

Photodynamic Therapy for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strain using Photogem and 630 nm LED

Jin-Chul Ahn^{1,†}, Daesik Kim² and Phil-Seung Kwon¹

¹Medical Laser and Device Research Center, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea.

²Department of Clinical Laboratory Science, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the most common nosocomial pathogens. It is associated with hospitals is now being isolated in the community. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of photodynamic therapy using Photogem and 630 nm LED on MRSA and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). The broth cultured MRSA and MSSA incubated with various concentrations of Photogem (500, 50, 5 and 0.5 µg/mL) for 4 h. Then 630 nm LED was given at 9 J/cm². 20 µl of the exposed bacteria solution was inoculated onto agar plate. Plates were incubated for 24 h and colonies were counted. The PDT group was effective in killing MRSA and MSSA at the Photogem dose of 50 µg/mL. But MSSA is more sensitive than MRSA in photodynamic effect. Other groups (light only, sensitizer only, or no treatment) observed no bacterial cell killing. These results raise the possibility of using PDT with or without antimicrobial drugs to eradicate MRSA and MSSA. In order to confirm this result, we need to further study bacterial death mechanism and *in vivo* study.

Key Words: Photodynamic therapy, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Photogem

서 론

황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)은 그람양성세균으로 노란색소를 생성하며 응고인자 (clumping factor), 장관독소 (enterotoxins), 표피박탈독소 (exfoliative toxins), 백혈구 사멸독 (leukocidin), 핵산분해효소 (DNase), 용혈독 (hemolysin), 페니실린분해효소 (penicillinase), protein A 등 많은 균체 외 물질을 생성함으로써 종기, 여드름과 같은 피부병, 중이염, 방광염, 폐렴, 골수염, 뇌막염, 패혈증 및 식중독 등 인체에 감염하는 중요한 병원균 중의 하나로 알려져 있다 (Anliffe, 1997; Lowy, 2000). 항생제 내성을 가진 *S. aureus* 중 가장 큰 문제로 인식되고 있는 것이 penicillin 계열의 항생제인 methicillin에 내성을 가진 황색포도상구균 (MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*)이다. MRSA는 1960년대부터 분리되기 시작했는데, 주된 병원 감염과 유행병의 문제로 대두되기 시작했다. 지금은 병원 내의 어디에서나 분리되고 있는 실정으로 사회적으로 심

각한 문제가 되고 있다. 따라서 MRSA가 병원에서 퍼져 나가는 것을 통제할 필요가 강하게 제기되고 있다 (Boyce et al., 1991). 병원감염의 원인균으로 MRSA가 차지하고 있는 중요한 의의는 우리나라의 종합병원에서 분리 동정되고 있는 황색포도상구균 중 MRSA 분리율이 높고 (Seo, 1994; Jeong et al., 1995; Park and Kim, 1995), 병원내에 토착화되어 지속적인 증균과 병원감염을 유발시킬 수 있으며 (Seo, 1994; Jeong et al., 1995), 여러 항균제에 대하여도 내성을 획득하고 있어 치료가 어렵다는 사실이다 (Noble et al., 1992; HICPAC, 1995).

광역학치료 (photodynamic therapy)는 레이저 빛에 예민한 반응을 보이는 광감작제 (photosensitizer)를 종양에 투여하고, 광감작제가 활성화되는 특정 파장의 빛을 조사하여 광화학적, 광생물학적 기전에 의해 암조직을 특이적으로 손상시키는 암치료 방법이다 (Dougherty et al., 1998; Oleinick and Evans, 1998).

광역학치료에 의한 세포내 작용기전의 시작은 광물리 현상으로 이해되고 있는데 바닥상태의 광감작제를 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

*논문 접수: 2008년 12월 4일

수정재접수: 2008년 12월 15일

†교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 안서동 산 29, 단국대학교 의과대학 의학레이저 연구센터

