



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0005887
(43) 공개일자 2013년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/19 (2006.01) A61K 31/22 (2006.01)

A61K 31/21 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0067548

(22) 출원일자 2011년07월07일

심사청구일자 2011년07월07일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김명옥

경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

(74) 대리인

손민

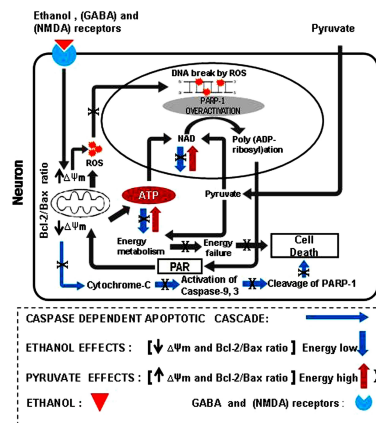
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 피루브산을 포함하는 신경세포 보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 피루브산을 포함하는 신경세포 보호용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있도록 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 신경세포 보호용 조성물 및 건강기능식품, 및 상기 조성물을 투여하여 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 신경세포 보호용 조성물은 에탄올에 의해 유도된 아포토시스를 억제할 수 있으므로, 에탄올 등의 화학물질에 의한 신경손상의 예방 및 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008075
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대 바이오그린 21, 농생명바이오식의약소재 개발 사업단
연구과제명	고기능성 국내산 농산물 천연신물질에서 신경장애 및 퇴행성 뇌질환 개선(치료)제 개발 모
색	
주관기관	경상대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하고, 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있는 신경세포 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 신경세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 FAS(Fetal Alcohol Syndrom)-관련 뇌손상 질환, 알코올 관련 신경발달이상(ARNDs), 태아발육저해, 태아기형 및 신생아 돌연사 증후군으로 구성된 군으로부터 선택된 신경계 질환의 예방 또는 치료를 위한 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 (a) 에탄올에 의하여 증가된 Bax 발현수준의 감소, (b) 에탄올에 의하여 세포질로 방출되는 사이토크롬-c의 방출량 감소, (c) 에탄올에 의하여 활성화된 카스파제-3의 발현 감소 및 (d) 에탄올에 의하여 증가된 PARP-1의 절단 감소로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효과를 나타내는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하는 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있는 신경세포 보호용 건강기능식품.

청구항 7

피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호하는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 피루브산을 포함하는 신경세포 보호용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명은 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있도록 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 신경

[0001]

세포 보호용 조성물 및 건강기능식품, 및 상기 조성물을 투여하여 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 알코올은 정신활성물질로 가장 많이 쓰이고 있으며, 알코올 중독은 많은 국가에서 의학적 사회경제적으로 문제 시되고 있다. 이러한 알코올 (에탄올)은 신경전달물질 및 신경조절물질의 합성, 방출, 수용체 결합 및 신호를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다. 뇌 성장 기간 중의 에탄올 노출은 중추신경시스템 (central nerve system, CNS)에 영향을 주어서 신경이동에서의 결합, 몇몇 뇌 부위에서의 세포감소 및 시냅스 연결과 신경세포 수 결손 등의 신경질환, 더 나아가 에탄올-유도 아폽토시스 신경퇴행을 일으킨다.
- [0003] 특히, 신경세포는 시냅스 형성기간 동안에 에탄올-유도 아폽토시스 신경퇴행에 좀 더 취약한데, 인간의 경우 이러한 시냅스 형성기간은 임신 3개월 후부터 출생 후까지 계속 되는 것으로 알려져 있으며, 이 시기에 뇌가 급격히 성장한다. 성장 최고조 기간인 출생 후의 발달 중인 동물에 있어서 에탄올의 노출은 신경 부분의 성장 기간 동안 뇌에서 넓은 부위의 신경의 취약한 부분에 구조적 및 기능적 변형에 영향을 미쳐 태아 알코올 증후군 (Fetal Alcohol Syndrom, FAS)이나 태아 알코올 영향 (Fetal alcohol effects, FAE)을 일으킨다. FAS의 경우, 서구세계의 정신지체의 주된 비유전학적 요인으로 보고되어 있으며 이는 출생 후의 비유전학적 요인 중의 하나인, 에탄올 노출이 그의 원인이 될 수 있음을 시사한다.
- [0004] 발달 중인 설치류의 뇌의 에탄올 유발-아폽토시스는 광학과 전자 현미경을 이용하여 조직학적으로 본질적인 형태학적인 특징을 얻는 연구가 진행되고 있다. 신경 세포 사멸의 원인으로 사이토크롬-c는 세포질로 방출되어, ATP를 이용한 카스파제-3 및 카스파제-9의 활성화의 원인이 되거나 PARP-1(poly (ADP-ribose) polymerase) 활성화에 관련된 Bax-의존형 미토콘드리아의 내재적 아폽토틱 경로 (Bax-dependent mitochondrial intrinsic apoptotic pathway)에 의하여 매개된다고 알려졌다. 따라서, 출생 후 뇌가 에탄올 노출될 경우, 이런 아폽토시스 연쇄반응 (cascade)의 활성화와 넓은 범위의 신경세포사를 유발하게 된다. 이러한 초기 뇌 발달 기간 중의 에탄올-유도 아폽토시스는 청소년기에서 성인기로 계속되는 학습과 기억 결손, 과잉행동, 정신지체, 정신병, 우울증 및 정신분열증 등을 포함하는, 신경 질환들의 원인이 된다.
- [0005] 발달 중인 뇌의 에탄올 손상의 정확한 기작은 다 알려지지 않는 않지만, 산화적 스트레스가 에탄올-유도 아폽토시스 신경퇴행에 관련된 잠재적인 기작으로 알려져 있다. 산화적 스트레스는 사이토크롬-c의 방출과 카스파제 및 아폽토시스의 활성화 이후에 나타나는 미토콘드리아 막의 탈분극을 유발 한다.
- [0006] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 에탄올에 의하여 유발된 아폽토시스에 의한 신경퇴행을 예방 및 치료할 수 있는 물질을 찾기 위해 예의 연구노력한 결과, 에탄올에 의하여 유발되는 신경세포의 손상을 피루브산이 저해할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하고, 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있는 신경세포 보호용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하는, 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있는 신경세포 보호용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성

분으로 포함하고, 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있는 신경세포 보호용 조성물을 제공한다.

