



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](#)

碩士學位論文

Aminoglycoside 계열 항생제  
tobramycin의 멜라닌 생성 증진 효과

濟州大學校 大學院

化 學 科

文 勝 鉉

2019年 8月

Aminoglycoside 계열 항생제 tobramycin의  
멜라닌 생성 증진 효과




指導教授 玄 昌 久

文 勝 鉉

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2019年 8月

文勝鉉의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長	李 南 昊	
委 員	玄 昌 久	
委 員	尹 景 奭	

濟州大學校 大學院

2019年 8月

# Effect of Aminoglycoside Antibiotic tobramycin on Melanogenesis Enhancement

Seung Hyun Moon

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of Master of Science

2019. 8.

This thesis has been examined and approved by

Nam Ho Lee

CHANG-GU HYUN

Kyung-Sup Yoon

6/17

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY



## ABSTRACT

Since the first antibiotic, penicillin, the era of antibiotics has opened and many new antibiotics have been discovered and developed. However, in the 21st century, antibiotics discovered in the 20th century have been gradually reduced in usage or are no longer used due to antibiotic resistance, side effects, and the development of more effective antibiotics. In this study, we investigated the effects of streptomycin, kanamycin A, kanamycin B, tobramycin, fradiomycin, paromomycin, spertinomycin, hygromycin B, gentamicin, fosfomycin and lincomycin on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. First, the effect of each antibiotic on the survival of B16F10 cells was confirmed by MTT assay. Subsequently, the groups of antibiotic alone treatment and the groups treated with antibiotics and  $\alpha$ -MSH in the non-toxic concentration were divided to evaluate the effect on melanogenesis. Melanin production was decreased in kanamycin A and streptomycin, and melanin production was increased in tobramycin, fosfomycin and lincomycin. Melanin production was not changed in kanamycin B, fadomycin, paromomycin, spectinomycin, hygromycin B and gentamicin. Among them, melanin contents assay and tyrosinase activity assay were further performed with tobramycin, which increased melanin production remarkably. It was confirmed that tobramycin increased melanin production and increased the activity of tyrosinase, an enzyme important for melanin synthesis. We also confirmed that tobramycin phosphorylates p38, one of the MAPK proteins, by using western blotting and inhibitors, thereby increasing the expression of MITF protein. The increased expression of MITF increased the expressions of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, an enzyme important for the synthesis of melanin, in a dose-dependent manner. We compared the effects of kanamycin A, kanamycin B with similar structure to tobramycin and 2-DOS, the central structure of these on the synthesis of melanin. As a result, the effect of

tobramycin on the synthesis of melanin was presumed to be the structure of the aminosugar attached to the C-4 of 2-DOS, the central skeleton. Since melanocytes are mainly in the skin layer, the effect of tobramycin on keratinocytes was evaluated. At a concentration of 2 mg/mL, cell viability was over 90 %. In addition, the effect of RAW 264.7 cells on NO production, an inflammatory substance, was evaluated but not effective. Based on these results, we suggest that tobramycin may be helpful in the treatment of hypopigmentation.

Key words: Tobramycin, Old antibiotics, B16F10 melanoma cells, Melanogenesis, Aminoglycoside

# 목 차

ABSTRACT .....	1
목 차 .....	3
LIST OF TABLE .....	4
LIST OF FIGURES .....	5
I. 서 론 .....	7
II. 재료 및 방법 .....	24
1. 시료 및 시약 .....	24
2. 실험방법 .....	26
2.1. 세포배양 .....	26
2.2. 세포독성평가 .....	27
2.3. 멜라닌 함량 측정 .....	28
2.4. Tyrosinase 활성 측정 .....	28
2.5. Western blot 실험 .....	29
2.6. NO 생성량 측정 .....	31
2.7. 통계처리 .....	32
III. 결 과 .....	33
1. B16F10 melanoma 세포 내에서 항생제의 세포독성 평가 .....	33
2. B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 합성에 항생제가 미치는 영향 평가 .....	38
3. Tobramycin이 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성에 미치는 영향 .....	50
4. Western blot 분석 .....	53
4.1. 멜라닌 생성 관련 효소들의 발현에 tobramycin이 미치는 영향 .....	53
4.2. MAPK , AKT 신호전달경로에 대한 tobramycin의 영향 .....	56
4.3. 신호전달경로에 대한 저해제 및 tobramycin의 영향 .....	58
5. Aminoglycoside 계열 항생제의 골격 .....	61
6. HaCaT keratinocyte 세포에서 tobramycin의 세포독성 평가 .....	66
7. RAW 264.7 macrophage 세포에서 tobramycin의 NO 활성 억제 효과 .....	68
IV. 고 찰 .....	70
V. 참고문헌 .....	74

## LIST OF TABLE

Table 1. Timeline of antibiotics .....	11
--	----



## LIST OF FIGURES

Figure 1. Melanogenesis in UV-induced skin .....	9
Figure 2. Melanin biosynthesis pathway .....	9
Figure 3. Structure of streptomycin .....	13
Figure 4. Structure of fradiomycin .....	14
Figure 5. Structure of hygromycin B .....	15
Figure 6. Structure of kanamycin .....	16
Figure 7. Structure of paromomycin .....	17
Figure 8. Structure of spectinomycin .....	18
Figure 9. Structure of gentamicin .....	19
Figure 10. Structure of tobramycin .....	20
Figure 11. Structure of lincomycin .....	21
Figure 12. Structure of fosfomycin .....	22
Figure 13. Principle of MTT assay .....	30
Figure 14. Principle of western blot .....	30
Figure 15. Principle of griess test .....	31
Figure 16. Cell viability of kanamycin A, kanamycin B and tobramycin on B16F10 melanoma cells .....	34
Figure 17. Cell viability of fradiomycin, paromomycin and streptomycin on B16F10 melanoma cells .....	35
Figure 18. Cell viability of spectinomycin, hygromycin B and gentamicin on B16F10 melanoma cells .....	36
Figure 19. Cell viability of fosfomycin and lincomycin on B16F10 melanoma cells .....	37
Figure 20. Melanin contents of kanamycin A on B16F10 melanoma cells .....	39
Figure 21. Melanin contents of kanamycin B on B16F10 melanoma cells .....	40
Figure 22. Melanin contents of tobramycin on B16F10 melanoma cells .....	41
Figure 23. Melanin contents of fradiomycin on B16F10 melanoma cells .....	42
Figure 24. Melanin contents of paromomycin on B16F10 melanoma cells .....	43
Figure 25. Melanin contents of streptomycin on B16F10 melanoma cells .....	44
Figure 26. Melanin contents of spectinomycin on B16F10 melanoma cells .....	45
Figure 27. Melanin contents of hygromycin B on B16F10 melanoma cells .....	46
Figure 28. Melanin contents of gentamicin on B16F10 melanoma cells .....	47
Figure 29. Melanin contents of fosfomycin on B16F10 melanoma cells .....	48
Figure 30. Melanin contents of lincomycin on B16F10 melanoma cells .....	49
Figure 31. Melanin contents of tobramycin on B16F10 melanoma cells .....	51
Figure 32. Tyrosinase activity of tobramycin on B16F10 melanoma cells .....	52

Figure 33. Effect of tobramycin on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16F10 cells .....	54
Figure 34. Effect of tobramycin on MITF expression in B16F10 cells .....	55
Figure 35. Effect of tobramycin on MAPK expression in B16F10 cells .....	57
Figure 36. Effect of MAPK inhibitors on tyrosinase activity in tobramycin-treated B16F10 cells .....	59
Figure 38. Structures of (a) 2-DOS, (b) streptidine, (c) actinamine .....	60
Figure 39. Cell viability of aminocyclitols on B16F10 melanoma cells .....	61
Figure 40. Melanin contents of 2-DOS on B16F10 melanoma cells .....	62
Figure 41. Melanin contents of streptidine on B16F10 melanoma cells .....	63
Figure 42. Melanin contents of actinamine on B16F10 melanoma cells .....	64
Figure 43. Cell viability of tobramycin on HaCaT human keratinocytes .....	65
Figure 44. Effect of tobramycin on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	69
Figure 45. Structure of antibiotics with 2-DOS as the central skeleton .....	73
Figure 46. Effect of tobramycin in melanogenesis on B16F10 melanoma cells	73

## I. 서론

자외선(UVR, ultraviolet radiation)은 돌연변이의 원인 및 비특이적인 손상제로 종양억제제와 종양 촉진제의 특성을 모두 갖고 있기 때문에 완전한 발암물질로 분류된다. UV는 또한 다양한 유형의 급성 및 만성 피부에도 영향을 준다. UV에 대한 인간 피부의 급성 반응에는 광손상, 홍반, 돌연변이, 면역억제 등이 포함된다 [1,2].

피부는 자외선에 의한 손상을 방지하기 위해 멜라닌을 형성한다. 첫번째로 각질 세포에서 UVR에 의해 매개되는 DNA 손상은 p53을 활성화시키고 활성화된 p53은 pro-opiomelanocortin (POMC) 유전자에 결합하여 활성화시킨다. POMC 폴리펩티드는  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH, 멜라닌세포 자극 호르몬), Adrenocorticotrophic hormone (ACTH, 부신피질 자극호르몬),  $\beta$ -Endorphin을 생산하기 위해 쪼개진다 [3]. 자극되어진 각질세포 유래의  $\alpha$ -MSH는 G 단백질 연결 수용체 (G protein-coupled receptor)인 melanocortin 1 receptor (MC1R)를 통해 멜라닌세포에 신호를 전달한다 [4].  $\alpha$ -MSH는 멜라닌세포의 MC1R에 결합하고 adenylyl cyclase (AC)를 자극하여 이차전달인자인 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)의 세포 내 농도를 증가시킨다. cAMP는 protein kinase A (PKA)를 활성화시키고 cAMP response element-binding protein (CREB) 단백질을 인산화시킨다. CREB는 M-box에 결합하여 멜라닌 생성효소인 tyrosinase (TYR), TRP-1 및 TRP-2의 발현을 조절하는 멜라닌 생성의 주요 조절자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)를 포함한 여러 유전자의 전사 인자 역할을 한다. 또 다른 경로로는 MAPK 신호전달경로가 있다. MPAK는 ERK, JNK, p38 세가지 단백질로 구성되어 있다. 이 중 ERK 단백질의 인산화는 MITF 단백질을 인산화하고 인산화된 MITF 단백질은 유비퀴틴화되어 분해되고 JNK와 p38의 인산화는 MITF 단백질의 발현을 증가시킨다는 연구결과가 보고되었다 [5,6].

또한 최근 연구에 따르면 PI3K/AKT 신호전달경로, Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달경로와 같은 다양한 멜라닌 형성에 영향을 미치는 신호전달경로가 밝혀졌다. 그리고 SCF/c-kit, NO (nitric oxide), cytokine 같은 멜라닌 생성을 억제하거나 촉진시키는 다양한 요인이 알려져 있다 [4,7-9].

발현된 TYR 및 TRP-1, TRP-2는 멜라노솜(melanosomes)이라고 불리는 세포소기관으로 이동하며, 멜라노솜에서는 두 종류의 멜라닌, 유멜라닌(eumelanin) 및 페오멜라닌(pheomelanin)을 생산한다. 이렇게 생성된 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할 외에도 피부색을 결정하고 머리카락과 눈에 존재한다. 멜라닌의 UVR 차폐효과, 특히 유멜라닌은 UVR을 산란시키는 물리적 장벽 역할을 하며 표피로의 UVR 침투를 줄이기 위한 흡수 필터 역할을 한다. 태양광 차단제로서의 멜라닌의 효능은 약 1.5-2.0 sun protection factor (SPF), 최대 4 SPF로 가정되며, 이는 멜라닌이 UVR의 50%에서 75%를 흡수한다는 것을 의미한다 [10].

저색소침착증(hypopigmentation)은 멜라닌 생성의 감소의 결과이다. 이것은 멜라닌 모세포의 비정상적인 이동과 분화, tyrosinase 활성의 저하, 멜라노솜의 비정상적인 구조, 멜라노솜의 각질세포로의 이동 저하, 멜라노솜의 분해, tyrosinase 유전자의 돌연변이 등 여러 가지 이유로 인해 일어난다. 저색소침착의 증상은 vitilio, piebaldism, albinism 등이 존재하며 다양한 연구 통해 치료방법을 찾고 있다 [11-14].

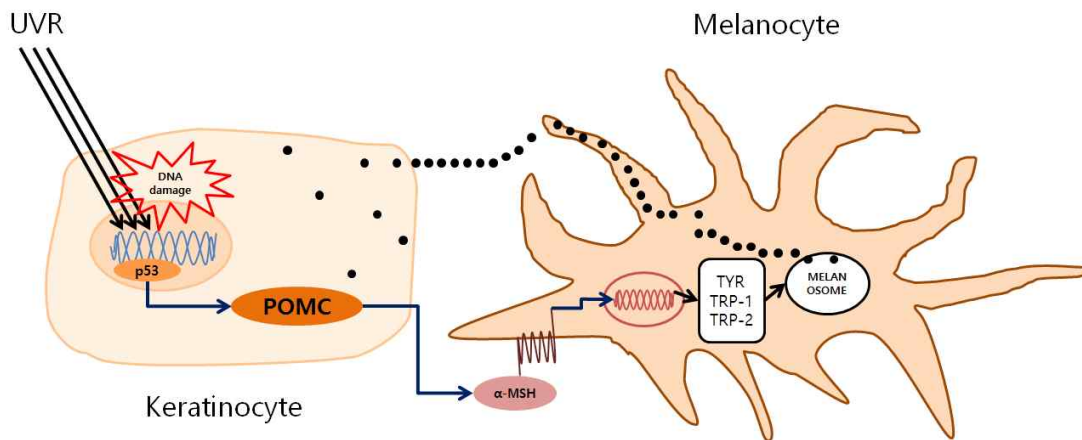


Figure 1. Melanogenesis in UV-induced skin

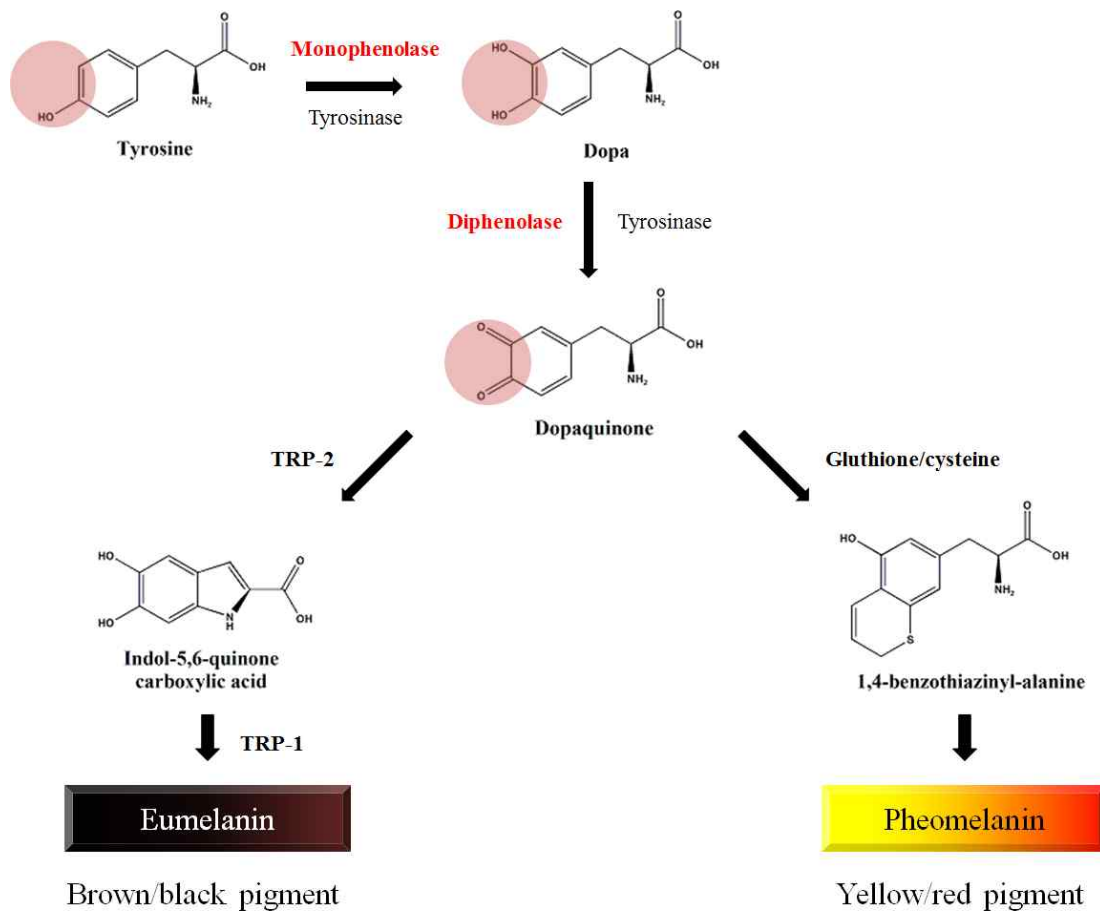


Figure 2. Melanin biosynthesis pathway

20 세기 초 이전에는 천연두, 콜레라, 페럼, 장티푸스, 결핵, 매독 등과 같은 전염병들이 전 세계적으로 만연했다 [15]. 그렇기에 허브, 꿀 동물성 배설물, 식물 추출물과 같이 감염에 대해 자연적으로 이용 가능한 다양한 치료법을 사용했다는 기록이 남아있다 [16]. 그러나 황색포도알균에 의한 균혈증의 사망률이 82 %에 달했고 50 세 이상 환자에서는 2 %만이 생존할 수 있었다. 때문에 항생제가 사용되기 이전에는 이러한 감염질병에 의해 수많은 사람들 사망하였다. [17].

1928 년 Alexander Fleming 이 포도상구균(*Staphylococcus*)을 배양하던 중 푸른색 곰팡이가 핀 페트리 접시에서는 포도상구균의 성장을 억제하는 것을 발견하였고 세균의 성장을 억제하는 물질이 있을 것이라 생각하여 그 물질을 추출한 것이 penicillin 이라는 최초의 항생제이다 [18]. 페니실린이 사용되기 시작하면서 이후 sulfonamides, beta-lactams, aminoglycosides, chloramphenicol 과 같은 새로운 항생제가 발견, 개발되었으며 최근까지 개발된 항생제의 연대표는 Table 1.과 같다 [19]. 1941 년에 Selman Waksman 이 처음으로 ‘antibiotic’이라는 단어를 사용하며 ‘흙 속의 곰팡이나 미생물로부터 생성되어 다른 미생물의 성장을 억제하거나 파괴시키는 물질’로 정의하였다 [20]. 현대로 와서는 반합성, 합성, 천연물질 등 미생물의 성장을 억제하거나 파괴시키는 능력을 가지고 있는 물질들을 통칭하기도 한다.

Table 1. Timeline of antibiotics.

