

혈청결핍 상태에서 크레아틴이 RGC-5세포의 생존에 미치는 영향

김재우 · 홍정흠 · 강선희 · 김윤영

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

목적: 혈청결핍 상태에서 세포의 에너지 전구물질로 작용하는 크레아틴이 RGC-5세포의 생존에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다.
대상과 방법: 혈청이 포함되지 않은 배지에서 RGC-5세포를 5 mM의 크레아틴에 노출시킨 후 세포의 생존을 MTT assay로 측정하였으며, 미토콘드리아의 호흡활성도를 resazurin assay로 조사하였다. 세포고사의 정도를 알아보기 위해 acridine orange/Hoechst 33342로 생체염색을 시행하였으며 annexin/PI 이중염색을 이용한 유세포분석을 시행하였다.
결과: 크레아틴은 혈청결핍상태에서 RGC-5세포의 생존을 유의하게 증가시켰으며, 생체염색과 유세포분석에서 세포고사를 감소시켰다. 이러한 효과는 미토콘드리아의 호흡활성의 증가와 동반되어 나타났다.
결론: 에너지 전구물질인 크레아틴은 혈청결핍상태에서 세포의 생존을 증가시켰으며 이는 크레아틴이 망막신경절세포의 보호할 가능성이 있음을 보여 준다.
(대한안과학회지 2011;52(5):618-623)

호기성 해당과정은 뇌에서 ATP를 합성하는 일차경로로 알려져 있으며¹ 소량의 포도당과 산소, 글리코겐이 저장되어 있는 경우 해당의 정도는 혈류량과 산소의 획득과 밀접하게 관련되어 있고 이러한 해당과정은 ATP의 이용과 연관되어 진행된다.² ATP를 신속하게 합성하는 또 다른 경로로는 creatine kinase/phosphocreatine system이 있는데 이는 adenine nucleotide가 phosphocreatine과 크레아틴에 평형을 이루는 기질의 인산화 과정을 통해 일어난다. 따라서 creatine kinase/phosphocreatine system은 신경세포 같은 고도의 에너지를 요하는 세포에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며³⁻⁵ 이러한 ATP의 결핍이나 산화스트레스, glutamate의 증가는 신경세포의 사멸을 유발하게 된다.⁶

에너지 전구물질인 크레아틴을 투여할 경우 신경세포에서 신경독성물질에 대한 보호효과를 나타내며 동물실험에서는 퇴행성 신경병증의 진행을 늦추는 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.⁷ 대사성 또는 산화 스트레스나 허혈 상태에서 세포 내 크레아틴을 증가시키면 creatine/phosphocreatine에

대한 기질로 작용하여 세포 내 ATP 합성을 보완해줌으로써⁸⁻¹⁴ 미토콘드리아의 permeability transition을 막아 세포고사를 저하시키는 것으로 알려져 있다.^{15,16}

망막은 고도로 분화된 조직으로 광신호를 전기 에너지로 바꾸어 중추신경계로 신호를 전달하는데 이를 위해 망막은 높은 수준의 에너지를 요하며 고농도의 크레아틴을 포함하고 있으나¹⁷ 크레아틴이 망막세포에 미치는 영향은 아직 자세히 알려져 있지 않다. RGC-5세포는 변형된 망막세포주으로써 망막신경절세포와 유사하게 특이한 표지자를 발현하며 혈청결핍이나 산화스트레스에 대해 미토콘드리아와 관련된 경로를 통해 세포고사가 유발된다.¹⁸

본 연구에서는 RGC-5세포를 이용하여 혈청결핍상태를 유발한 후 크레아틴이 세포의 생존에 미치는 영향과 미토콘드리아의 관련 여부에 대해 알아보려고 하였다.

대상과 방법

세포배양과 생존율 검사

RGC-5 수립세포주를 해동 분주하여 DMEM (Dulbecco's modified Eagles Medium) 배지에 10% 우태아혈청을 첨가하여 배양하였다. 세포를 24-well plate에 옮겨 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 혈청이 없는 저농도(5 mM) 포도당 DMEM배지를 이용하여 4일간 배양하였다. 이때 실험군에서는 5

■ 접수 일: 2010년 8월 13일 ■ 심사통과일: 2010년 11월 9일
■ 게재허가일: 2011년 3월 8일

■ 책임저자: 김 재 우
대구시 남구 대명 4동 3056-6
대구가톨릭대학교병원 안과
Tel: 053-650-4728, Fax: 053-627-0133
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

* 이 연구는 2009년도 대구가톨릭대학교 의과대학연구소의 연구비 지원으로 이루어졌음.

mM 크레아틴을 첨가하였다.

