



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](#)

석사학위논문

개 외이도염에서 광감각제인 5-ALA,
MAL, CLC를 이용한 광역학 치료

제주대학교 대학원

수 의 학 과

이 민 호

2016년 2월

개 외이도염에서 광감각제인 5-ALA, MAL, CLC를 이용한 광역학 치료

지도교수 윤 영 민

이 민 호

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함

2015년 12월

이민호의 수의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____(인)

위 원 _____(인)

위 원 _____(인)

제주대학교 대학원

2015년 12월

Abstract

Photodynamic therapy using topically applied 5-ALA, MAL and CLC for canine otitis externa

Minho Lee

(Supervised by Prof. Youngmin Yun)

Department of Veterinary Medicine, Graduate School,
Jeju National University, Jeju, Korea

Canine otitis externa is common disorder in small animal practice with prevalence up to 20%. In a large percentage of cases, canine otitis externa is chronic and recurrent disease also that associated with drug-resistant bacteria is difficult to treat with traditional antibiotics. Photodynamic therapy (PDT) is a new strategy to exterminate pathogenic microorganisms such as bacteria and fungi. The objective of this study was to investigate an effect of photodynamic therapy against canine otitis externa using three photosensitizer (PS); 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) and Methyl aminolevulinic acid (MAL) with semiconductor laser diode (SLD, 635nm of wave length), Chlorophyll-lipoid complex (CLC) with light-emitting diode(LED, 660nm of wave length).

After PDT, dogs showed improved Otitis Index Score (OTIS) in swelling, exudate, odor and pain. A result of cytology test revealed decrease of bacteria and malassezia count in oil immersion field and

colony forming units count. PDT was effective as a bactericide of multidrug-resistant *Acinetobacterium* (MRA) as well as methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) and a fungicide of *Malassezia pachydermatis*. MAL and 5-ALA were more effective PS against canine otitis externa than CLC.

These results suggest that PDT is a new strategy to exterminate pathogenic microorganisms such as bacteria and fungi. PDT can be considered new therapeutic approach for canine recurrent otitis externa and a countermeasure to drug resistance that is a drawback of traditional antibiotic and antifungal therapy.

Key words : Photodynamic therapy, 5-ALA, MAL, CLC, otitis externa, dog

목 차

| | | | |
|-------------|-------|-------|----|
| I. 서 | 론 | | 1 |
| II. 재료 및 방법 | | 6 | |
| III. 결 | 과 | | 15 |
| IV. 고 | 찰 | | 40 |
| V. 결 | 론 | | 45 |
| VI. 참 고 문 헌 | | 46 | |

Abbreviations

| | |
|-------|--|
| PDT | Photodynamic therapy |
| PS | Photosensitizer |
| 5-ALA | 5-aminolevulinic acid |
| MAL | Methyl aminolevulinic acid |
| CLC | Chlorophyll-lipoid complex |
| PpIX | Protoporphyrin IX |
| SLD | Semiconductor laser diode |
| LED | Light-emitting diode |
| MRSA | Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MRSP | Methicillin-resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> |
| VRSA | Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MRA | Multidrug-resistant <i>Acinetobacterium</i> |
| CFU | Colony forming unit |

I. 서 론

개의 외이도염은 개에서 가장 빈번하게 발생하는 질병중의 하나이며, 개가 동물병원에 내원하게 되는 이유 중 최대 20%까지 차지한다고 보고되어 있다(1, 2). 외이도염의 발생요인은 크게 원발요인(primary factor), 소인요인(predisposing factor)과 지속요인(perpetuating factor)으로 나누어진다(3). 원발요인은 아토피, 식이알러지로 인한 과민증, 외부기생충, 이물질, 각화이상 피부질병(keratinization defects), 특발성 염증(Idiopathic Inflammatory) 등이 있다(3-5). 소인요인으로는 높은 습도와 온도 등의 외부환경적요인, 이도 내 모낭 증가, 이도협착(샤페이, 불독, 차우차우 종 등), 이도를 덮는 귀의 해부학적 구조(코커스파니엘, 라브라도 리트리버 종 등)가 있다(6). 지속요인으로는 세균 및 진균(*Malassezia pachydermatis*)의 증식이 있는데 이는 귀의 염증반응을 악화시켜 외이도염의 원발요인이 제거된 후에도 병증을 지속시키는 경향이 있어 외이도염 치료실패의 가장 중요한 원인이 된다(3, 7, 8).