Year	Antibiotics	Year	Antibiotics	Year	Antibiotics	Year	Antibiotics
1911	Arsphenamine (A.K.A. Salvarsan)	1962	Cloxacillin	1980	Cefotaxime	1989	Cefpodoxime
1912	Neosalvarsan	1962	Fusidic Acid	1980	Piperacillin	1989	Enrofloxacin
1935	Prontosil	1963	Fusafungine	1981	Amoxicillin/Clavulanic Acid	1989	Lomefloxacin
1936	Sulfanilamide	1963	Lymecycline	1981	Cefoperazone	1989	Moxifloxacin
1938	Sulfapyridine	1963	Gentamicin	1981	Cefotiam	1992	Piperacillin/Tazobactam
1939	Sulfacetamide	1964	Cefalotin	1981	Cefsulodin	1992	Rufloxacin
1940	Sulfamethizole	1966	Doxycycline	1981	Latamoxef	1993	Brodiprim
1942	Benzylpenicillin	1967	Carbenicillin	1981	Netilmicin	1993	Dirithromycin
1942	Gramicidin S	1967	Rifampicin	1982	Ceftriaxone	1993	Levofloxacin
1942	Sulfadimidine	1967	Nalidixic Acid	1982	Micronomicin	1993	Nadifloxacin
1943	Sulfamerazine	1967	Tobramycin	1983	Cefmenoxime	1993	Panipenem/Betamipron
1943	Streptomycin	1968	Clindamycin	1983	Ceftazidime	1993	Sparfloxacin
1947	Sulfadiazine	1969	Fosfomycin	1983	Ceftizoxime	1994	Cefepime
1948	Chlortetracycline	1970	Cefalexin	1983	Norfloxacin	1996	Meropenem
1949	Chloramphenicol	1971	Cefazolin	1984	Cefonicid	1999	Quinupristin/Dalfopristin
1949	Neomycin (Fradiomycin)	1971	Pivampicillin	1984	Cefotetan	2000	Linezolid
1950	Oxytetracycline	1971	Tinidazole	1984	Temocillin	2001	Telithromycin
1950	Penicillin G Procaine	1972	Amoxicillin	1985	Cefpiramide	2003	Daptomycin
1952	Erythromycin	1972	Cefradine	1985	Imipenem/Cilastatin	2005	Tigecycline
1954	Benzathine Penicillin	1972	Minocycline	1985	Ofloxacin	2005	Doripenem
1955	Spiramycin	1972	Pristinamycin	1986	Mupirocin	2009	Telavancin
1955	Tetracycline	1973	Fosfomycin	1986	Aztreonam	2010	Ceftaroline
1955	Thiamphenicol	1974	Talampicillin	1986	Cefoperazone/Subactam	2011	Fidaxomicin
1955	Vancomycin	1975	Tobramycin	1986	Ticarcillin/Clavulanic Acid	2012	Bedaquiline
1956	Phenoxyethylpenicillin	1975	Bacampicillin	1987	Ampicillin/Subactam	2013	Telavancin
1957	Kanamycin	1975	Ticarcillin	1987	Cefixime	2014	Tedizolid
1958	Colistin	1976	Amikacin	1987	Roxithromycin	2014	Dalbavancin
1958	Demeclocycline	1977	Azlocillin	1987	Sultamicillin	2014	Ceftolozane/Tazobactam
1959	Virginiamycin	1977	Cefadroxil	1987	Ciprofloxacin	2015	Ceftazidime/Avibactam
1959	Paromomycin	1977	Cefamandole	1987	Rifaximin		
1960	Methicillin	1977	Cefoxitin	1988	Azithromycin		
1960	Metronidazole	1977	Cefuroxime	1988	Flomoxef		
1961	Ampicillin	1977	Mezlocillin	1988	Isepamycin		
1961	Spectinomycin	1977	Pivmecillinam	1988	Midecamycin		
1961	Sulfamethoxazole	1979	Cefaclor	1988	Rifapentine		
1961	Trimethoprim	1980	Cefmetazole	1988	Teicoplanin		

Timeline of antibiotics based on the date of release or discovery

- **Aminoglycoside**

Aminoglycoside 는 방선균(actinomycetes)에서 추출한 천연 또는 반합성 광범위 항생제이다. Aminoglycoside 의 중심구조에는 2-deoxystreptamine 같은 aminocyclitol ring 에 2 개 이상의 amino sugar 가 glycosidic bond 로 결합되어 있다. 이 항생제는 30S 리보솜에 결합하고 번역을 억제함으로써 단백질 합성 억제 작용을 한다 [21].



## 1. Streptomycin

Streptomycin 은 1944 년에 Albert Schatz 가 *Streptomyces griseus* 에서 처음 분리한 최초의 aminoglycoside 계열의 항생제이다 [22]. 페니실린에 의해 영향을 받지 않는 그람 음성균에 대해 강력한 작용을 발휘한다 [23].

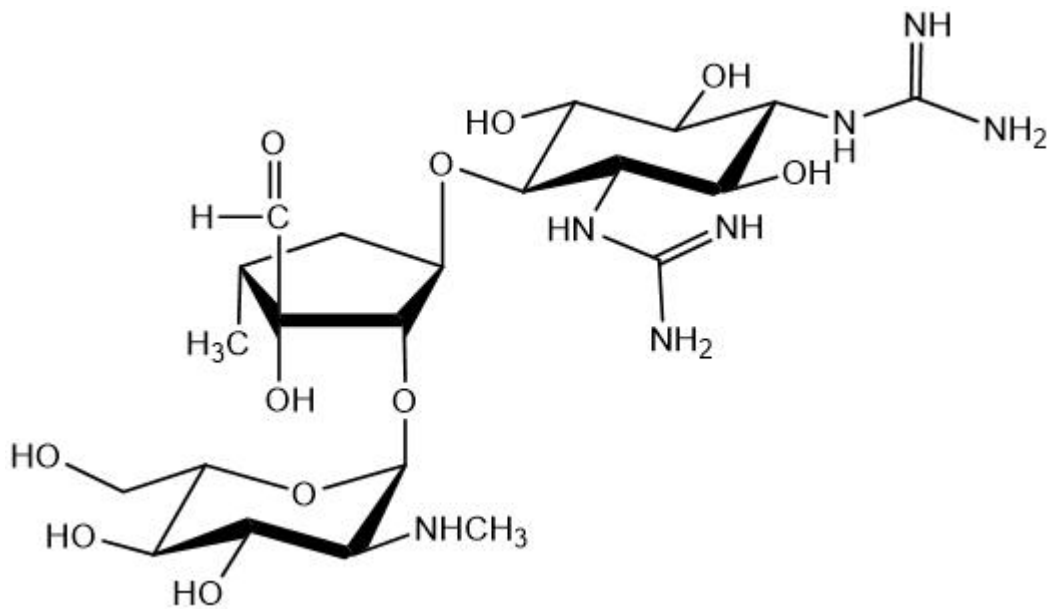


Figure 3. Structure of streptomycin

## 2. Fradiomycin

Fradiomycin 은 neomycin 이라고도 하며 1949 년 미생물학자 Selman Waksman 과 그의 학생 Hubert Lechevalier 에 의해 발견되었다. *Streptomyces fradiae* 에서 자연적으로 생산되며 aminoglycoside 계열의 항생제이다 [24]. Fradiomycin 은 다른 aminoglycoside 계열의 항생제들과 비슷하게 감염치료에도 이용되고 간성뇌증, 고콜레스테롤 혈증 예방치료에 사용되기도 한다 [25,26]. 비교적 독성이 있는 편이고 많은 사람들이 이 항생제에 알러지 반응을 나타낸다 [27].

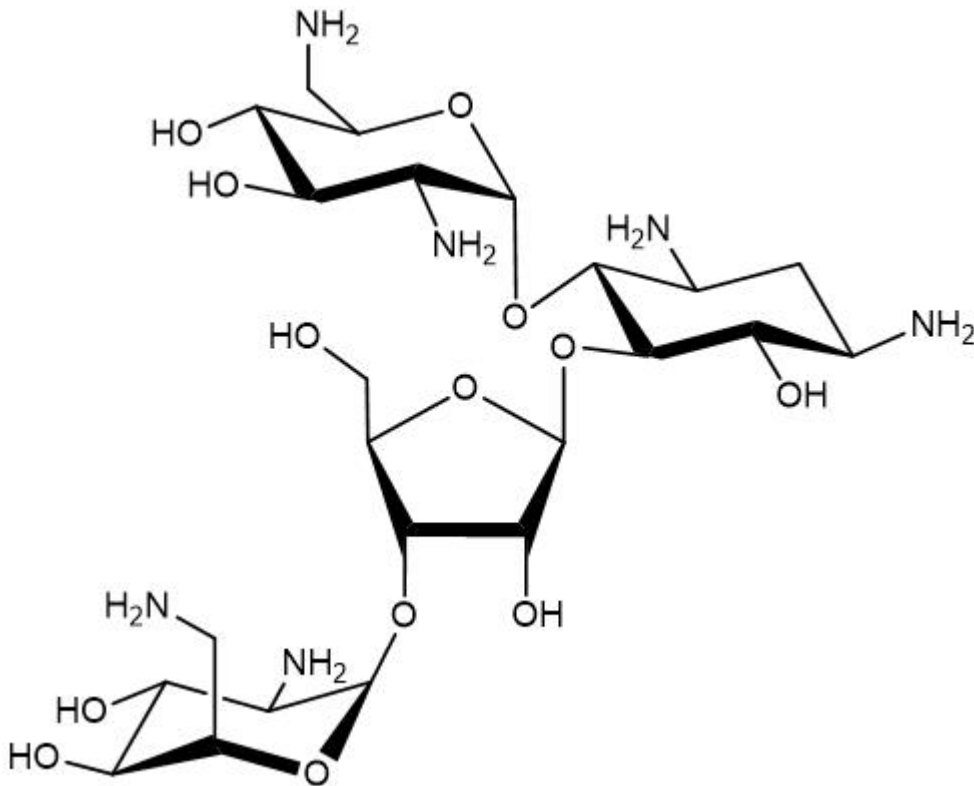


Figure 4. Structure of fradiomycin

### 3. Hygromycin B

Hygromycin B는 1953년에 *Streptomyces hygroscopicus*에서 처음 분리되었으며 처음에는 동물에 사용하기 위해 개발되었다. 단백질 합성을 억제하여 박테리아, 곰팡이 및 고등 진핵세포를 사멸시키는 aminoglycoside 항생제이다 [28].

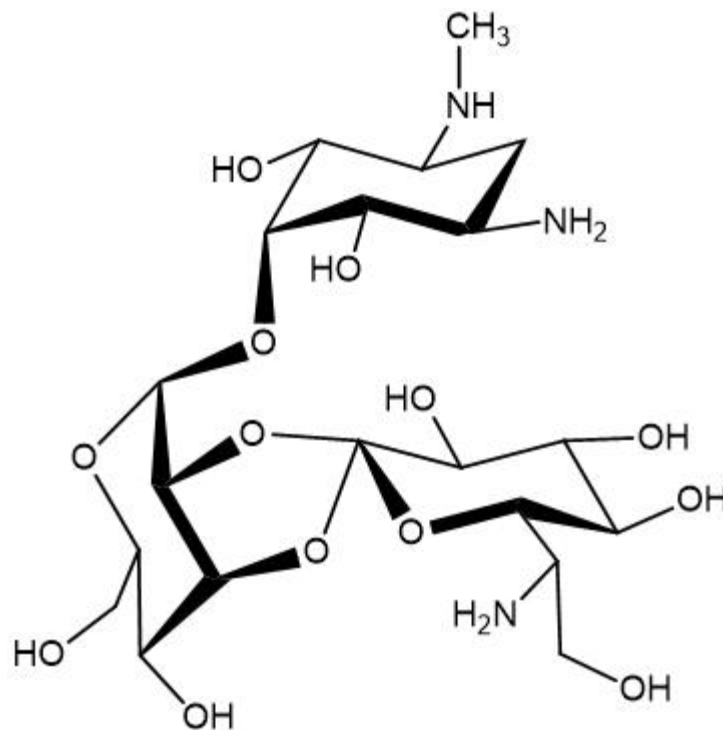
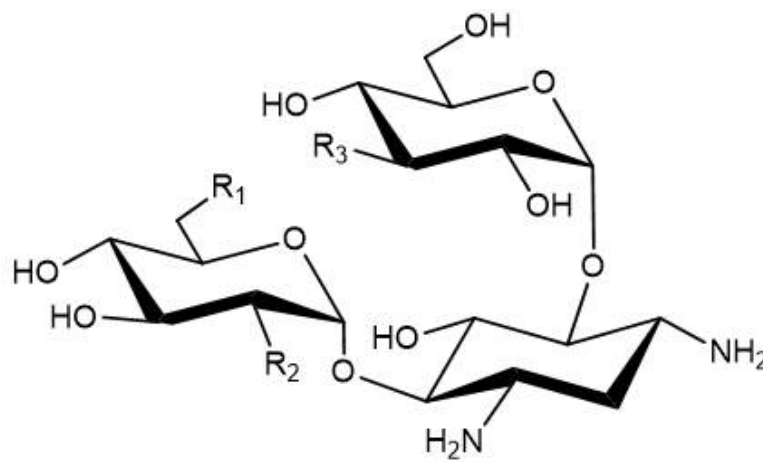


Figure 5. Structure of hygromycin B

#### 4. Kanamycin

Kanamycin 은 1957 년 일본의 미생물학자 Hamao Umezawa 등에 의해 발견된 aminoglycoside 계열의 항생제이다 [29]. *Streptomyces kanamyceticus* 에서 분리된 kanamycin 은 대부분의 kanamycin A 와 약간의 kanamycin B, kanamycin C, kanamycin D 로 구성되어 있다 [30]. 심한 박테리아 감염 및 결핵 치료에 사용 된다 [31].



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Kanamycin A	NH <sub>2</sub>	OH	NH <sub>2</sub>
Kanamycin B	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>
Kanamycin C	OH	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>
Kanamycin D	NH <sub>2</sub>	OH	OH

Figure 6. Structure of kanamycin

## 5. Paromomycin

Paromomycin 은 1950 년대에 *Streptomyces krestomuceticus* 에서 처음 분리되었다. 그람 음성 및 양성 균에 효과가 있으며 몇몇 원생생물, 촌충류에 대해서도 효과적이다. 그리고 임상적으로 중요한 항경련작용을 갖는 유일한 aminoglycoside 이다 [32].

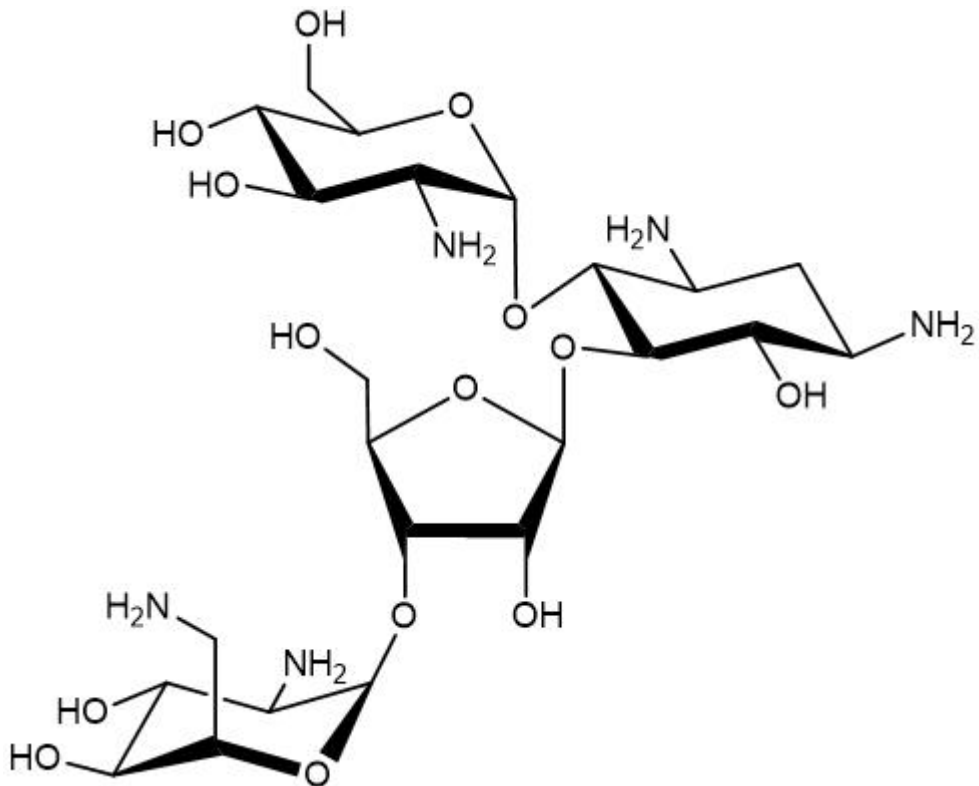


Figure 7. Structure of paromomycin

## 6. Spectinomycin

Spectinomycin 은 1961 년 *Streptomyces spectabilis* 에서 처음 분리된 물질이다 [33]. 임균 감염 치료에 유용하며 일반적인 부작용으로는 주사 부위의 통증, 발진, 메스꺼움, 발열, 수면 장애 등이 알려져 있다 [34].

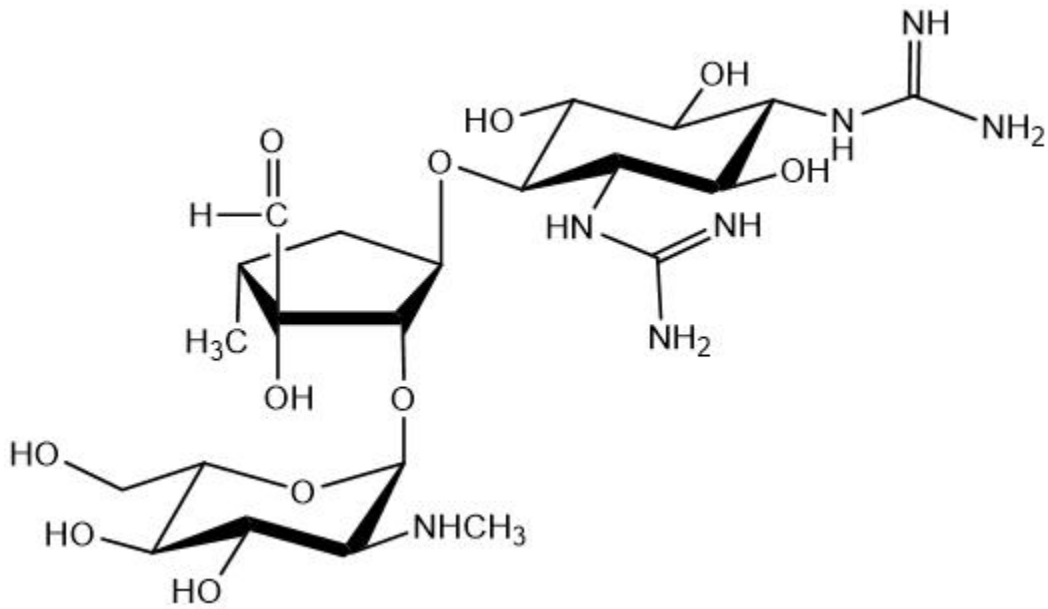


Figure 8. Structure of spectinomycin

## 7. Gentamicin

Gentamicin 은 1963 년 Weinstein, Wagman 등이 *Micromonospora purpurea* 의 발효에서 처음 발견했다 [35]. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* 및 그람 양성 포도상구균을 비롯한 대부분 그람 음성 박테리아에 대해 활성이 있다. Gentamicin 은 호흡기 감염, 요로 감염, 혈액, 뼈 및 이들 감수성 세균의 연조직 감염 치료에 사용 된다 [36].

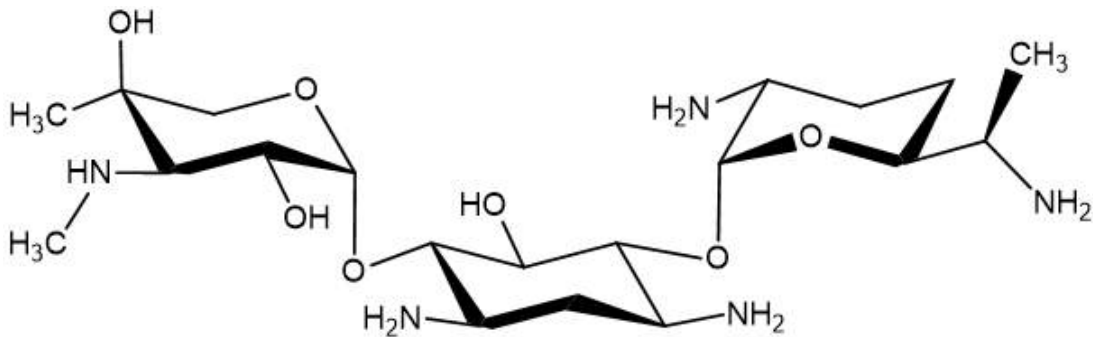


Figure 9. Structure of gentamicin

## 8. Tobramycin

Tobramycin 은 1967 년에 Eli Lilly and Company 의 근로자들이 *Streptomyces tenebrarius* 에서 처음 분리한 광범위 항생물질이다. tobramycin 의 구조는 2,6-diamino-2,6-dideoxy sugar 와 3-amino-3-deoxyglucose 가 4-and 6-hydroxyl groups of 2-deoxystreptamine 에 결합되어 있는 형태로 구성되어 있는 aminoglycoside 계열의 항생제로서 몇몇 그람 양성 세균과 대부분의 그람 음성 세균 감염 치료에 이용되고 있다 [37,38].

