



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](#)

2008년 8월

박사학위 논문

Chlorine e6 유도 광역학 살균효과

조선대학교 대학원

치의공학과

황 덕 호

Chlorine e6 유도 광역학 살균효과

Photodynamic Antimicrobial Effect with Chlorine e6

2008년 8월 일

조선대학교 대학원

치의공학과

황덕호

Chlorine e6 유도 광역학 살균효과

지도교수 윤 정 훈

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로
제출함

2008년 5월 일

조선대학교 대학원

치 의 공 학 과

황 덕 호

황덕호의 박사학위 논문을 인준함

| | | | | |
|-----|-------|----|-----|---|
| 위원장 | 조선대학교 | 교수 | 이상호 | 인 |
| 위원 | 조선대학교 | 교수 | 김시욱 | 인 |
| 위원 | 조선대학교 | 교수 | 안상건 | 인 |
| 위원 | 조선대학교 | 교수 | 윤정훈 | 인 |
| 위원 | 동국대학교 | 교수 | 김수아 | 인 |

2008년 5월 일

조선대학교 대학원

목 차

| | |
|--|-----|
| 목 차 | i |
| 표목차 | ii |
| 도목차 | iii |
| ABSTRACT | iv |
| | |
| I. 서 론 | 1 |
| | |
| II. 연구재료 및 방법 | 3 |
| 1. 세균배양 | 3 |
| 2. 광민감제 (Photosensitizer) 및 광원 (Light) | 3 |
| 3. Inhibition zone 분석 | 4 |
| 4. Colony-forming units (CFU) 측정 | 4 |
| 5. 세균 생존율 측정 | 4 |
| 6. 통계 분석 | 5 |
| | |
| III. 연구 결과 | 6 |
| 1. Inhibition zone 분석 | 6 |
| 2. Colony-forming units (CFU) 측정 | 7 |
| 3. Bacterial viability 측정 | 10 |
| | |
| IV. 고찰 | 13 |
| | |
| V. 결론 | 16 |
| | |
| VI. 참고 문헌 | 17 |

표 목 차

| | |
|---------------------------------|---|
| Table 1. Bacteria species | 3 |
|---------------------------------|---|

도 목 차

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Structure of chlorine e6 | 3 |
| Fig. 2. Inhibition zone analysis following PDT using chlorine e6 | 6 |
| Fig. 3. CFU measurement following PDT | 8 |
| Fig. 4. Bacterial viability test following PDT | 10 |

ABSTRACT

Photodynamic Antimicrobial Effect with Chlorine e6

Hwang Deok Ho

Advisor : Prof. Jung-Hoon Yoon, DDS, PhD

Department of Dental Engineering,

Graduate School of Chosun University

Recently, new antibacterial strategy has been demanded because of the increased occurrence of drug-resistant bacteria. Accordingly, photodynamic therapy has been attempted for clinical application against drug-resistant bacteria. Antimicrobial photodynamic therapy combines a nontoxic photosensitizer with harmless visible light to generate singlet oxygen and free radicals that kill microorganism. In this study, the author investigated bactericidal effect of photodynamic therapy by using photosensitizer chlorin e6 to pathogenic bacteria including a gram-positive *Staphylococcus aureus* and gram-negative strains including *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. To examine antimicrobial effect of photodynamic therapy, we measured inhibition zone, colony forming units(CFU), and in situ viability of bacterial cells after illumination with an energy density (Diode pumped laser driver LD2030) of 20J/cm² in the presence of 10 μ M chlorin e6. We found the increase of inhibition zone on agar plates, the reduction of CFU, and the rapid decrease of viable cell number of all bacterial species examined while those of control bacteria treated solely with either light or photosensitizer were unchanged. The most sensitive bacteria examined was *S. aureus*, and the *E. coli* showed the smallest growth inhibition. These findings suggest that this system can be clinically applicable as an alternative antibacterial strategy to treat multiple drug-resistant bacteria. It is further necessary to devise

suitable strategies which enhance the permeability of the outer wall in order to make gram-negative bacteria sensitive to the action of photodynamic processes. It should be additional in vivo experiment to see possibility of clinical treatment.

I. 서론

광역학 치료는 레이저 빛에 예민한 반응을 보이는 광민감제(photosensitizer)를 증양에 투여하고, 광민감제가 활성화되는 특정 파장의 빛을 조사하여 광화학적, 광생물학적 기전에 의해 암 조직을 특이적으로 손상시키는 암 치료 방법으로 잘 알려져 있다. 광역학 치료에 의한 세포내 작용기전의 시작은 광물리 현상으로, 바닥상태의 광민감제를 특정 파장의 빛으로 활성화시켜 단일항 상태나 삼중항 상태로 되고 여기서 바닥상태로 될 때 방출되는 에너지가 산소와 반응하여 활성산소(O₂)를 생성시키거나 (Type II 반응), 감작제가 전자전달계에 관여하는 경우 자유라디칼이 형성되어 (Type I 반응) 세포파괴가 일어난다. 즉, 현재까지 알려진 광역학 치료의 원리는 비독성 광활성 염색 분자인 광민감제가 세포내에 투과된 후, 빛에 의해 활성화되면 singlet oxygen 등 free radical을 형성하여 세포내 구성분자를 파괴하는 것이다¹⁻⁴.

최근 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 광역학 치료에 의해 세균을 사멸시키는 것이 가능하다고 보고하였다⁵⁻¹². 광역학 치료에 이용되는 다양한 광감작제와 빛이 세균의 DNA 손상을 초래하며, 또한 세균의 세포막 이동계통과 효소의 비활성 및 세포성분의 약화에 따른 세포막 손상으로 일으켜서 세균의 비활성화에 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다^{1,4,13,14}. 더욱이 광역학 치료는 병원성 미생물에서 유래한 감염질환의 치료에 대해 항균 스펙트럼이 넓고, 항생제 내성 균주를 효과적으로 불활성화 시키며, 돌연변이 가능성이 낮고, 광 내성 세균이 없다는 몇 가지 유리한 특징을 가지고 있다^{4,5}. 따라서 광역학 치료가 감염성 질환의 치료에 실용적인 대안이 될 수 있음을 강력하게 뒷받침 하고 있다.

