

## 페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들 (MBPA, MMBPA)의 활성질소소거활성

김순희, 김광원

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《사회주의의학은 본질에 있어서 예방의학이며 병을 미리막고 사람의 생명과 건강을 보호증진시키는것은 사회주의의학의 기본임무입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 70페이지)

방사선손상과 관련한 물질새는 완전히 밝혀지지 않았지만 방사선을 쏘이면 활성산소 및 활성질소가 과잉발생된다는것이 실험적으로 증명되였다.[7, 8] 방사선을 쏘였을 때 골수세포들과 내피세포들을 비롯한 여러 세포들에서는 활성질소종(RNS)의 일종인 일산화질소(NO)의 생성량이 증가되어 단백질의 티로신니트로화와 DNA손상, 지어는 종양억제자인 p<sup>53</sup>단백질의 활성화와 같은 여러가지 물질새로 아포토시스가 유발될수 있다.[9, 10] 또한 방사선조임에 의해 NO생성이 유도되어 세포들에서 방사선감수성이 증가된다.[11, 12]

에틸렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들인 3-메톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민염화망간(MMBC, 일명 에틸비스이미노메틸구아야콜염화망간: EMC)[1], 3-에톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민초산망간(MEBA)[2], N, N'-비스(살리칠리덴)에틸렌디아민염화망간(MBC)[3]의 항산화효소류사활성과 림상리용가능성에 대한 연구결과들은 이미 발표되였다. 그러나 살렌-망간착화합물들은 개별적인 구조마다 독특한 치료효과를 나타내기때문에 새로운 살렌-망간착화합물에 대한 연구를 심화시키는것은 의연히 중요한 문제로 나선다. 우리는 종전의 에틸렌디아민대신 페닐렌디아민을 리용하면 활성중심금속인 망간주위에 1개 방향족고리가 더 생겨 천연항산화효소에 보다 가까와지지 않겠는가 하는데 주의를 돌렸다.

우리는 페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들인 N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간(MBPA)과 3-메톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간(MMBPA)의 활성질소소거활성특성을 조사하였다.

### 재료와 방법

페닐렌디아민을 리용하는 MBPA[4]와 MMBPA[5]의 제조는 이전과 같이 하였다.

NO소거활성측정은 뇌수균마액으로 옥시헤모글로빈을 메트헤모글로빈으로 전환시켜 일산화질소함량을 측정하는 방법과 니트로프루시드나트리움으로 옥시헤모글로빈을 메트헤모글로빈으로 전환시켜 일산화질소함량을 측정하는 방법[6]으로 진행하였다.

뇌수균마액에 의한 옥시헤모글로빈으로부터 메트헤모글로빈으로의 전환을 리용한 일산화질소함량측정법에서는 시험구에 50mmol/L 린산칼리움완충액(pH 7.2) 110μL, 시료용액 30μL, 뇌수균마액 100μL를 첨가하고 37℃의 온도를 보장하면서 10min동안 1min 간격으로 흡광도를 기록하였다. 10min만에 50μmol/L 옥시헤모글로불린용액 30μL, 분석완충액(1mmol/L 아

르기닌, 0.5mmol/L NADPH, 10mmol/L  $MgCl_2$ ) 30 $\mu$ L를 첨가하여 반응을 개시하고 10min동안 1min간격으로 401, 421nm에서 흡광도를 기록하였다. 대조구에는 시료용액대신 50mmol/L 린산칼리움완충액(pH 7.2) 30 $\mu$ L를 넣었다.

니트로프루시드나트륨에 의한 옥시헤모글로빈으로부터 메트헤모글로빈으로의 전환을 이용한 일산화질소합량측정에서는 매 시험구에 50mmol/L 린산칼리움완충액(pH 7.2) 210 $\mu$ L와 50 $\mu$ mol/L 옥시헤모글로빈용액 30 $\mu$ L씩 넣은 다음 NO발생제인 니트로프루시드나트륨( $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$ , 분자량 298) 30 $\mu$ mol/L용액을 풀고 즉시 매 시험구에 30 $\mu$ L씩 첨가하였다. 30s만에 401, 421nm에서 흡광도를 기록하였다. 대조구에는 50mmol/L 린산칼리움완충액(pH 7.2) 30 $\mu$ L, 다른 시험구에는 시료용액 30 $\mu$ L를 첨가하고 30s 간격으로 5min동안 401, 421nm에서 흡광도를 기록하였다.