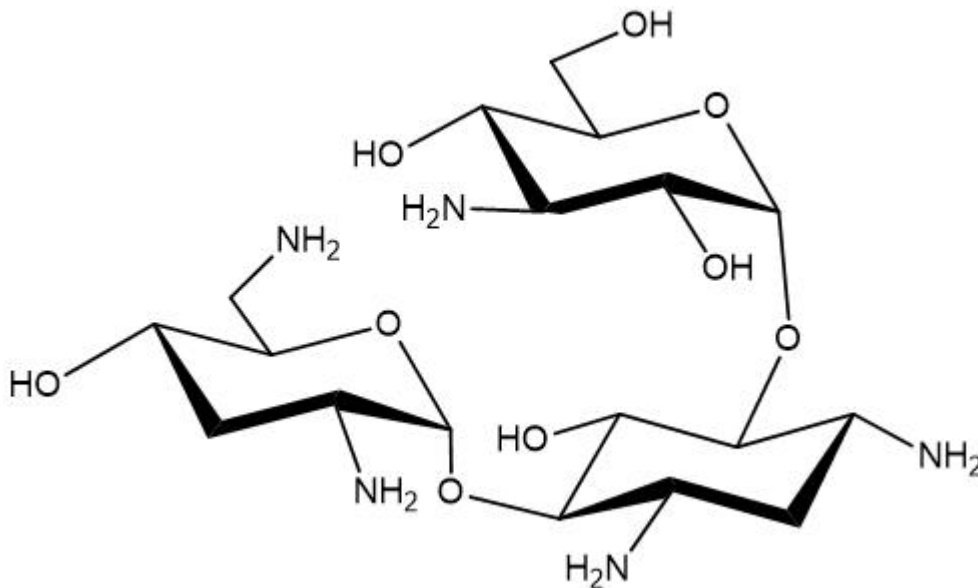


Figure 10. Structure of tobramycin



- Other antibiotics

### 1. Lincomycin

Lincomycin 은 방선균 류 *Streptomyces lincolnensis* 에서 유래 한 lincosamide 계열의 항생제이다 [39]. 1964 년에 처음으로 의약용으로 사용되었다 [40]. Lincosamide 계열의 항생제들은 consist of pyrrolidine ring 이 pyranose moiety 와 펩타이드 결합 (methylthio-lincosamide)되어 있는 구조가 특징이다 [41].

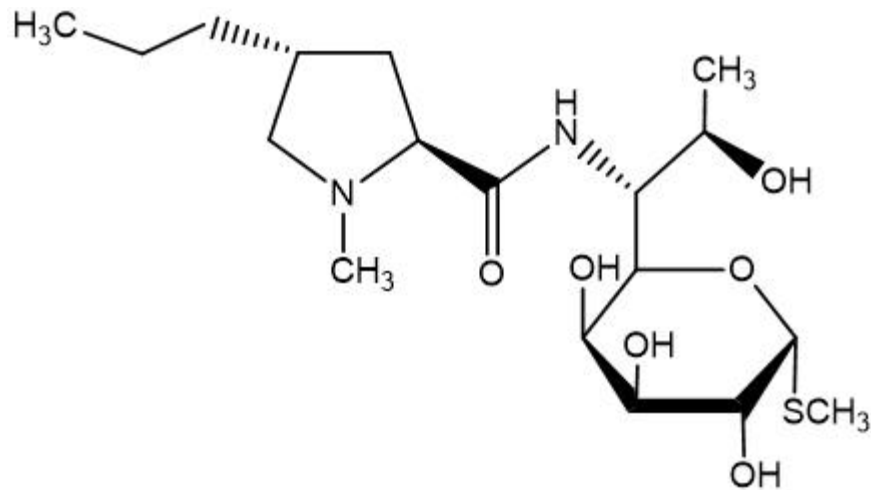


Figure 11. Structure of lincomycin

## 2. Fosfomycin

Fosfomycin (처음에는 phosphonomycin 으로 알려졌었다.)은 1969 년, Merck and Company 와 스페인의 Compañía Española de Penicilina y Antibióticos (CEPA)의 공동노력으로 발견되었다. *Streptomyces fradiae* 에서 처음 분리하였으며 이후 1971 년에 산업적으로 생산하기 시작했다.

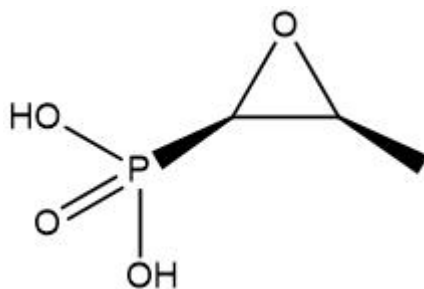


Figure 12. Structure of fosfomycin

앞서 언급했던 8종의 aminoglycoside 계열의 항생제들은 공통적으로 전정기관 독성, 청력 독성, 신독성, 근신경차단 등의 부작용이 있으며 부수적으로 피부발진, 알러지 반응 등이 존재한다 [42-44]. Lincomycin, fosfomycin은 메스꺼움, 두통, 설사 등의 부작용이 알려져 있다 [45,46]. 이 항생제들은 모두 20세기 초 중반에 미생물로부터 분리되었으며 오랫동안 사용되어 왔다. 그러나 심각한 부작용, 더 효과가 뛰어난 항생제의 개발, 항생제 내성균의 출현 등으로 인해 현대사회로 와서는 사용량이 감소했거나 더 이상 쓰이지 않고 있다 [47].

본 연구에서는 이 11종의 항생제와 3종의 aminocyclitol을 가지고 이들의 다른 효능을 찾기 위해 진행하였다. 각 시료를 B16F10 melanoma 세포에 처리하였을 때 멜라닌 합성에 어떤 영향을 끼치는지 확인해 보았다. 그리고 추가적으로 염증실험과 사람의 각질세포에서의 독성평가도 진행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

Tobramycin, gentamicin, kanamycin A, lincomycin, fosfomycin, fradiomycin, hygromycin B, spectinomycin, streptomycin 은 Tokyo Chemical Industry (Chuo-ku, Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

2-DOS, actinamine, streptidine 은 Toronto Research Chemicals Inc (Toronto, Ontario, Canada)에서 구입하였다.

Dulbecco modified eagle medium (DMEM), penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, PD98059, BCA protein assay kit 는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

$\alpha$ -MSH, NaOH, L-DOPA, griess reagent, proteasome inhibitor cocktail, kanamycin B, arbutin, H89 (PKA inhibitor)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 VWR (Radnor, Pennsylvania, U.S.A)에서 구입하였다.

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 1 차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-AKT, AKT,  $\beta$ -actin 1 차항체, anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, anti-mouse IgG HRP-linked Antibody, LY294002 (AKT inhibitor)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Enhanced chemiluminescence (ECL) kit, 2× Laemmli sample buffer 바이오세상 (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다.

SP600125 (JNK inhibitor)는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

SB203580 (p38 inhibitor)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 세포배양

B16F10 mouse melanoma 세포와 RAW 264.7 murine macrophage 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)에서 구매하였다. HaCaT human keratinocyte 세포는 CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Baden-Württemberg, Germany)에서 구입했다. 각 세포는 10 % FBS 와 1% penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지에서 37℃, 5 % CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

## 2.2. 세포독성평가

시료가 세포생존에 끼치는 영향을 평가하기 위해 MTT 실험을 진행하였다. MTT 실험은 비색분석법을 사용하여 시료의 세포독성을 평가하는 방법으로 세포에 노란색의 수용성 기질인 MTT 시약을 처리하면 살아있는 세포 내 미토콘드리아의 NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase 효소에 의해 보라색의 불용성 formazan 으로 환원된다. 이 때 생성된 formazan 의 양을 측정하여 시료의 세포독성을 평가하는 방법이다.

B16F10 세포를 24 well plate 에  $1 \times 10^4$  cells/well 농도로 접종하여 10 % FBS 와 1 % penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지에 24 시간 동안 배양한 후 시료를 각 농도 별로 처리하였다. 48 시간 후 배지로 희석한 0.2 mg/mL MTT 시약을 처리하여 1 시간 30 분 동안 반응시켰다. 그리고 상층액을 제거하고 DMSO 를 넣어 formazan 을 녹여 96 well plate 에 200  $\mu$ L 씩 옮겨 담아 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Swizerland)를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

RAW 264.7 세포와 HaCaT 세포를 24 well plate 에 각각  $7 \times 10^4$  cells/well,  $4 \times 10^4$  cells/well 농도로 접종하여 10 % FBS 와 1 % penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지에 24 시간 동안 배양한 후 시료를 각 농도 별로 처리하였다. 24 시간 후 배지로 희석한 0.2 mg/mL MTT 시약을 처리하여 1 시간 30 분 동안 반응시켰다. 그리고 상층액을 제거하고 DMSO 를 넣어 formazan 을 녹여 96 well plate 에 200  $\mu$ L 씩 옮겨 담아 microplate reader 를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.3. 멜라닌 함량 측정

B16F10 세포를 100 $\pi$  dish 에  $2 \times 10^5$  cells/well 농도로 접종한 뒤 10 % FBS 와 1 % penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지에 24 시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 시료를 배지에 각 농도 별로 희석하여 처리하였고 양성 대조군으로는  $\alpha$ -MSH, arbutin 을 사용하였다. 72 시간 후 상층액을 제거하고 1 x PBS 로 1 회 세척하였고 RIPA buffer (with 1 % inhibitor cocktail)를 처리하여 4°C에서 20 분간 반응시킨 후 1.5 mL e-tube 에 세포를 건었다. 건어진 세포는 15,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 제거하여 pellet 만 추출하였다. 추출된 pellet 에 1 N NaOH (10 % DMSO)를 넣고 70°C에서 1 시간 용해시켰다. 각 용액들은 96 well plate 에 200  $\mu$ L 씩 옮겨 담고 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit 를 사용하여 정량하였다.

### 2.4. Tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포를 100 $\pi$  dish 에  $2 \times 10^5$  cells/well 농도로 접종한 뒤 10 % FBS 와 1 % penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지에 24 시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 시료를 배지에 각 농도 별로 희석하여 처리하였고 단백질 저해제와 양성 대조군으로는  $\alpha$ -MSH, arbutin 를 사용하였다. 72 시간 후 상층액을 제거하고 1 x PBS 로 1 회 세척하였고 RIPA buffer (with 1 % inhibitor cocktail)를 처리하여 4°C에서 20 분간 반응시킨 후 1.5 mL e-tube 에 세포를 건었다. 건어진 세포는 15,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 BCA protein assay kit 를 사용하여 정량하였다. 각각의 상층액 단백질은 1  $\mu$ g/mL 농도로 희석하여 단백질 용액 20  $\mu$ L 와 L-DOPA (2 mg/mL) 80  $\mu$ L 를 넣고 37°C에서 1 시간동안 반응하였다. 그 후 microplate reader 를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.



## 2.5. Western blot 실험

B16F10 세포를 60π dish 에  $1 \times 10^5$  cells/well 농도로 접종한 뒤 10 % FBS 와 1 % penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지에 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 시료를 배지에 각 농도 별로 희석하여 4, 20, 40 시간 동안 처리하였다. 그 후에 1xPBS 로 1회 세척하였고 RIPA buffer (with 1 % inhibitor cocktail)를 처리하여 4°C에서 20분간 반응시킨 후 1.5 mL e-tube 에 세포를 걸었다. 걸어진 세포는 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 BCA protein assay kit 를 사용하여 정량하였다. 각각의 상층액 단백질은 20 μg 농도로 희석하여 2x Laemmli sample buffer 를 1:1 비율로 섞어 100°C에서 5분간 가열하여 loading sample 을 제조하였다. 각 loading sample 을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 에 전기영동하여 단백질을 크기 별로 분리한 후, polyvinylidene (PVDF) membrane 으로 옮겨주었고 0.1 % tween 20 이 함유된 tris-buffered saline (TBST)로 3회 세척하였다. 세척된 membrane 을 5 % skim milk (in TBST)에 2시간 동안 blocking 처리한 후 다시 TBST 로 3회 세척하였다. 그리고 측정하고자 하는 단백질의 1차 항체를 TBST 에 적절한 농도로 희석하여 membrane 과 밤새도록 반응시켰다. 반응이 끝난 1차 항체를 제거한 후 TBST 로 3회 세척 후 TBST 에 HRP 가 결합된 2차 항체를 희석하여 2시간 동안 반응하였다. 마지막으로 TBST 로 3회 세척 후 ECL 용액과 반응시켜 chemidoc (Fusionsolo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)를 사용하여 단백질 밴드를 검출하였다.

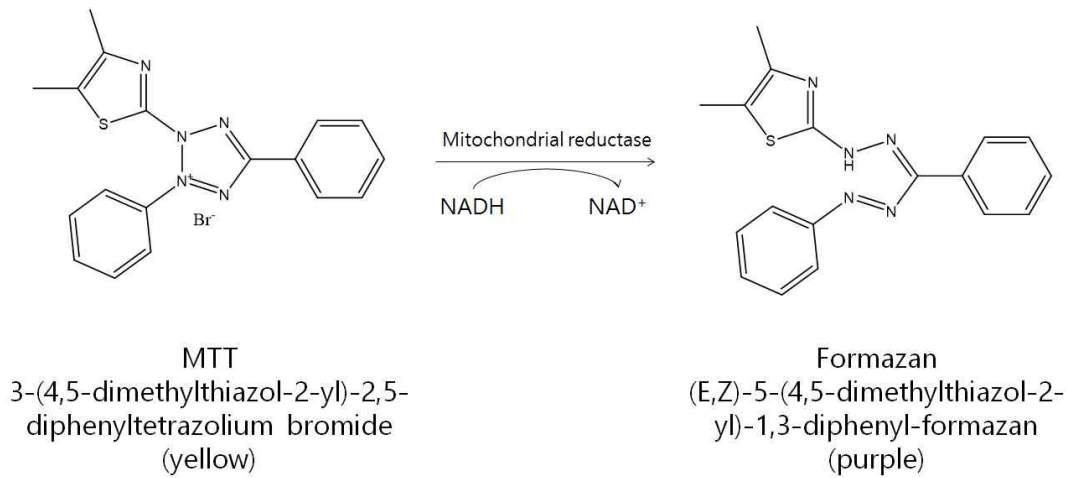


Figure 13. Principle of MTT assay

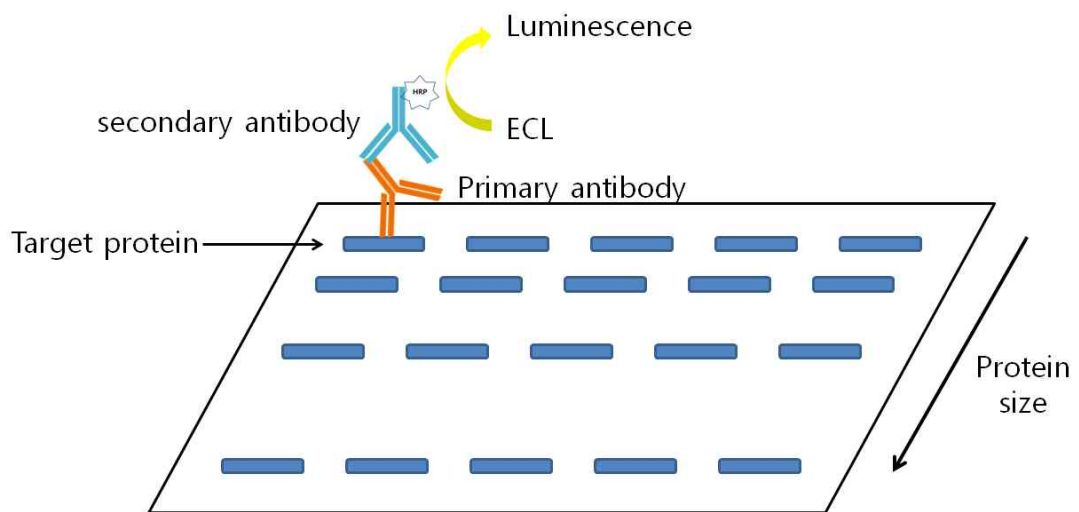


Figure 14. Principle of western blot

## 2.6. NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate 에  $7 \times 10^4$  cells/well 농도로 접종하여 10 % FBS 와 1 % penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지에 24 시간 동안 배양한 후 배지를 제거한 후 아무것도 첨가하지 않은 DMEM 배지에 LPS (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )와 시료를 각 농도 별로 희석하여 24 시간 동안 처리하였다. 그 후에 96 well plate 에 상층액 100  $\mu\text{L}$  와 griess 시약 100  $\mu\text{L}$  를 15 분 동안 암반응 시킨 후 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

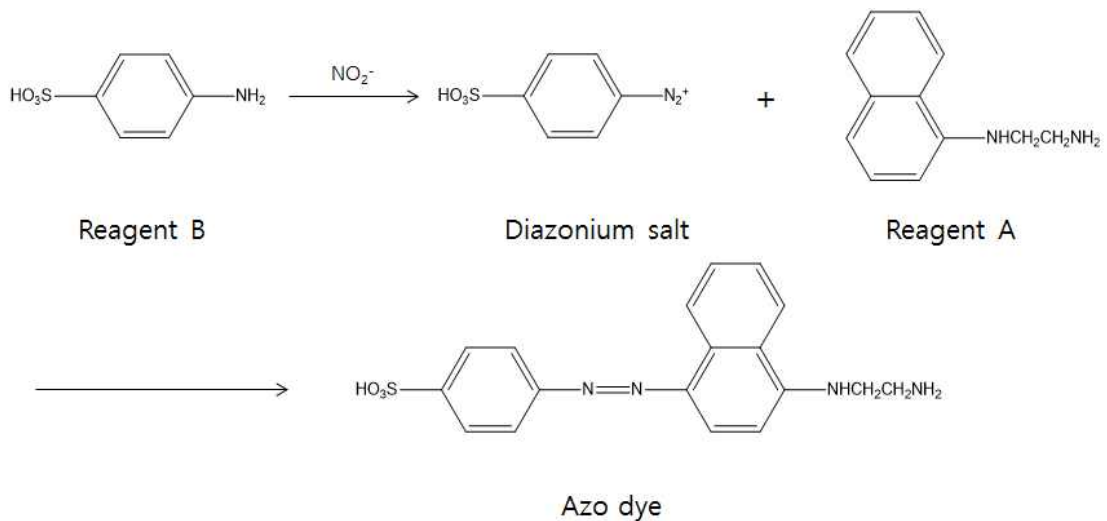


Figure 15. Principle of griess test

## 2.7. 통계처리

모든 실험의 결과는 평균  $\pm$  표준편차 (SD: n = 3 or 4)로 표현하였다. Student's t-test 를 사용하여 통계적 유의성 및  $p$  값을 표현하였다. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs. tobramycin treatment 로 나타내었다.

### III. 결 과

#### 1. B16F10 melanoma 세포 내에서 항생제의 세포독성 평가

B16F10 melanoma 세포에서 각각의 항생제가 세포생존에 미치는 영향을 평가하기 위해 MTT 실험을 진행하였다. 각 항생제들은 다양한 농도 범위 (0.00625 ~ 16 mg/mL)에서 48 시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 세포(대조군)을 기준으로 하여 측정하였고 80 % 이상의 세포생존율의 농도에서 후속 실험을 진행하였다.