감염성 질환의 치료는 항생제가 널리 이용되고, 이에 따라 전 세계적으로 항생제 내성균의 증가는 보건의료계에 큰 문제로 대두되고 있다⁵. 우리나라에서도 감염질환의 치료 내성 뿐 만 아니라 농축산업 및 어업에서도 항생제 오남용이 심각하여 항생제 내성의 발생률이 상당히 높다. 특히 Methicillin 내성 포도상구균 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)에 의한 사망률이 미국의 경우 에이즈에 의한 사망률보다 높아졌다는 최근 보고는 항생제 내성균의 위험성을 단적으로 보여주는 실례이다. 그러므로, 세균의 항생제 내성기작에 대한 연구 및 새로운 항생제의 개발 또는 제어기술이 절대적으로 필요하다¹⁵⁻¹⁷. 그러나, 우리나라 뿐 만 아니라 주요 선진국에서 많은 연구가 수행되고 있음에도 불구하고, 현재까지 가시적인 제어기술이 개발되지 않고 있으며, 많은 환자가 감염된 조직의 외과적 절제와 대증치료에 의존하고 있으며, 이 후에도

다른 조직으로 확산과 재감염되어 사망하게 된다.

따라서 이 연구에서는 다양한 감염성 질환을 초래하는 세균인 대장균 (*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella enterica*), 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 (*Pseudomonas aeruginosa*) 균에 광역학 치료 방법을 적용하여 inhibition zone을 분석하고, colony forming unit (CFU)을 측정하며, 세균의 생존율을 측정하여 살균효과를 확인하고자 하였다. 이 연구를 통해 추후 항생제 내성균을 포함한 난치성 세균 감염질환에 대한 새로운 치료방법을 제시하고, 실제 임상에서 적용할 수 있는 시스템을 구축할 기초자료를 확립하고 이 연구를 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세균 배양

실험에 이용한 세균은 그람 양성 *Staphylococcus aureus*, 그람 음성 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar typhimurium*을 이용하였다.

모든 세균은 1% sodium chloride, 5% yeast extract, 1% tryptone이 포함된 LB liquid media에 37°C 조건으로 24시간 배양하였다.

실험에 이용한 세균은 그람 양성 *Staphylococcus aureus* (KCTC 3881), 그람 음성 *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 2004), *Escherichia coli* (MG 1655), *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (14028 S)을 이용하였다. 모든 세균은 1% sodium chloride, 5% yeast extract, 1% tryptone이 포함된 LB liquid media에 37°C 조건으로 24시간 배양하였다 (Table 1).

Table 1. Bacteria species

| Bacteria | strain | Medium |
|----------------------|-----------|--------|
| <i>S. aureus</i> | MG 1655 | LB |
| <i>P. aeruginosa</i> | 14028 S | LB |
| <i>E. coli</i> | KCTC 3881 | LB |
| <i>Salmonella</i> | KCTC 2004 | LB |

2. 광민감제 (Photosensitizer) 및 광원 (Light)

실험에 이용한 광민감제는 chlorin e6 (Ce6)로 LS-Pharm (Gwangju, Korea)으로부터 제공받아 사용하였다. Ce6의 구조는 Fig 1과 같으며, 10 μ M, 20 μ M이 되게 멸균 생리식염수에 녹인 뒤 세균에 농도별로 처리하여 실험하였다.

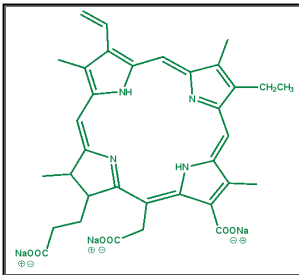


Fig. 1. Structure of chlorine e6

광원은 diode laser (Diode pumped laser driver LD2030, Geumkwang Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하였고, chlorin e6 처리 후 24시간 뒤에 660nm파장, 10J/cm²와 20J/cm²로 bacteria에 직접 조사하였다. Inhibition zone 분석에서는 LB agar plate상에서 직경 1cm이 되도록 광원의 초점을 위치한 후 10J/cm²(17s), 20J/cm²(34s), 30J/cm²(51s), 40J/cm²(68s), 50J/cm²(85s)로 조사하였다.

모든 실험에 사용된 세균은 아무것도 처리하지 않은 군과 laser만 조사하거나 chlorin e6만 처리한 군, chlorin e6 와 laser 두 가지 모두 처리한 군으로, 4 그룹으로 나누어 각각 2번 이상 분석하였다.

3. Inhibition zone 분석

Chlorin e6 매개 PDT에 의한 광 독성 효과를 알아보기 위하여 inhibition zone 분석을 수행하였다. 요약하면 OD600값 0.01이 되도록 resuspension 된 200 μ l의 세균을 각각 chlorin e6 10 μ M, 20 μ M과 1:2비율이 되도록 혼합하여 15분간 어두운 실온에서 처리한 후 suspension의 200 μ l를 LB agar plate에 옮겨 spreading 하였다. Diode laser는 LB agar plate에 직경 1cm이 되도록 위치하고 10J/cm²(17s), 20J/cm²(34s), 30J/cm²(51s), 40J/cm²(68s), 50J/cm²(85s)로 각각 조사하였으며, 37 $^{\circ}$ C의 조건 하에 2일간 배양하면서 inhibition zone을 관찰하였다.