- [0011] 본 발명에서 용어, "피루브산"은 화학식 CH_3COCOOH 로서, 세균·효모와 동식물 등 생물체 내에서 물질대사 중간체로 존재하는 중요한 물질로, 탄수화물(글리코젠)이 체내에서 에너지로 변환되는 동시에 젖산을 생성하는 해당(解糖)이나, 아미노산의 일종인 알라닌의 합성 등 많은 생체 내의 반응에 관여하는 것으로 알려진 물질이다. 본 발명에서는 이러한 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 에탄올에 의한 신경세포 손상을 효과적으로 억제할 수 있음을 최초로 확인하였다.
- [0012] 바람직하게, 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸은 에탄올에 의한신경세포의 아포토시스일 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 신경세포의 아포토시스를 억제하는 조성물일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 용어, "아포토시스 (apoptosis)"란 세포가 유전자에 의해 제어되어 사멸하는 증상을 의미하는데, 외부적 요인에 의한 세포의 괴사(necrosis)와는 구별된다. 상기 아포토시스는 발달과정에서는 몸의 형태를 구성하는데 이용되고, 성체에서는 정상적인 세포를 갱신하거나 이상이 생긴 세포를 제거하는데 사용된다.
- [0014] 본 발명에서 용어, "신경세포"는 근육을 포함한 타 세포의 작용을 조절하는 효과를 나타내고, 일반적 세포와 달리 전기적 방법으로 신호를 전달하며 발생 단계가 끝난 후에는 더 이상 분열하지 않는 세포를 의미한다. 이처럼 신경세포는 분열 횟수의 제한에 의해 손상시 복구가 거의 불가능하기 때문에, 정상적인 분화에 의하여 정상기능을 수행할 수 있게 하는 것이 무엇보다 중요하다. 특히, 에탄올에 노출된 신경세포의 보호는 청소년기에서 성인기에 영향을 미치며, 본 발명의 일 실시예에서는 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 에탄올에 노출된 신경세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였다(도 1 내지 6).
- [0015] 바람직하게, 본 발명의 조성물은 에탄올에 의하여 증가된 Bax 발현수준의 감소, 에탄올에 의하여 세포질로 방출되는 사이토크롬-c의 방출량 감소, 에탄올에 의하여 활성화된 카스파제-3의 발현 감소 및 에탄올에 의하여 증가된 PARP-1의 절단을 감소시킴으로써, 결과적으로는 에탄올에 의하여 유발된 아포토시스로부터 신경세포를 보호할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어, "Bax"는 아포토시스 유도인자로 알려져 있으며, Bcl-2와 유전자 염기서열이 비슷하여 Bcl-2 패밀리에 속한다. Bax가 활성화되면 아포토시스를 촉진하여 세포사멸이 증가하고, 반대로 Bcl-2가 활성화되면 아포토시스를 억제하여 세포사멸이 감소하게 되므로 Bcl-2 및 Bax 발현은 세포가 아포토시스로 진행될 때의 감수성을 결정하게 된다.
- [0017] 본 발명의 조성물을 이용한 신경세포 보호 효과는 신경세포가 존재하는 위치나 크기에 관계없이 모든 신경세포를 보호할 수 있으며, 바람직하게는 발달 중인 개체의 뇌의 피질, 해마 및/또는 시상 영역에 존재하는 신경세포일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 조성물을 이용하는 경우, 에탄올에 의해 유발되는 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호할 수 있으므로, 본 발명의 조성물은 에탄올에 의하여 직/간접적으로 유발되는 질환의 예방 및 치료에 이용될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 에탄올에 의하여 직/간접적으로 유발되는 질환을 억제시키거나 발생을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 에탄올에 의하여 직/간접적으로 유발되는 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 상기 에탄올에 의하여 직/간접적으로 유발되는 질환은 FAS (Fetal Alcohol Syndrom)-관련 뇌손상 질환, 알코올 관련 신경발달이상 (ARNDs), 태아발육저해, 태아기형 및 신생아 돌연사 증후군 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방 가능한 질환이 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 본 발명의 조성물의 투여방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 경구, 정맥 내, 피하, 피 내, 비강 내, 복강 내, 근육 내, 경피 등 다양한 방식을 이용하여 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다.
- [0022] 상기 조성물의 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 연령 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성 성분인 약물의 종류에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있으므로 상기 투여량에 의해 본 발명이 범위가 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체로,

경구 투여시에는 결합제, 활락제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우 정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 한약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다. 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필 하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0024] 바람직하게 본 발명의 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 투여 개체의 체중(kg)에 비례해서 500 내지 1500 mg/kg의 양으로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 1000 mg/kg의 농도로 투여될 수 있다. 다만, 이러한 니코틴아미드의 투여량은 투여되는 세포 또는 개체의 종류, 부피, 특징, 무게 등의 다양한 요인에 따라 시험에 의해 당업자가 결정할 수 있다.
- [0025] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하는 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸을 억제할 수 있는 신경세포 보호용 건강기능식품을 제공한다.
- [0026] 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 식품 첨가물로 사용할 경우, 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0027] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0028] 본 발명의 건강음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0029] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0030] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 에탄올에 의하여 유발된 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호하는 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서 동물은 소, 말, 코끼리, 돼지, 쥐, 인간, 사슴, 다람쥐, 토끼, 호랑이, 사자, 늑대, 염소, 표범, 곰, 고래, 물개, 박쥐, 고양이, 참새, 제비, 꿩, 매, 독수리, 고니, 천둥오리, 펭귄, 비둘기, 타조, 예뽕, 뱀, 도마뱀, 거북이, 악어, 개구리, 두꺼비, 도롱뇽, 붕어, 메기, 잉어, 가물치, 농어, 조기, 고등어, 꽂치, 갈치, 쏘가리, 광어, 우럭 또는 가오리 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 개체가 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 바람직하게, 본 발명의 신경세포 보호 방법은 에탄올에 의하여 증가된 Bax 발현수준의 감소, 에탄올에 의하여 세포질로 방출되는 사이토크롬-c의 방출량 감소, 에탄올에 의하여 활성화된 카스파제-3의 발현 감소 및 에탄올에 의하여 증가된 PARP-1의 절단 감소를 통하여 신경세포를 보호할 수 있다.
- [0033] 피루브산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병

용하여 투여 될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 신경세포 보호용 조성물은 에탄올에 의해 유도된 아폽토시스를 억제할 수 있으므로, 에탄올 등의 화합물질에 의한 신경손상의 예방 및 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1의 A는 에탄올-유도된 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 Bax 단백질 발현 수준에 대한 피루브산염의 영향을 나타내는 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

도 1의 B는 에탄올-유도된 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 Bcl-2 단백질 발현 수준에 대한 피루브산염의 영향을 나타내는 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

도 2는 에탄올-유도된 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 세포질 사이토크롬-c 단백질 발현 수준에 대한 피루브산염의 영향을 나타내는 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

도 3의 A는 에탄올-유도된 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 활성화된 카스파제-3 단백질 발현 수준에 대한 피루브산염의 영향을 나타내는 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

도 3의 B는 에탄올-유도 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 활성화된 카스파제-3 단백질 발현 수준에 대한 피루브산염의 영향을 나타내는 신경세포의 니슬 염색 사진이다.

도 4는 에탄올-유도된 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 잘린 PARP-1 단백질 발현 수준에 대한 피루브산염의 영향을 나타낸 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 그래프이다.

도 5는 에탄올-유도 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 신경세포에 대한 피루브산염의 영향을 나타내는 FJB 염색 사진이다.

도 6은 에탄올-유도 7일령 랫트로부터 피질, 해마, 시상 내에서 신경세포에 대한 피루브산염의 영향을 나타내는 니슬 염색 사진이다.

