

<원저>

레이저 투과 선량에 따른 황색포도상구균의 광역학적 비활성화

구본열¹⁾·김지원²⁾¹⁾전주비전대학교 방사선학과 · ²⁾전주대학교 방사선학과

Photodynamic Inactivation of Staphylococcus Aureus Based on Dose of Laser Transmission

Bon-Yeoul Koo¹⁾·Ji-Won Kim²⁾¹⁾Department of Radiology, Vision College of Jeonju²⁾Department of Radiological Science, Jeonju University

Abstract *Staphylococcus aureus* is a major pathogen that causes clinical infections in humans and can also cause massively colonized in lesion skin, particularly in atopic dermatitis patients. This study investigated the effects of photodynamic inactivation with radachlorin and diode laser irradiation on the viability of *S. aureus* in vitro and assessed the effects of the dose of laser transmission. In the PDI group, 5 μ L of *S. aureus* suspension and 5 μ L of radachlorin were inoculated in a 55 mm petri dish (63.6 cm²). The samples were placed in a 37° incubator for 30 min and then irradiated with light (660 nm diode laser). After laser irradiation, the cells were stored for 24 h at 37° in an incubator with 5% CO₂, and the number of colonies was counted. All CFU/mL of *S. aureus* were reduced by diode laser in the presence of radachlorin, with a killing rate of 87.9% at an energy dose of 9 J/cm². This study contribute to treat colonized with *S. aureus* in atopic dermatitis patients and wound infections by providing information on the optimal dose of laser transmission using PDI to eliminate *S. aureus*.

Key Words: Photodynamic inactivation, Staphylococcus aureus, Laser dose, Photosensitizer, Radaclorin

중심 단어: 광역학 요법, 황색포도상구균, 레이저 선량, 광과민제, 라다클로린

1. 서론

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)은 사람에게 임상 감염을 일으키는 중요한 병원균으로[1], 특히 수술이나 상처 후 국소 감염을 일으키고 아토피 피부염을 갖은 환자의 피부에 대량으로 집락화 할 수 있다[2-4]. 또한, 이 병원균은 농가진(impetigo) 및 봉와직염(cellulitis)과 같은 피부 연조직 감염을 유발할 수 있으며, 이들 중 일부는 생명을 위협할 수 있다[1,5].

*S. aureus*과 같은 병원성 박테리아에 감염된 환자의 가장 일반적인 치료법은 항생제의 사용이다[6]. 그러나 항생제에 대한 내성 균주의 수가 급격히 증가하면서 기존 약물

사용이 어려워지고 있다[7]. 특정 박테리아를 제거하는 방법으로 국소 소독제가 있지만, 이 방법은 새로운 육아 조직에 독소가 발생할 수 있어[8,9], *S. aureus*에 감염된 상처 부위의 치료로는 제한적이다.

항생제에 내성이 있는 박테리아에 의한 상처 감염을 치료하는 다른 방법으로 광역학적 비활성화 요법 (photodynamic inactivation, PDI)이 있다. 이 방법은 특정 파장의 빛과 이 빛에 활성화되는 물질인 광과민제, 세포 내 산소를 이용하는 방법이다. 이 원리는 광과민제와 결합한 기저 상태의 세포가 특정 파장의 빛으로 활성화되면 단일항(singlet) 또는 삼중항 상태 (triplet state)인 더 높은 에너지 상태로 이동한다. 이후 활성산소(reactive oxygen species)가 발생하여 세

Corresponding author: Ji-Won Kim, Department of Radiological Science, Jeonju University, 303 Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju city, 55069, Republic of Korea / Tel: +82-43-284-1583 / E-mail: nicemidari@naver.com

Received 22 February 2022; Revised 10 March 2022; Accepted 28 March 2022

Copyright ©2022 by The Korean Journal of Radiological Science and Technology

포가 파괴되고 미생물의 DNA와 원형질막이 손상된다[10-13].