세포의 생존에 대한 효과는 세포생존과 세포독성의 선별 검사로 흔히 이용되고 있는 발색검사의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St. Louis, USA) assay를¹⁹ 이용하였다. MTT assay는 약물처리한 세포의 배지에 MTT를 각 well 당 100 μ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액(D-PBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco, Carlsbad, USA)으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide를 각 well당 0.5 ml씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well 배양 접시에 200 μ l씩 옮겨 분광광도계(FLUOstar OPTIMA, BMG labtech, Offenburg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 생존 정도는 혈청을 처리한 대조군을 100%로 하여 혈청을 처리하지 않은 군을 크레아틴을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 측정치를 대조군에 대한 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

세포고사 측정

세포고사를 형태학적으로 관찰하기 위하여 5 mM 크레아틴을 4일간 처리한 후 acridine orange (AO: Sigma, St Louis, MO, USA)와 Hoechst 33342 (HO: Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하여 AO/HO 이중생체 염색을 하였다.²⁰ 각 세포군을 트립신 처리하여 원심분리한 다음 10 μ l의 세포부유액에 10 μ l의 AO/HO 용액을 섞어 흔든 다음 청색채널의 즉시 형광현미경(Axiophot HBO 50, Zeiss, Schwaben, Germany)으로 관찰하였다. 이때 AO/HO 용액의 최종 농도는 0.001% AO, 5 μ g/ml HO로 하였다.

세포고사의 정도를 정량하기 위하여 상용의 kit (TACS Annexin V-FITC apoptosis detection kit, R & D systems, Minneapolis, USA)를 이용하여 FITC-Annexin/propidium iodide (PI) 이중염색을 시행한 후 유세포분석을 시행하였다.²¹ 4일간 배양한 세포를 트립신으로 분리하여 원심분리한 후 세척한 다음 5 μ l의 Annexin V와 1 μ l의 PI를 100 μ l의 세포부유물에 추가하여 15분간 실온에서 정치배양한 후 400 μ l의 완충액을 넣어 섞어 유세포분석기(Cytomics 500, Beckman, Coulter, Miami, USA)를 이용하여 분석하였으며 이때 fluorescence emission은 530 nm와 575 nm 이상으로 하였다.

미토콘드리아 호흡활성도 측정

크레아틴이 미토콘드리아의 호흡활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 비독성의 resazurin (Sigma, St Louis,

MO, USA) 염색을 이용하였다.²² 4일간 배양한 세포군을 반씩 나누어 받은 200 μ M amiodrone (Sigma, St Louis, MO, USA)을 첨가하여 60분간 정치배양하였다. 6 μ M resazurin을 첨가한 후 다시 240분간 배양하였다. 0, 60, 120, 180, 240분에 형광도를 측정하여 resazurin과 배지만 사용한 배경 값을 제거하였다. 이렇게 구한 값의 평균치를 구한 다음 단백질 양에 대해 정상화하였다. 이때 미토콘드리아의 호흡활성도는 각 대조군과 실험군에서 amiodrone을 넣지 않고 측정한 값에서 amiodrone을 넣어 측정한 값을 뺀 후 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 시행하였다. 모든 실험에서 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 unpaired *t*-test를 사용하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

결 과

혈청결핍상태에서 크레아틴이 RGC-5세포의 생존에 미치는 영향

혈청을 포함한 경우에 비해 혈청을 포함하지 않은 경우 세포의 생존율은 $89.21 \pm 6\%$ 로 감소하였다. 이와 대조적으로 혈청결핍 상태에서 5 mM 크레아틴을 첨가하여 4일간 배양하였을 때 대조군에 비하여 세포의 생존은 $98.21 \pm 5\%$ 로 증가하였다($p < 0.05$, Fig. 1).