도 7은 에탄올-유도 아폽토시스의 피루브산염의 영향을 나타내는 개요도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 실시예에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1: 실험 동물 준비 및 약물 처리

[0038] 모든 실험에서 7일령 스프레그-돌리 랫트(평균 몸무게 18 g)를 사용하였고, 4개의 서로 다른 그룹으로, 즉 대조군, 에탄올 처리군, 피루브산염 처리군, 및 에탄올+피루브산염 처리군으로 균등 분배하였다. 상기 대조군에는 상기 랫트의 피하에 식염수만을 주사하고, 에탄올 처리군에는 상기 랫트의 피하에 에탄올(5 g/kg)을 주사하였으며, 상기 피루브산염 처리군에는 상기 랫트의 피하에 0.9% 식염수에 용해시킨 피루브산염(1000 mg/kg)을 주사하였다. 상기 각 군의 실험동물을 약물 처리 4-48 시간 후에 희생시켰다.

[0039] 실시예 2. 웨스턴 블랏

[0040] 상기 실시예 1에서 희생시킨 4군의 실험동물로부터 뇌를 적출하고, 이로부터 피질, 해마 및 시상하에 대한 시료를 획득하였다. 상기 각 시료를 단백질을 분해효소 저해제 콕테일(protease inhibitor cocktail)이 함유된 0.2 M PBS에 넣어 균질화하고, 상기 균질화된 시료에 각각에 포함된 단백질 40 μ g을 10-15% SDS-PAGE에 적용한 다음, 전기영동된 단백질을 PVDF 막(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 이동시키고, 토끼 유래의 항-Bcl-2, 항-Bax, 및 항-카스파제-3, 항-PARP-1 항체 그리고 염소 유래의 다클론 항-사이토크롬-c (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[0041] 실시예 3: 조직분리 및 준비

[0042] 실험동물은 약물 처리 24시간과 48시간 후 희생시켰다. 대조군 랫드로부터의 뇌 절편 및 24시간 동안 에탄올 주입 후 뒤이은 피루브산염을 처리한 랫드로부터의 뇌 절편을 분석하였다. 조직 분석을 위해 (그룹 당 n = 4-5), 발달 중인 어린 랫트는 얼음처럼 차가운 4% 파라포름알데하이드로 관류시킨 후에, 1 $\times$ PBS로 경심(transcardially) 관류하였다. 그리고 뇌를 4% 파라포름알데하이드에서 밤새 고정시켰으며, 상기 뇌가 튜브의 바닥으로 가라앉을 때까지 20% 수크로스로 이동시켰다. 뇌는 O.C.T 혼합물에서 (A.O. USA) 얼리고, 16 μ m 두께로 관상면 절편 (coronal plane)을 제작하였다 (Leica cryostat CM 3050C, Germany). 절편을 탐침이 있는 양이온 슬라이드 (Fisher)에 얼리고 고정하였다.

[0043] 실시예 4 : 면역조직화학 염색

[0044] 면역조직화학을 하기 방법에 따라 수행하였다. 슬라이드를 0.01 M PBS로 세척하고, 10분간 3% 과산화수소가 포함된 메탄올 용액에서 냉각시켰다. 그 후 1시간 동안 블로킹 용액 (2% BSA/0.2% milk/0.1% Triton-X 100 in PBS)에서 배양하였고, 이어서 밤새 블로킹 용액에 1:1000로 희석한 토끼 항-활성 카스파제-3 항혈청 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)에서 배양하였다. 일차적인 항혈청과 함께 배양한 후, 절편은 90분 동안 이차적인 항혈청 (블로킹 용액 내에 염소 항-토끼 1:200)에서 배양하였고, 그 후 90분 동안 암실에서 ABC 시약 (standard Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA)에서 반응시켰다. 절편을 PBS로 두 차례 세척하였고, VIP 시약 (Vector VIP substrate kit for peroxidase, Vector Labs, Burlingame, CA)과 함께 보라색을 발현시키기 위해 배양하였다. 이미지는 형광 광학현미경으로 관찰하였다. 각 절편의 다른 부위의 활성 카스파제-3-양성 세포는 처리조건에 따른 관찰자의 오차를 최소화해서 그 숫자를 계산하였다.

[0045] 실시예 5 : FJB (Fluoro-Jade B) 염색

[0046] 하기 방법에 따라 FJB (Fluoro-Jade B) 염색을 수행하였다. 약물 처리 24시간 후, 실험 동물을 깊게 마취시키고, 0.9% 살린, 뒤이어 0.1 M PBS (phosphate-buffered saline) 내에 얼음처럼 차가운 4% 파라포름알데하이드로 경심(transcardially) 관류시켰다. 요약하면, 뇌 절편을 슬라이드에 고정하였고, 밤새 공기-건조시켰다.

[0047] 슬라이드를 1% 수산화나트륨 및 80% 에탄올 용액에 5분간 담군 후, 2분간 70% 알코올, 뒤이어 2분간 증류수에 담갔다. 그 후 슬라이드를 0.06% 과망간산칼륨 용액에서 10분간 이동시켰다. 물로 씻어준 후, 슬라이드를 0.1% 아세트산 및 0.01% FJB (Chemicon International, USA) 용액에 20분간 담갔다.

[0048] 슬라이드를 증류수로 2번 세척하였고, 10분간 건조시켰다. 유리 커버 슬립을 고정 배지에 있는 유리 슬라이드에 고정하였다. FJB (녹색)를 검출하기 위해 FITC 필터를 사용하여 공초점 레이저 현미경 (confocal laser scanning microscope) (Fluoview FV 1000, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 각 절편의 다른 부위에서 FJB-양성의 세포는 처리조건에 따른 관찰자의 오차를 최소화해서 그 숫자를 계산하였다.

[0049] 실시예 6: 니슬 염색 (Nissl staining)

[0050] 니슬 염색에 사용할 수 있는 염기성아닐린염료인 크레실 바이올렛을 신경세포 손실의 조직학적 검사 및 측정을 위해 조직 절편을 염색하는데 사용하였다. 발달 중인 랫트 뇌의 니슬 조직학과 사멸 및 손상된 신경의 존재 및 부재를, 16 μ m 두께의 뇌 절편을 고정시킨 슬라이드를 현미경으로 분석하였다. 모든 검사한 어린 랫트로부터 얻은 절편은 상승 알코올 (70-100%)에서 탈지하였고, 강하 알코올 (95-70%)에서 수소화하였고, 아세테이트 버퍼 pH 5.0에서 세척한 후, 뒤이어 0.25% 크레실 바이올렛으로 약 15분간 염색하였다. 절편을 증류수로 세척하고 다단계 에탄올에서 탈수소시켰다. 이미지는 형광 광학현미경으로 관찰하였다.

[0051] 실시예 7 : 데이터 분석 및 통계

[0052] RT-PCR 및 웨스턴 블랏의 밴드를 스캔하고 시그마 젤 시스템 (Sigma Gel System, SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용해서 밀도측정을 함으로써 분석하였다. 밀도 값은 $\pm$ 표준오차 (SEM)로서 표현하였다. 통계학적 차이는 일원변량분석 (ANOVA, one-way analysis of variance)과 뒤 이은 스튜던트티검정 (Student's *t*-test)으로 결정하였다. 모든 실험에서, 통계적인 유의미성을 위한 허용 수준은 $P < 0.05$ 로 고려하였다.