Tel: 041-550-1786, e-mail: jcahn@dankook.ac.kr

형성되어 (Type I 반응) 세포파괴가 일어난다 (Foote, 1987; Tomio et al., 1980; Moan and Berg, 1991; Ochsner, 1997). 광역학치료는 1903년 피부암의 치료에 처음 사용된 이래 광반응물질과 레이저의 발달로, 1992년 캐나다에서 방광암, 식도암에 대한 치료방법으로 처음 승인된 이래, 유럽에서 폐암과 식도암의 치료 (초기 및 진행성병변), 1994년 일본에서 자궁경부 이형성증을 포함하여 자궁경부암, 식도암, 폐암, 위암 등에 대한 치료방법으로 인정받았고, 1995년 미국 FDA에서 암치료로 인정되어 현재 폐, 식도, 방광, 피부암의 치료에 이용되고 있으며 점차위암, 대장암 등의 소화기계 암과 유방암에도 적용되어 비교적 좋은 치료결과를 보이고 있다. 현재 광역학치료는 암세포 치료 뿐 아니라 항생제 내성균주 그리고 항암제와 병행 치료연구가 활발히 진행 중에 있다 (Maisch T, 2007).

본 연구에서는 항생제 내성을 갖는 MRSA에 대한 광역학치료 효과를 확인하기 위하여 MSSA와 광역학치료 효과를 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 미생물 균주

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)와 methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) 두 균주를 이용하여 본 실험에 사용하였다. 각각의 균주를 nutrient agar plate에 도말한 후 5% CO₂ incubator (Thermo Forma, 47502-3362)에서 24시간 동안 배양하여 생성된 colony를 loop를 이용하여 colony 1개를 취하여 mueller-hinton broth (Difco, 275730) 2 ml에 현탁시킨 다음 1.5×10⁸ CFU/mL가 되는 0.5 McFarland standard값이 분광광도계 (Spectrophotometer, Optizen 2120UV)를 이용하여 600 nm에서 흡광도 측정 시 0.08~0.1을 나타냄을 감안하여 실험 균주 농도를 희석하여 사용하였다.