혈청결핍상태에서 크레아틴이 RGC-5세포의 고사에 미치는 영향

AO/HO 이중 생체염색을 하면 정상세포의 핵은 청색 형

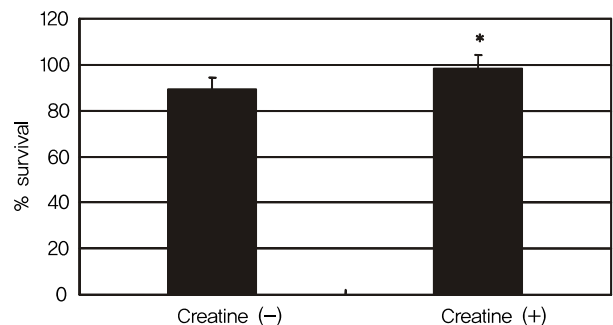


Figure 1. Effect of creatine on the survival of RGC-5 cells after serum deprivation for 4 days. Addition of 5 mM creatine significantly increased cellular survival. * $p < 0.05$.

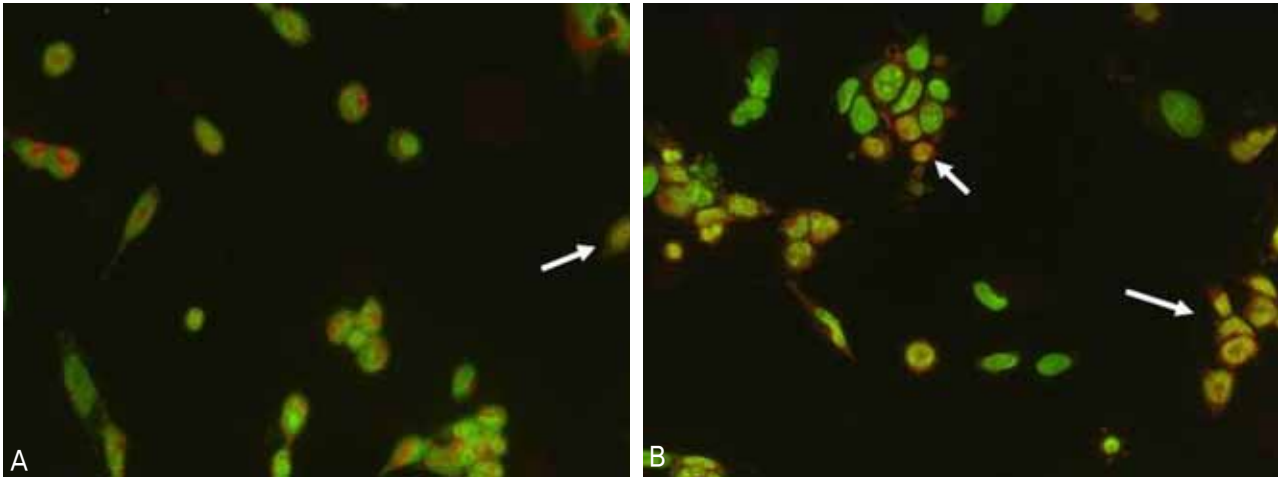


Figure 2. AO/HO double staining of RGC-5 cells with or without treatment of 5 mM creatine for 4 days. Normal control cell stains blue nuclei and brilliant red cytoplasm. In contrast, the apoptotic cell (arrows) shows yellow to orange-red nuclei, becoming indistinguishable from the cytoplasm. Addition of 5 mM creatine (A) revealed less apoptotic cells compared non-treated control (B) ($\times 200$).

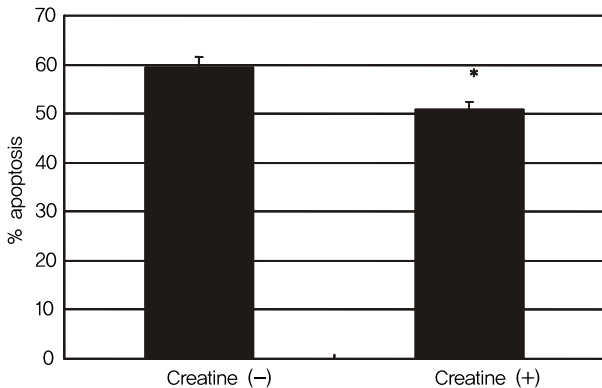


Figure 3. Flow cytometric analysis of the effect of creatine on the survival of RGC-5 cells after serum deprivation for 4 days. Addition of 5 mM creatine significantly decreased cellular apoptosis. * $p < 0.05$.