외이도염의 치료는 발병의 원인이 되는 원발요인 혹은 소인요인을 제거하고, 스테로이드제제, 항생제, 구충제 등을 이용한 약물요법, 귀 세정, 외과적 처치를 통하여 할 수 있다(3). 그러나 약제를 전신적으로 투약할 경우 이도 내 분비물, 이물질 등에 의하여 약물이 분포되기 어렵고, 약제를 국소적으로 반복적으로 투약 할 경우 이도 내에 감염된 세균 혹은 진균이 약제내성을 가지기 쉽다(9). 따라서 개의 외이도염은 재발률이 60% 정도로 높은 편이며, 만성 혹은 난치성으로 악화되는 경우가 많다(10, 11).

광역학 치료(photodynamic therapy)는 1900년 번개가 치는 날 아크리딘 색소(acridine hydrochloride)에 노출된 짚신벌레(paramecium caudatum)가 죽는 것을 발견하여 처음으로 고안되었고, 피부암에 대하여 5% Eosin용액과 백색광으로 실시된 것이 최초의 광역학 치료로 기록되어 있다 (12, 13).

광역학 치료는 광감작제(photosensitizer)와 광선(light)의 두 가지 비독성 물질로 이루어진다. 전신적 혹은 국소적으로 병변부위에 투여된 광감작제는 비활성

상태로 있다가 특정파장의 빛을 받으면 활성화되어 빛 에너지를 산소분자로 전달하여 활성산소(ROS, reactive oxygen species)를 생성한다(14) (Fig 1). 활성산소는 일중항산소(singlet oxygen)를 포함하는 높은 산화력을 지닌 분자로 세포막, DNA 등의 세포구성요소에 손상을 입혀 세포자멸사(apoptosis)를 유도한다(15). 이 반응은 특정 파장의 빛에 노출된 조직에서만 일어나므로 주위의 정상조직에는 영향 없이 목표조직에서만 선택적으로 일어난다(16).



Fig 1. Photodynamic therapy process.

Light activation of photosensitizer generates reactive oxygens and triplet oxygen that exterminate pathogenic microorganisms.

현재까지 가장 많은 연구가 이루어진 광감각제(photosensitizer)는 19세기 중반 발견된 porphyrin이다. Porphyrin은 혈액소 안에 많이 포함되어 있으며, 생체 내에서 산화·환원반응에 중요한 역할을 하는 물질이다. 1912년 독일의 물리학자 Friedrich는 porphyrin을 인체에 처음 적용한 사람으로, 그는 스스로의 몸에 hematoporphyrin 200 mg를 주입하였고, 팔에 빛을 조사하여 궤양 및 부종이 생기는 것을 확인하였다(17). 현재는 hematophorphyrin을 정제하여 더 적은 양으로 같은 효과를 내는 hematophorphyrin 유도체를 많이 사용하고 있다. 그러나 1세대 광감각제인 hematophorphyrin 유도체는 체내로부터 배설되는 시간이 한 달 이상으로 길기 때문에 피부의 광과민증이 오래 지속되어 완전히 대사될 때까지 빛에 노출을 피해야 하며, 피부 투과도가 높은 630 nm 파장 빛에