본 연구에서는 광역학 비활성화 요법을 위해 660 nm 다이오드 레이저와 광과민제로 수용성 클로로필의 유도체인 라다클로린(radachlorin)을 사용하였다. 이는 주로 염화나트륨 e6 (sodium chlorin e6)으로 어두운 곳에서는 독성이 낮지만, 특정 파장의 빛에서는 높은 광독성을 나타내고 체 내에서 빠르게 배설된다는 장점이 있다[14,15].

여러 연구에서 *S. aureus*에 대해 다양한 빛과 광과민제를 이용한 PDI의 항균 효과가 입증되었다[5,6,9]. 그러나 660 nm 다이오드 레이저를 이용하여 *S. aureus*를 제거하기 위한 적절한 레이저 투과 선량을 입증한 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 *S. aureus*에 감염된 상처 부위를 치료하기 위해 라다클로린 존재하에 660 nm 다이오드 레이저의 적절한 투과 선량을 평가하는 것이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 세균배양

본 연구에 이용된 표준 균주 *S. aureus* (ATCC 29213)는

대전에 있는 D대학교에서 제공 받았다. 이 균주는 50% Brain Heart Infusion(BHI) Broth에 접종하여 냉동고에 보관 후 혈액한천배지에 계대 배양하였다. 그 후 온도 37°의 5% CO₂가 있는 곳에서 24시간 동안 성장시켜 사용하였다.

2. 광과민제 및 광원

광과민제 라다클로린(RADA-PHARMA Co. Ltd., 모스크바, 러시아) 0.1%은 Dulbecco의 인산염 완충 식염수(Dulbecco's phosphate-buffered saline)에서 1,000 μg/mL로 희석하였다.

본 연구에 사용된 광원은 660 nm 다이오드 레이저 시스템으로 세부 사양은 Table 1에 있다. *S. aureus*가 들어 있는 페트리접시(Petri dish) 에 다이오드 레이저를 조사했고, 조사선량과 조사 시간에 대한 정보는 Table 2에 있다.

3. 실험 방법

현탁액에 멸균 탈이온 수(sterile deionized water)를 첨가하여 박테리아를 약 1.5×10^5 cells/mL의 탁도로 조정했다.

Table 1. Device information

Country of Manufacturer	South Korea
Model	PDT0A-153
Year produced	2018
Laser type	InGaAl (Indium-Gallium-Aluminum) Semiconductor Laser Diode
Beam wavelength (nm)	660 nm ± 10 nm
Output power	~400 mW
Operating time	1-3,600 s
Operating mode	Continuous
Safety class	class 3B

Table 2. Study design conditions for analysis of energy dose, irradiation time

Groups	Energy dose	Irradiation time (s)
Control groups	Control C1 aNA	aNA
	Only radachlorin C2 aNA	aNA
	Only laser C3 9 J/cm ²	1,067
PDI groups	radachlorin + laser T1 3 J/cm ²	356
	radachlorin + laser T3 5 J/cm ²	593
	radachlorin + laser T5 7 J/cm ²	823
	radachlorin + laser T7 9 J/cm ²	1,067

aNA: not available

라다클로린 존재하에 레이저 조사의 광학적 비활성화를 증명하기 위해 세균 단독 군, 레이저 단독 조사 군, 라다클로린 단독 군을 대조군으로 설정하였다(Table 2). 세균 단독 군과 레이저 단독 조사 군에서는 55 mm 페트리 접시(23.7 cm²)에 세균 현탁액 5 µL와 멸균 식염수 5 µL를 접종하였다. 라다클로린 단독 군은 55 mm 페트리 접시(23.7 cm²)에 세균 현탁액 5 µL와 라다클로린 5 µL를 접종하였다. 세균 단독 군과 라다클로린 단독 군에서는 37°인큐베이터(Vision Scientific Co., Ltd., 대전, 대한민국)에서 24시간 보관 후 집락 수(CFU/mL)를 세었고, 레이저 단독 조사 군에서는 시료를 37°인큐베이터에 30분간 보관 후에 레이저를 9 J/cm²의 선량으로 조사하였다(Fig. 1).