2. 광감작제 및 Light source

본 연구에 사용된 광감작제 photogem은 Lomonosov

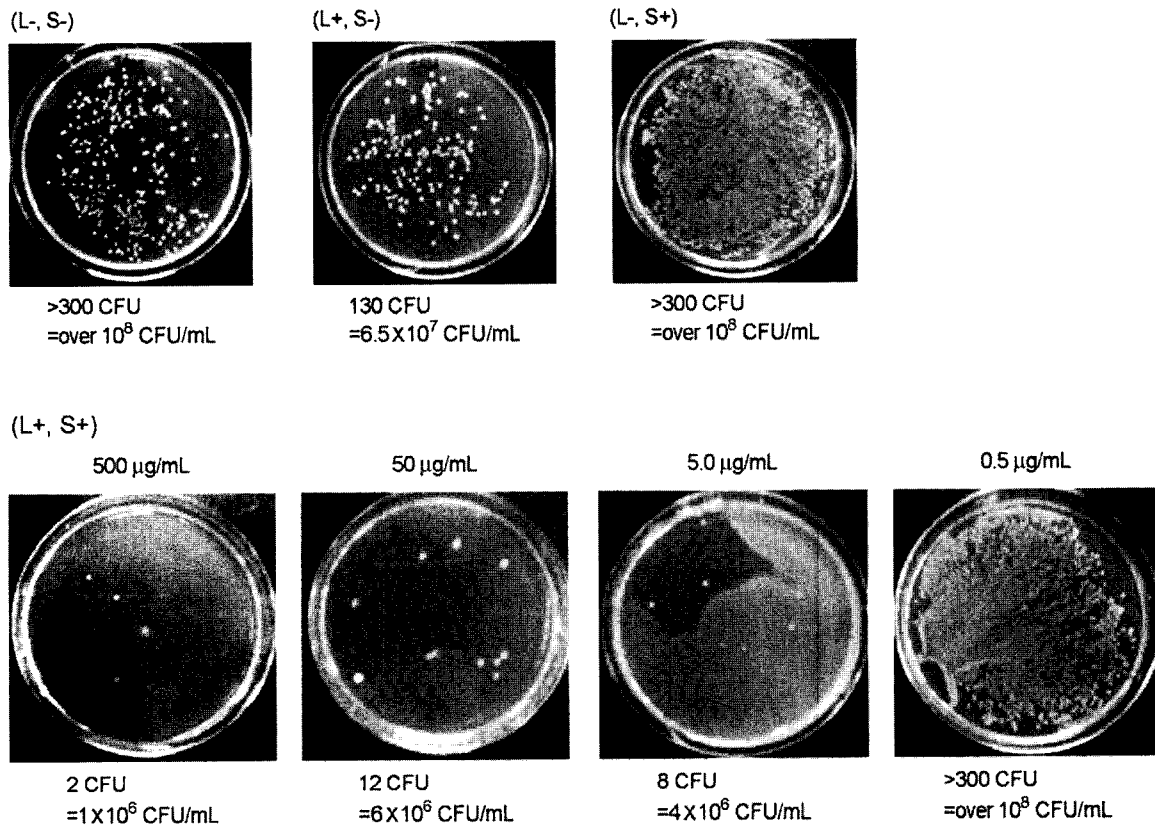


Fig. 1. Viable count of MRSA on the agar plates.

L-, S- : Unirradiated suspensions in the absence of the sensitizer,
L-, S+ : Unirradiated suspensions in the presence of the sensitizer,

L+, S- : Irradiated suspensions in the absence of the sensitizer
L+, S+ : Irradiated suspensions in the presence of the sensitizer

Institute of Fine Chemical, Russia에서 구입한 powder 제품을 DPBS (Hyclone, SH30264.01)에 10 mg/mL로 녹여 만든 뒤 0.2 µm filter (Sartorius, 16534)를 이용하여 여과하여 사용하였다. Photogem의 최종 농도를 각각 500, 50, 5, 0.5 µg/mL가 되도록 MRSA와 MSSA 배양액과 혼합한 실험군과 50, 5, 2.5, 1.25, 0.625 µg/mL이 되도록 MRSA와 MSSA 배양액과 혼합한 실험군으로 분류하여 5% CO₂ incubator (Thermo Forma, 47502-3362)에 4시간 동안 intake

time을 주었다. 가로 10×세로 15개의 630 nm LED (Ujin LED Co., ULP-H5R1101 A)를 장착한 판넬을 제작하여 5 mW/cm²의 출력으로 30분간 조사를 실시하였다. 이때 실험에 사용된 최종 energy density는 9 J/cm²로 LED 조사가 끝난 후 nutrient agar plate에 각각 20 µl씩 넣고 spreader를 이용하여 도말한 후 24시간 동안 배양시킨 다음 생성된 집락의 수를 확인하였다.