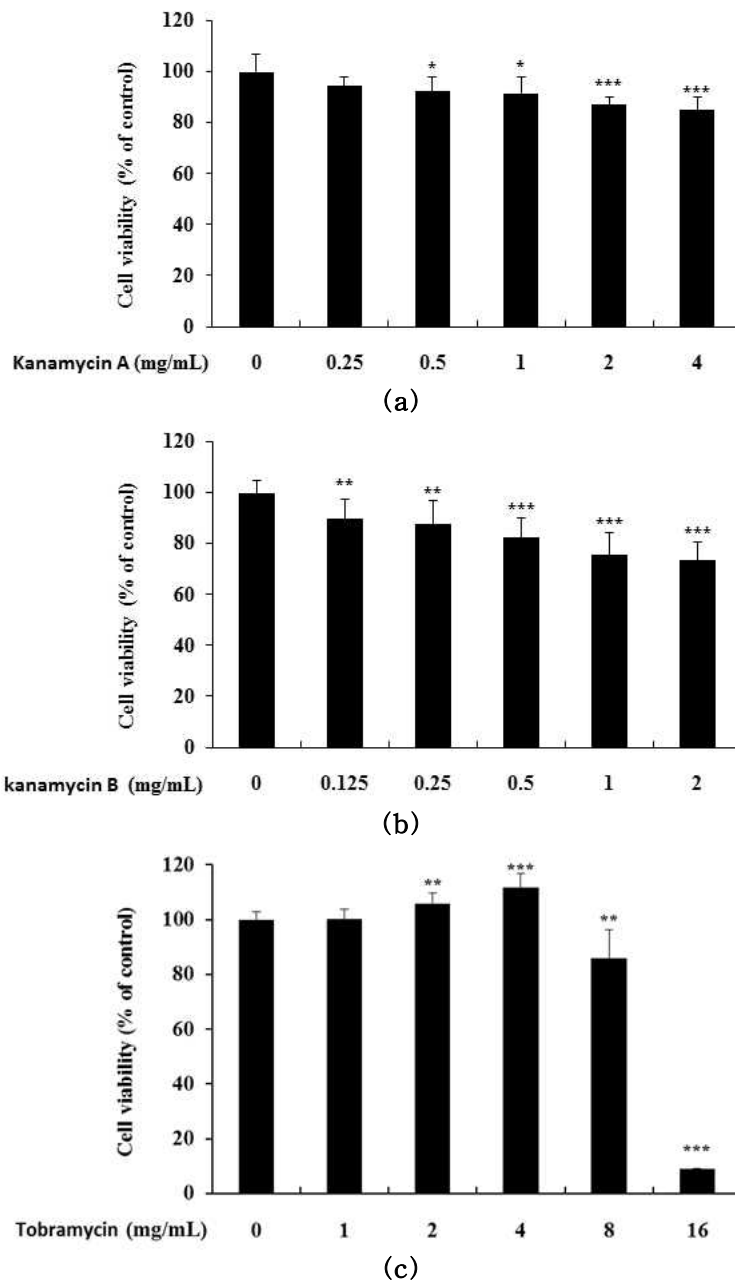


Figure 16. Cell viability of kanamycin A, kanamycin B and tobramycin on B16F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of (a) kanamycin A, (b) kanamycin B and (c) tobramycin for 48 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \* indicates  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

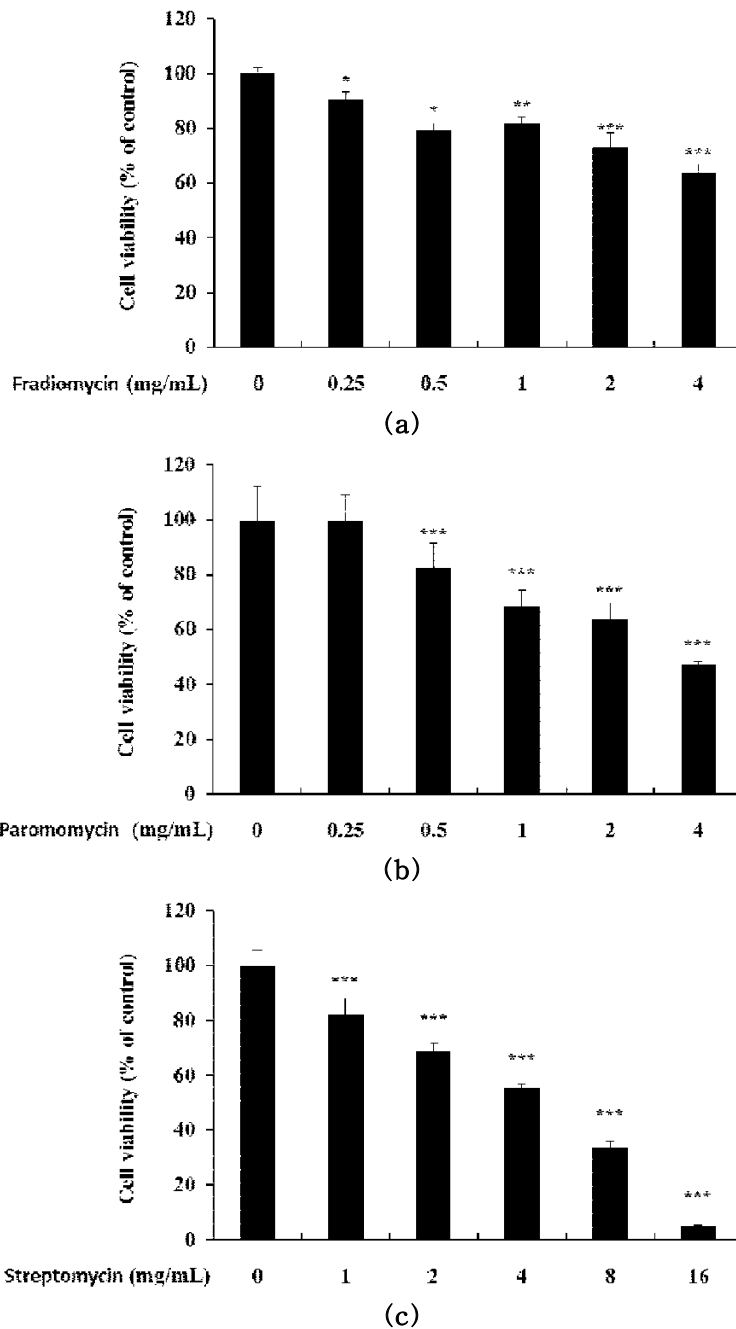


Figure 17. Cell viability of fradiomycin, paromomycin and streptomycin on B16F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of (a) fradiomycin, (b) paromomycin and (c) streptomycin for 48 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \* indicates  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

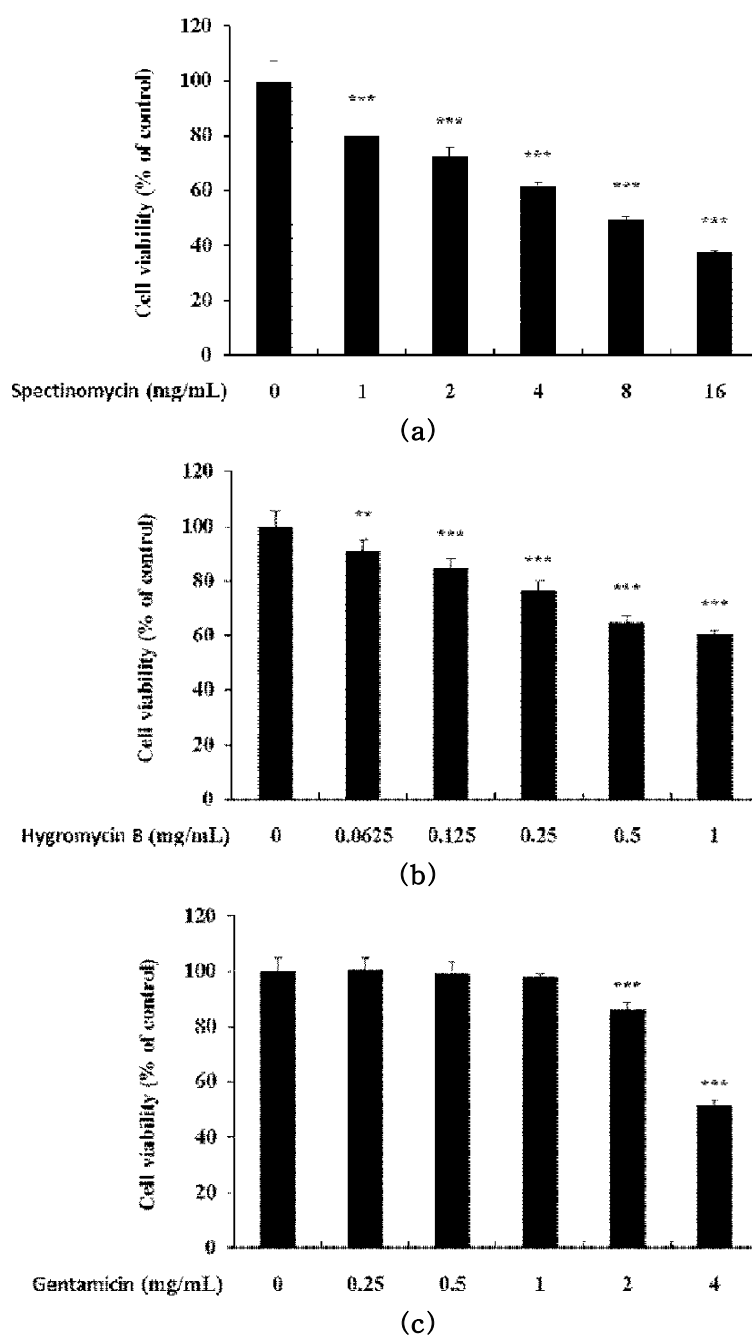


Figure 18. Cell viability of spectinomycin, hygromycin B and gentamicin on B16F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of (a) spectinomycin, (b) hygromycin B and (c) gentamicin for 48 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.



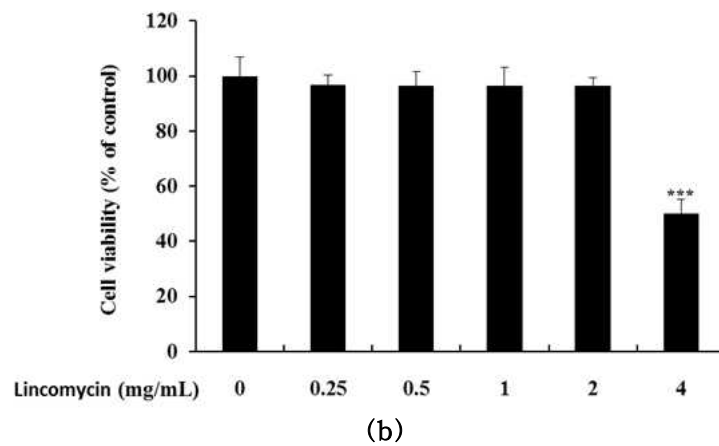
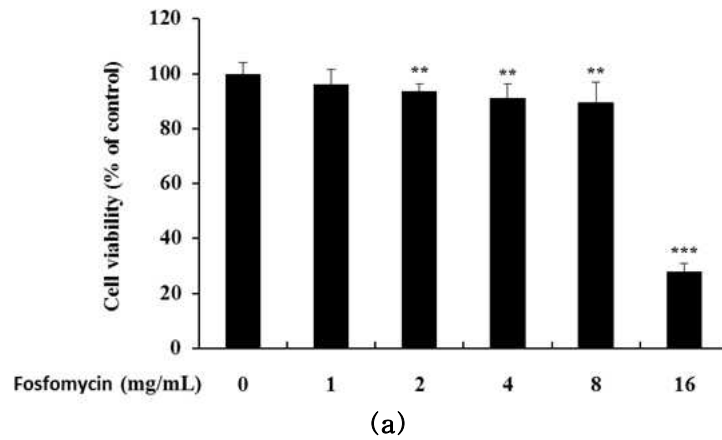
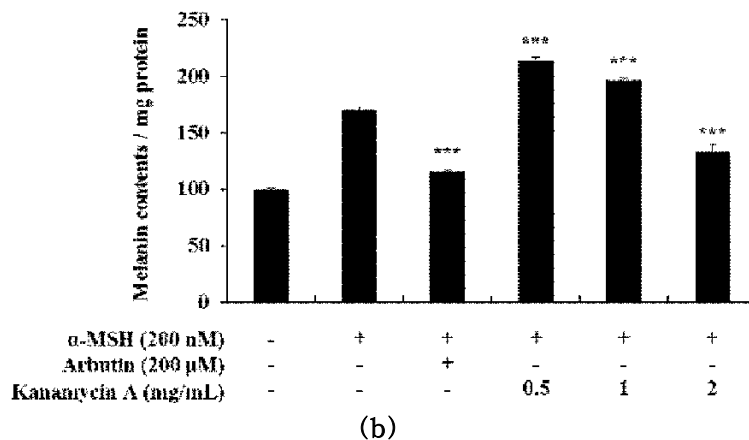
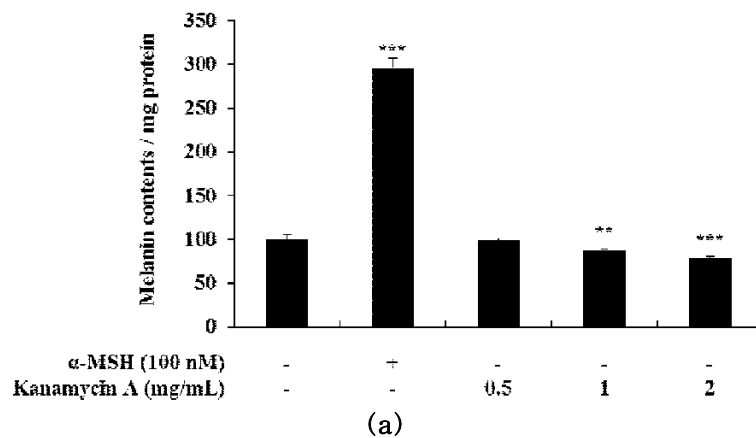


Figure 19. Cell viability of fosfomycin and lincomycin on B16F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of (a) fosfomycin and (b) lincomycin for 48 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

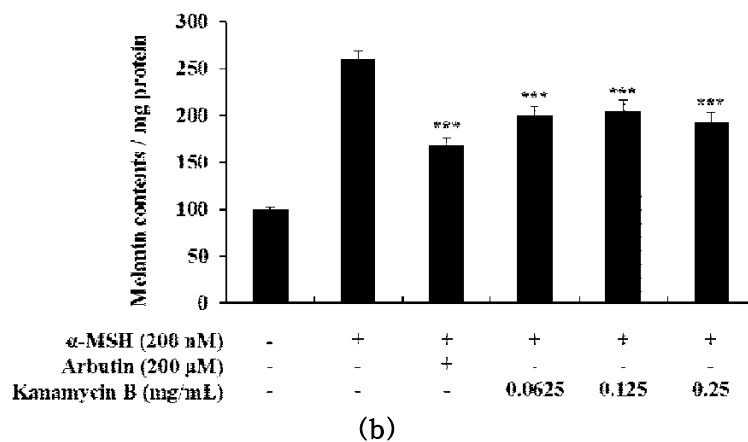
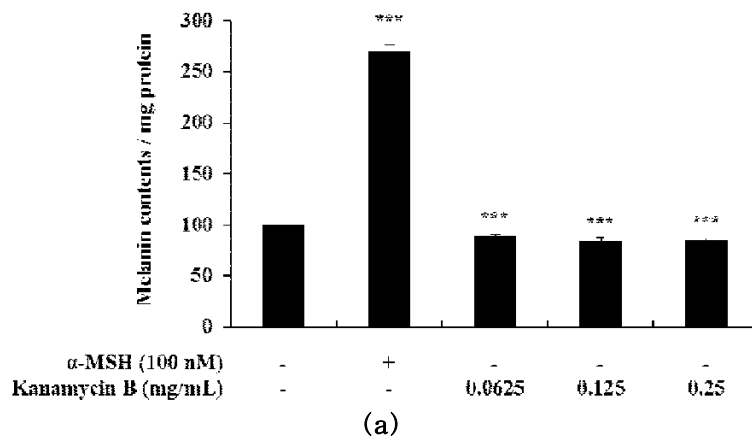
## 2. B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 합성에 항생제가 미치는 영향 평가

항생제가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포생존에 영향을 미치지 않는 농도범위의 항생제를 B16F10 세포에 72 시간 동안 처리하였다. 양성대조군으로는  $\alpha$ -MSH (100, 200 nM), arbutin (200  $\mu$ M)을 사용하였다.

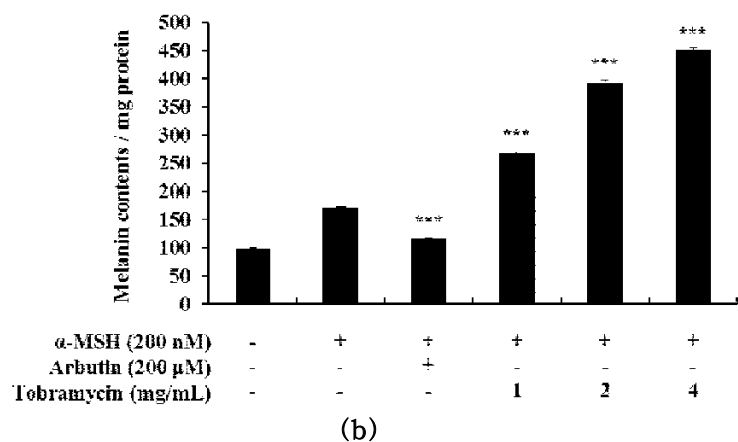
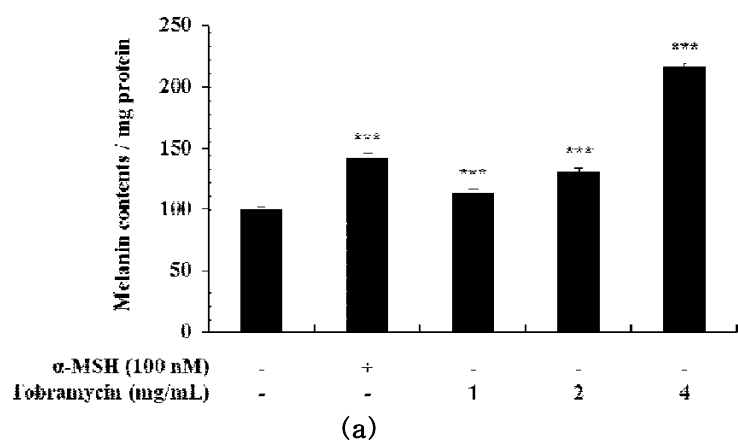
실험결과 kanamycin A, streptomycin 은 멜라닌이 감소하였으며 tobramycin, fosfomycin, lincomycin 은 멜라닌이 증가하였다. 이 중 kanamycin A 와 streptomycin 은 이전에 멜라닌 감소효과가 있는 것으로 알려져 있었지만 tobramycin, fosfomycin, lincomycin 의 멜라닌 증가효과에 대한 연구는 진행되지 않았다 [48,49].



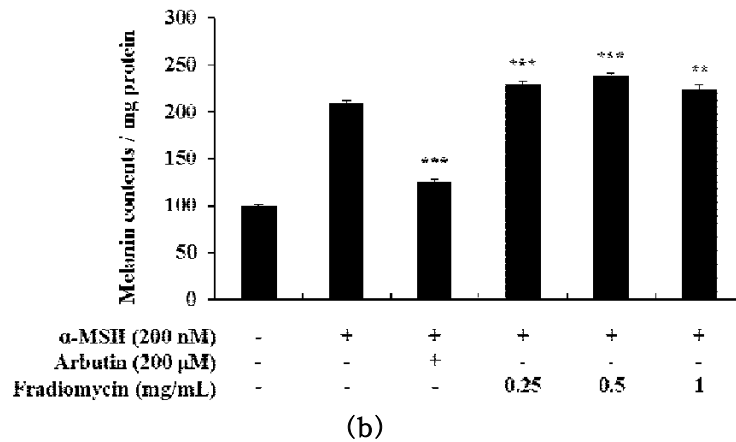
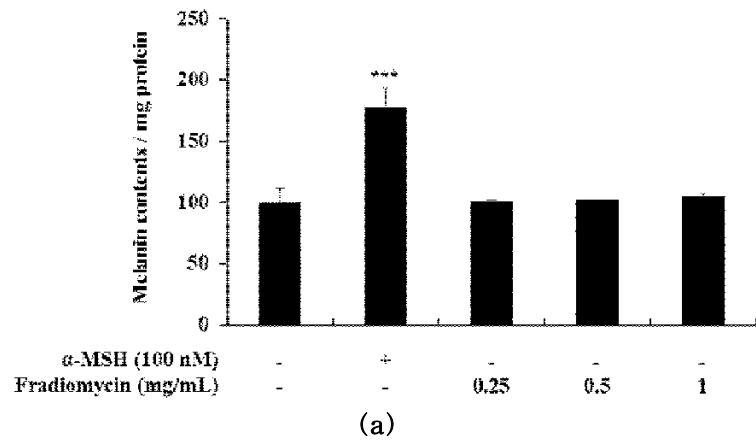
**Figure 20. Melanin contents of kanamycin A on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of kanamycin A for 72 h. α-MSH was used as the positive control and arbutin was used as the negative control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in kanamycin A. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or α-MSH treatment (b).