광역학적 비활성화를 보고자 하는 PDI 군은 55 mm 페트리 접시(23.7 cm²)에 세균 현탁액 5 µL와 라다클로린 5 µL를 접종하여 37°인큐베이터에 30분간 보관 후에 빛을 조사하였다(Fig. 1). 레이저 선량에 따른 효과를 보기 위해 3, 5, 7, 9 J/cm²로 레이저를 조사하였다. 레이저 조사 후 세포를 37°5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 보관하고 집락 수(CFU/mL)를 세었다. 모든 실험은 6회 반복되었다.

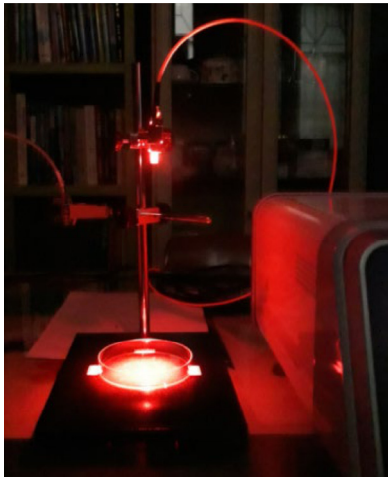


Fig. 1. Experimental setup showing the method for laser light irradiation.

4. 통계 분석

데이터는 SPSS Statistics 소프트웨어(Version 25.0)를 사용하여 분석하였다. 레이저 선량에 따른 집락 수(CFU/mL)는 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 통계적으로 분석하였다. 또한, 사후 검정으로 Tukey HSD (honestly significant difference) test 방법을 사용하였고, F 값이 0.05 미만인 결과는 유의미한 것으로 간주하였다($P < 0.05$).

III. 결과

1. 광역학 비활성화 후 집락 수(CFU/mL) 분석

본 연구 결과는 *S. aureus*의 모든 집락 수(CFU/mL)가 라다클로린이 있는 상태에서 다이오드 레이저 조사에 의해 감소되었음을 확인하였다(Fig. 2). 그러나 사멸 정도는 레이저 선량에 따라 차이가 있었다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, *S. aureus*의 집락 수(CFU/mL)는 레이저 에너지 선량이 증가함에 따라 감소하였다. 또한, 레이저 선량 9 J/cm²에서 87.91%의 사멸률이 나타났다(Table 3). 일원 분산 분석은 각 PDI에 대해 상당한 억제($F=375.261$, $P < 0.05$)를 보여주었으며 사후 분석에서는 각 그룹에서 3, 5, 7, 9 J/cm²의 레이저 에너지 선량에 따라 유의한 차이가 있었다.

2. 레이저 단독 조사와 라다클로린 단독 투여 시 집락 수(CFU/mL) 분석

Table 3에서 보듯이 라다클로린 없이 레이저만 조사한 그룹과 대조군 그룹을 비교한 결과 유의한 차이가 없어 레이저 조사만으로는 살균 효과가 없음을 나타내었다. 또한, 레이저 조사 없이 라다클로린만 투여한 군도 대조군과 차이가 없어 라다클로린의 독성을 관찰하지 못하였다($P > 0.05$).



(a) (b) (c) (d)

Fig. 2. Experimental evidence for the reduction in *S. aureus* viability after photodynamic inactivation. (a): T1-PDI 3 J/cm², (b): T3-PDI 5 J/cm², (c): T5-PDI 7 J/cm², (d): T7-PDI 9 J/cm².