광을 나타내지만 세포고사가 일어나는 세포의 핵은 세포고사의 단계에 따라 밝은 황색이나 오렌지 색을 나타낸다. 본 실험에서 4일간 크레아틴에 노출시킨 경우 살아있는 세포는 청색 채널로 관찰할 수 있었는데 세포질은 주황색의 과립이 관찰되었고 세포핵은 청색으로 염색되었다. 이와 대조적으로 크레아틴으로 처리하지 않은 경우 세포고사의 특징적 소견인 세포질은 주황색으로 세포핵은 황색으로 염색되는 것이 관찰되었으며 세포고사가 진행된 경우인 세포질과 핵이 모두 황색으로 염색되는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 크레아틴이 세포고사를 감소시키는 것을 형태학적으로 관찰할 수 있었다.

FITC-Annexin/PI 이중염색을 시행한 경우 세포고사는 Annexin (+)로 나타난다. 본 실험에서 크레아틴 처리를 하지 않고 4일간 혈청결핍상태에서 배양한 경우 세포고사는

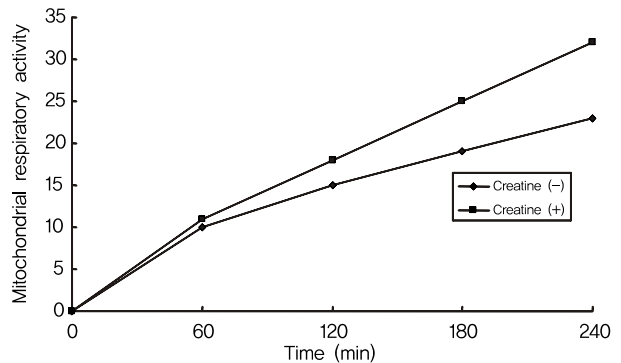


Figure 4. Effect of creatine on the mitochondrial respiratory activity in the RGC-5 cells after serum deprivation for 4 days. Addition of 5 mM creatine significantly increased mitochondrial respiratory activity compared to non-treated controls.

$59.39 \pm 2.32\%$ 로 나타났다. 이와 대조적으로 5 mM 크레아틴을 처리한 경우에는 세포고사는 $50.97 \pm 1.47\%$ 로 감소하였다(Fig. 3).

혈청결핍상태에서 크레아틴이 RGC-5세포의 미토콘드리아 호흡활성도에 미치는 영향

혈청결핍상태에 의한 세포고사에 미토콘드리아의 호흡경로가 관여하는 것으로 알려져 있으므로 크레아틴이 미토콘드리아의 호흡활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 resazurin assay를 시행하였다. 4일간 혈청을 결핍시켜 배양했을 때 크레아틴을 첨가한 경우 첨가하지 않은 대조군에 비해 미토콘드리아 호흡활성도가 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 따라서 에너지 전구물질인 크레아틴은 RGC-5세포의 미토콘드리아 호흡활성도를 증가시켜 세포고사를 저

하시킬 수 있을 것이다.

고 찰

신경절세포에서는 신경신호의 전달에 필요한 높은 수준의 에너지를 미토콘드리아에서 공급하는데, 망막신경절세포의 미토콘드리아의 기능을 약화되면 세포고사를 유발하며 미토콘드리아의 에너지 생산을 촉진시키는 물질들이 녹내장 치료에 도움이 될 것이라고 알려져 있다.²³

Guanidine 복합체인 크레아틴은 미토콘드리아와 세포질의 creatine kinase의 전구물질로 이용되는데 크레아틴을 투여하면 세포 내 크레아틴과 phosphocreatine을 증가시켜 creatine kinase/phosphocreatine system의 기능을 개선하여 ATP 재합성을 촉진하게 된다. 또한 세포질의 크레아틴 증가와 함께 미토콘드리아의 creatine kinase는 세포고사의 초기 단계에서 나타나는 미토콘드리아의 permeability transition을 억제하게 된다.

Creatine kinase/phosphocreatine system은 고도의 에너지를 요하는 근육이나 뇌 조직에서 생리적으로 중요한 역할을 담당한다.²⁴ 이러한 조직의 세포에서 고에너지를 가진 phosphocreatine은 즉각적인 에너지의 공급뿐만 아니라, 세포의 미토콘드리아나 해당과정에 기질을 제공하여 에너지를 많이 소모하는 부위에 에너지를 생산할 수 있도록 한다.²⁵

크레아틴은 동물실험에서 세포보호효과를 가지고 있으며 신경전달을 지속시키고 저산소증에 의한 손상을 줄이는 것으로 보고되어 있으며,^{26,27} 이러한 효과는 크레아틴과 ATP를 동시에 공급할 경우 가장 효과가 크게 나타나는 것으로 알려져 있다.²⁸

혈청이나 포도당의 결핍에 의해 대사성 손상이 유발되면 세포 내 ATP가 감소되어 신경세포가 손상 받는 것으로 알려져 있다.²⁹ 본 실험에서 혈청을 결핍시킨 경우 세포의 생존이 저하되었으며 세포고사를 나타내는 형태학적 손상도 관찰할 수 있었다. 이때 크레아틴을 첨가한 경우 RGC-5 세포의 손실과 형태학적 변화를 줄일 수 있는 것을 알 수 있었다.