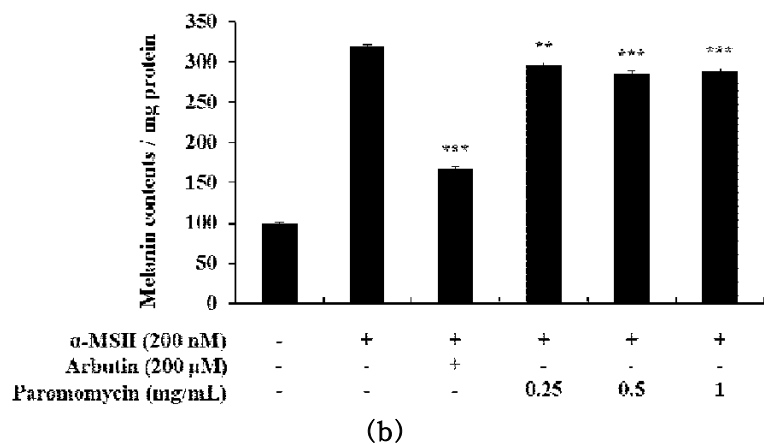
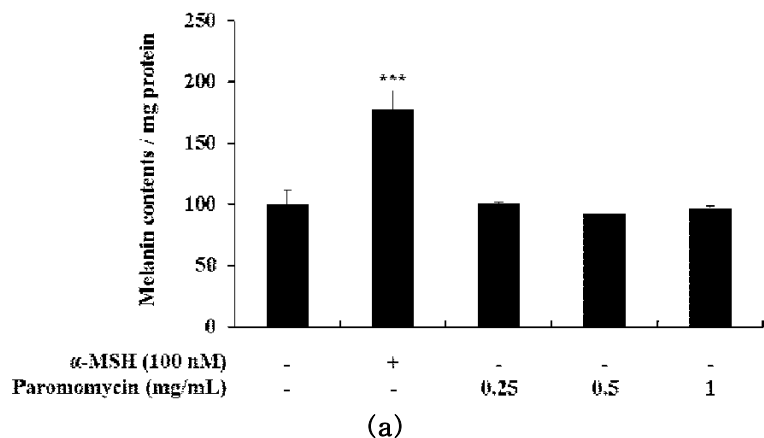
**Figure 21. Melanin contents of kanamycin B on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of kanamycin B for 72 h.  $\alpha$ -MSH was used as the positive control and arbutin was used as the negative control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in kanamycin B. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments ( $n=4$ ). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).



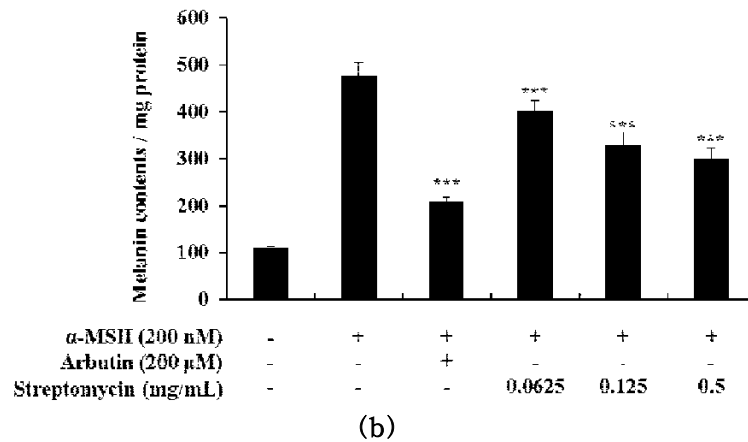
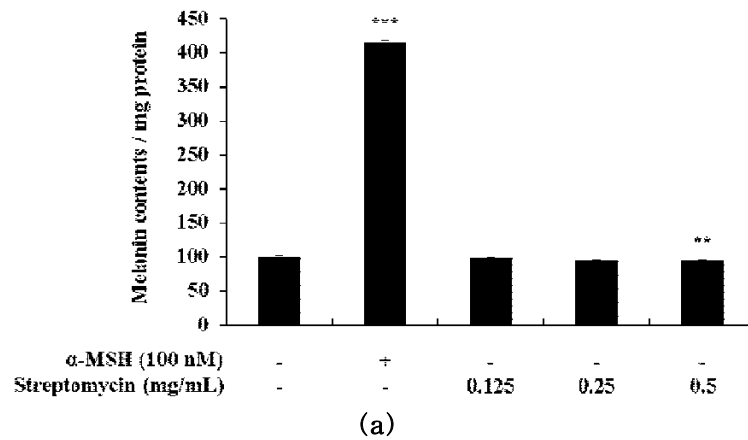
**Figure 22.** Melanin contents of tobramycin on B16F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of tobramycin for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in tobramycin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).



**Figure 23. Melanin contents of fradiomycin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of fradiomycin for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in fradiomycin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).

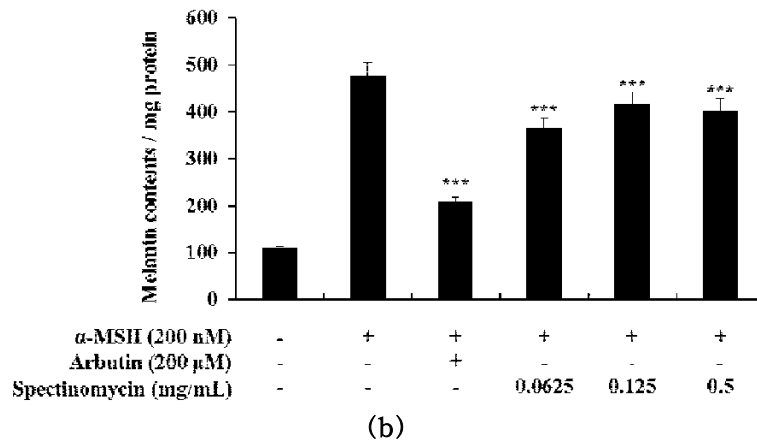
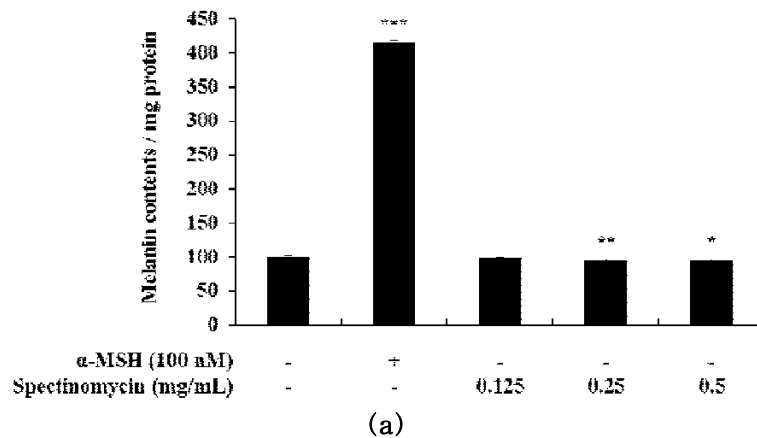


**Figure 24. Melanin contents of paromomycin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of paromomycin for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in paromomycin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments ( $n=4$ ). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).



**Figure 25. Melanin contents of streptomycin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of streptomycin for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in streptomycin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments ( $n=4$ ). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).





**Figure 26. Melanin contents of spectinomycin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of spectinomycin for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in spectinomycin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).

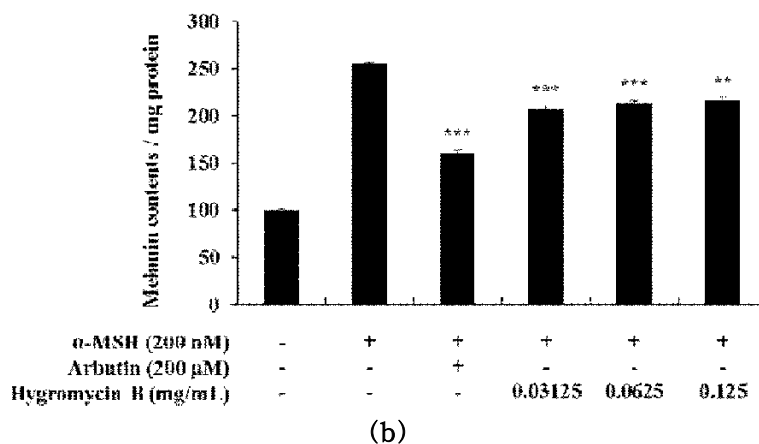
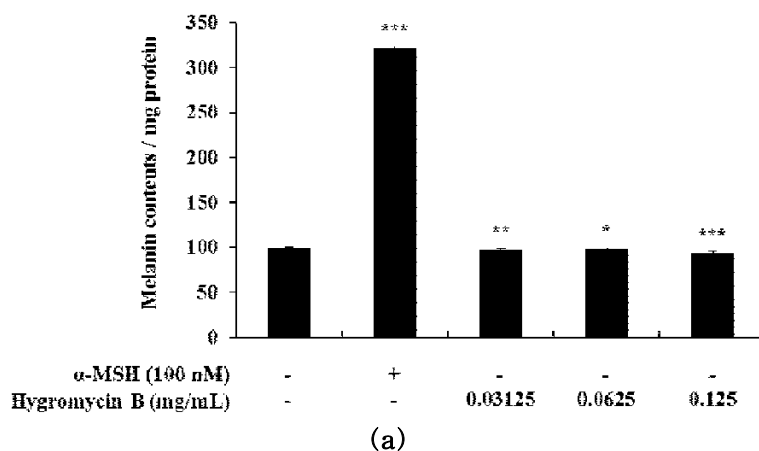
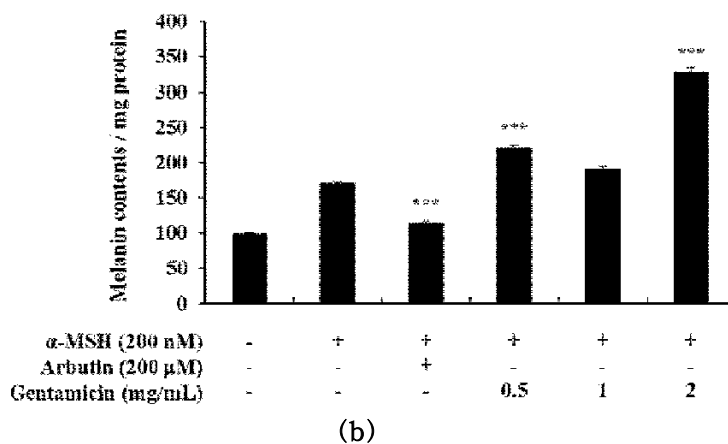
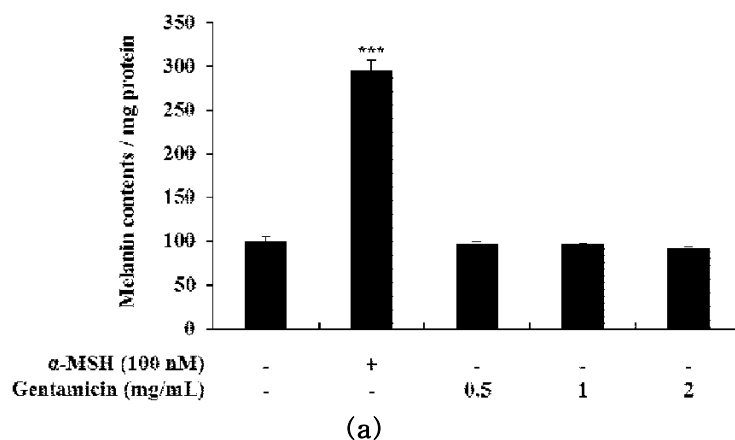
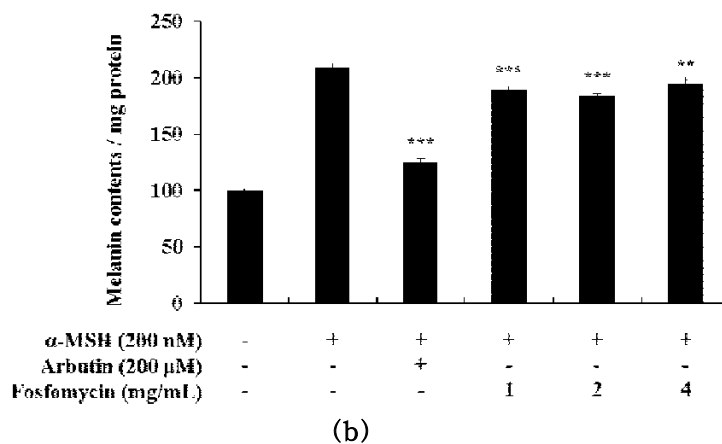
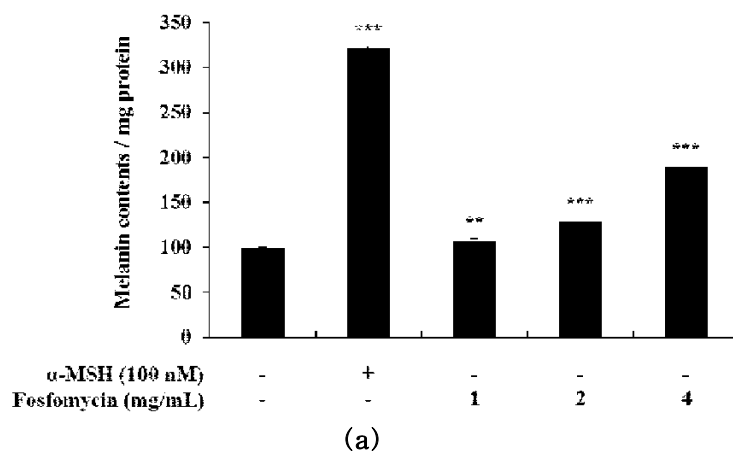


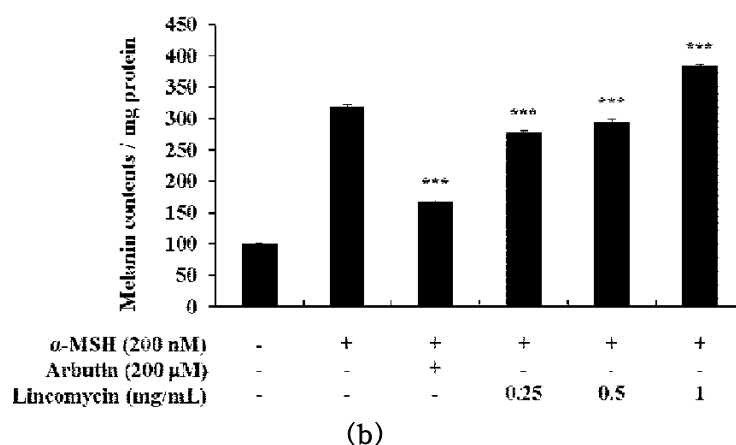
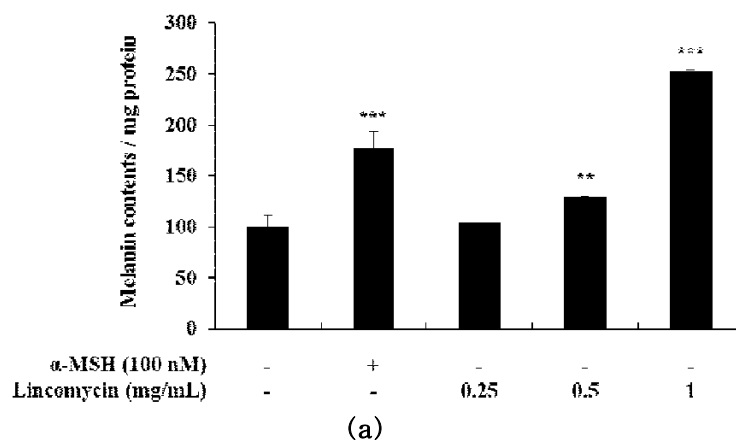
Figure 27. Melanin contents of hygromycin B on B16F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of hygromycin B for 72 h. α-MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in hygromycin B. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or α-MSH treatment (b).



**Figure 28. Melanin contents of gentamicin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of gentamicin for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in gentamicin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).



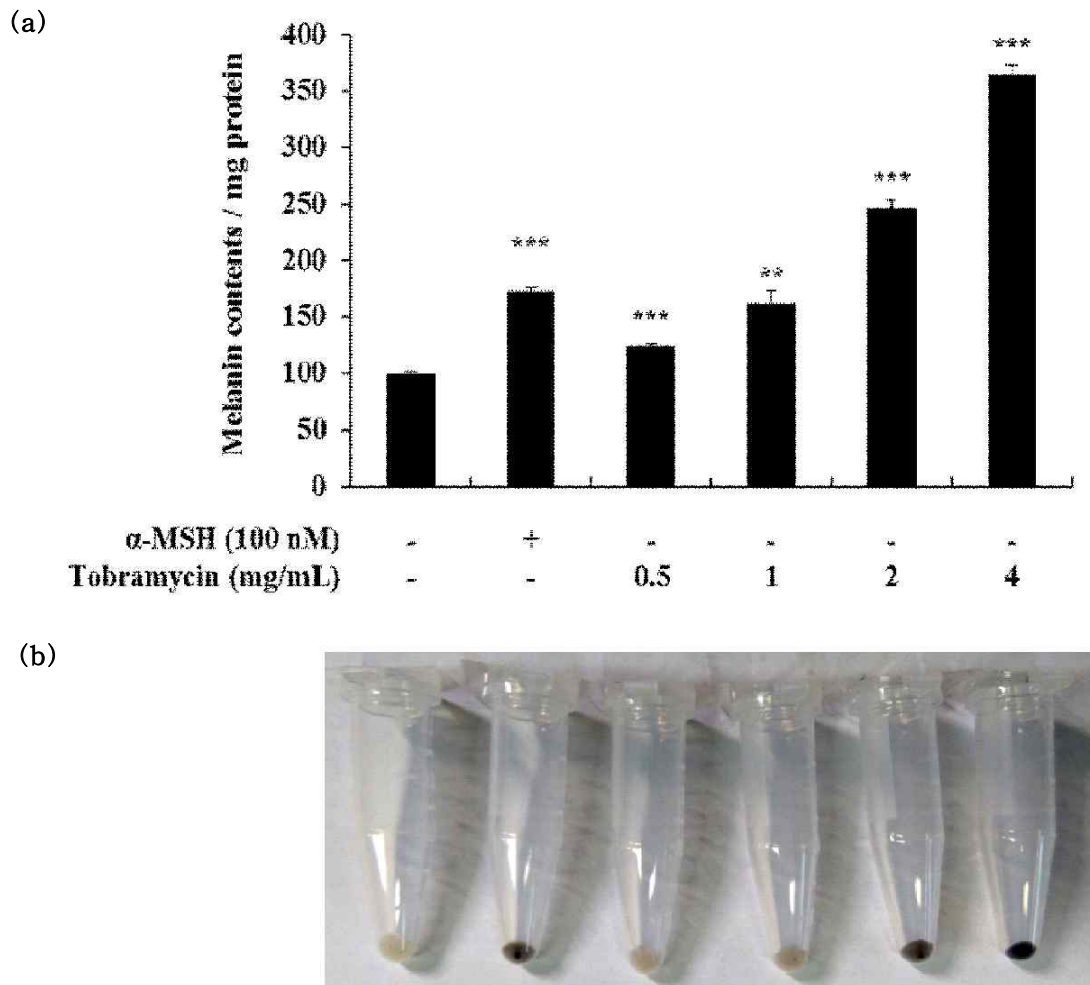
**Figure 29. Melanin contents of fosfomycin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of fosfomycin for 72 h. α-MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in fosfomycin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or α-MSH treatment (b).



**Figure 30. Melanin contents of lincomycin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of lincomycin for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in lincomycin. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).

