pharmacology* 87.2 (2001): 143-150.
 41. Mizuno, Dai, and Masahiro Kawahara. "The molecular mechanisms of zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type senile dementia." *International journal of molecular sciences* 14.11 (2013): 22067-22081.
 42. Choi, Dennis W., and Jae Y. Koh. "Zinc and brain injury." *Annual review of neuroscience* 21.1 (1998): 347-375.
 43. Tønder, N., et al. "Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia

- in the adult rat." *Neuroscience letters* 109.3 (1990): 247-252.
44. Koh, Jae-Young, et al. "The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia." *Science* 272.5264 (1996): 1013-1016.
 45. Bush, Ashley I., et al. "Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc." *Science* 265.5177 (1994): 1464-1467.
 46. Zirah, Séverine, et al. "Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid β -peptide upon zinc binding and in vitro aging." *Journal of Biological Chemistry* 281.4 (2006): 2151-2161.
 47. Lee, Joo-Yong, Yang-Hee Kim, and Jae-Young Koh. "Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats." *Journal of Neuroscience* 21.20 (2001): RC171-RC171.
 48. Kawahara, Masahiro, Midori Kato-Negishi, and Yoichiro Kuroda. "Rapid communication: pyruvate blocks zinc-induced neurotoxicity in immortalized hypothalamic neurons." *Cellular and molecular neurobiology* 22.1 (2002): 87-93.
 49. Takeda, Atsushi. "Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain." *Biometals* 14.3-4 (2001): 343-351.
 50. Noh, Hae Sook, et al. "Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity." *Journal of neuroscience research* 83.4 (2006): 702-709.
 51. Jellinger, K. A., and C. Stadelmann. "Mechanisms of cell death in neurodegenerative disorders." *Advances in Dementia Research*. Springer, Vienna, 2000. 95-114.
 52. Doble, Adam. "The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy."

- Pharmacology & therapeutics 81.3 (1999): 163-221.
53. Bleakman, David, and David Lodge. "Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors." *Neuropharmacology* (1998).
 54. Sun, Albert Y., Yu Cheng, and Grace Y. Sun. "Kainic acid-induced excitotoxicity in neurons and glial cells." *Progress in Brain Research*. Vol. 94. Elsevier, 1992. 271-280.
 55. Cheng, Yu, and Albert Y. Sun. "Oxidative mechanisms involved in kainate-induced cytotoxicity in cortical neurons." *Neurochemical research* 19.12 (1994): 1557-1564.
 56. Gluck, Martin R., et al. "CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy." *Epilepsy research* 39.1 (2000): 63-71.
 57. Milatovic, Dejan, Ramesh C. Gupta, and Wolf-D. Dettbarn. "Involvement of nitric oxide in kainic acid-induced excitotoxicity in rat brain." *Brain research* 957.2 (2002): 330-337.
 58. Candelario-Jalil, Eduardo, et al. "Selective vulnerability to kainate-induced oxidative damage in different rat brain regions." *Journal of Applied Toxicology: An International Journal* 21.5 (2001): 403-407.
 59. Kim, Tae-Youn, et al. "Pyruvate protects against kainate-induced epileptic brain damage in rats." *Experimental neurology* 208.1 (2007): 159-167.
 60. Selkoe, Dennis J. "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiological reviews* (2001).
 61. Eckert, Anne, et al. "Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease." *Biochemical pharmacology* 66.8 (2003): 1627-1634.
 62. Mullan, Mike, et al. "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -

- amyloid." *Nature genetics* 1.5 (1992): 345-347.
63. Chartier-Harlin, Marie-Christine, et al. "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene." *Nature* 353.6347 (1991): 844-846.
 64. Van der Auwera, Ingrid, et al. "A ketogenic diet reduces amyloid beta 40 and 42 in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nutrition & metabolism* 2.1 (2005): 28.
 65. Xie, Guanghong, et al. "The neuroprotective effects of β -hydroxybutyrate on A β -injected rat hippocampus in vivo and in A β -treated PC-12 cells in vitro." *Free radical research* 49.2 (2015): 139-150.
 66. Selvatici, Rita, et al. "Sodium azide induced neuronal damage in vitro: evidence for non-apoptotic cell death." *Neurochemical research* 34.5 (2009): 909-916.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease associated with the abnormal accumulation of the peptide amyloid-beta ($A\beta$) in the brain. The neurotoxic mechanisms of $A\beta$ have been linked to oxidative stress or excitotoxicity in neurons, causing neuronal damage. Studies have reported that ketone bodies, used as alternative energy sources in brain, have been related to treatment of AD. Herein, we investigated the neuroprotective effects of ketone bodies, acetoacetate (AcAc) or β -hydroxybutyrate (B-HB), against the neurotoxin-induced cell death. SH-SY5Y cells were co-treated with a neurotoxin such as H_2O_2 , NaN_3 , hypoxia, $ZnCl_2$, kainic acid (KA), or $A\beta_{42}$, and a ketone body, AcAc or B-HB, in comparison with the addition of sodium pyruvate (SPY). We found that either AcAc or B-HB protected the SH-SY5Y cells from the neurotoxin-induced cell death, showing the increase in the cell viability and the decrease in the number of PI-stained dead cells. These results suggest that ketone bodies may play a therapeutic role in neurological diseases such as AD.

Keywords: Alzheimer's disease (AD), Amyloid- β ($A\beta$), Oxidative stress, Excitotoxicity, Ketone body, Acetoacetate (AcAc), β -hydroxybutyrate (B-HB), Pyruvate, Neuroprotection