비록 다양한 실험에서 크레아틴이 세포보호효과를 나타내는 것으로 알려져 있지만 크레아틴의 작용 기전은 아직 확실하게 밝혀져 있지 않은데 현재까지는 에너지 저장을 촉진하는 것과 미토콘드리아에서 permeability transition pore를 안정화시키는 것이 작용 기전으로 알려져 있다.^{30,31} 미토콘드리아에서 creatine kinase는 크레아틴과 ATP를 phosphocreatine과 ADP로 변환시켜 세포질에 에너지를 제공하는데³² 허혈 상태에서는 크레아틴이 creatine kinase에

의해 ATP로 변환되기 때문에 ATP보다 빠르게 phosphocreatine이 소모된다고 한다.³³

본 연구에서 크레아틴은 뇌 신경세포에서와 마찬가지로 망막신경절세포에서도 세포보호효과를 나타내며 미토콘드리아의 호흡활성을 증가시키는 것으로 보아 미토콘드리아에 에너지를 공급함으로써 permeability transition을 막아 세포고사를 저하시킬 가능성이 있음을 알 수 있다. 즉 세포고사를 유발할 수 있는 혈청결핍상태에서 크레아틴을 공급함으로써 phosphocreatine을 더 많이 만들어 에너지를 제공하여 세포 손실을 저하시킬 수 있을 것이다. 따라서 creatine/phosphocreatine system은 RGC-5세포에서도 에너지 대사에 중요한 역할을 하며 이러한 세포보호효과는 이전의 보고와 마찬가지로 미토콘드리아의 호흡활성도 증가와 동반되어 나타났다.³⁴

본 연구의 단점은 미분화된 RGC-5세포를 사용하였으므로 망막신경절세포를 일차배양한 경우와 RGC-5세포를 분화시킨 경우와는 그 기전이나 효과가 다르게 나타날 수 있을 것이며 또한 RGC-5세포 자체가 장기간 보관할 경우 변성이 될 가능성도 있으므로 실험 결과를 해석하는 데 있어 이러한 한계점을 고려해야 할 것이다.^{35,36} 따라서 이러한 한계점들을 보완하기 위해 향후 일차배양한 망막신경절세포를 이용한 더 자세한 연구가 필요할 것이다.

결론적으로 본 연구에서 크레아틴은 혈청결핍상태의 RGC-5 세포에서 세포보호효과를 나타내었으며 향후 신경세포의 손상에 대한 보호역할도 가능성이 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- 1) Ames A 3rd. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;34:42-68.
- 2) Holtzman D, Olson JE, Nguyen H, et al. Brain cellular and mitochondrial respiration in media of altered pH. *Metab Brain Dis* 1987;2:127-37.
- 3) Hemmer W, Wallimann T. Functional aspects of creatine kinase in brain. *Dev Neurosci* 1993;15:249-60.
- 4) Wallimann T, Schnyder T, Schlegel J, et al. Subcellular compartmentation of creatine kinase isoenzymes, regulation of CK and octameric structure of mitochondrial CK: important aspects of the phosphoryl-creatine circuit. *Prog Clin Biol Res* 1989;315:159-76.
- 5) Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992;281:21-40.
- 6) McNaught KS, Carrupt PA, Altomare C, et al. Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 1998;56:921-33.
- 7) Brewer GJ, Wallimann TW. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in

- rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2000;74:1968-78.
- 8) Michaelis T, Wick M, Fujimori H, et al. Proton MRS of oral creatine supplementation in rats. Cerebral metabolite concentrations and ischemic challenge. *NMR Biomed* 1999;12:309-14.
- 9) Wilken B, Ramirez JM, Probst I, et al. Creatine protects the central respiratory network of mammals under anoxic conditions. *Pediatr Res* 1998;43:8-14.
- 10) Wilken B, Ramirez JM, Probst I, et al. Anoxic ATP depletion in neonatal mice brainstem is prevented by creatine supplementation. *Arch Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F224-7.
- 11) Zhu S, Li M, Figueroa BE, et al. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2004;24:5909-12.
- 12) Adcock KH, Nedelcu J, Loenneker T, et al. Neuroprotection of creatine supplementation in neonatal rats with transient cerebral hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 2002;24:382-8.
- 13) Chen L, Roberts R, Friedman DL. Expression of brain-type creatine kinase and ubiquitous mitochondrial creatine kinase in the fetal rat brain: evidence for a nuclear energy shuttle. *J Comp Neurol* 1995;363:389-401.
- 14) Hemmer W, Riesinger I, Wallimann T, et al. Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. *J Cell Sci* 1993;106:671-83.
- 15) Dolder M, Walzel B, Speer O, et al. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 2003;278:17760-6.
- 16) O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997;414:253-7.
- 17) Acosta ML, Kalloniatis M, Christie DL. Creatine transporter localization in developing and adult retina: importance of creatine to retinal function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C1015-23.
- 18) Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, et al. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86:1-12.
- 19) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989;119:203-10.
- 20) Mpoke SS, Wolfe J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: application to macronuclear elimination in *Tetrahymena*. *J Histochem Cytochem* 1997;45:675-83.
- 21) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
- 22) Osborne NN. Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Prog Brain Res* 2008;173:339-52.
- 23) Abu-Amero KK, Bosley TM. Detection of mitochondrial respiratory dysfunction in circulating lymphocytes using resazurin. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:1295-8.
- 24) Wallimann T, Hemmer W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 1994;133:193-220.
- 25) Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992;281:21-40.
- 26) Whittingham TS, Lipton P. Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J Neurochem* 1981;37:1618-21.
- 27) Carter AJ, Müller RE, Pschorn U, Stransky W. Preincubation with creatine enhances levels of creatine phosphate and prevents anoxic damage in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1995;64:2691-9.
- 28) Chung I, Zhang Y, Eubanks JH, Zhang L. Attenuation of hypoxic current by intracellular applications of ATP regenerating agents in hippocampal CA1 neurons of rat brain slices. *Neuroscience* 1998;86:1101-7.
- 29) Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 1999;31:305-19.
- 30) O'Gorman E, Beutner G, Dolder M, et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997;414:253-7.
- 31) Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000;80:1107-213.
- 32) Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1992;1102:119-66.
- 33) Passonneau JV, Lowry OH. Metabolite flux in single neurons during ischemia and anesthesia. *Curr Probl Clin Biochem* 1971;3:198-212.
- 34) Stachowiak O, Dolder M, Wallimann T, Richter C. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem* 1998;273:16694-9.
- 35) Ganapathy PS, Dun Y, Ha Y, et al. Sensitivity of staurosporine-induced differentiated RGC-5 cells to homocysteine. *Curr Eye Res* 2010;35:80-90.
- 36) Wood JP, Chidlow G, Tran T, et al. A comparison of differentiation protocols for RGC-5 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3774-83.

=ABSTRACT=

Effect of Creatine on the Survival of RGC-5 Cells under Serum Deprivation

Jae Woo Kim, MD, PhD, Jung Heum Hong, MD, Sun Hee Kang, MD, Yun Young Kim, MD, PhD

Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: To evaluate the protective effect of creatine on the survival of retinal ganglion cells after serum deprivation.

Methods: RGC-5 cells were exposed to 5 mM creatine with serum-free media for 4 days. Cellular survival and mitochondrial respiratory activity were measured with MTT assay and resazurin assay, respectively. Degree of apoptosis was evaluated with vital staining using acridine orange/Hoechst 33342 and flow cytometric analysis using annexin/PI, respectively.

Results: Creatine increased cellular survival of RGC-5 cells significantly after serum deprivation. Additionally, creatine increased mitochondrial respiratory activity and inhibited apoptosis of RGC-5 cells.

Conclusions: The energy precursor creatine increased survival of retinal ganglion cells after serum deprivation. Creatine could be relevant for the cytoprotection of retinal ganglion cells.

J Korean Ophthalmol Soc 2011;52(5):618-623

Key Words: Creatine, Cytoprotection, Retinal ganglion cells

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University Medical Center

#3056-6 Daemyeong 4-dong, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: jwkim@cu.ac.kr