4. Colony-forming units (CFU) 측정

모든 세균을 phosphate buffered saline (PBS)으로 두 번 세척하고 OD600값 0.01이 되도록 PBS에 resuspension하였다. Chlorin e6 10 μ M, 20 μ M을 각각 bacterial suspension과 1:2 비율이 되도록 혼합하여 어두운 실온에서 15분 처리하였다. 세균 혼합액의 100 μ l를 직경 1cm되는 well에 옮겨 diode laser 20J/cm²(34초)로 조사하였다. Chlorin e6와 laser가 처리된 suspension은 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 이 되게 PBS에 희석 한 후 각각의 200 μ l를 agar plates에 옮겨 37 $^{\circ}$ C의 조건 하에 24시간 배양한 후 CFU의 수를 측정하였다.

5. 세균 생존율 측정

Chlorin e6 매개 PDT에 의한 세균의 생존율을 확인하기 위해 L7012 LIVE/DEAD BacLighTM Bacterial Viability Kit를 이용하여 수행하였다. 이를 요약하면, 세균을 OD600값 0.06이 되도록 0.85% NaCl에 resuspension하고, chlorin e6 10 μ M, 20 μ M과 1:2

비율이 되도록 혼합하여 어두운 실온에서 15분 처리하였다. 직경 1cm되는 well에 100 μ l 를 옮겨 diode laser 10J/cm²(17초), 20J/cm²(34초)로 각각 조사하였다. Chlorin e6와 laser 처리한 세균 100 μ l에 SYTO 9 과 Propidium iodide가 동량으로 혼합된 용액을 곧바로 첨가하여 15분 동안 처리한 후 형광현미경 (Olympus IX 71, Olympus America Inc., Melville, NY)으로 관찰하였다. SYTO 9과 Propidium iodide를 merging한 후 양성인 세균의 수는 $\times 200$ 시야에서 가장 많은 5 부위의 평균을 구하였다.

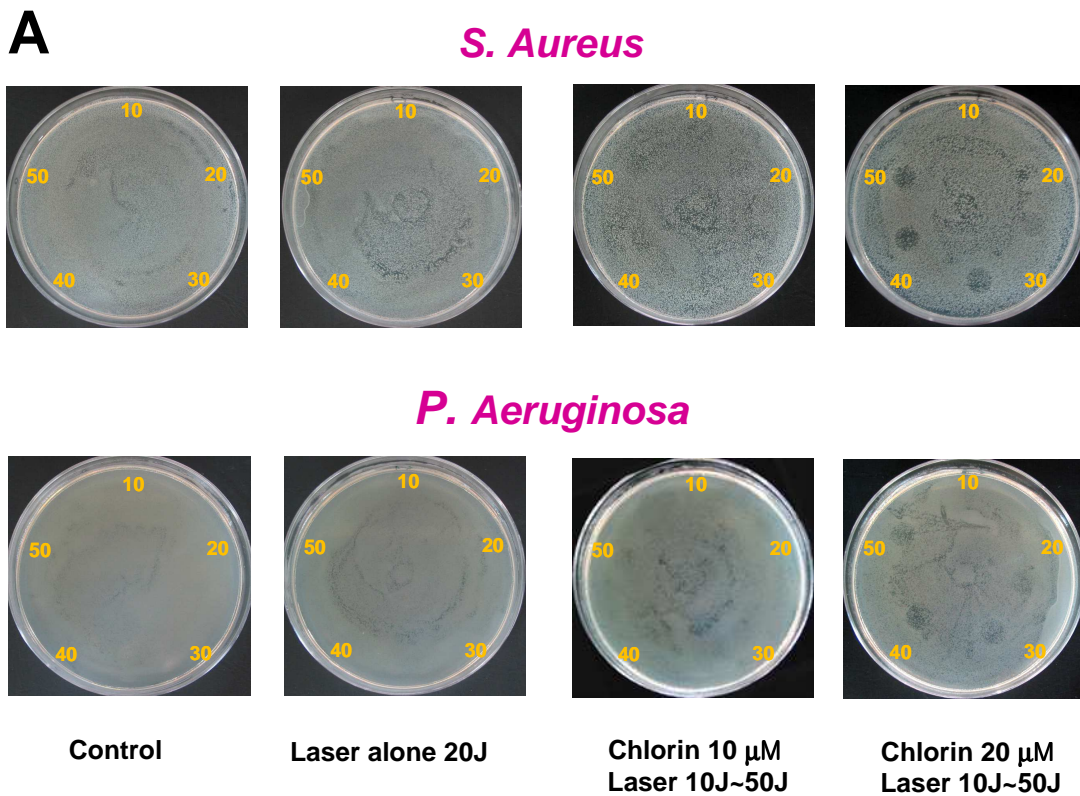
6. 통계 분석

각 그룹의 평균값을 구하고 평균 SD로 표현하였다. 모든 통계적 계산은 Microsoft Excel을 사용하여 산출하였다.

III. 연구결과

1. Inhibition zone 분석

Chlorin e6 10 μ M, 20 μ M을 처리한 세균을 LB agar plat에 옮겨 10J/cm²(17s), 20J/cm²(34s), 30J/cm²(51s), 40J/cm²(68s), 50J/cm²(85s)로 각각 조사한 후 2일간 배양하면서 inhibition zone을 관찰한 결과, 24시간 후 그람 양성인 *S. aureus*와 그람 음성인 *P. aeruginosa*에서는 chlorin e6 10 μ M과 laser 에너지 20J/cm²부터 inhibition zone이 형성되었고, 에너지가 증가함에 따라 점차 inhibition zone이 뚜렷이 형성되었다 (Fig 2A). 그러나 그람 음성세균인 *E. coli*와 *S. typhimurium*에서는 inhibition zone이 관찰되지 않았다 (Fig 2B).