[0053] 결과

[0054] 1. 발달 중인 랫트의 뇌안의 에탄올-유도 Bax의 상향조절에 대한 피루브산염의 영향

[0055] Bcl-2 족 맴버인 프로-아포토시스 Bax와 항-아포토시스 Bcl-2가 미토콘드리아 내 아포토시스 경로의 주요 조절자이며 Bax는 에탄올-유도 아포토시스 신경퇴행에 관여되기 때문에 Bax 단백질의 발현 수준에 대한 피루브산염의 효과를 조사하였다.

[0056] 구체적으로, 피질, 해마, 시상 내 Bax 단백질 수준을 측정하였다. 에탄올 (5 g/kg) 단독 또는 에탄올과 피루브산염 (1000 mg/kg)을 동시 피하 주사한 후, 4시간 후에 발달 중인 랫트의 뇌에서 Bax 단백질의 발현 수준을 측정하였다.

[0057] 에탄올 단독 처리는 피질, 해마, 시상 내에서 Bax의 발현을 상당히 증가시켰고, 에탄올과 피루브산염의 동시 처리는 뇌의 동일 부위 내에서 에탄올-유도 Bax 상향조절을 억제하였다 (도 1의 A). 한편, 뇌의 동일 부위 내에서 Bcl-2 발현의 증가는 관찰되지 않았다(도 1의 B). 이는 에탄올-유도 아포토시스 신경퇴행에 대항한 피루브산염의 방어영향이 대조군에 비하여, 프로-아포토시스 Bax의 상향조절을 저해하는 능력 때문임을 암시하는 것으로 분석되었다.

[0058] 도 1의 경우, 상기 실시예 1에서 기술 한 방법으로, 7일령 랫트에 4시간 동안 에탄올을 처리한 후, 피루브산염을 처리하여 피질, 해마, 시상 내의 Bax (A) 및 Bcl-1 단백질 (B)의 발현 수준을 실시예 2에서 기술한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행한 사진 및 그래프이다. 에탄올 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용하여 수량화 되었고, 밴드들 사이의 차이는 그래프로 표현하였다. 액틴은 단백질 로딩의 대조군으로 사용되었다. Bax에 해당하는 단백질이 존재할 때의 밀도 값은 $\pm$ 표준오차 (SEM)로서 표현하였다($n = 4-5$ 동물 실험/그룹). Y축 상의 밀도값은 임의의 유닛 (arbitrary units, AU)으로 표현되었다 (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b 피루브산염과 유의미하게 다름; ^c에탄올+피루브산염과 유의미하게 다름; ^d에탄올과 유의미하게 다름). 유의미성= $P < 0.05$.

[0059] 또한, 에탄올 단독 처리는 Bax/Bcl-2 비율의 증가를 유도하여 아포토시스 신경퇴행을 진행시키는 반면, 피루브산염과 동시 처리하였을 경우, Bax/Bcl-2 비율을 상당히 감소시켜 발달 중인 랫트의 뇌의 아포토시스 활성을 저해시키는 것을 도 7 개요도에서 알 수 있었으며, 이는 피루브산이 에탄올-유도된 아포토시스에서 항-아포토시스가 가능한 물질임을 암시하는 것으로 분석되었다.

[0060] 도 7의 경우, 에탄올()이 GABA나 NMDA 수용기()와 결합하면 아포토시스의 원인이 되고 ROS를 생성하며 미토콘드리아 의존형 아포토시스가 활성화되고, Bax의 상향조절이 시작되고, 미토콘드리아에서 세포질로 방출되는

사이토크롬-c가 증가하고, 활성화된 카스파제-3의 발현과 NAD⁺의 고갈 (파란 화살표)과 함께 PARP-1의 절단이 일어나는 것을 보여주는 개요도이다.

[0061] X 표시로 표시된 피루브산염 처리 후의 영향은 ROS의 생성을 억제하고 아포토시스 연쇄반응의 몇몇의 주요 요소로서, Bax의 하향조절이 시작되고, 미토콘드리아에서 세포질로 방출되는 사이토크롬-c가 감소하고, PARP-1의 절단이 저해되고 ATP와 NAD⁺가 고갈되는 것을 보호한다 (). 그 결과, 발달 랫트의 뇌에서 발생하는 에탄올-유도 아포토시스로부터 신경세포를 보호하는 구체적인 기작을 설명할 수 있는 것으로 분석되었다.

[0062] 2. 발달 중인 랫트의 뇌안의 에탄올-유도 세포질 사이토크롬-c 수준에 대한 피루브산염의 영향

[0063] 미토콘드리아 막 사이의 단백질 사이토크롬-c가 세포질로 이동하면 카스파제-9와 카스파제-3의 활성화 및 이어지는 아포토시스를 유도하기 때문에 세포질 사이토크롬-c 수준에 대한 피루브산염의 효과를 조사하였다.

[0064] 구체적으로, 피질, 해마, 시상 내 세포질의 사이토크롬-c 단백질 수준을 측정하였다. 에탄올 (5 g/kg) 단독 또는 에탄올과 피루브산염 (1000 mg/g)을 동시 피하 주사한 후, 4시간 후에 발달 중인 랫트의 뇌에서 세포질의 사이토크롬-c 단백질의 발현 수준을 측정하였다. 에탄올 단독 처리는 피질, 해마, 시상 내에서 세포질 내 사이토크롬-c 수준을 증가시켰고, 에탄올과 피루브산염의 동시 처리는 에탄올 단독 처리된 군과 비교하여, 미토콘드리아로부터 세포질로 사이토크롬-c의 이동을 상당히 감소시켰다 (도 2).

[0065] 도 2의 경우, 상기 실시예 1 및 2에서 기술한 방법으로 실험을 수행한 후, 웨스턴 블랏을 수행한 사진 및 그래프이다. 도 2의 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용하여 수량화 되었고, 밴드들 사이의 차이는 그래프로 표현하였다. 액틴은 단백질 로딩의 대조군으로 사용되었다. Bax에 해당하는 단백질이 존재할 때의 밀도 값은 $\pm$ 표준오차 (SEM)로서 표현하였다 (n = 4-5 동물실험/그룹). Y축 상의 밀도값은 임의의 유닛 (arbitrary units, AU)으로 표현되었다 (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b피루브산염과 유의미하게 다름; ^c에탄올+피루브산염과 유의미하게 다름; ^d에탄올과 유의미하게 다름). 유의미성= P < 0.05.

[0066] 상기 도 2의 결과는 상기 결과 1의 피루브산의 Bax 단백질 수준 조절 결과와 일치하며, 이는 피루브산이 에탄올-유도된 아포토시스에서 항-아포토시스가 가능한 물질임을 암시하는 것으로 분석되었다.

[0067] 3. 발달 중인 랫트의 뇌안의 에탄올-유도 카스파제-3의 활성화에 대한 피루브산염의 영향

[0068] 카스파제 활성화는 일반적인 아포토시스 경로의 중요 증거이기 때문에 미토콘드리아 막 탈분극과 사이토크롬-c 방출이 저해에 대한 피루브산염의 효과를 조사하였다. 또한 활성화된 카스파제-3의 저해와 같은 하류 세포경로 수준에 대한 피루브산염의 효과도 조사하였다.