페닐렌디아민, 살리칠알데히드, *o*-와닐린, 초산망간( $C_4H_6MnO_4 \cdot 4H_2O$ ), 에타놀 등 시약들은 모두 분석순이상의 것이었다. 용액의 흡광도는 자외가시선분광광도계(《Shimadzu》)로 측정하였다.

## 결과 및 논의

### 1) iNOS의 일산화질소생성활성에 미치는 MBPA와 MMBPA의 영향

먼저 반응계에 살렌-망간착화합물을 넣은 다음 일산화질소생성반응을 시작하였을 때 유도성일산화질소합성효소(inducible nitric oxide synthase: iNOS)의 일산화질소생성량변화를 관찰하였다. 시험구를 3개로 구성하고 시험구 1에는 50mmol/L 린산칼리움완충액(pH 7.2)을, 시험구 2에는 500 $\mu$ mol/L 살렌-망간착화합물용액을, 시험구 3에는 500 $\mu$ mol/L 과산화수소( $H_2O_2$ )용액과 500 $\mu$ mol/L 살렌-망간착화합물용액을 넣고 흡광도변화를 관찰한 다음 10min만에 분석완충액을 넣어 시간에 따르는 일산화질소생성량변화를 측정한 결과는 그림 1, 2와 같다.

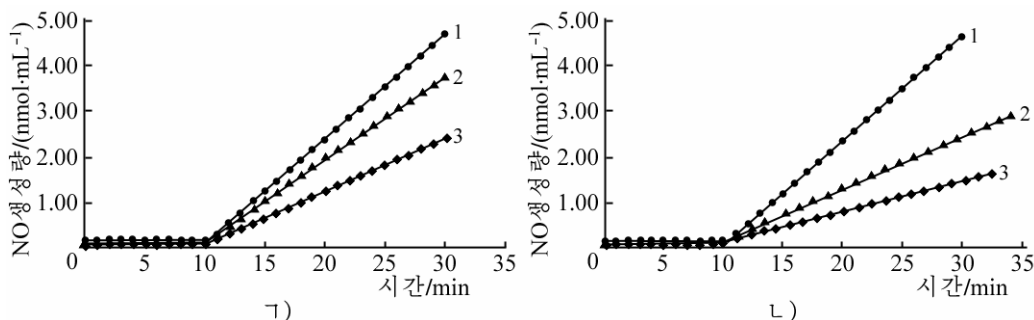


그림 1. MBPA(Γ)와 MMBPA(Λ)를 먼저 넣고 반응을 개시하였을 때

iNOS에 의한 일산화질소생성량의 변화

1-대조, 2-MBPA, 3-MBPA +  $H_2O_2$ (Λ)에서는 MMBPA +  $H_2O_2$ )

그림 1에서와 같이 일산화질소생성반응이 개시되기 전에는 반응계의 일산화질소합량이 거의 0이었다. 그러나 분석완충액을 넣었을 때 일산화질소합량이 급격히 증가하기 시작하였다. 이것은 분석완충액을 넣었을 때부터 iNOS의 일산화질소생성활성이 정확히 유도되었다는 것을 보여준다. 일산화질소생성반응이 개시되어서부터는 시험구에 따라서 일산화질소생성량이 차이났는데 살렌-망간착화합물시험구에서는 대조구에 비하여 일산화질소생성량

이 완만하게, 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서는 급격히 떨어졌다.