### 3. Tobramycin이 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성에 미치는 영향

앞의 실험결과에서 tobramycin 이 멜라닌 함량을 증가시키는 경향이 나와 다시 한 번 멜라닌 함량을 측정하고 멜라닌 합성에 중요한 효소인 tyrosinase 의 활성실험을 진행하였다. B16F10 세포에 양성대조군으로  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 처리하였고 다양한 농도의 tobramycin (0.5, 1, 2, 4 mg/mL)를 처리하였다. 그 결과 고농도의 tobramycin 을 처리한 군의 멜라닌 함량이 양성대조군보다 큰 폭으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 토브라마이신을 처리한 군에서 대조군, 양성대조군과 비교했을 때 tyrosinase 의 활성이 크게 증가한 것을 확인하였다.



**Figure 31. Melanin contents of tobramycin on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of tobramycin for 72 h and  $\alpha$ -MSH was used as the positive control. (a) Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. (b) Images of pellets of B16F10 cells after harvested by centrifugation. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\*\* indicates  $p < 0.001$  vs. control.

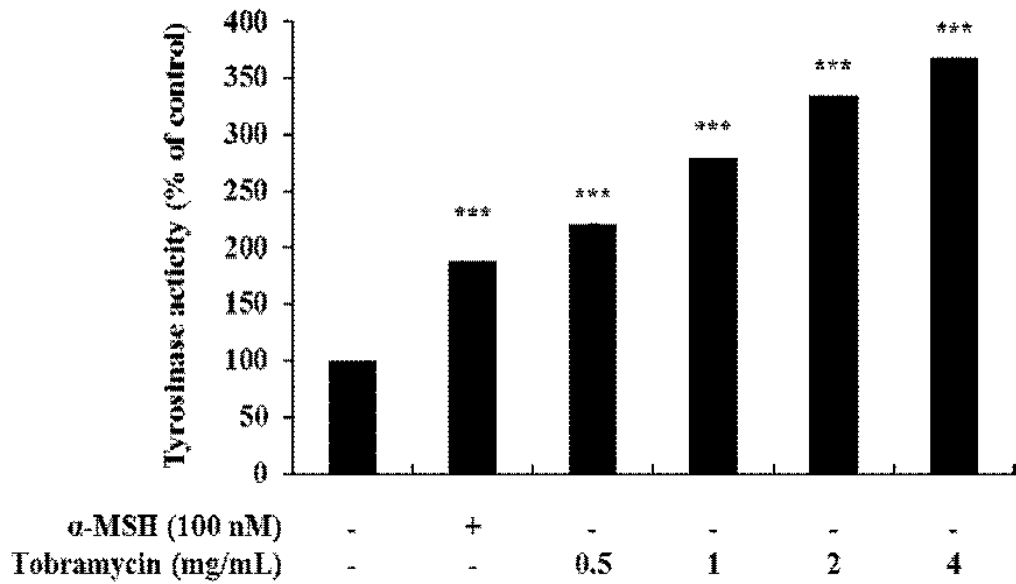


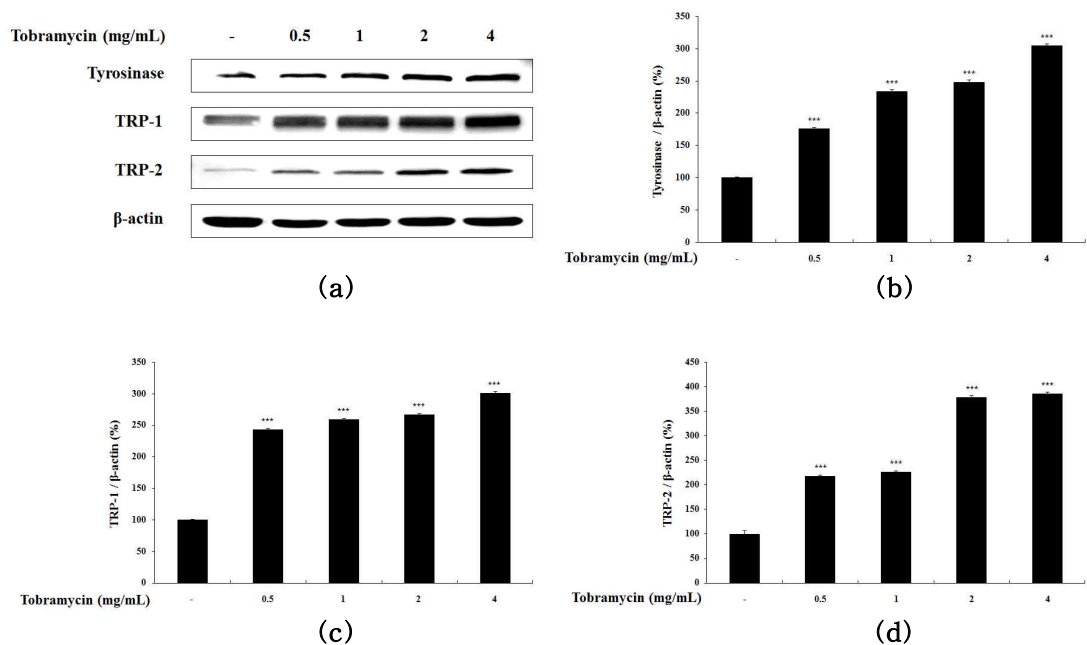
Figure 32. Tyrosinase activity of tobramycin on B16F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of tobramycin for 72 h and  $\alpha$ -MSH was used as the positive control. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\*\* indicates  $p < 0.001$  vs. control.



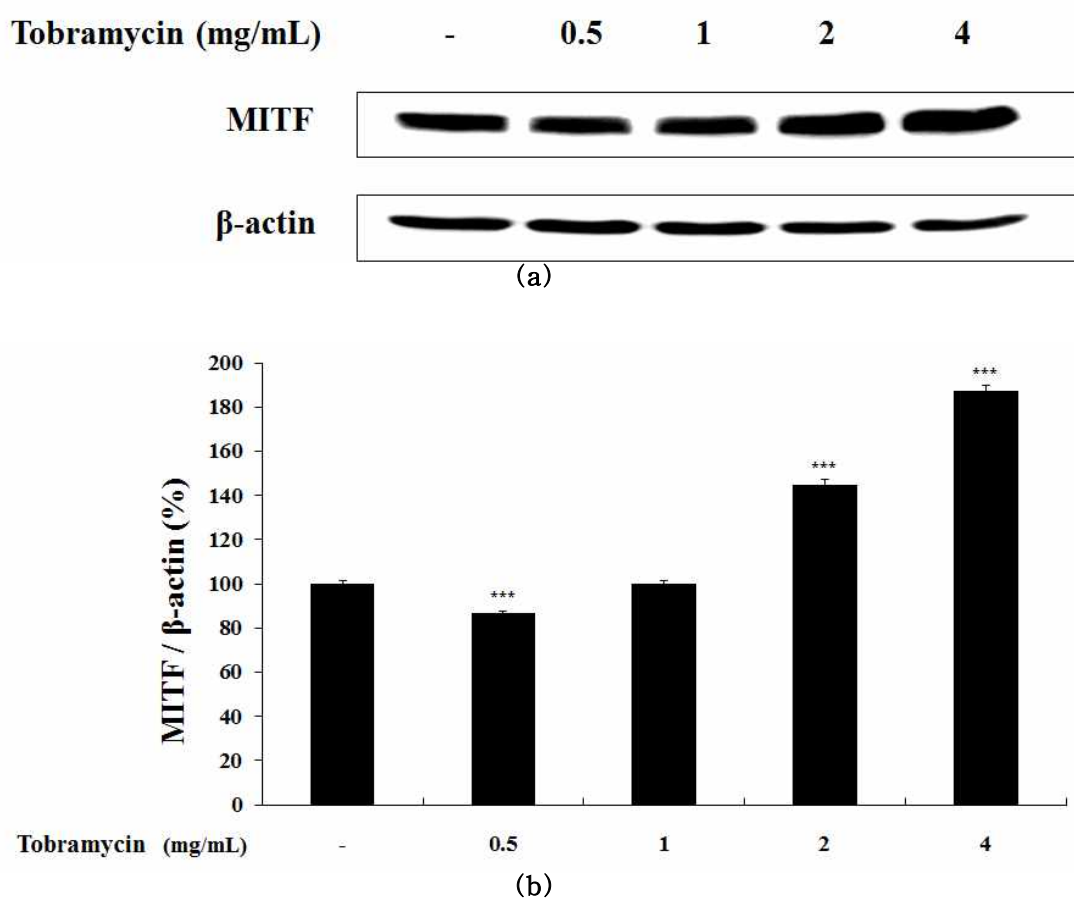
## 4. Western blot 분석

### 4.1. 멜라닌 생성 관련 효소들의 발현에 tobramycin이 미치는 영향

멜라닌이 합성되는 과정에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 중요한 역할을 하는 효소이다. 앞선 실험에서 tobramycin이 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성을 증진시키는 것을 확인할 수 있었다. 이에 tobramycin이 세포 내에서 이러한 효소들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 실험 결과 tobramycin의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 앞의 세 효소는 MITF라는 조절인자에 의해 발현량이 조절된다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현이 증가하였으므로 tobramycin이 MITF의 발현에 끼친 영향을 확인한 결과 tobramycin의 농도가 증가함에 따라 MITF의 발현도 농도의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.



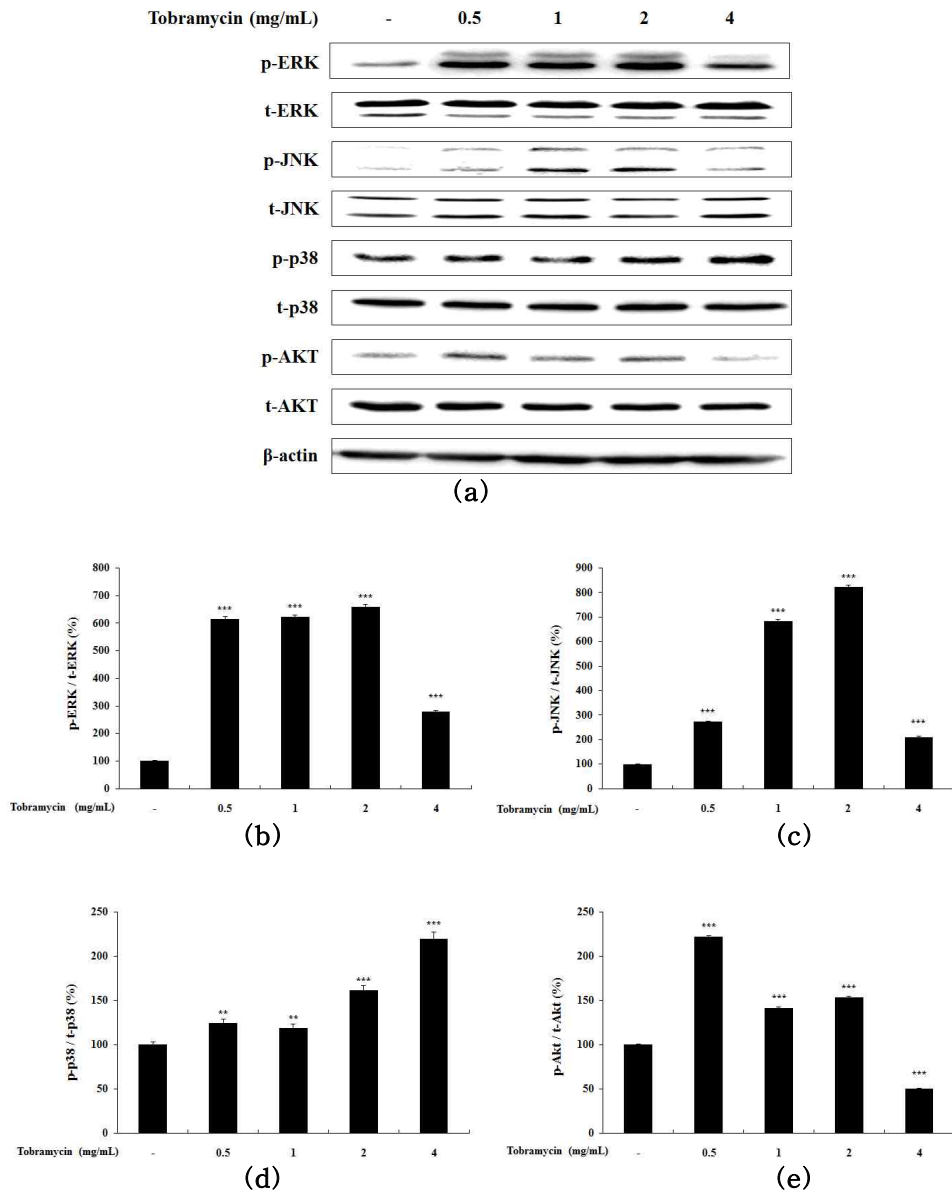
**Figure 33.** Effect of tobramycin on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16F10 cells. Cells were treated with various concentration of tobramycin for 40 h. Protein levels were examined by western blotting. (a) Result of western bolting, and protein level of (b) tyrosinase, (c) TRP-1 and (d) TRP-2. Result are expressed as a percentage of the control. Data are presented as mean  $\pm$ standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). \*\*\* indicates  $p < 0.001$  vs. control.



**Figure 34.** Effect of tobramycin on MITF expression in B16F10 cells. Cells were treated with various concentration of tobramycin for 20 h. Protein levels were examined by western blotting. (a) Result of western blotting, and protein level of (b) MITF. Results are expressed as a percentage of the control. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). \*\*\* indicates  $p < 0.001$  vs. control.

#### 4.2. MAPK , AKT 신호전달경로에 대한 tobramycin의 영향

선행 연구에 의하면 MAPK 신호전달 경로에서 ERK의 인산화는 MITF의 분해로 이어지고 JNK, p38의 인산화는 MITF의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다. 또한 AKT 신호전달 경로에서 AKT의 인산화는 MITF의 분해로 이어져 멜라닌 생성을 감소시킨다고 보고되었다. 따라서 tobramycin이 B16F10 세포 내 신호전달경로의 단백질들에 어떤 영향을 미치는지를 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 실험결과 tobramycin이 ERK, JNK, AKT의 인산화 또는 발현에 유의미한 영향을 미치지 못한 반면 p38 단백질을 농도의존적으로 인산화하는 것을 확인하였다.



**Figure 35. Effect of tobramycin on MAPK expression in B16F10 cells.** Cells were treated with various concentration of tobramycin for 4 h. Protein levels were examined by western blotting. (a) Result of western blotting and protein level of (b) p-ERK, (c) p-JNK, (d) p-p38 and (e) p-Akt. Result are expressed as a percentage of the control. Data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments (n=3). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

#### 4.3. 신호전달경로에 대한 저해제 및 tobramycin의 영향

Tobramycin 이 세포 내에서 멜라닌 형성에 관련된 신호전달경로에 어떠한 영향을 미치는지 단백질 저해제를 사용하여 tyrosinase activity assay 를 진행하였다. 실험결과 SB203580 (p38 inhibitor)와 tobramycin 을 동시에 처리한 그룹에서 tobramycin 단독 처리군에 비해 tyrosinase 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이것으로 tobramycin 이 p38 단백질을 인산화 함으로써 멜라닌 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 그 외 H89 (PKA inhibitor) and LY294002 (AKT inhibitor) 처리를 통한 PKA, AKT 신호전달경로에 대한 tobramycin 의 영향도 다시 한 번 확인해본 결과 해당 신호전달경로에서 tobramycin 의 영향은 없는 것으로 확인되었다.

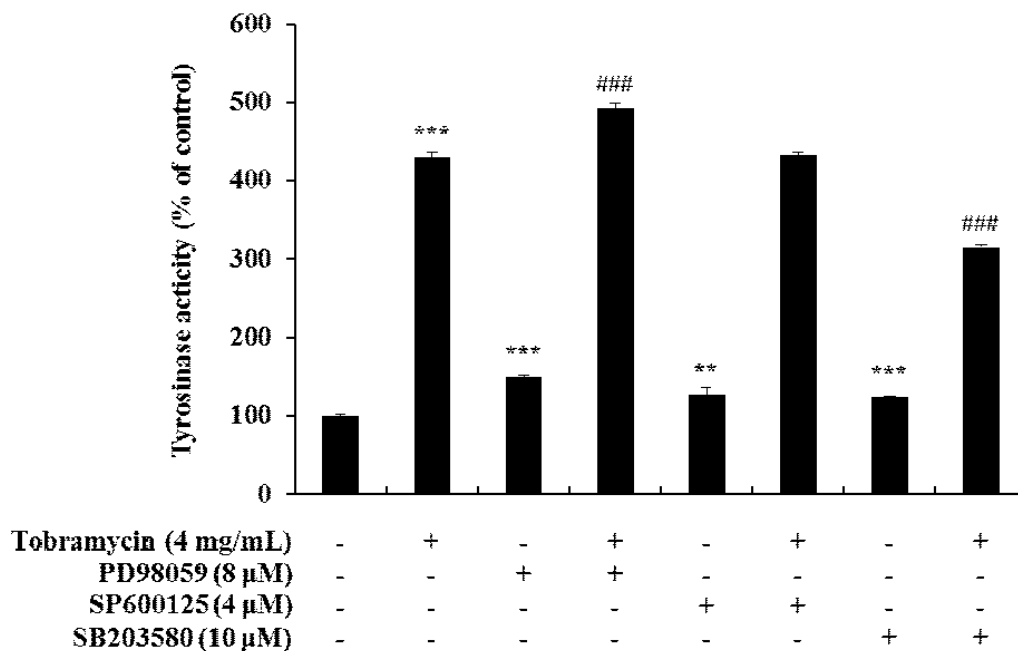


Figure 36. Effect of MAPK inhibitors on tyrosinase activity in tobramycin-treated B16F10 cells. To confirm the mechanism of tobramycin in melanogenesis, a cellular tyrosinase activity was measured using the following MAPK inhibitors: PD98059 (ERK inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor). Result is expressed as a percentage of the control. Data are presented as mean  $\pm$ SD of at four three independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control and ### indicates  $p < 0.001$  vs. tobramycin treatment.

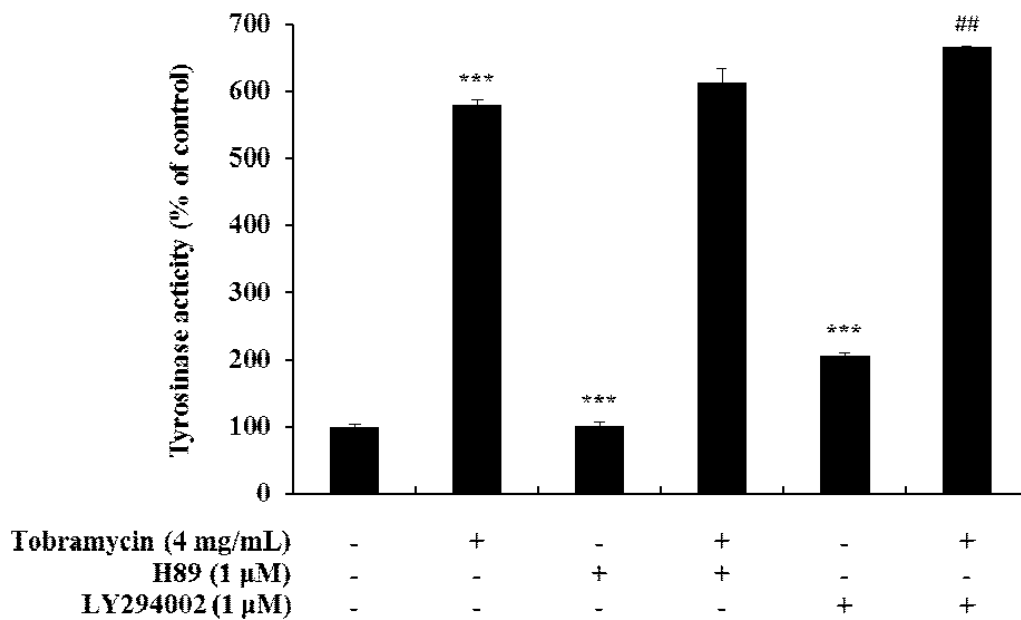


Figure 37. Effects of PKA and AKT inhibitors on tyrosinase activity in tobramycin-treated B16F10 cells. To confirm the mechanism of tobramycin in melanogenesis, a cellular tyrosinase activity was measured using the H89 (PKA inhibitor) and LY294002 (AKT inhibitor). Result is expressed as a percentage of the control. Data are presented as mean  $\pm$ SD of at four three independent experiments (n=4). \*\*\* indicates  $p < 0.001$  vs. control and ## indicates  $p < 0.01$  vs. tobramycin treatment.