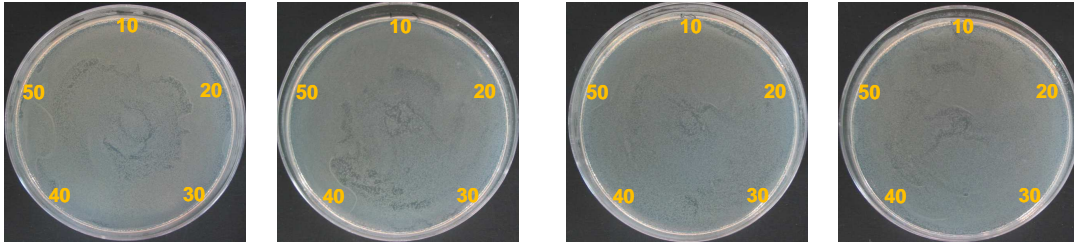
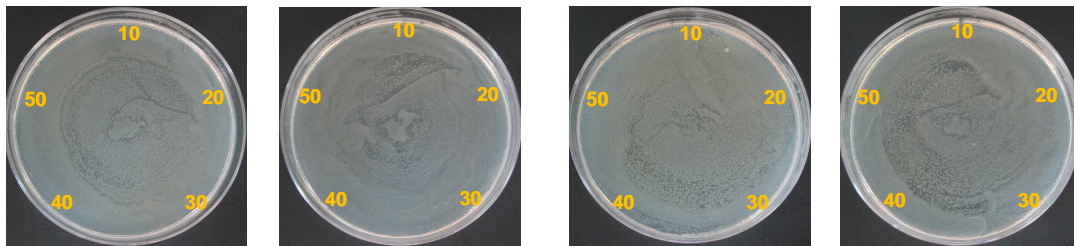
B***E. Coli******S. Typhimurium*****Control****Laser alone 20J****Chlorin 10 μ M
Laser 10J~50J****Chlorin 20 μ M
Laser 10J~50J**

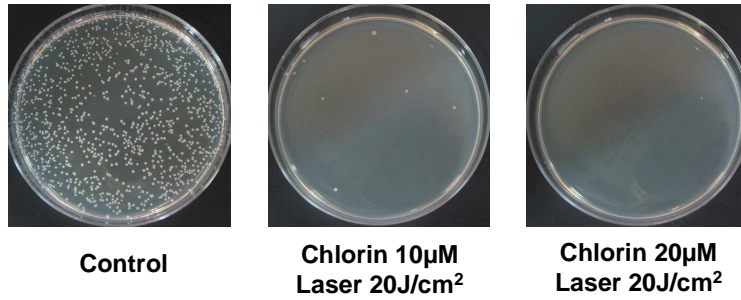
Fig 2. Inhibition zone analysis following PDT using chlorine e6.

2. Colony-forming units (CFU) 측정

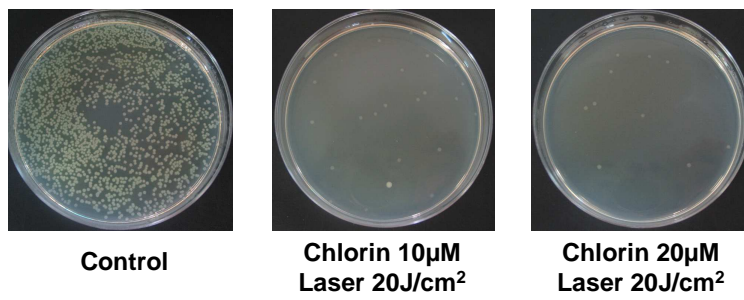
CFU의 측정에 의한 세균의 생존율을 알아보기 위해, chlorin e6 10 μ M, 20 μ M을 24시간동안 처리한 후 laser 20J/cm²(34초)로 조사하여 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶로 각각 agar plates에서 CFU의 수를 측정하였다. 그 결과 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에서는 대조군에 비해 chlorin e6 10 μ M과 20 μ M에 laser 20J/cm² 처리한 군에서 CFU가 급격히 감소하였다 (Fig 3A, B). 그러나 *E. coli*와 *S. typhimurium*는 대조군에 비해 chlorin e6 10 μ M과 laser 20J/cm²처리 후 50%정도의 CFU 감소를 보였고, chlorin e6 20 μ M과 laser 20J/cm² 처리 후에는 60% 이상 감소됨을 보였다 (Fig 3C, D).

A

S. Aureus

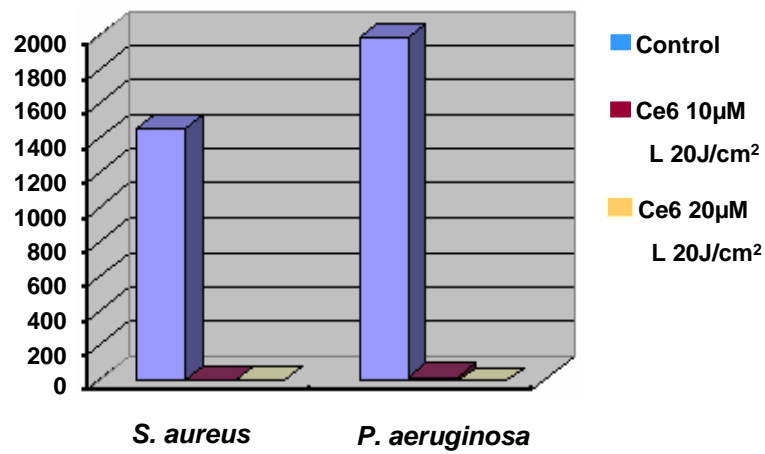


P. Aeruginosa



B

| Bacteria | CFU count | | |
|---------------------------------------|-----------|-----------------|-----------------|
| | Control | Chlorin e6 10µM | Chlorin e6 20µM |
| Energy density (20J/cm ²) | | | |
| <i>S. Aureus</i> | 1464 | 8 | 1 |
| <i>P. Aeruginosa</i> | 1989 | 23 | 10 |