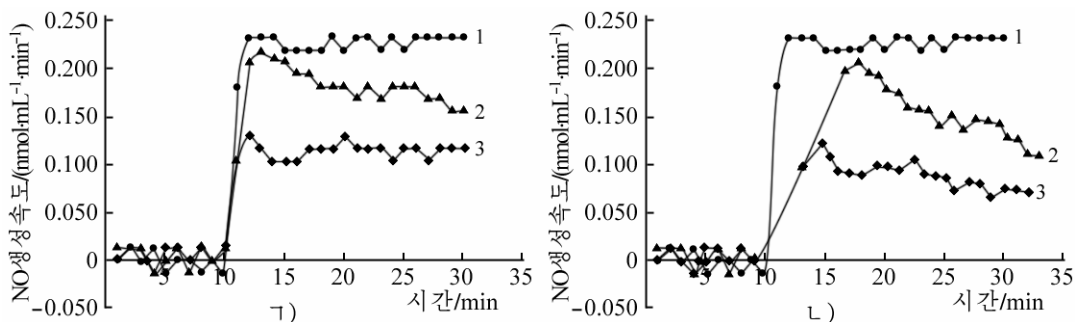


그림 2. MBPA(Γ)와 MMBPA(L))를 먼저 넣고 반응을 개시하였을 때  
일산화질소생성속도의 변화

1-대조, 2-MBPA, 3-MBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(L)에서는 MMBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

또한 그림 2에서 보는바와 같이 대조구와 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서는 iNOS의 일산화질소생성속도가 일정하게 유지되었지만 살렌-망간착화합물시험구에서는 시간이 지남에 따라 점차 감소하는 경향성이 나타났다. iNOS의 일산화질소생성속도를 계산해본 결과 살렌-망간착화합물시험구와 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서 대조구에 비해 79.4, 50.4%로 감소하였다. 결국 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서 일산화질소생성억제률이 제일 높았다.

다음으로 일산화질소생성반응을 개시한 후 반응계에 살렌-망간착화합물을 넣었을 때 iNOS효소원의 일산화질소생성량변화를 고찰하였다.

우에서와 같이 시험구를 3개로 구성하고 매 시험구들에 뇌수균마액을 넣어 흡광도변화를 5min간 관찰한 다음 분석완충액을 넣어 흡광도변화를 측정하였다. 다음 10min만에 시험구 1에는 50mmol/L 린산칼리움완충액(pH 7.2)을, 시험구 2에는 500μmol/L 살렌-망간착화합물용액을, 시험구 3에는 500μmol/L 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)용액과 500μmol/L 살렌-망간착화합물용액을 넣어 시간에 따르는 일산화질소생성량변화를 측정한 결과는 그림 3, 4와 같다.

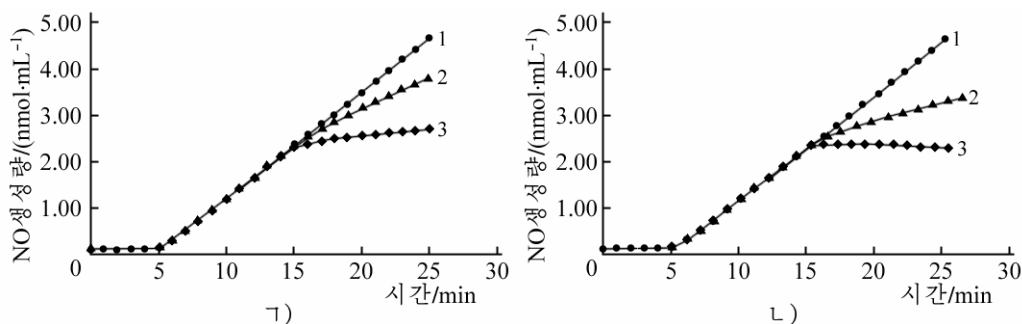


그림 3. 일산화질소생성반응을 개시한 후 MBPA(Γ)와 MMBPA(L))를  
넣었을 때 일산화질소생성량의 변화

1-대조, 2-MBPA, 3-MBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(L)에서는 MMBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

그림 3에서 보는바와 같이 반응계에 분석완충액을 넣은 다음부터 10min간은 3개의 시험구에서 일산화질소생성량이 똑같이 증가하였다. 이것은 3개의 시험구에서 iNOS의 일산화질소생성활성이 똑같이 유도되어 유지된다는것을 보여준다. 그러나 일산화질소생성반응이 개

시된 다음 10min만에 살렌-망간착화합물과 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구들에서 일산화질소생성량이 대조구에 비하여 감소하였는데 특히 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서 급격히 감소하였다.