## 5. Aminoglycoside 계열 항생제의 골격

Tobramycin은 aminoglycoside 계열의 항생제이며 aminoglycoside는 구조적으로 2-DOS, streptomine, actinamine 등의 aminocyclitol 코어를 갖는다. 이러한 aminocyclitol의 구조가 멜라닌 형성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 MTT assay와 melanin contents assay를 진행하였다.

MTT assay 결과를 바탕으로 3가지 시료 모두 세포생존률이 80% 이상인 농도가 250  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되어 이후 이 농도를 기준으로 실험을 진행하였다. Melanin contents assay에서는 2-DOS, streptomine에서는 멜라닌 함량에 변화가 없었으나 actinamine에서는 약간 감소하는 경향이 있었다.

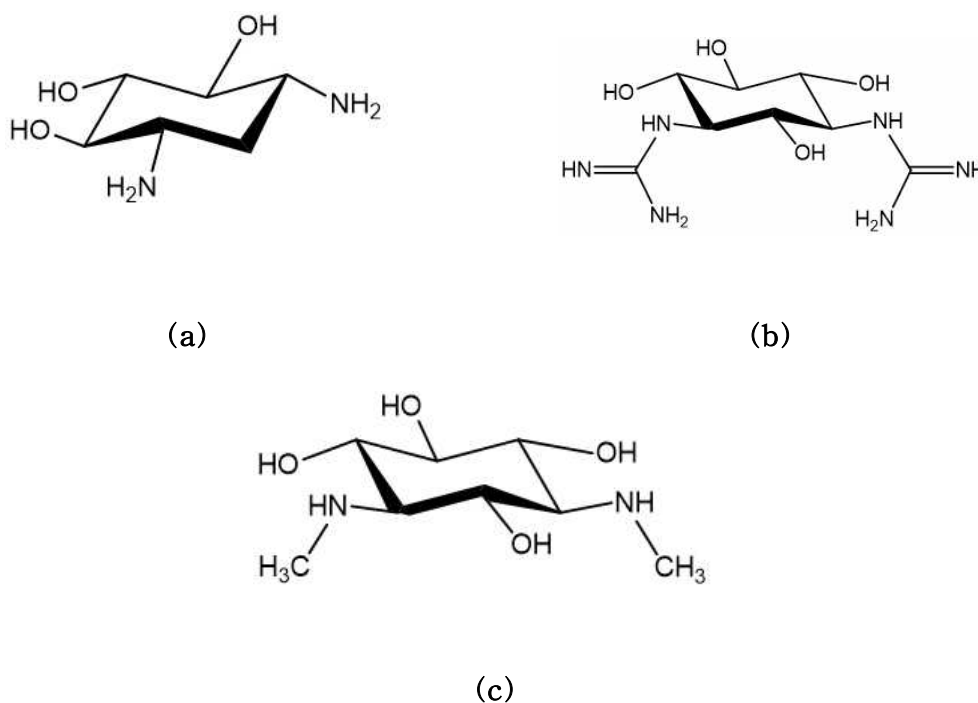
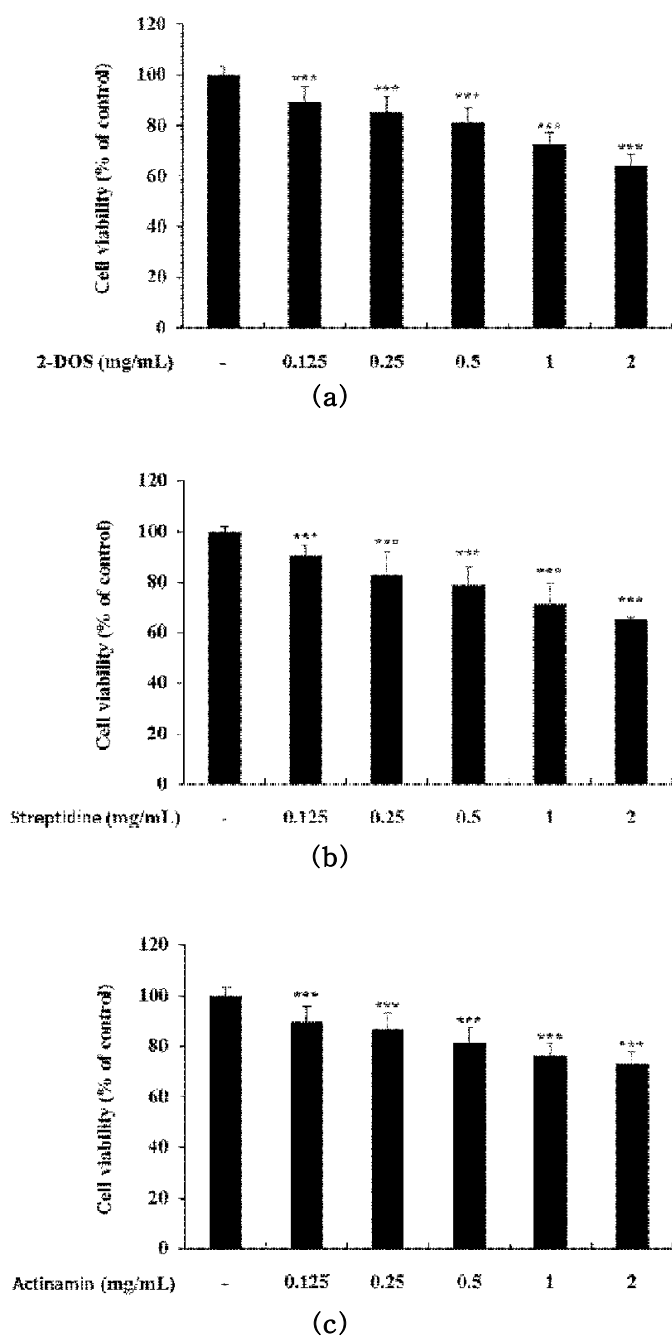
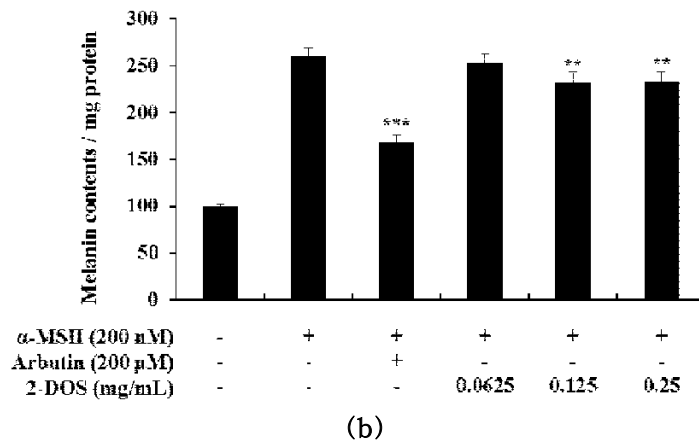
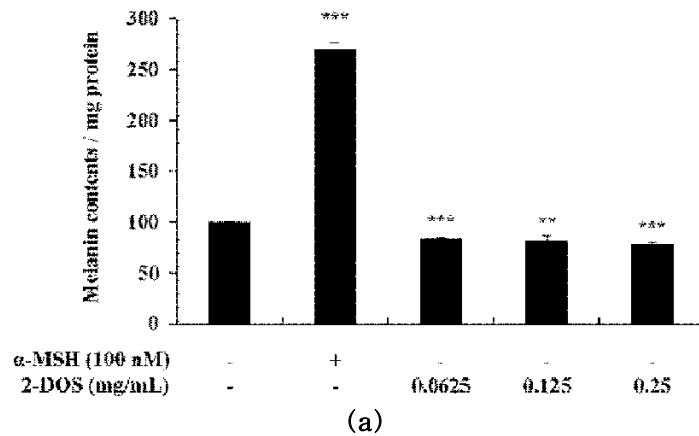


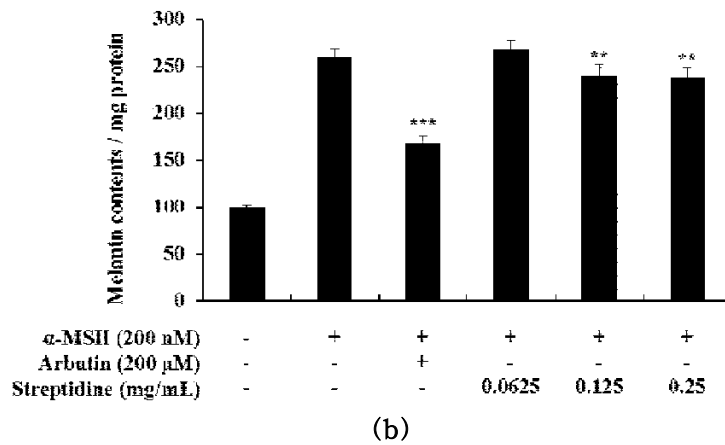
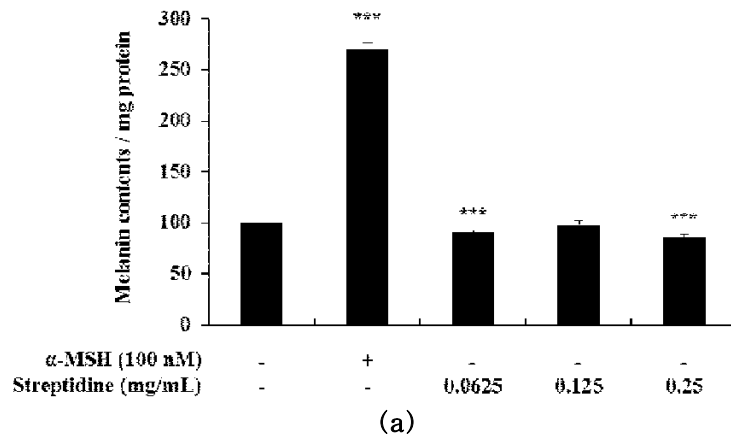
Figure 38. Structures of (a) 2-DOS, (b) streptomine, (c) actinamine.



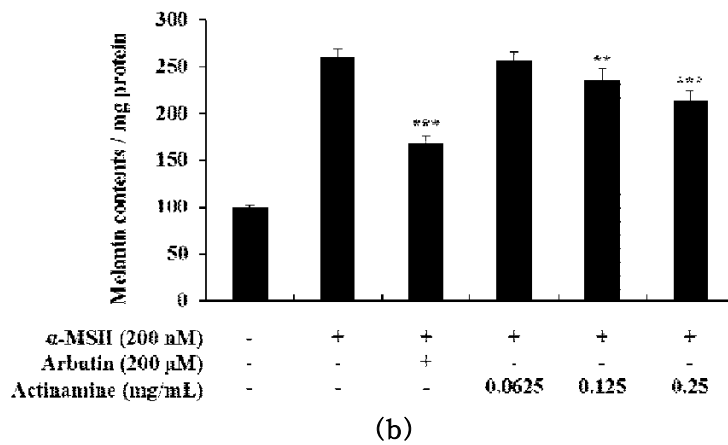
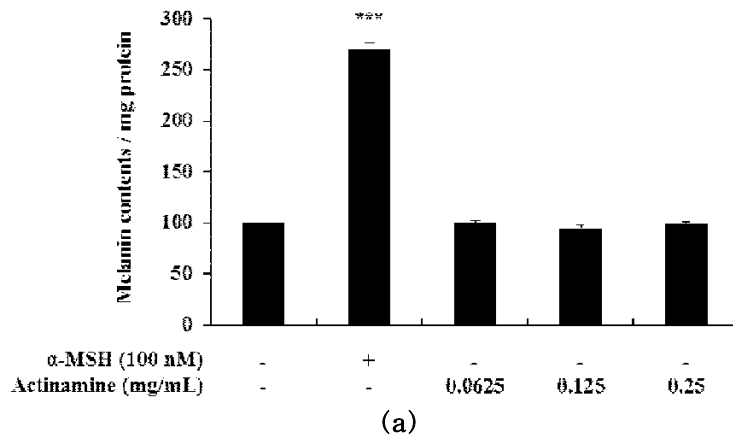
**Figure 39. Cell viability of aminocyclitols on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of (a) 2-DOS, (b) streptidine and (c) actinamine for 48 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \* indicates  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.



**Figure 40. Melanin contents of 2-DOS on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of 2-DOS for 72 h. α-MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in 2-DOS. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. (a) Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or α-MSH treatment (b).



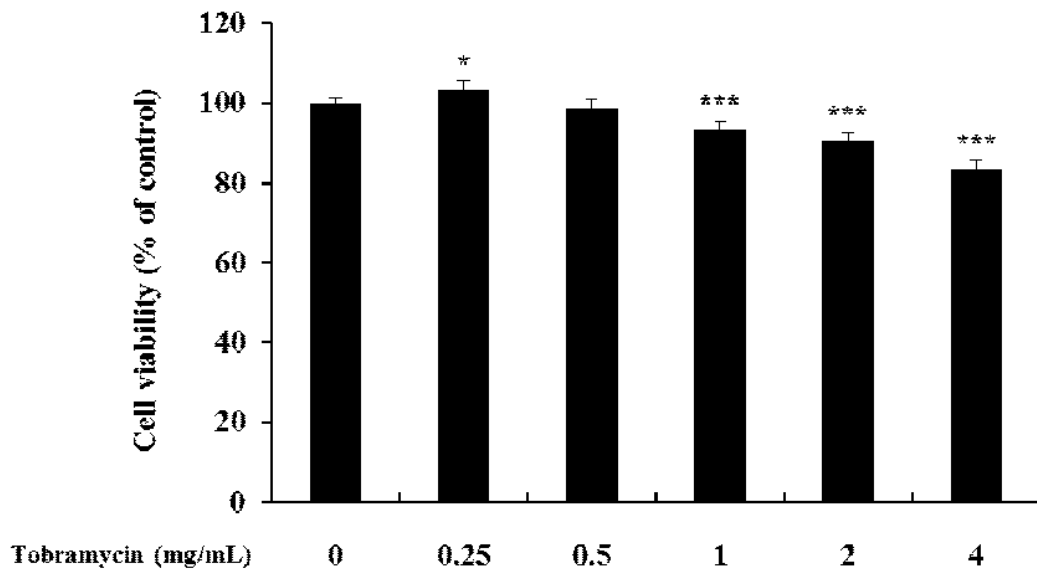
**Figure 41. Melanin contents of streptidine on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of streptidine for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in streptidine. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. (a) Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments ( $n=4$ ). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).



**Figure 42. Melanin contents of actinamine on B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with various concentrations of actinamine for 72 h.  $\alpha$ -MSH and arbutin were used as the positive control. We conducted a melanin content experiment to evaluate the potential for increased melanin or decreased melanin in actinamine. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. (a) Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments ( $n=4$ ). \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control (a) or  $\alpha$ -MSH treatment (b).

## 6. HaCaT keratinocyte 세포에서 tobramycin의 세포독성 평가

멜라닌세포는 피부 기저층에 각질세포와 함께 존재하며 하나의 멜라닌세포에서 뻗어나온 돌기는 30~40 개의 주변 각질세포와 접촉하고 있다. 앞에서는 tobramycin 이 멜라닌세포에서 멜라닌 합성 증진 효과를 가지고 있는 것을 확인하였기에 멜라닌세포 주변의 각질세포에서의 tobramycin 의 영향을 확인하기 위해 인간 각질세포인 HaCaT 세포를 사용하여 MTT assay 를 진행하였다. 그 결과 멜라닌세포에서는 8 mg/mL 이상에서 독성을 보였으나 각질세포에서는 4 mg/mL 에서 83 %의 세포생존률을 보였다 [50].



**Figure 43. Cell viability of tobramycin on HaCaT human keratinocytes.** The cells were treated with various concentrations of tobramycin for 24 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \* indicates  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

## 7. RAW 264.7 macrophage 세포에서 tobramycin의 NO 활성 억제 효과

Tobramycin의 NO 활성 억제 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에서 독성이 나타나지 않는 범위 (0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL)에서 griess test 실험을 진행하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지와 양성대조군으로 LPS (1 µg/mL)를 처리하였다. Tobramycin은 독성이 나타나지 않는 농도 범위에서 LPS와 동시에 처리하였다. 그 결과 tobramycin과 LPS를 동시에 처리한 세포와 LPS 단독으로 처리한 세포의 NO 생성량에는 차이가 없었다. 이것으로 보아 tobramycin은 RAW 264.7 세포에서 NO 생성량에 아무런 영향도 미치지 못하는 것을 확인하였다.



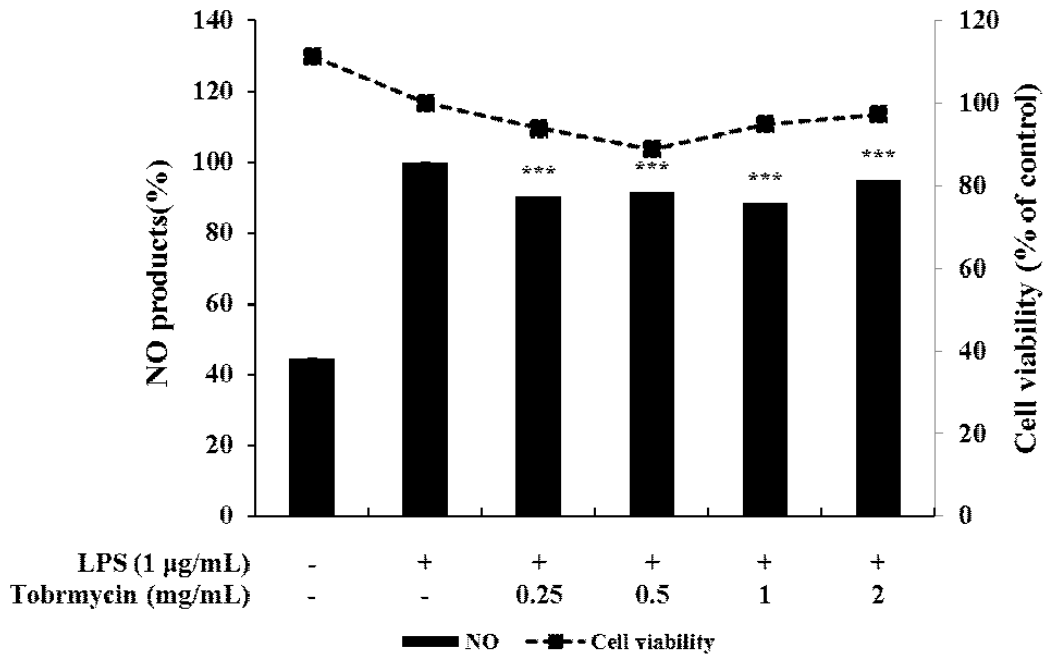


Figure 44. Effect of tobramycin on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentration of tobramycin (0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL) for 24 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\*\* indicates  $p < 0.001$  vs. control.

## IV. 고찰

최초의 항생제인 페니실린 이후 많은 항생제들이 개발되면서 질병의 치료와 예방, 사망률과 합병증 감소에 큰 영향을 미쳤다. 하지만 시간이 지남에 따라 초기에 발견된 항생제들은 보다 더 효과가 뛰어나고 부작용이 적은 항생제들의 개발에 의해 사용량이 감소하거나 더 이상 사용되지 않고 있다. 본 연구에서는 20세기 초•중반에 발견된 항생제들의 또 다른 활성을 찾기 위해 B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 합성에 오래된 항생제들이 어떤 영향을 미치는지를 평가하였다. 이 중 aminoglycoside 계열 항생제인 tobramycin 이 멜라닌 합량을 증가시키는 경향이 나타났고 이에 따른 추가적인 실험을 통해 tobramycin 이 멜라닌 합성 효소 및 멜라닌 생성 기전을 확인하였다.