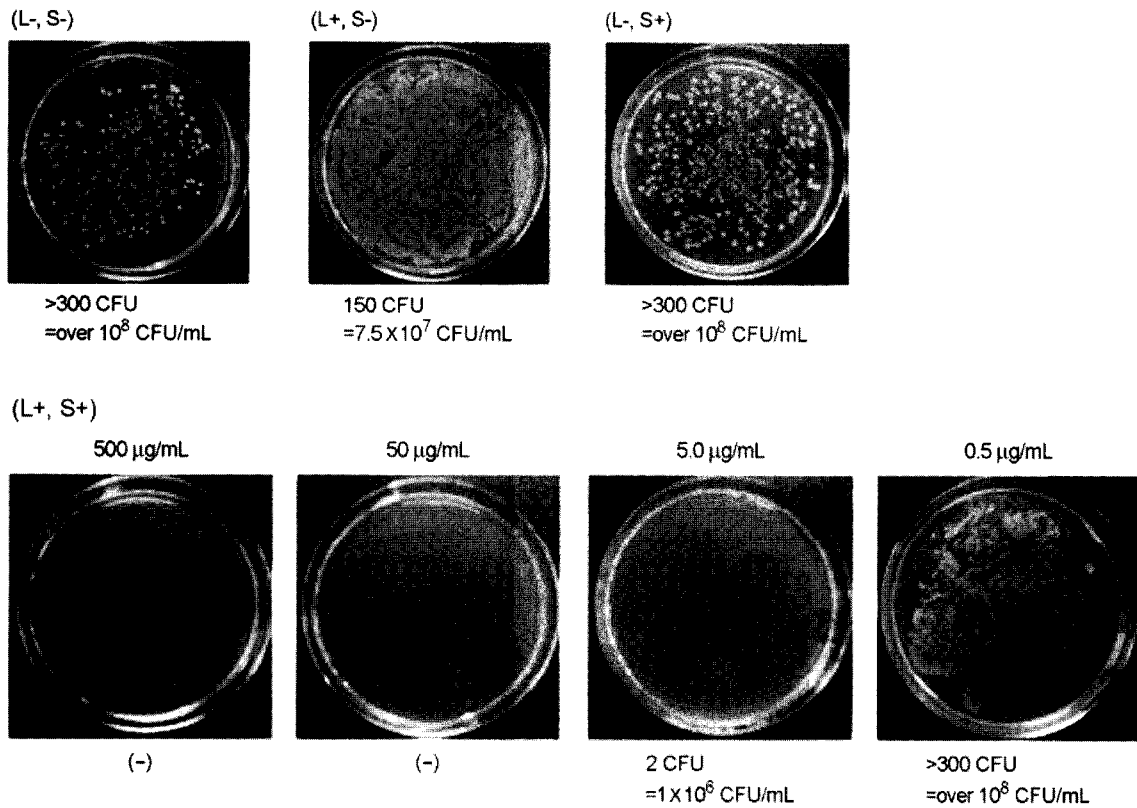


Fig. 2. Viable count of MSSA on the agar plates.

L-, S- : Unirradiated suspensions in the absence of the sensitizer,
L-, S+ : Unirradiated suspensions in the presence of the sensitizer,

L+, S- : Irradiated suspensions in the absence of the sensitizer
L+, S+ : Irradiated suspensions in the presence of the sensitizer

Table 1. Viable count in studies with Photogem

Test condition	Variable	MRSA colony count (CFU)				MSSA colony count (CFU)			
		L-, S-	L+, S-	L-, S+	L+, S+	L-, S-	L+, S-	L-, S+	L+, S+
	Conc. (µg/mL)	130		150	
PIT = 4h ED = 9 J/cm ²	0.5			
	5.0				8				2
	50.0				12				0
	500.0				2				0

L-, S- : Unirradiated suspensions in the absence of the sensitizer,
L-, S+ : Unirradiated suspensions in the presence of the sensitizer,
PIT : Pre-irradiation time,
... : over 300 CFU

L+, S- : Irradiated suspensions in the absence of the sensitizer
L+, S+ : Irradiated suspensions in the presence of the sensitizer
ED : Energy density,

결 과

630 nm light emitting diode (LED)를 가지고 다양한 photogem 농도를 처리하여 *in vitro*상에서 PDT 실시를 하였을 때 MRSA와 MSSA에 대한 살균능을 확인한 실험결과는 다음과 같다 (Fig. 1, 2 and Table 1).

본 실험은 아무 것도 처리하지 않은 것 (L-, S-), 두 번째 광감작제만 있고 LED 조사되지 않은 것 (L-, S+) 그리고 마지막 광감작제가 없이 LED 조사만 된 것 (L+, S-)으로 분류한 3종류의 대조군을 지정하고 실험군으로 다양한 농도의 photogem를 첨가한 배양액에 LED 조사된 것 (L+, S+)으로 나누어 시행하였다. MRSA의 실험결과 (L-, S-)와 (L+, S-) 그리고 (L-, S+)의 대조군에서는 많은 수의 colony들을 눈으로 확인할 수 있었고 (L+, S+)의 경우 5, 50, 500 µg/mL photogem 농도에서 집락수가 적게 counting된 것으로 확인되었다 (Fig. 1 and Table 1). MSSA의 실험결과도 MRSA와 마찬가지로 대조군에서는 많은 수의 집락이 생성되었고 (L+, S+)의 경우도 MRSA와 같은 경향을 보였으며 photogem의 최종 농도를 50과 500 µg/mL이 되도록 MSSA 배양액과 혼합하여 PDT 시행하였을 때 MSSA 배양 plate상에 집락이 생성되지 않아 미생물이 모두 박멸되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2 and Table 1).

여러 신체 부위에서 채취되고 확보된 MRSA와 MSSA를 채취 부위별로 분류하여 photogem의 최종 농도를 각각 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 및 50 µg/mL가 되도록 미생물배양액과 혼합하여 PDT한 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서와 같이 여러 부위의 MRSA와 MSSA에 대해서도 PDT에 의한 살균효과가 있음을 확인하였는데 MSSA의 경우 5.0 및 50 µg/mL photogem 농도에서 실시된 PDT에서 3개의 모델 중 2개가 모두 박멸되는 결과를 볼 때 MRSA보다 MSSA에 좀더 sensitive하게 PDT에 의한 효과가 나타남을 알 수 있었다. PDT 관련 여러 논문에서 밝혀진 바와 같이 위의 결과에서도 광감작제 단독 또는 빛 단독으로 처리한 경우 박테리아의 사멸에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