C

E. Coli

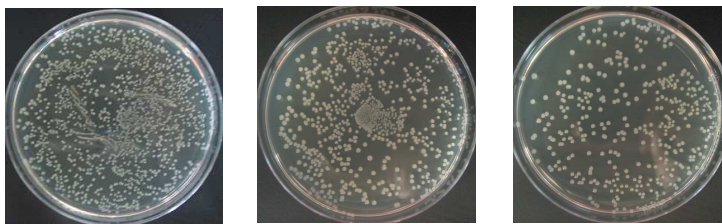


Control

Chlorin 10µM
Laser 20J/cm²

Chlorin 20µM
Laser 20J/cm²

S. Typhimurium



Control

Chlorin 10µM
Laser 20J/cm²

Chlorin 20µM
Laser 20J/cm²

D

| Bacteria | CFU count | | |
|---------------------------------------|-----------|-----------------|-----------------|
| | Control | Chlorin e6 10mM | Chlorin e6 20mM |
| Energy density (20J/cm ²) | | | |
| <i>E. coli</i> | 1838 | 910 | 636 |
| <i>S. Typhimurium</i> | 1637 | 883 | 445 |

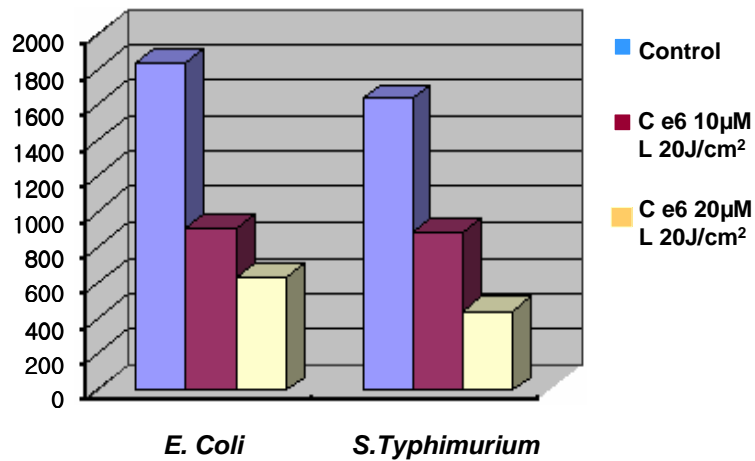
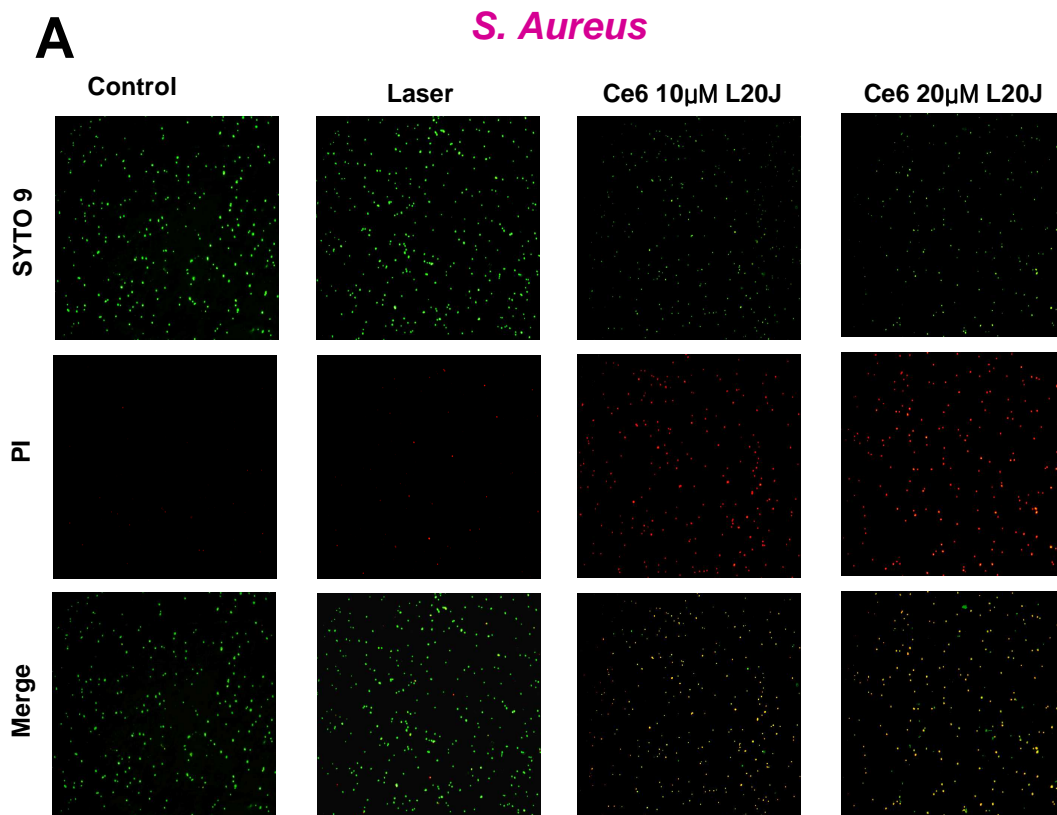
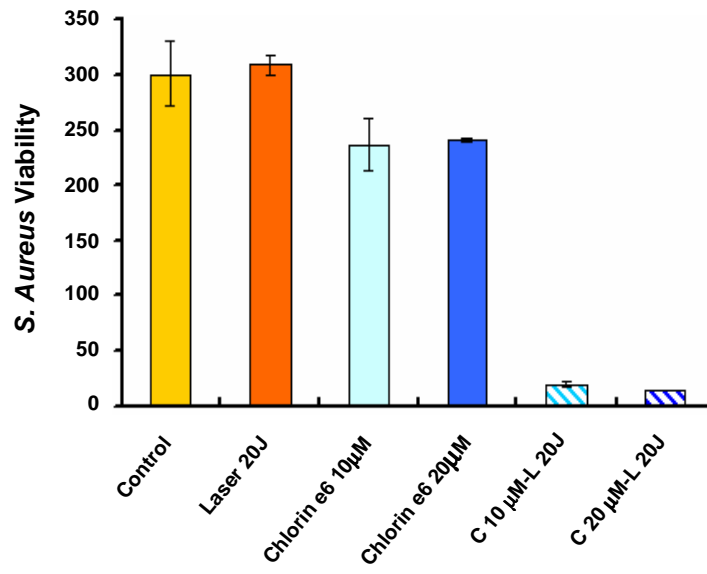
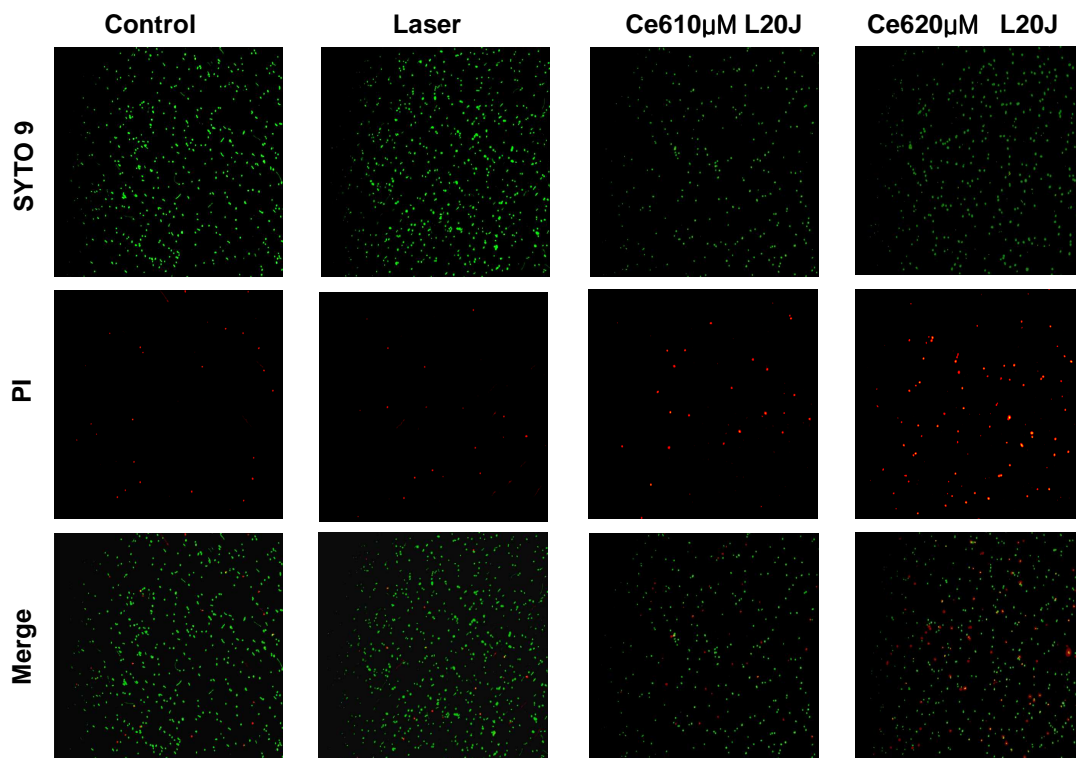