먼저 MTT assay 를 통해 tobramycin 의 농도가 8 mg/mL 일 때 85 %의 세포독성이 나타나는 것을 확인하였다(Figure 16). 이에 세포독성이 나타나지 않은 농도인 4 mg/mL 를 최고 농도로 정하고 melanin contents assay 와 tyrosinase activity assay 를 진행하였다. 실험결과 멜라닌 합량은 대조군에 비해 최대 265 % 증가하였고 tyrosinase 활성은 고농도에서 대조군에 비해 267 % 증가하였다(Figure 31, 32). 이것으로 보아 tobramycin 이 농도의존적으로 tyrosinase 활성을 증가시키고, 그 결과 멜라닌 합량이 증가하는 것을 알 수 있었다. 그리고 tobramycin 이 B16F10 세포 내에서 어떠한 작용을 하는지 알아보기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 발현과 이들의 발현을 조절하는 인자인 MITF 단백질의 발현에 tobramycin 을 다양한 농도 (0.5, 1, 2, 4 mg/mL)로 처리하였을 때 농도의존적으로 세 가지 효소의 발현(Figure 33)과 MITF 단백질의 발현(Figure 34)이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 MITF 단백질의 발현에는 여러 가지 신호전달기전이 작용한다. MAPK 신호전달 경로에서 ERK, JNK, p38 단백질의 발현에 tobramycin 의 영향을 확인하였다. 이 세 가지 단백질 중 p38 단백질이 tobramycin 을 처리한 그룹에서 농도의존적으로

인산화하는 것을 확인하였다(**Figure 35**). 마지막으로 MAPK 저해제, PKA 저해제, AKT 저해제를 사용하여 B16F10 세포에서 tobramycin의 영향을 평가하였다. MAPK 저해제 중 ERK, JNK 저해제만 처리한 군과 tobramycin과 ERK, JNK 저해제를 같이 처리한 군에서는 대조군과 tobramycin 단독 처리군과 큰 차이를 보이지 않았으나 p38 저해제와 tobramycin을 처리한 군은 tobramycin 단독 처리군에 비해 114 % 감소하였다. 이것으로 보아 tobramycin은 B16F10 세포에서 P38 단백질을 인산화함으로써 MITF 단백질의 발현을 증가시키고 이는 곧 멜라닌 합성효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 효소의 발현을 증가로 이어지고 멜라닌의 합성을 증가하였음을 의미한다.

Aminoglycoside 계열 항생제들의 구조는 중심 골격으로 aminocyclit ring에 amino sugar가 결합되어 있는 물질이다. 이 중 kanamycin A, kanamycin B, gentamicin, paromomycin, tobramycin, fradiomycin은 중심 구조로 2-DOS를 갖고 streptomycin은 streptidine, spectinomycin은 actinamine, hygromycin B는 streptamine이라는 물질이 중심 구조를 이루고 있다. 2-DOS 골격 항생제 중 paromomycin, fradiomycin은 4, 5번 탄소에 amino sugar가 결합되어 있고 kanamycin A, kanamycin B, gentamicin, tobramycin은 4, 6번 탄소에 amino sugar가 결합되어 있는 구조로 되어 있다. 이러한 기본 골격인 2-DOS, streptidine, actinamine의 구조가 멜라닌 합성에 끼치는 영향에 대해 평가하기 위해 세포독성이 없는 농도 범위(**Figure 39**)에서 멜라닌 생성량을 측정하였다(**Figure 40-42**). 2-DOS, streptidine의 멜라닌 생성에 미치는 영향은 없었으며 actinamine의 경우 멜라닌 생성 저해의 효능이 조금 나타났다. 이는 tobramycin의 멜라닌 생성 증진 효과에 2-DOS의 구조가 미치는 영향이 없을 것이라 사료되었다. Tobramycin은 kanamycin에서 파생된 물질로 구조가 굉장히 유사하다. Kanamycin A는 멜라닌 생성 감소효과가 나타났고 kanamycin B는 멜라닌 생성에 아무런 영향을 미치지 못한 반면 tobramycin은 멜라닌 생성을 증진시켰다. 세 가지 물질을 구조적으로 비교를 하면 2-DOS의 4번 탄소에 결합되어 있는 amino sugar의 구조가 조금씩 다른 형태를 가지고 있다. kanamycin A는 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH, 5'-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>가 결합되어 있고

kanamycin B는 2'-NH<sub>2</sub>, 3'-OH, 4'-OH, 5'-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, tobramycin은 2'-NH<sub>2</sub>, 4'-OH, 5'-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>가 결합되어 있는 형태이다(**Figure 45**). 이것으로 보아 tobramycin의 멜라닌 생성 증진효과가 2-DOS의 4번 탄소에 결합되어 있는 amino sugar의 구조적인 차이에서 발생하는 것으로 사료된다.

멜라닌세포는 피부 표피의 기저층 전체에 골고루 분포되어 있다 [51]. 멜라닌세포에서 생성된 멜라닌은 주변의 맞닿아있는 각질세포로 이동하게 된다. 그렇기 때문에 멜라닌세포와 각질세포는 떼어놓고 생각할 수 없는 관계임으로 각질세포에서 tobramycin의 세포독성을 평가하였다 (**Figure 43**). HaCaT human keratinocyte에서 tobramycin의 세포독성은 4 mg/mL에서 83%의 세포독성이 나타났으나 2 mg/mL 이하의 농도에서는 90% 이상의 세포생존율을 보여 2 mg/mL 농도 이하에서는 피부에 안전할 것으로 추측된다.

마지막으로 tobramycin의 NO 생성 저해 효과를 평가하기 위해 griess test를 진행하였다. NO는 활성산소종으로 알려진 불안정한 라디칼 성분 중 하나이며 염증의 병인에 중요한 역할을 하는 신호 물질이다. 정상적인 생리 조건하에서는 항염증 효과를 줄 수 있지만 과다한 NO의 생산은 염증을 유도하는 전염증성 인자로서 역할을 수행한다 [52]. 실험결과 LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 tobramycin의 NO 생성 저해 효과는 없는 것으로 나타났다(**Figure 44**).

본 연구의 결과들을 토대로 tobramycin이 B16F10 세포에서 멜라닌 생성을 증진하는 것을 확인하였다. 이것으로 tobramycin이 저색소침착증의 근본적인 치료제는 될 수 없으나 이러한 질병을 치료하는데 도움이 될 것이라 제안한다. 또한 오래된 항생제들의 잠재적인 가능성을 살펴보았으며 이 중 lincomycin, fosfomycin 같은 항생제들은 멜라닌 생성에 영향을 미치는 것이 확인되었기에 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

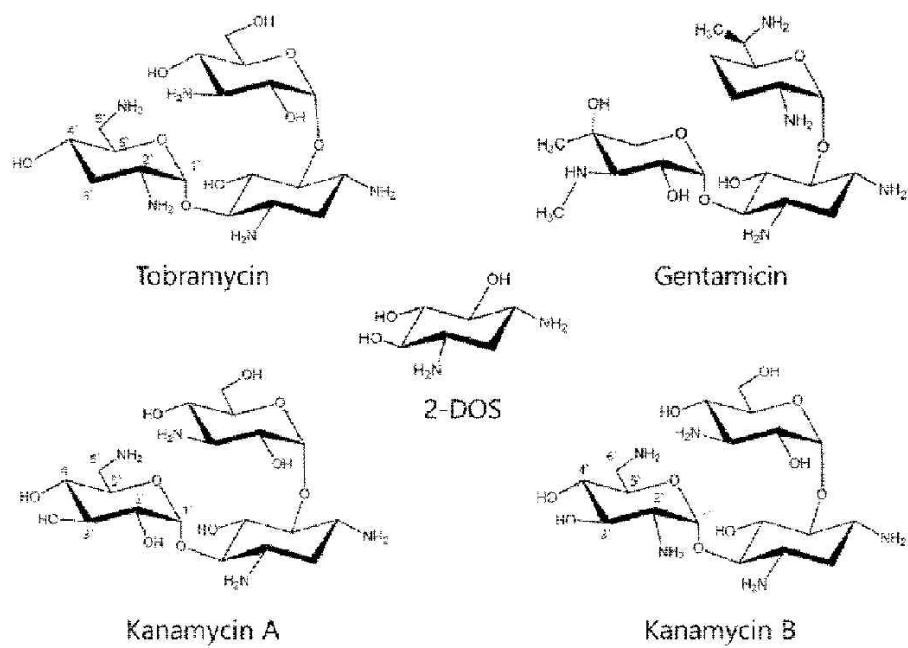


Figure 45. Structure of antibiotics with 2-DOS as the central skeleton.

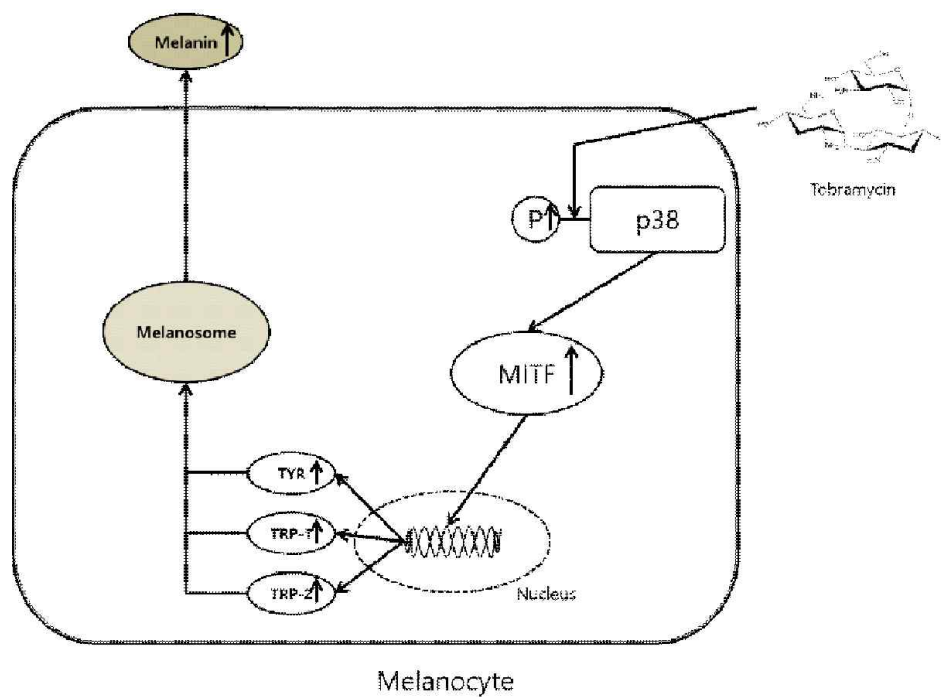


Figure 46. Effect of tobramycin in melanogenesis on B16F10 melanoma cells.

## V. 참고문헌

1. Brenner, M.; Hearing, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and photobiology* **2008**, *84*, 539-549, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x.
2. D’Orazio, J.; Jarrett, S.; Amaro-Ortiz, A.; Scott, T. UV radiation and the skin. *International journal of molecular sciences* **2013**, *14*, 12222-12248, doi:10.3390/ijms140612222.
3. Videira, I.F.; Moura, D.F.; Magina, S. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais brasileiros de dermatologia* **2013**, *88*, 76-83.
4. Tran, T.T.; Schulman, J.; Fisher, D.E. UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies. *Pigment cell & melanoma research* **2008**, *21*, 509-516, doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00498.x.
5. Wellbrock, C.; Arozarena, I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment cell & melanoma research* **2015**, *28*, 390-406, doi:10.1111/pcmr.12370.
6. Chung, Y.C.; Kim, S.; Kim, J.H.; Lee, G.S.; Lee, J.N.; Lee, N.H.; Hyun, C.G. Pradol, an O-Methylated Flavone, Induces Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells via p-p38 and p-JNK Upregulation. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22101704.
7. Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Jung, S.H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular signalling* **2017**, *40*, 99-115, doi:10.1016/j.cellsig.2017.09.004.
8. Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Jung, S.H. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009 - 2014). *Expert opinion on therapeutic patents* **2015**, *25*, 775-788, doi:10.1517/13543776.2015.1039985.
9. Hartman, M.L.; Czyz, M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2015**, *72*, 1249-1260, doi:10.1007/s00018-014-1791-0.
10. Kaidbey, K.H.; Agin, P.P.; Sayre, R.M.; Kligman, A.M. Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1979**, *1*, 249-260.

11. Barr, A.J. The biochemical basis of disease. *Essays in biochemistry* **2018**, *62*, 619-642, doi:10.1042/EBC20170054.
12. Franks, A.G., Jr. Skin manifestations of internal disease. *The Medical clinics of North America* **2009**, *93*, 1265-1282, doi:10.1016/j.mcna.2009.08.010.
13. Pinto, F.J.; Bologna, J.L. Disorders of hypopigmentation in children. *Pediatric clinics of North America* **1991**, *38*, 991-1017.
14. Bologna, J.L.; Pawelek, J.M. Biology of hypopigmentation. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1988**, *19*, 217-255.
15. Adedeji, W.A. The Treasure Called Antibiotics. *Annals of Ibadan postgraduate medicine* **2016**, *14*, 56-57.
16. Gould, K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2016**, *71*, 572-575, doi:10.1093/jac/dkv484.
17. Wenzel, R.P. The antibiotic pipeline--challenges, costs, and values. *The New England journal of medicine* **2004**, *351*, 523-526, doi:10.1056/NEJMp048093.
18. Zaffiri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L.H. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* **2012**, *25*, 67-77, doi:10.3109/08941939.2012.664099.
19. Wikipedia. Timeline of antibiotics. Available online: [https://en.wikipedia.org/wiki/Timeline\\_of\\_antibiotics](https://en.wikipedia.org/wiki/Timeline_of_antibiotics) (accessed on May 23).
20. Clardy, J.; Fischbach, M.A.; Currie, C.R. The natural history of antibiotics. *Current biology : CB* **2009**, *19*, R437-441, doi:10.1016/j.cub.2009.04.001.
21. Krause, K.M.; Serio, A.W.; Kane, T.R.; Connolly, L.E. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2016**, *6*, doi:10.1101/cshperspect.a027029.
22. Comroe, J.H., Jr. Pay dirt: the story of streptomycin. Part I. From Waksman to Waksman. *The American review of respiratory disease* **1978**, *117*, 773-781, doi:10.1164/arrd.1978.117.4.773.
23. Gold, H.; Mc, D.W.; et al. Uses of streptomycin. *The American journal of medicine* **1948**, *4*, 130-141.

24. Waksman, S.A.; Lechevalier, H.A.; Harris, D.A. Neomycin-Production and Antibiotic Properties. *The Journal of clinical investigation* **1949**, *28*, 934-939, doi:10.1172/JCI102182.
25. Patidar, K.R.; Bajaj, J.S. Antibiotics for the treatment of hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease* **2013**, *28*, 307-312, doi:10.1007/s11011-013-9383-5.
26. Hritcko, P.; Kapadia, V.K.; Folstad, J. Treatment of hypercholesterolemia with oral neomycin. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* **1999**, *56*, 2227-2229, doi:10.1093/ajhp/56.21.2227.
27. Menezes de Padua, C.A.; Schnuch, A.; Lessmann, H.; Geier, J.; Pfahlberg, A.; Uter, W. Contact allergy to neomycin sulfate: results of a multifactorial analysis. *Pharmacoepidemiology and drug safety* **2005**, *14*, 725-733, doi:10.1002/pds.1117.
28. Pittenger, R.C.; Wolfe, R.N.; Hoehn, M.M.; Marks, P.N.; Daily, W.A.; Mc, G.J. Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiotics & chemotherapy* **1953**, *3*, 1268-1278.
29. Umezawa, H. Kanamycin: its discovery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1958**, *76*, 20-26.
30. Adams, E.; Dalle, J.; De Bie, E.; De Smedt, I.; Roets, E.; Hoogmartens, J. Analysis of kanamycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of chromatography. A* **1997**, *766*, 133-139.
31. Sotgiu, G.; Centis, R.; D'Ambrosio, L.; Migliori, G.B. Tuberculosis treatment and drug regimens. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2015**, *5*, a017822, doi:10.1101/cshperspect.a017822.
32. Davidson, R.N.; den Boer, M.; Ritmeijer, K. Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2009**, *103*, 653-660, doi:10.1016/j.trstmh.2008.09.008.
33. T.Sokolski, W. *Analytical Microbiology* 1972; Vol. Volume II, pp. Pages 339-341.
34. Pharmacists, T.A.S.o.H.-S. Spectinomycin Hydrochloride. Availabe online: <https://www.drugs.com/pro/trobicin.html> (accessed on May 23).
35. Weinstein, M.J.; Luedemann, G.M.; Oden, E.M.; Wagman, G.H.; Rosselet, J.P.; Marquez, J.A.; Coniglio, C.T.; Charney, W.; Herzog, H.L.; Black, J. Gentamicin, a



- New Antibiotic Complex from Micromonospora. *Journal of medicinal chemistry* **1963**, *6*, 463-464.
36. Pharmacists, T.A.S.o.H.-S. Gentamicin Sulfate. Available online: <https://www.drugs.com/monograph/gentamicin-sulfate.html> (accessed on May 23).
  37. Neu, H.C. Tobramycin: an overview. *The Journal of infectious diseases* **1976**, *134 Suppl*, S3-19, doi:10.1093/infdis/134.supplement\_1.s3.
  38. Brogden, R.N.; Pinder, R.M.; Sawyer, P.R.; Speight, T.M.; Avery, G.S. Tobramycin: a review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* **1976**, *12*, 166-200, doi:10.2165/00003495-197612030-00002.
  39. Macleod, A.J.; Ross, H.B.; Ozere, R.L.; Digout, G.; Van, R. Lincomycin: A New Antibiotic Active against Staphylococci and Other Gram-Positive Cocci: Clinical and Laboratory Studies. *Canadian Medical Association journal* **1964**, *91*, 1056-1060.
  40. Duncan, I.B.; Jeans, B. Lincomycin in hospital practice. *Canadian Medical Association journal* **1965**, *93*, 685-691.
  41. Spizek, J.; Rezanka, T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical pharmacology* **2017**, *133*, 20-28, doi:10.1016/j.bcp.2016.12.001.
  42. Kahlmeter, G.; Dahlager, J.I. Aminoglycoside toxicity - a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **1984**, *13 Suppl A*, 9-22, doi:10.1093/jac/13.suppl\_a.9.
  43. Prayle, A.; Watson, A.; Fortnum, H.; Smyth, A. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax* **2010**, *65*, 654-658, doi:10.1136/thx.2009.131532.
  44. Whelton, A. The aminoglycosides. *Clinical orthopaedics and related research* **1984**, 66-74.
  45. Iarikov, D.; Wassel, R.; Farley, J.; Nambiar, S. Adverse Events Associated with Fosfomycin Use: Review of the Literature and Analyses of the FDA Adverse Event Reporting System Database. *Infectious diseases and therapy* **2015**, *4*, 433-458, doi:10.1007/s40121-015-0092-8.

46. Soni, N.; Kam, P. 4-aminopyridine—a review. *Anaesthesia and intensive care* **1982**, *10*, 120-126, doi:10.1177/0310057X8201000205.
47. Gerding, D.N.; Larson, T.A.; Hughes, R.A.; Weiler, M.; Shanholtzer, C.; Peterson, L.R. Aminoglycoside resistance and aminoglycoside usage: ten years of experience in one hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1991**, *35*, 1284-1290, doi:10.1128/aac.35.7.1284.
48. Wrzesniok, D.; Otreba, M.; Beberok, A.; Buszman, E. Impact of kanamycin on melanogenesis and antioxidant enzymes activity in melanocytes—an in vitro study. *Journal of cellular biochemistry* **2013**, *114*, 2746-2752, doi:10.1002/jcb.24623.
49. Wrzesniok, D.; Beberok, A.; Otreba, M.; Buszman, E. Effect of streptomycin on melanogenesis and antioxidant status in melanocytes. *Molecular and cellular biochemistry* **2013**, *383*, 77-84, doi:10.1007/s11010-013-1756-x.
50. Fitzpatrick, T.B.; Breathnach, A.S. [the Epidermal Melanin Unit System]. *Dermatologische Wochenschrift* **1963**, *147*, 481-489.
51. Thingnes, J.; Lavelle, T.J.; Hovig, E.; Omholt, S.W. Understanding the melanocyte distribution in human epidermis: an agent-based computational model approach. *PLoS one* **2012**, *7*, e40377, doi:10.1371/journal.pone.0040377.
52. Sharma, J.N.; Al-Omran, A.; Parvathy, S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* **2007**, *15*, 252-259, doi:10.1007/s10787-007-0013-x.