[0069] 구체적으로, 피질, 해마, 시상 내에서 활성화된 카스파제-3의 단백질 수준을 아포토시스 마커를 이용하여 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다. 아포토시스 마커는 발달 중인 랫트에서 에탄올에 의하여 과활성화되기 때문이다. 에탄올 단독 처리는 피질, 해마, 시상 내에서 활성화된 카스파제-3의 수준을 증가시켰다. 에탄올과 피루브산염을 동시 처리한 경우, 처리하지 않은 대조군 또는 피루브산염만 단독 처리한 대조군이 나타내는 유사한 수준까지, 활성화된 카스파제-3의 수준을 유의하게 감소시켰다 (도 3의 A). 이로부터 피루브산이 에탄올-유도된 아포토시스에서 항-아포토시스가 가능한 물질임을 알 수 있었다.

[0070] 도 3의 A의 경우, 상기 실시예 1 및 2에서 기술한 방법으로 실험을 수행한 후, 웨스턴 블랏을 수행한 사진 및 그래프이다. 도 3의 A의 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용하여 수량화 되었고, 밴드들 사이의 차이는 그래프로 표현하였다. 액틴은 단백질 로딩의 대조군으로 사용되었다. 사이토크롬-c와 활성화된 카스파제-3에 해당하는 단백질이 존재할 때의 밀도 값은 $\pm$ 표준오차 (SEM)로서 표현하였다 (n = 4-5 동물실험/그룹). Y축 상의 밀도값은 임의의 유닛 (arbitrary units, AU)으로 표현되었다 (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b피루브산염과 유의미하게 다름; ^c에탄올+피루브산염과 유의미하게 다름; ^d에탄올과 유의미하게 다름). 유의미성= P

<0.05.

4. 발달 중인 랫트의 뇌안의 활성 카스파제-3 발현에 대한 동시 처리한 피루브산염의 영향

결과 3의 에탄올 처리 후 아포토시스의 발병에서 활성화된 카스파제-3에 대한 피루브산염의 웨스턴 블롯의 결과를 면역조직화학적 분석으로 보완하였다.

에탄올 처리 24시간 후, 피질, 해마, 시상 내에서 활성화된 카스파제-3의 발현을 크레실 염색을 통해 분석하였다. 에탄올 단독 처리는 랫트의 대상피질, 해마의 CA1과 시상의 LDN 내에서 강하게 활성화된 카스파제-3 면역반응성을 보이는 손상되고 죽은 신경세포가 많이 관찰하였다 (도 3의 B, 패널 B, E, H). 에탄올과 피루브산염의 동시 처리는 뇌의 동일 부위 내에서 활성화된 카스파제-3-양성 세포의 수가 상당히 감소시켰다 (도 3의 B, 패널 C, F, I). 이는 피루브산이 에탄올-유도된 아포토시스에서 항-아포토시스가 가능한 물질임을 나타낸다.

도 3의 B의 경우, 상기 실시예 4에서 기술한 방법으로 면역조직화학적 분석 수행한 것을 보여주는 현미경 사진이며 피루브산염 처리 또는 미처리에 관계없이 에탄올 처리한 경우의 신경세포를 나타낸다. 크레실 염색을 한 세포 안의 신경 광학현미경사진은 에탄올과 피루브산염을 동시 처리한 발달 중인 랫트의 뇌의 절편을 나타낸다. 이미지는 적어도 그룹당 4~6 동물실험에서 준비된 절편의 염색물을 나타낸다. 니슬 염색의 패널 (A-I)은 40 x objective field를 가지는 높은 확대율, 스케일 바 = 20 μ m. (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b피루브산염과 유의미하게 다름; ^c에탄올+피루브산염과 유의미하게 다름; ^d에탄올과 유의미하게 다름). 유의미성= $P < 0.05$.

5. 발달 중인 랫트의 뇌안의 에탄올-유도 PARP-1의 절단에 대한 피루브산염의 영향

활성화된 카스파제-3가 DNA 회복에 중요한 PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1)을 포함하는 단백질들을 자름으로써 아포토시스를 촉진하면서 피루브산염이 그에 대한 보호 영향을 미치는지 조사하였다.

웨스턴 블랏 분석으로 발달 중인 랫트의 피질, 해마, 시상 내에서 아포토시스 동안 나타나는 카스파제-3의 활성화의 증가에 의해 PARP-1이 잘리는 것을 알 수 있었다. 에탄올 단독 처리는 군의 피질, 해마, 시상 내에서 PARP-1의 절단 수준은, 대조군과 피루브산염-처리한 군보다 상당히 강화되었다. 에탄올과 피루브산염의 동시 처리는 발달 중인 랫트의 동일 뇌 부위내에서 카스파제-3로 잘린 후, 총 길이 116 kDa PARP-1가 89 kDa의 PARP-1의 생성물들을 생성하는 데 있어 상당한 감소를 초래하는 것을 알 수 있었다 (도 4). PARP-1가 절단되면 불활성화가 되어 DNA가 붕괴되는 아포토시스가 유발됨을 확인하였다.

도 4의 경우, 상기 실시예 1 및 2에서 기술한 방법으로 실험을 수행한 후, 웨스턴 블랏을 수행한 사진 및 그래프이다. 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용하여 수량화 되었고, 밴드들 사이의 차이는 그래프로 표현하였다. 액틴은 단백질 로딩의 대조군으로 사용되었다. 카스파제-3와 카스파제-3로 잘린 89 kDa PARP-1에 해당하는 단백질이 존재할 때의 밀도 값은 $\pm$ 표준오차 (SEM)로서 표현하였다 ($n = 4-5$ 동물실험/그룹). Y축 상의 밀도 값은 임의의 유닛 (arbitrary units, AU)으로 표현되었다 (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b피루브산염과 유의미하게 다름; ^c에탄올+피루브산염과 유의미하게 다름; ^d에탄올과 유의미하게 다름). 유의미성= $P < 0.05$.