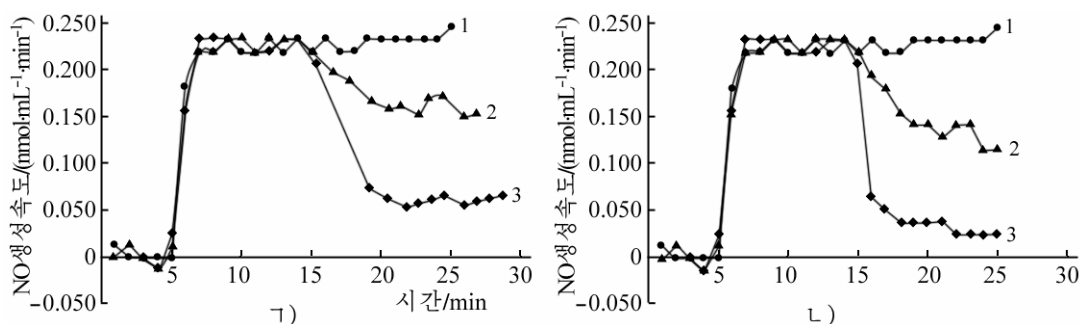


그림 4. 일산화질소생성반응을 개시한 후 MBPA( $\gamma$ )와 MMBPA( $\text{L}$ )를 넣었을 때 일산화질소생성속도의 변화  
1-대조, 2-MBPA, 3-MBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>( $\text{L}$ )에서는 MMBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

그림 4에서와 같이 대조구에 비해 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서는 일산화질소생성속도가 급격히 감소하여 일정한 값을 유지하였지만 살렌-망간착화합물시험구에서는 일산화질소생성속도가 점차적으로 감소하는 경향성이 나타났다.

iNOS의 일산화질소생성속도를 계산해본 결과 살렌-망간착화합물시험구와 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서 대조구에 비하여 63.1, 16.2%로 감소하였다. 결국 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서 일산화질소생성억제률이 제일 높았다.

## 2) 니트로프루시드나트륨에 의해 생성된 일산화질소의 반감기에 미치는 MBPA와 MMBPA의 영향

시험구를 3개로 구성하고 매 시험구에 50 $\mu\text{mol/L}$  옥시헤모글로빈용액과 30 $\mu\text{mol/L}$  니트로프루시드나트륨용액을 넣고 30s만에 흡광도를 측정한 다음 시험구 1에는 50mmol/L 린산칼리움완충액(pH 7.2)을, 시험구 2에는 500 $\mu\text{mol/L}$  살렌-망간착화합물용액을, 시험구 3에는 500 $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액과 500 $\mu\text{mol/L}$  살렌-망간착화합물용액을 넣고 시간에 따르는 일산화질소합량변화를 측정한 결과는 그림 5와 같다.

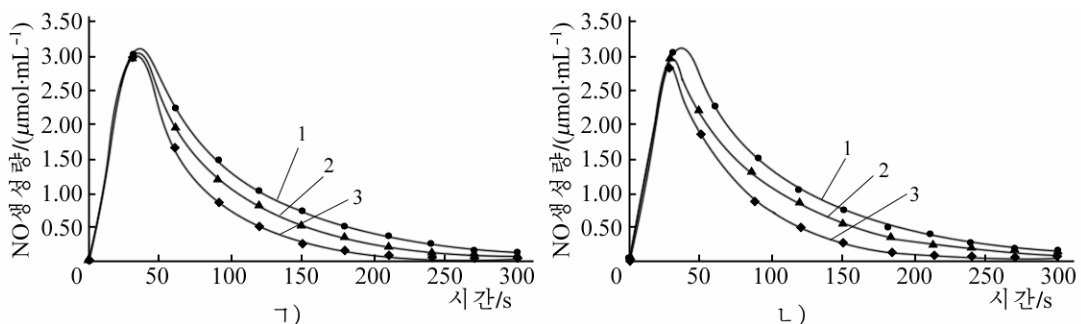


그림 5. 니트로프루시드나트륨에 의한 일산화질소생성반응에 미치는 MBPA( $\gamma$ )와 MMBPA( $\text{L}$ )의 영향  
1-대조, 2-MBPA, 3-MBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>( $\text{L}$ )에서는 MMBPA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

그림 5에서 보는바와 같이 매 시험구에서 30s동안 니트로프루시드나트륨에 의해 똑같은 량의 일산화질소가 생성되었다. 그러나 30s 지나서부터는 매 시험구에서 일산화질소합

량이 감소하였으며 대조구에 비하여 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에서 뚜렷이 감소되었다. 니트로프루시드나트리움에 의하여 일단 생성된 일산화질소는 일산화질소자체의 반감기가 짧은것으로 하여 점차 감소된다고 본다.