Table 3. Mean value CFU/mL of *S. aureus* in each group

groups		Mean value	Kill rate (%)
Control groups	C1 Control	5.05×10^5	-
	C2 Only radachlorin	5.12×10^5	-
	C3 Only laser	4.98×10^5	-
PDI groups	T1 PDI 3 J/cm ²	2.75×10^5	45.5
	T3 PDI 5 J/cm ²	1.96×10^5	62.1
	T5 PDI 7 J/cm ²	1.3×10^5	74.3
	T7 PDI 9 J/cm ²	1.2×10^4	87.9

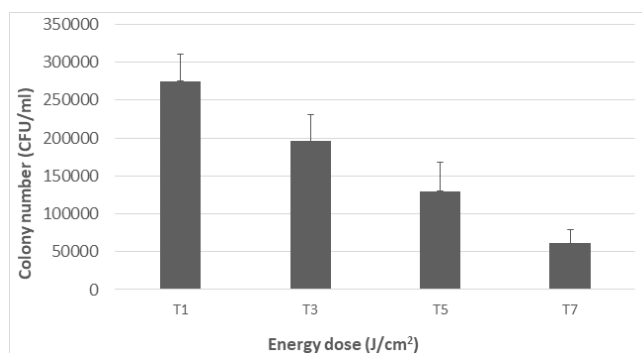


Fig. 3. Mean number of viable *S. aureus* colonies after photodynamic inactivation. (T1: PDI 3 J/cm², T3: PDI 5 J/cm², T5: PDI 7 J/cm², T7: PDI 9 J/cm²).

IV. 고찰

본 연구에서 라다클로린과 다이오드 레이저를 이용한 PDI가 *S. aureus*의 생존율을 줄이는데 상당히 효과적임을 보여주었다. 또한, 본 연구 결과는 9 J/cm²의 에너지 선량에서 87.9%의 사멸률을 확인했다.

많은 연구에서 다양한 광원과 광과민제를 사용하여 *S. aureus*에 대한 PDI의 효과를 조사하였다[16-19]. Fekrazad 등은 라다클로린과 662 nm 다이오드 레이저 (12 J/cm²)를 이용하여 *S. aureus*의 집락 수가 6.28 log₁₀으로 감소했음을 입증했다[19]. 또한, Thakuri 등은 리보플라빈 (riboflavin) 존재하에 청색 LED를 120분 동안 조사한 경우 *S. aureus*의 성장이 크게 감소했음을 관찰하였다[17]. Topalogluet 등은 인도시아닌이(indocyanine) 있는 상태에서 809 nm 다이오드 레이저를 84 J/cm²로 조사했을 때 야생형 *S. aureus*의 95% 이상이 감소했다고 보고했다[6]. Hsieh 등은 5-아미노레블린산(5-aminolevulinic acid, ALA) 1.0 M과 630 ± 5 nm LED (90 min, 162 J/cm²) 조사가 *S. aureus*의 생존 수를 완전히 감소시켰다[16]. 그러나 본 연구에서 라다클로린이 있는 상태에서 660 nm 다이오드 레이저를 이용한 *S. aureus*의 PDI는 3 J/cm²에서 45.5%, 5 J/cm²에서 61.2%, 7 J/cm²에서 74.3%, 9 J/cm²에서 87.9%의 사멸률을 보여주었다. 이는 이전 연구와 비교하여 *S. aureus*에 대한 평균 효과는 9 J/cm²의 비교적 낮은 선량과 1,067 s의 낮은 레이저 조사 시간으로 87% 이상의 평균효과를 관찰하였다.