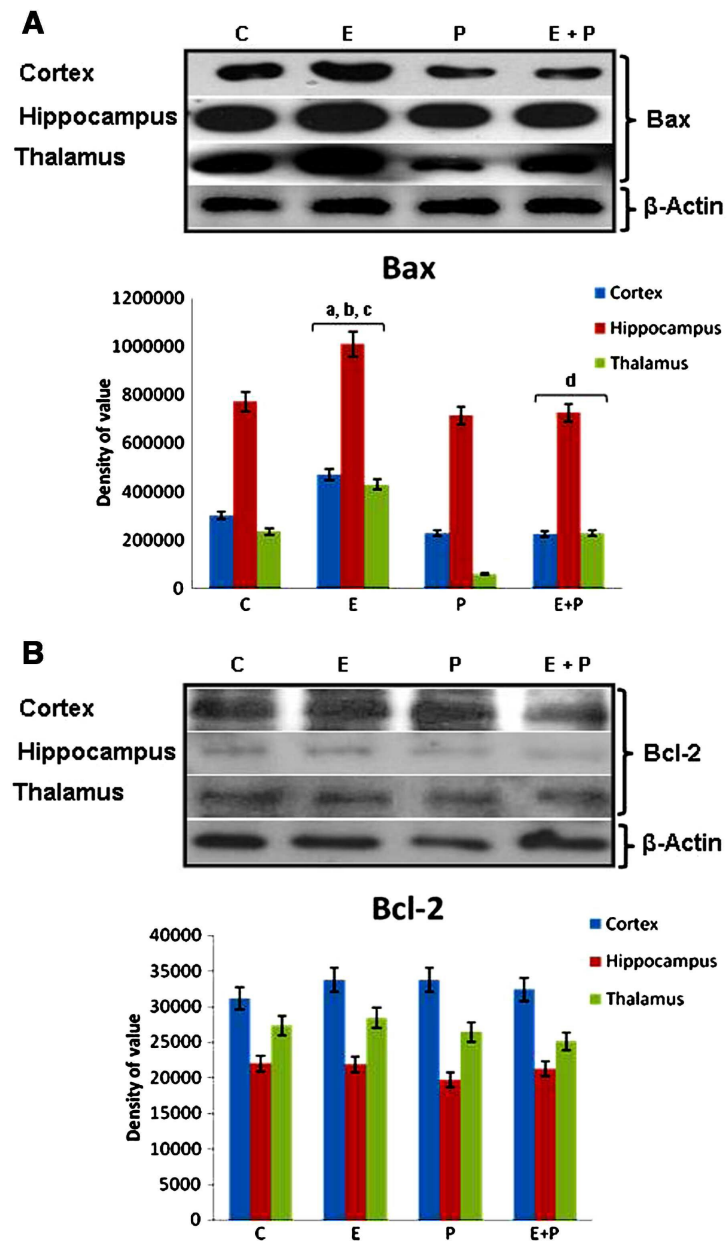
따라서, 에탄올에 노출된 이후의 랫트의 뇌의 피질, 해마, 시상 내에서 PARP-1 절단이 증가하는 것을 보여준다. 그리고 피루브산염이 뇌의 동일 부위 내에서 에탄올-유도된 PARP-1의 절단 수준을 대조군에서 나타내는 수준까지 유의하게 감소시킨다. 이로부터, 피루브산이 에탄올-유도된 아포토시스를 억제할 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

6. 발달 중인 랫트의 뇌안의 에탄올-유도 신경퇴행에 대한 동시 처리한 피루브산염의 영향

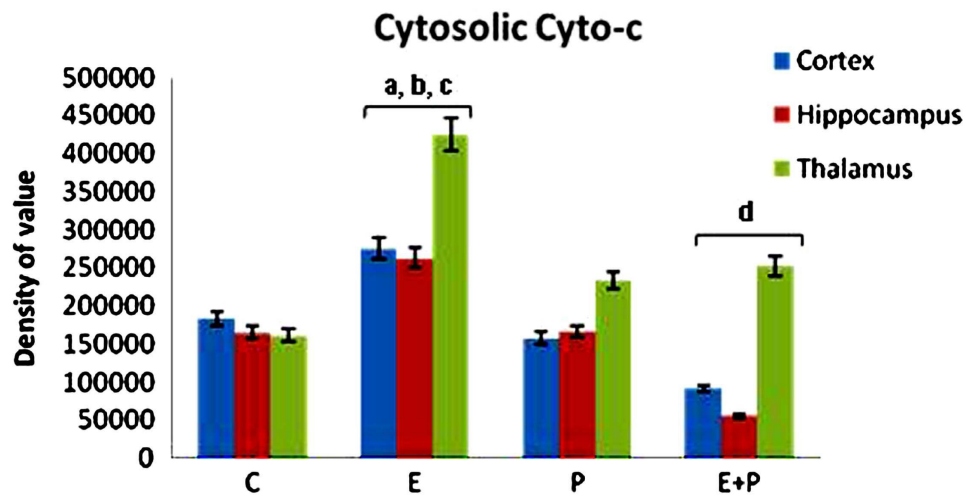
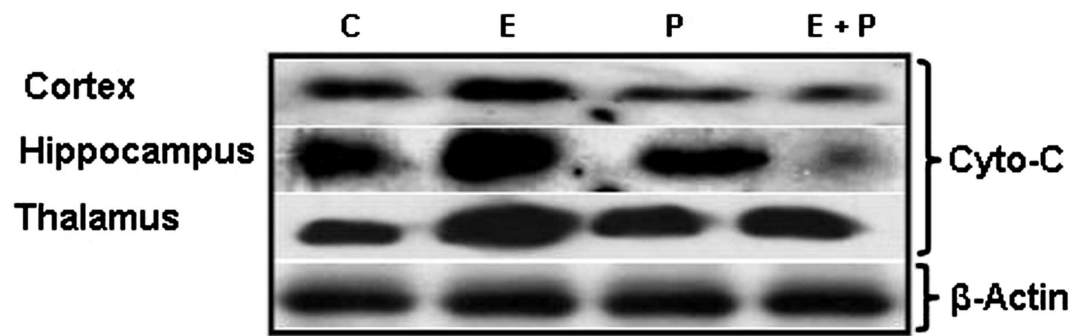
- [0081] 신경세포의 취약성에 대하여 신뢰할 수 있는 마커인, 음이온 형광색소인 FJB (Fluoro-Jade-B)을 사용하여 다양한 생존 시기 후의 퇴행하는 신경을 염색하였다.
- [0082] 에탄올 단독 처리 24시간 후, 전두대상피질, 해마의 CA1과 시상의 LDN에서 많은 죽은 신경세포들이 보였다. 구체적으로, 에탄올 단독 처리 랫트의 전두대상피질, 해마의 CA1과 시상의 LDN에서 FJB-양성 세포들의 전체 수에 상당한 증가가 나타났다 (도 5, 패널 Bb, Ee와 Hh). 에탄올과 피루브산염의 동시 처리는 어린 랫트의 뇌의 동일 부위 내에서 FJB-양성 세포의 수의 상당한 감소를 보였다 (도 5, 패널 Cc, Ff와 Ii).
- [0083] 도 5의 경우, 상기 실시예 5에서 기술한 방법으로 수행한 FJB 염색된 사멸 및 손상된 신경세포를 화살표로 나타낸다. 이미지는 적어도 그룹 당 4~6 동물실험에서 준비된 절편의 염색물을 나타낸다. FJB의 패널 (c-k = 60 x) 는 패널 (c-k = 20 x)로부터 확대된 그림이다. 스케일 바 = 20 μ m. (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b피루브산염과 유의미하게 다름; ^c에탄올+피루브산염과 유의미하게 다름; ^d에탄올과 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.
- [0084] 에탄올에 의해 유도된 아포토시스의 정도를 조사하고 발달 중인 랫트 뇌의 피질, 해마, 시상의 피루브산염 보호를 평가하기 위해 48시간 후에 니슬 염색을 수행하였다. 이 방법으로 대상피질, 해마의 CA1과 시상의 LDN 안의 죽은 신경세포들의 표식을 명확히 알 수 있었다. 구체적으로, 작거나 하얗게 응고되거나, 조직이 파괴되거나, 남색핵, 아포토시스 몸체로 알 수 있었다. 대조군과 비교했을 때 에탄올 단독 처리는 대상피질, 해마의 CA1과 시상의 LDN 안에 신경세포의 손실, 핵포화, 세포 붕괴가 상당한 수로 증가하였다 (도 6, 패널 B, E 와 H). 이때, 대조군 동물의 뇌 부위는 형태학적으로 정상이었다. 한편, 에탄올과 피루브산염의 동시 처리는 뇌의 동일 부위 내에서 상당히 적은 핵포화 현상과 신경세포의 손실을 보였다 (도 6, 패널 C, F 와 I). 따라서, 피루브산이 에탄올-유도된 아포토시스에서 항-아포토시스가 가능한 물질임을 알 수 있었다.
- [0085] 도 6은 에탄올 처리 48시간 후, 상기 실시예 7에서 기술한 방법으로, 피루브산염을 처리한 경우의 손상 및 사멸된 신경세포를 보여준다. 이미지는 적어도 그룹당 4~6 동물실험에서 준비된 절편의 염색물을 나타낸다. 니슬 염색의 패널 (A-I) = 40 x objective field를 가지는 높은 확대율, 스케일 바 = 20 μ m. (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b피루브산염과 유의미하게 다름; ^c에탄올+피루브산염과 유의미하게 다름; ^d에탄올과 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도면