Fig. 3. CFU measurement following PDT.

3. Bacterial viability 측정.

Chlorin e6 매개 PDT에 대한 세균의 생존율을 측정하기 위해 Bacterial Viability Kit를 이용하여 실험하였다. chlorin e6 10 μ M, 20 μ M과 laser 20J/cm²을 조사한 후 모든 세포를 염색하는 SYTO 9과 손상된 세포를 염색하는 propidium iodide (PI)를 혼합하여 세균에 처리하고 merge한 결과, *S. aureus*와 *P. aeruginosa*의 생존 세균수는 대조군에 비해 PDT 처리된 군에서 세균의 생존율이 감소되었고 chlorin e6의 농도가 10 μ M 보다는 20 μ M에서 세포 생존율이 더욱 감소하였다 (Fig 4A-D).



B**C***P. Aeruginosa*

D

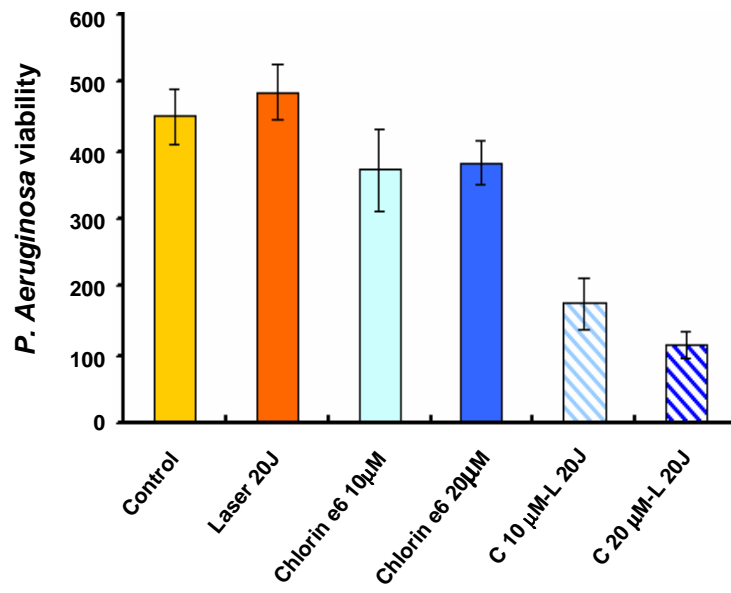


Fig. 4. Bacterial viability test following PDT

IV. 고찰

이 연구에서 실험한 대장균 (*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella enterica*), 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 (*Pseudomonas aeruginosa*)는 다양한 유형의 질환을 초래한다. 특히, 포도상구균, 대장균과 슈도모나스는 가장 대표적이고 흔한 병원내 감염을 초래한다⁵⁾. 살모넬라균은 편모를 가진 그람 음성 막대균으로서, 전 세계적으로 음식물이나 물을 통해 전파되는 장내 감염의 가장 흔한 원인이다. *S. typhi*는 대변, 소변, 구토물, 입 분비물 등에 섞여 나오는데 감염된 환자나 회복기 환자뿐만 아니라 만성 보균자 역시 감염원이 될 수 있다⁵⁻⁸⁾. 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 그람 양성 구균으로 다양한 피부 병변, 인후염, 폐렴, 심내막염, 식중독, 독성 쇼크 증후군 등을 일으킨다. 특히 화상이나 수술부위에서 발생하는 병원성 감염의 원인으로 대장균 다음으로 흔하다. 또한 피부, 폐, 골, 심장판막 등을 침범하여 화농성 염증을 일으켜서 국소적인 조직 파괴를 특징으로 한다. 대장균은 그람 음성 장내 세균으로서 비침습성 공생체로서 동물과 인체의 창자 내강에서 자라고 인체에 해로운 세균의 증식을 억제하기도 한다. 이 균은 유전적으로 가장 다양하며, 많은 혈청형 중 소수가 인체에 독성을 나타내며 대장균 플라스미드와 혈청형에 따라 질병이 달리 나타난다^{5-8,18,19)}. *E. coli*는 일차적 요로감염의 주요 원인이며, 주로 외요도를 통해 방광으로 들어가며, 요관을 타고 역행성 감염을 하여 신장까지 파급되어 국소적인 화농성 병소를 초래한다. 허약한 환자, 면역기능이 억제된 경우에는 호흡기를 침범하여 심한 출혈성 기관지 폐렴과 균혈증을 나타내며, 이 경우 세균의 약제 내성으로 인해 치사율이 높다^{5-8,20)}. *Pseudomonas aeruginosa*는 기회감염을 일으키는 그람 음성 막대균이다. 화상 후 흔히 감염되어 패혈증을 유발하며, *S. aureus*와 대장균 다음으로 병원 감염의 중요한 원인이다. 다른 그람 음성균과 마찬가지로 녹농균은 털과 접착성 단백을 가지고 있어 상피세포와 폐 점액에 접착이 용이하며, 내독소를 분비하여 패혈증 증상을 보인다^{5-8,21)}.

이 연구에서 저자는 다양한 감염성 질환을 초래하는 세균인 대장균 (*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella enterica*), 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 (*Pseudomonas aeruginosa*) 균에 chlorine e6와 diode laser를 적용하여 세 가지 방법을 통해 광역학 살균효과를 관찰하였다. Inhibition zone 분석에서 그람 양성인 *S. aureus*와 그람 음성인 *P. aeruginosa*에서는 chlorin e6 10 μ M과 laser 에너지 20J/cm²부터 inhibition zone이 형성되었고, 에너지가 증가함에 따라 점차 inhibition zone이 뚜렷이 형성되었다. 그러나 그람 음성세균인 *E. coli*와 *S. typhimurium*에서는 inhibition zone이

관찰되지 않았다. CFU 측정 결과도 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에서는 대조군에 비해 광역학 처리한 군에서 CFU가 급격히 감소하였고, chlorin e6 농도 증가에 따라 CFU도 감소하였다. 그러나 *E. coli*와 *S. typhimurium*는 대조군에 비해 chlorin e6 10 μ M과 laser 20J/cm²처리 후 50%정도의 CFU 감소를 보였고, chlorin e6 20 μ M과 laser 20J/cm² 처리 후에는 60% 이상 감소됨을 보여 inhibition zone 분석과 유사한 결과를 보였다. 이런 결과를 기초로 하여 그람 음성균인 *E. coli*와 *S. typhimurium*의 광역학 살균효과가 미약하여 bacterial viability 측정은 *S. aureus*와 *P. aeruginosa* 두 균주에서만 시행하였다. 그 결과 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*의 생존 세균수는 대조군에 비해 광역학 처리된 군에서 세균의 생존율이 감소되었고 chlorin e6의 농도가 높을수록 세포 생존율이 더욱 감소하였다. 이러한 소견은 chlorin e6 매개 광역학 치료는 실험한 균주 모두에서 살균효과를 관찰할 수 있었지만, 광역학 반응은 세균의 유형에 따라 다르게 반응한다고 할 수 있다. 가장 민감한 반응을 보인 세균은 *S. aureus*이었고 성장억제가 가장 미약한 균주는 *E. coli*였다. 이러한 광역학 살균효과의 차이는 세균그람 양성 및 그람 음성 세균들은 3차원적 구조에 있어 뚜렷한 차이 때문인 것으로 생각할 수 있다^{8,14}. 특히 그람 양성 세균에서 15- 80nm 두께의 외벽은 lipoteichoic acid와 음전하를 띠는 teichuronic acid와 밀접한 관계가 있는 100개까지의 펩티도글리칸 층을 갖고 있다^{16,18-20}. 그러므로, 그람 양성 세균들은 일반적으로 사용되는 1500-1800 달톤을 넘지 않는 광민감제에 대해 투과성 장벽으로서의 역할을 하지 못하여 쉽게 침투하게 된다. 이와는 대조적으로 그람 음성균은 펩티도글리칸 층 바깥쪽에 10-15nm 두께의 추가적인 구성 요소와 함께 porin기능을 하는 단백질 LPS 삼합체, 바깥 표면을 치밀한 음전하로 싸여진 유사한 연속체로 만들어주는 지방 단백질 등 매우 이질적 구성요소를 가진다¹⁸⁻²¹. 이런 체계화된 구조는 숙주세포와 체액성 방어 요소의 투과를 억제하고, 일부 항생제에 대한 내성기전을 촉진시킬 수 있다²⁰. 또한 분자량이 600-700 이하인 상대적으로 친수성 구성요소들만이 porin 채널을 통해 확산될 수 있다. 그러므로 광역학 살균효과가 그람 음성 세균에 민감하게 작용하기 위해서는 투과성을 증대시킬 수 있는 전략을 고안하는 것은 필수적이라 할 수 있다^{17,18}.