낮은 수준의 광선 요법은 미생물을 억제하는 것으로 나타났다[20,21]. 여러 연구에서 여러 종류의 박테리아가 서로 다른 강도와 빛의 파장에 의해 사멸된다는 것이 입증되었다

[9,22]. 그러나 이 연구에서는 광과민제 없이 660 nm 다이오드 레이저 단독 조사는 대조군과 비교하여 *S. aureus*의 집락 수를 감소시키지 않았다. 이는 660 nm 다이오드 레이저 조사만으로는 *S. aureus*에 세포 독성 효과가 없다는 것을 입증하였다. 이 결과는 Moslemi 등의 연구와 일치한다. 이들은 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*가 최대 출력 2.5 W의 662 nm 레이저의 6 J/cm²의 선량으로 조사되었을 때 평균효과가 없음을 보여주었다[13]. 그러나 다른 연구에서는 감광제 없이 662 nm 레이저 조사 (6 J/cm²)가 *Pseudomonas gingivalis*의 집락 수를 감소시키는 것을 관찰했다[23]. 또한, Vahabi 등은 660 nm 다이오드 레이저 3 J/cm²의 단독 조사로도 *Streptococcus mutans* 수가 예상보다 많이 감소되는 것을 확인했다[14]. 이처럼 레이저 빛의 평균 효과는 미생물의 종류와 상태에 따라 달라질 수 있다[23]. 따라서 인간 세포와 여러 종류의 박테리아에서 다이오드 레이저 조사가 독성 효과가 있는지에 대한 많은 연구가 필요하다.

현재 광역학적 비활성화 요법은 암(cancers) 및 피부 사상균(dermatophytes) 치료에 적용하여 연구되고 있다 [24-28]. Cornelius 등은 5-아미노레블린산을 이용한 광역학 요법으로 인간 수막종 세포의 치료 효과를 확인하였고 [24], Morton 등은 저용량 클로트리마졸을 이용하여 피부 사상균인 *Trichophyton rubrum*의 사멸의 광역학 효과를 입증하였다[26]. 이 치료법은 비용이 적게 들고 재현 가능하며 숙주 조직에 안전하다는 장점이 있어[13,19,29], 상처 감염 치료를 위한 좋은 대안이 될 수 있다.

본 연구는 다이오드 레이저와 라다클로린을 이용한 광역학 요법은 *S. aureus*의 성장을 억제하는데 매우 효과적이라는 것을 입증하였다. 그러나 *in vitro* 분석에 국한되어 있어 추가적인 *in vivo* 실험이 필요하다.

V. 결론

위의 결론들을 종합하였을 때, 라다클로린과 660 nm 다이오드 레이저를 이용한 광역학 요법은 *S. aureus*의 집락 수를 억제하는데 매우 효과적이었다. 또한, 레이저 선량이 증가할수록 *S. aureus*의 성장이 억제되었고, 9 J/cm²의 선량으로도 87.9%의 사멸률을 관찰하였다. 이는 아토피 피부염 및 상처 감염 환자에서 *S. aureus*에 감염된 부위의 집락을 치료하기 위한 새로운 치료법으로 고려될 수 있음을 입증하였다.