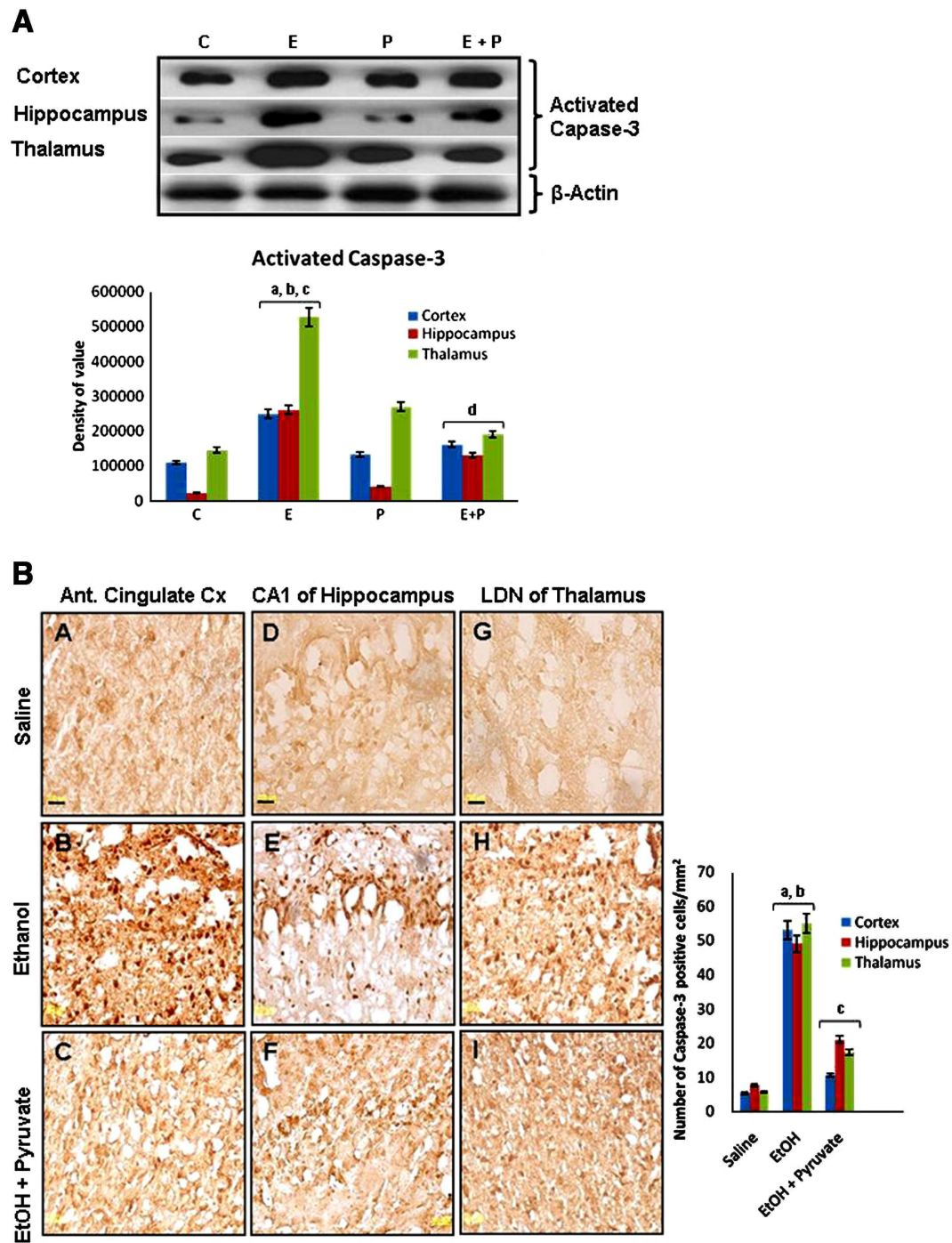
도면1



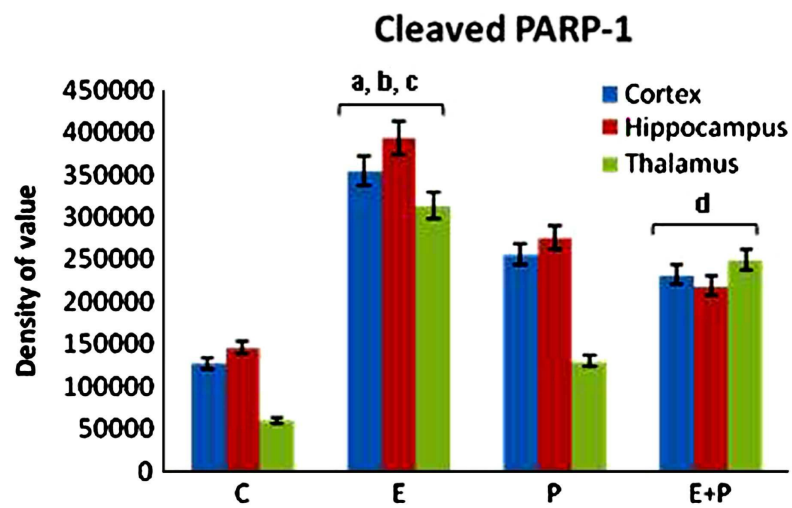
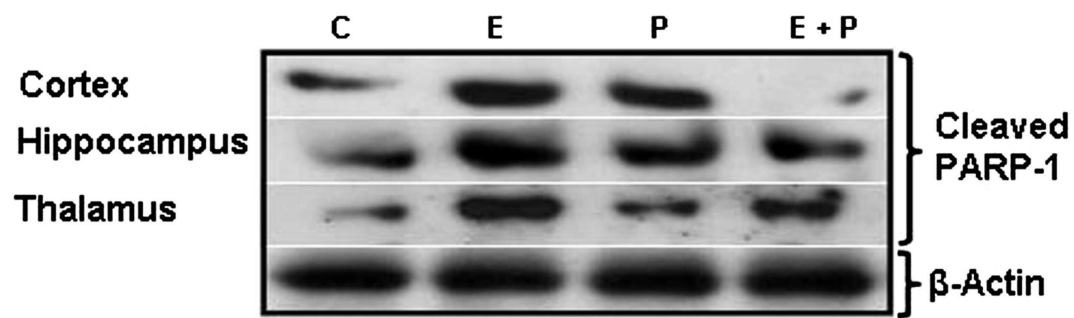
도면2