고 찰

현재 박테리아의 박멸은 주로 항생제 혼합치료를 통하여 이루어지고 있고 박멸효과는 우수하나 항생제 오남용

Table 2. Photogem induced PDT suppressed MRSA and MSSA

Test condition	Conc.(µg/ml) Bacteria	Colony count (CFU)				
		50	5.0	2.5	1.25	0.63
PIT = 4h ED = 9 J/cm ²	MR ₁	15	80	140
	MR ₂	0	5	10
	MR ₃	14
	MS ₁	7	10	2	5	...
	MS ₂	0	0	2	2	...
	MS ₃	0	0	3	7	...

MR₁: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Bronchial aspiration)

MR₂: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Low birth weight)

MR₃: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Transtracheal aspiration)

MS₁: Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (Bacterial pneumonia)

MS₂: Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (Cutaneous abscess, furuncle and carbuncle of face)

MS₃: ATCC 29213

PIT : Pre-irradiation time

ED : Energy density

... : over 300 CFU

으로 인한 내성균과 독성 등의 부작용을 보완하기 위한 많은 대체방법들이 시도되고 있다 (Gorbach, 1990). MRSA를 비롯한 항생제 내성 박테리아를 효과적으로 박멸시킬 수 있는 대체 치료법의 하나로 광역학치료법이 최근 많이 연구되고 있다. 실제로 광역학치료 (Photodynamic therapy; PDT)는 단일 파장의 특성을 지닌 레이저와 특정 파장의 빛을 흡수하여 작용하는 광감작제 및 체내산소의 상호작용으로 세포를 사멸시키는 방법으로 (Kwon et al., 2005), PDT는 암치료에 많이 이용되고 있으며, 박테리아를 사멸시키는데도 이용이 되고 있다고 보고되었다 (Bedwell et al., 1990; Barr et al., 1987).

Lambrechts 등의 보고에 의하면 화상을 입은 마우스 모델에서 *Staphylococcus aureus*를 감염시켜 광역학치료 효과를 입증하였는데 이때 사용한 광감작제는 meso-mono-phenyl-tri(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin (PTMPP)로 3도 화상을 입은 마우스에서 98% 이상의 살균효과를 광역학치료군에서 확인하였고 레이저만 조사한 군과 광감작제만 투여한 대조군 보다 빠른 세균 감소를 확인하였음을 밝혔다 (Lambrechts et al., 2005). 본 연구에서는 광감작제로 Photogem을 사용하여 MSSA에서 광감작제와 4시간 반응시켜 630 nm LED를 조사한 결과 5 µg/ml의 Photogem 농도에서 우수한 살균효과를 확인할 수 있었고 Lambrechts 등의 실험과 마찬가지로 LED만 조사한 군, 광감작제인

Photogem만을 처리한 군에서는 세균사멸에 큰 영향을 주지 못했다. MRSA에 대한 광역학치료 연구 또한 현재 전 세계적으로 초기단계에 있으며 현재 이에 대한 연구가 큰 관심을 보이고 있다 (Maisch T, 2007). 본 연구에서도 MRSA에 대하여 광역학치료를 시행하였는데 MSSA와 동일한 실험방법으로 세균사멸을 확인한 결과 MSSA와 같은 양상으로 세균사멸을 확인하였다, 그러나 MSSA보다 높은 농도의 광감작제에서 완전살균효과를 확인할 수 있었다. 이러한 차이는 세균의 변성과 광역학치료의 살균기전에 이유가 있다고 사료된다. 광역학치료의 세균 살균기전은 DNA 손상과 cytoplasmic membrane의 손상으로 알려져 있는데 single이나 double strand DNA의 파괴 그리고 그람 음성균과 그람양성균이 여러 종류의 광범위한 구조형태를 지닌 photosensitizer와 광역학적 비활성 후에 plasmid supercoiled fraction 나타나지 않는 것이 발견되었었다 (Bertoloni et al., 2000; Fiel et al., 1981; Menezes et al., 1990; Capella et al., 1996). Valduga와 Bertoloni는 세균의 사멸이 Cytoplasmic membrane protein의 변화 때문임을 보여 주고 있다 (Valduga et al., 1999; Bertoloni et al., 1990). 본 연구에서의 MRSA와 MSSA의 살균능의 차이는 세균의 변성에 의한 광감작제의 침투 정도가 다르기 때문이라고 사료된다.