REFERENCES

- [1] Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–61.
- [2] Ogonowska P, Gilaberte Y, Baranska-Rybak W, Nakonieczna J. Colonization With Staphylococcus aureus in Atopic Dermatitis Patients: Attempts to Reveal the Unknown. *Front Microbiol*. 2020;11:567090.
- [3] Kurlenda J, Grinholc M, Jasek K, Wegrzyn G. RAPD typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A 7-year experience in a Polish hospital. *Medical Science Monitor*. 2007;13(6):MT13–8.
- [4] Smeltzer MS, Gillaspay AF. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poult Sci*. 2000;79(7):1042–9.
- [5] Fekrazad R, Zare H, Vand SM. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on Staphylococcus aureus and Escherichia coli: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;15:213–7.
- [6] Topaloglu N, Gulsoy M, Yuksel S. Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(4):155–62.
- [7] Omar GS, Wilson M, Nair SP. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. *BMC Microbiol*. 2008;8:111.
- [8] Smith AJ, Daniels T, Bohnen JM. Soft tissue infections and the diabetic foot. *The American Journal of Surgery*. 1996;172(6):7s–12s.
- [9] Nussbaum EL, Lilge L, Mazzulli T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1–50 J/cm² on three species of bacteria in vitro. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20(6):325–33.
- [10] Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009;6(3–4):170–88.
- [11] Akilov OE, Kosaka S, O’Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte TJ, et al. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. *Chem Biol*. 2006;13(8):839–47.
- [12] Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):436–50.
- [13] Moslemi N, Soleiman-Zadeh Azar P, Bahador A, Rouzmeh N, Chiniforush N, Paknejad M, et al. Inactivation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: An in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):89–94.
- [14] Vahabi S, Fekrazad R, Ayremlou S, Taheri S, Zangeneh N. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on streptococcus mutans: An in vitro study. *J Dent (Tehran)*. 2011;8(2):48–54.
- [15] Privalov VA, Lappa AV, Seliverstov OV, Faizrakhmanov AB, Yarovoy NN, Kochneva EV, et al, eds. Clinical trials of a new chlorin photosensitizer for photodynamic therapy of malignant tumors. *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XI*. SPIE; 2002.
- [16] Hsieh CM, Huang YH, Chen CP, Hsieh BC, Tsai T. 5-Aminolevulinic acid induced photodynamic inactivation on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *J Food Drug Anal*. 2014;22(3):350–5.
- [17] Thakuri PS, Joshi R, Basnet S, Pandey S, Taujale SD, Mishra N. Antibacterial photodynamic therapy on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in-vitro. *Nepal Med Coll J*. 2011;13(4):281–4.
- [18] Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):165–73.
- [19] Fekrazad R, Zare H, Mohammadi Sepahvand S,

Morsali P. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin(R) on Staphylococcus aureus and Escherichia coli: An in vitro study. *J Lasers Med Sci*. 2014;5(2):82-5.

[20] Guffey JS, Payne W, Greenway J, Buchanan B, Collum J. Inhibition of Acinetobacter baumannii in vitro by low level light therapy at 625-nanometers. *Int J Adv Tech Sci*. 2014;1:51-9.

[21] Guffey JS, Payne W, Roegge W. In vitro fungicidal effects of methylene blue at 625-nm. *Mycoses*. 2017;60(11):723-7.

[22] Hamblin MR, Demidova TN, eds. Mechanisms of low level light therapy. Mechanisms for low-light therapy. International Society for Optics and Photonics; 2006.

[23] Moslemi N, Rouzmeh N, Shakerinia F, Bahador A. Photodynamic inactivation of Porphyromonas gingivalis utilizing radachlorin and toluidine blue O as photosensitizers: An in vitro study. *J Lasers Med Sci*. 2018;9(2):107-12.

[24] Cornelius JF, Slotty PJ, El Khatib M, Giannakis A, Senger B, Steiger HJ. Enhancing the effect of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in human meningioma cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11(1):1-6.

[25] Chen Y, Liu H, Zhang K, Gao L. Massive exudative retinal detachment following photodynamic therapy for retinal hemangioma in von Hippel-Lindau Syndrome. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11(2):250-3.

[26] Morton CO, Chau M, Stack C. In vitro combination therapy using low dose clotrimazole and photodynamic therapy leads to enhanced killing of the dermatophyte Trichophyton rubrum. *BMC Microbiol*. 2014;14(1):1-9.

[27] Smijs T, Dame Z, De Haas E, Aans JB, Pavel S, Sterenborg H. Photodynamic and nail penetration enhancing effects of novel multifunctional photosensitizers designed for the treatment of onychomycosis. *Photochem Photobiol*. 2014;90(1):189-200.

[28] Lee Y, Baron ED. Photodynamic therapy: Current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2011;30(4):199-209.

[29] Kim JW, Koo BY. Antimicrobial Photodynamic therapy using Diode Laser on Candida albicans. *Journal of Radiological Science and Technology*. 2021;44(2):141-6.

구분	성명	소속	직위
제1저자	구본열	전주비전대학교	조교수
교신저자	김지원	전주대학교	겸임교수