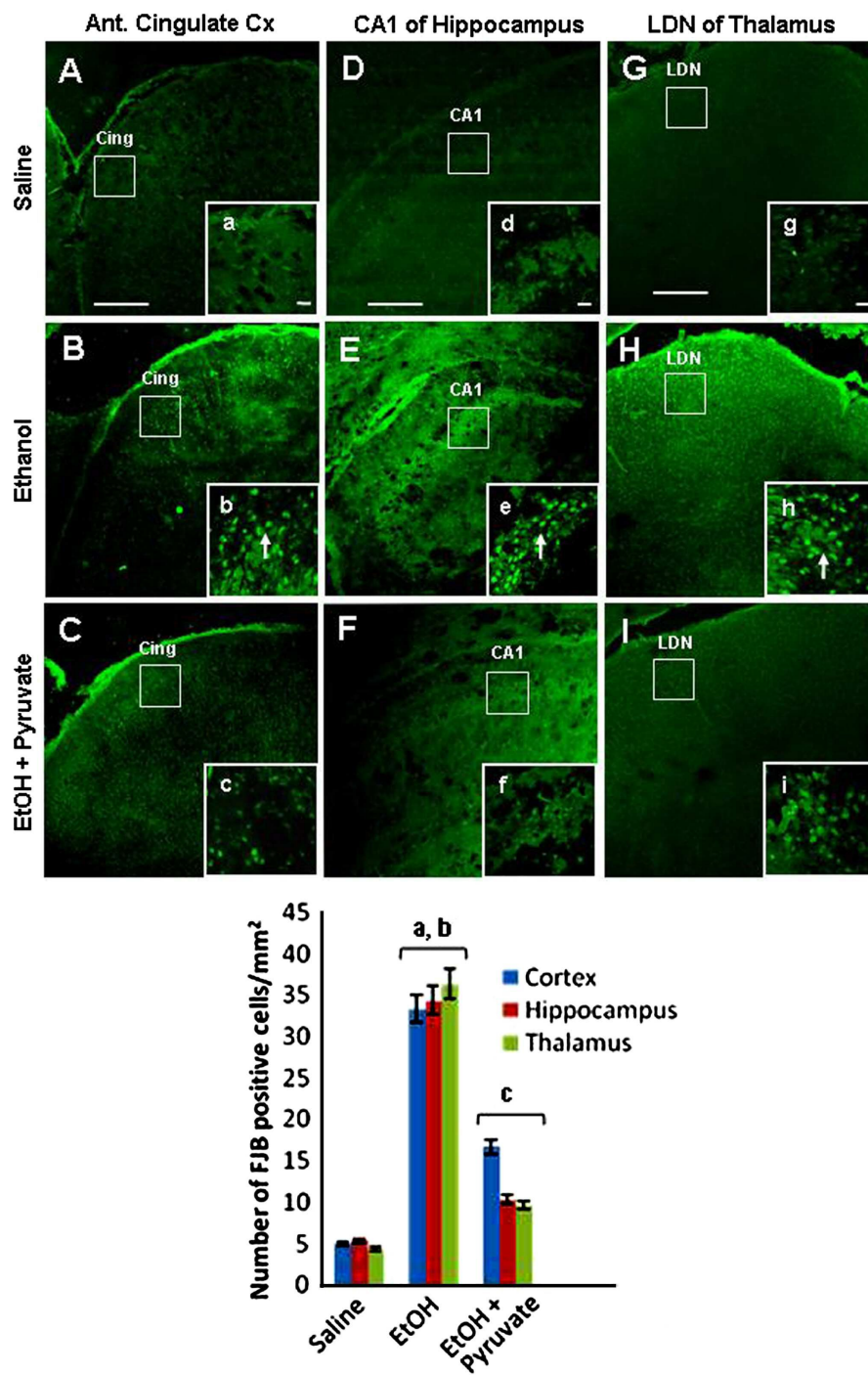
도면3



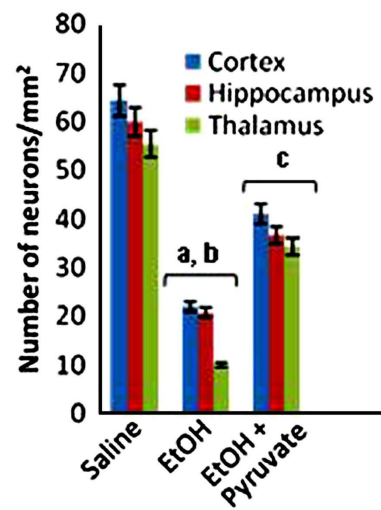
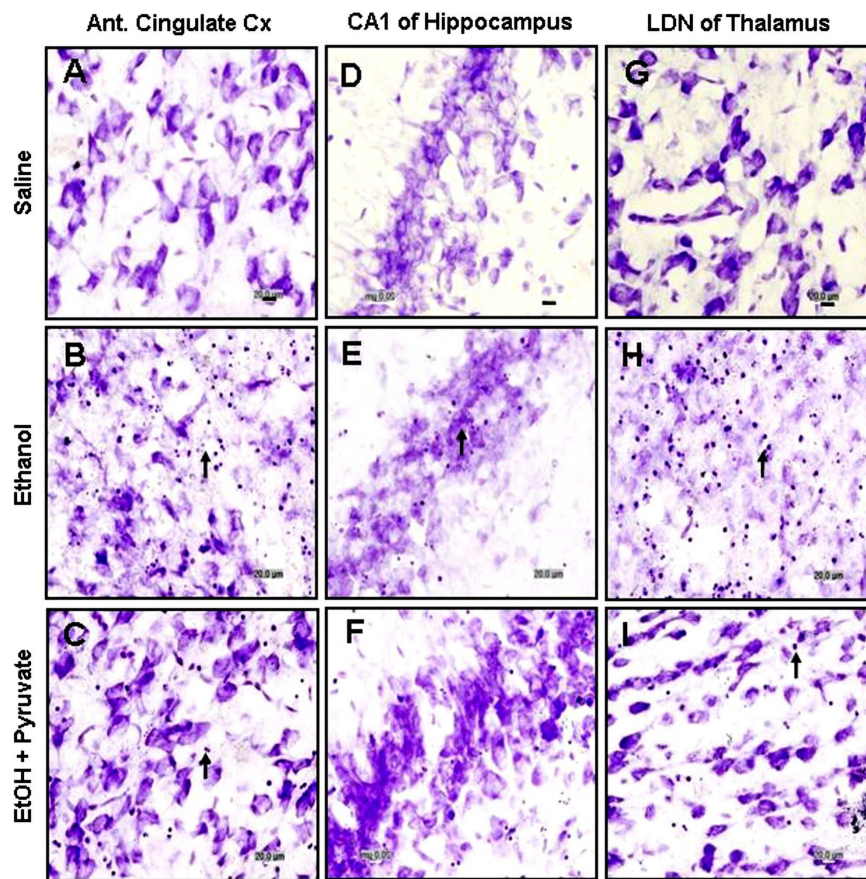
도면4



도면5



도면6



도면7