본 연구에서는 MRSA에 대한 광역학치료 효과를 MSSA와 비교하여 확인해본 결과 우수한 살균효과를 확인하였고 다양한 항생제 내성균주에 대한 광역학치료의 효과와 세균사멸에 대한 분자생물학적인 연구가 앞으로 필요하다고 사료된다.

REFERENCES

- Anliffe GA. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 1997. 24: 74-79.
- Barr H, Tralau CJ, MacRobert AJ, et al. Photodynamic therapy in the normal rat colon with phthalocyanine sensitisation. Br J Cancer 1987. 56: 111-118.
- Bedwell J, Holton J, Varia D, MacRobert AJ, Bown SG. In vitro killing of helicobacter pylori with photodynamic therapy. The Lancet 1990. 335: 1287.
- Bertoloni G, Salvato B, Dall'Acqua M, Vazzoler M, Jori G. Hematoporphyrin-sensitized photoin activation of *Streptococcus faecalis*. Photochem Photobiol. 1984. 39: 811-816.
- Boyce JM. Should we vigorously try to contain and control methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? Infect. Control Hosp Epidemiol. 1991. 12: 46-54.
- Capella M, Coelho AM, Menezes S. Effect of glucose on photodynamic action of methylene blue in *Escherichia coli* cells. Photochem photobiol. 1996. 64: 205-210.
- Dougherty T, Kaufman J, Goldfarb A, Weishaupt K, Boyle D. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res. 1978. 38: 143-151.
- Fiel R, Datta-Gupta JN, Mark EH, Howard JC. Introduction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. Cancer Res. 1981. 5: 3543-3545.
- Foote CS. Type I and Type II mechanisms of photodynamic action, in Heitz JR and Downum KR (eds), Light-Activates Pesticides, American Chemical Society, Washington DC. 21987. 2-38.
- Gorbach SL. Bismuth therapy in gastrointestinal diseases. Gastroenterology 1990. 99: 863-875.
- Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Recommendation for preventing the spread of vancomycin resistance. Infect Control Hosp Epidemiol. 1995. 16: 105-113.
- Jeong HJ, Kim WJ, Kim MJ, Park SC. Nosocomial Infection Surveillance in the Intensive Care Unit. Kor J Infect Dis. 1995. 27: 105-117.
- Kwon PS, Oh CH, Ahn JC, Rhee CK. Antibacterial effects of photodynamic therapy on *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis*. J Kor Photodynamic Association 2005. 2: 193-201.
- Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. Photochem Photobiol Sci. 2005. 4: 503-509.
- Lowy FD. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? Trends Microbiol. 2000. 8: 341-343.
- Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? Lasers Med Sci. 2007. 22: 83-91.
- Menezes S, Capella A, Caldas LR. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in *Escherichia coli*. J Photochem photobiol B. 1990. 5: 505-517.
- Nobel WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 1992. 72: 195-198.
- Ochsner M. New trends in photo biology Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. Photochem Photobiol. 1997. 39: 1-18.

- Oleinick NL, Evans HH. The photo biology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Rad Res.* 1998. 150: 146-156.
- Park ES, Kim JM. Infections among patients from Department of General Surgery. *Kor J Infect Dis.* 1995. 27: 37-43.
- Seo EJ. Molecular Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In an Intensive Care Unit. The degree of Master in Medicine, Graduate School, University of Ulsan. 1994.
- Tomio L, Redi G, Jori PL, Zorzi GB. Hematoporphyrin as a sensitizer in tumor photo therapy: effect of medium polarity on the photo sensitizing efficiency and role of the administration pathway on the distribution in normal and tumor bearing rats, in R. Pratesi and CA Sacchi (eds), *Lasers in photo medicine and photobiology*, Springer-Verlag, Berlin. 1980. 76-82.
- Valduga G, Breda B, Giacometti GM, Jori G, Reddi E. Photosensitization of wild and mutant strains of *Escherichia coli* by meso-tetra (N-methyl-4-pyridyl)porphyrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. 256: 84-88.
-