이 실험을 통해 MBPA와 MMBPA가 일산화질소소거활성을 가진다는것을 확증하였다. 그러나 MBPA와 MMBPA자체가 일산화질소소거활성을 가지는것이 아니라 옥소형MBPA와 옥소형MMBPA가 그 활성을 나타내었다. MBPA와 MMBPA는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>과 작용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 분해하는 동시에 자체는 옥소형MBPA와 옥소형MMBPA로 산화된다. 위의 실험들에서 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구들에서 일산화질소함량이 대조에 비하여 현저히 감소하였는데 이것은 옥소형MBPA와 옥소형MMBPA가 일산화질소를 산화시킨 결과라고 본다. 또한 MBPA와 MMBPA시험구들에서도 일산화질소함량이 감소되었으나 살렌-망간착화합물+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>시험구에 비하여 뚜렷하지 않았으며 감소되는 경향성 역시 MBPA와 MMBPA가 다른 요인들에 의하여 옥소형MBPA와 옥소형MMBPA로 일부 전환되어 생긴 결과라고 보아진다.

한편 일산화질소소거활성을 가지는 MBPA와 MMBPA는 ONOO<sup>-</sup>도 능히 소거할수 있다고 본다. ONOO<sup>-</sup>는 일산화질소와 수퍼록시드음이온에 의하여 생성된다. MBPA와 MMBPA는 일산화질소와 수퍼록시드음이온을 소거할수 있는것으로 하여 ONOO<sup>-</sup>의 생성을 억제할수 있다고 본다. 또한 과산화수소소거물림새와 유사하게 ONOO<sup>-</sup>도 환원시킬수 있다고 본다.

## 맺 는 말

페닐렌디아민을 리용하여 제조한 살렌-망간착화합물들인 N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간(MBPA)과 3-메톡시-N, N'-비스(살리칠리덴)페닐렌디아민초산망간(MMBPA)은 iNOS의 일산화질소생성을 억제한다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 56, 5, 145, 주체99(2010).
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학), 57, 11, 142, 주체100(2011).
- [3] 리형관 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 60, 주체104(2015).
- [4] 리은하 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 4, 59, 주체105(2016).
- [5] 리은하 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 5, 62, 주체105(2016).
- [6] 방의정; 기초의학, 2, 49, 1993.
- [7] J. S. Greenberger et al.; Gene Therapy and Molec. Biol., 8, 31, 2004.
- [8] W. Zhao et al.; Curr. Med. Chem., 16, 2, 130, 2009.
- [9] J. Smith et al.; Cell Death Differ., 23, 2, 211, 2016.
- [10] D. W. Davis et al.; J. Exp. Med., 192, 857, 2000.
- [11] H. Matsumoto et al.; Int. J. Radiat. Biol., 76, 1649, 2000.
- [12] M. Y. Janssens et al.; Cancer Res., 58, 5646, 1998.

**Reactive Nitrogen Species(RNS)-Scavenging Activities of  
Phenylenediamine-derived Salen-Mn Compounds  
(MBPA and MMBPA)**

*Kim Sun Hui, Kim Kwang Won*

Manganese N, N'-bis(salicylidene)phenylenediamine acetate(MBPA) and 3-methoxy-N, N'-bis(salicylidene)-phenylenediamine acetate(MMBPA), two phenylenediamine-derived salen-Mn compounds, are antioxidant enzyme(superoxide dismutase/catalase) mimetics. These compounds inhibit iNOS(inducible nitric oxide synthase)-mediated nitric oxide production.

Key words: MBPA, MMBPA, reactive nitrogen species, nitric oxide production, inducible nitric oxide synthase