지금까지 수행되었던 연구결과를 보면 매우 짧은 배양시간, 낮은 광민감제의 농도와 적은 용량의 광조사로도 광역학 살균효과가 우수하여 매력적인 감염증 치료전략이라 할 수 있다. 일부 연구에서 보인 것과 같이 사람 세포에는 영향을 주지 않는 조건하에서도 병원성 미생물의 선택적 사멸을 가능하게 하기 때문이다^{19,21}. 따라서 광역학 살균효과는 적어도 국소화된 감염의 경우에서 미생물 기원의 질병을 치료하는데 특별한 역할을 하

게 될 것으로 생각된다. 아울러 항생제 내성 균주에 대한 광역학 살균효과에 대한 연구와 함께 *in vivo*에서의 효능 연구가 필요하다고 생각한다.

V. 결론

이 연구에서는 다양한 감염성 질환을 초래하는 세균인 대장균 (*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella enterica*), 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 (*Pseudomonas aeruginosa*) 균에 광역학 치료 방법을 적용하여 inhibition zone을 분석하고, colony forming unit (CFU)을 측정하며, 세균의 생존율을 측정하여 살균효과를 확인하였다. 실험결과 chlorin e6 매개 광역학 치료는 실험한 모든 균주에서 살균효과를 관찰할 수 있었지만, 광역학 반응은 세균의 유형에 따라 다르게 반응하였다. 가장 민감한 반응을 보인 세균은 *S. aureus*이었고 성장억제가 가장 미약한 균주는 *E. coli*였다. 이러한 광역학 살균효과의 차이는 세균그람 양성 및 그람 음성 세균들의 3차원적 구조 차이로 생각하였다. 따라서 광역학 살균효과는 적어도 국소화된 감염성 질환 치료에 특별한 역할을 하게 될 것으로 생각된다. 앞으로 광역학 치료에서 그람 음성 세균의 외벽을 침투할 수 있는 치료 전략과 함께 항생제 내성 균주에 대한 광역학 살균효과 및 *in vivo*에서의 효능 연구가 필요하다고 생각한다.

VI. 참고문헌

1. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Rolf-Markus Szeimies RM, Baumler W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;24:104(17):7223-8.
2. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3(5):436-50.
3. Niedre MJ, Secord AJ, Patterson MS, Wilson BC. In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy. *Cancer Res* 2003;15:63(22):7986-94.
4. Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3(10):907-17.
5. Luksiene Z. New Approach to Inactivation of Harmful and Pathogenic Microorganisms by Photosensitization: An Overview. *Food Technol Biotechnol* 2005;43(4) 411-8.
6. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci* 2007;22(2):83-91.
7. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Laser Surg Med* 2006;38(5):468-81.
8. Martinetto P, Gariglio M, Lombard GF, Fiscella B, Boggio F. Bactericidal effects induced by laser irradiation and haematoporphyrin against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Drugs Exp Clin Res* 1986;12(4):335-42.
9. Nitzan Y, Shainberg B, Malik Z. The mechanism of photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* by deuteroporphyrin. *J Curr Microbiol* 1989;19:265-69.
10. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(2):324-30.
11. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(6): 2173-8.

12. Demidova TN, Gad F, Zahra T, Francis KP, Hamblin MR. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. *J Photochem Photobiol B* 2005;3;81(1):15-25.
13. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004;75(10):1343-9.
14. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol* 1992;55(1):89-96.
15. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(6):2329-35.
16. Komerik N, Wilson M, Poole S, The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72: 676-80.
17. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, Janjua S, Gad F, Hamblin MR. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(4):1402-10.
18. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(6):941-51.
19. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(10):2595-601.
20. Salmon-Divon M, Nitzan Y, Malik Z. Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(N-methylpyridyl)porphine. *Photochem Photobiol Sci* 200;3(5):423-9.
21. Sharma M, Bansal H, Gupta PK. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue. *Curr Microbiol* 2005;50(5):277-80.

저작물 이용 허락서

| | | | | | |
|------|---|-----|----------|-----|----|
| 학 과 | 치의공학과 | 학 번 | 20067616 | 과 정 | 박사 |
| 성 명 | 한글: 황덕호 한문: 영문: Deok Ho Hwang | | | | |
| 주 소 | 강원도 춘천시 석사동 대우아 103동 1304호 | | | | |
| 연락처 | 033-255-5288 E-MAIL : hdh10177@naver.com | | | | |
| 논문제목 | 한글: Chlorine e6 유도 광역학 살균효과 영문: Photodynamic Antimicrobial Effect with Chlorine e6 | | | | |

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2008년 6월 일

저작자: 황 덕 호 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하