대한 흡수도가 떨어진다는 단점이 있다(18). 이러한 한계점을 개선한 2세대 광감각제인 5-aminolevulinic acid (5-ALA)는 체내에서 배출되는 시간이 24시간에서 48시간으로 짧아 부작용이 적고, 국소적용에도 좋은 효과를 가지고 있다(18, 19). 5-ALA는 세포 내로 흡수되면 heme 생합성 경로를 거쳐 실질적 광감각제인 protoporphyrin IX (PpIX)로 변환되며 피부 투과도가 높은 635 nm 파장의 빛에서 활성화된다(16, 20) (Fig 2). 한편 2세대 광감각제는 친수성이 높은 분자로 구성되어 있어서 국소 적용 시에 세포막 및 세포간질에 대한 투과율이 다소 떨어진다는 단점을 가지고 있는데, 3세대 광감각제는 2세대 광감각제를 에스테르화시켜 친유성을 높임으로써 세포에 대한 흡수율을 증가시켰으며 대표적인 물질로 methyl aminolevulinic acid (MAL)이 있다(21). 3세대 광감각제는 세포 내에서 PpIX로 변환되는 시간도 단축되어서 광역학 치료의 시술 시간도 단축시켰으며, 2세대 광감각제보다 더 적은 용량으로 같은 효과를 보인다(22) (Fig 3). Chlorophyll-lipoid complex (CLC)는 *Spirulina maxima* 해조류 추출물로서 660 nm 파장의 빛을 받으면 우수한 활성산소 발생률을 보여 최근에 광역학 치료를 위한 광감각제로 사용되기 시작했다(23-25). 체내에 흡수되어 광감각물질로 대사되는 5-ALA와 MAL과는 달리 CLC는 그 자체로서 광감각제로 작용하기 때문에 5-ALA와 MAL에 대비하여 짧은 incubation time을 가지며 수 시간 내에 대사되기 때문에 광역학 치료의 부작용인 광독성현상도 더 적다(23, 25).

광역학 치료는 1995년 우리나라에 처음 도입된 이후 사람의 종양 및 피부질병 치료에 적용되어 성과를 내고 있으나 동물에는 거의 이루어지지 않고 있다. 이는 여러 가지 이유가 있겠지만 광역학 치료 장비와 광감각제의 높은 비용 때문이라고 생각된다. 본 연구는 개의 외이도염에 대하여 광감각제로서 효과가 알려진 5-ALA, MAL 및 CLC를 이용하여 생체 및 생체 외에서 광역학 치료의 효과 및 특성을 비교하고자 수행하였다.

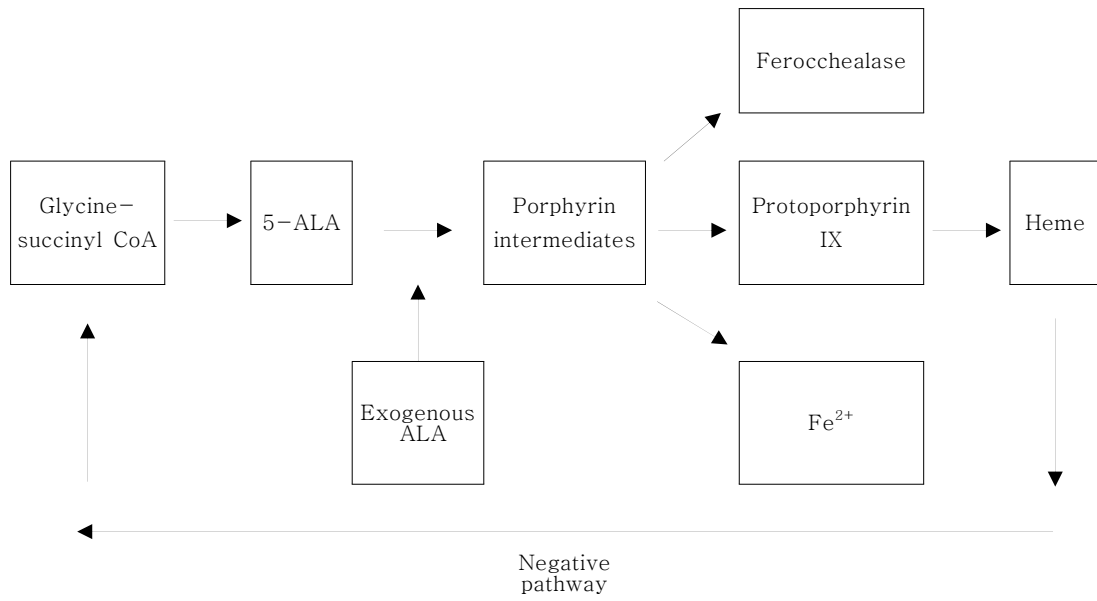


Fig 2. Aminolevulinic acid synthase pathway

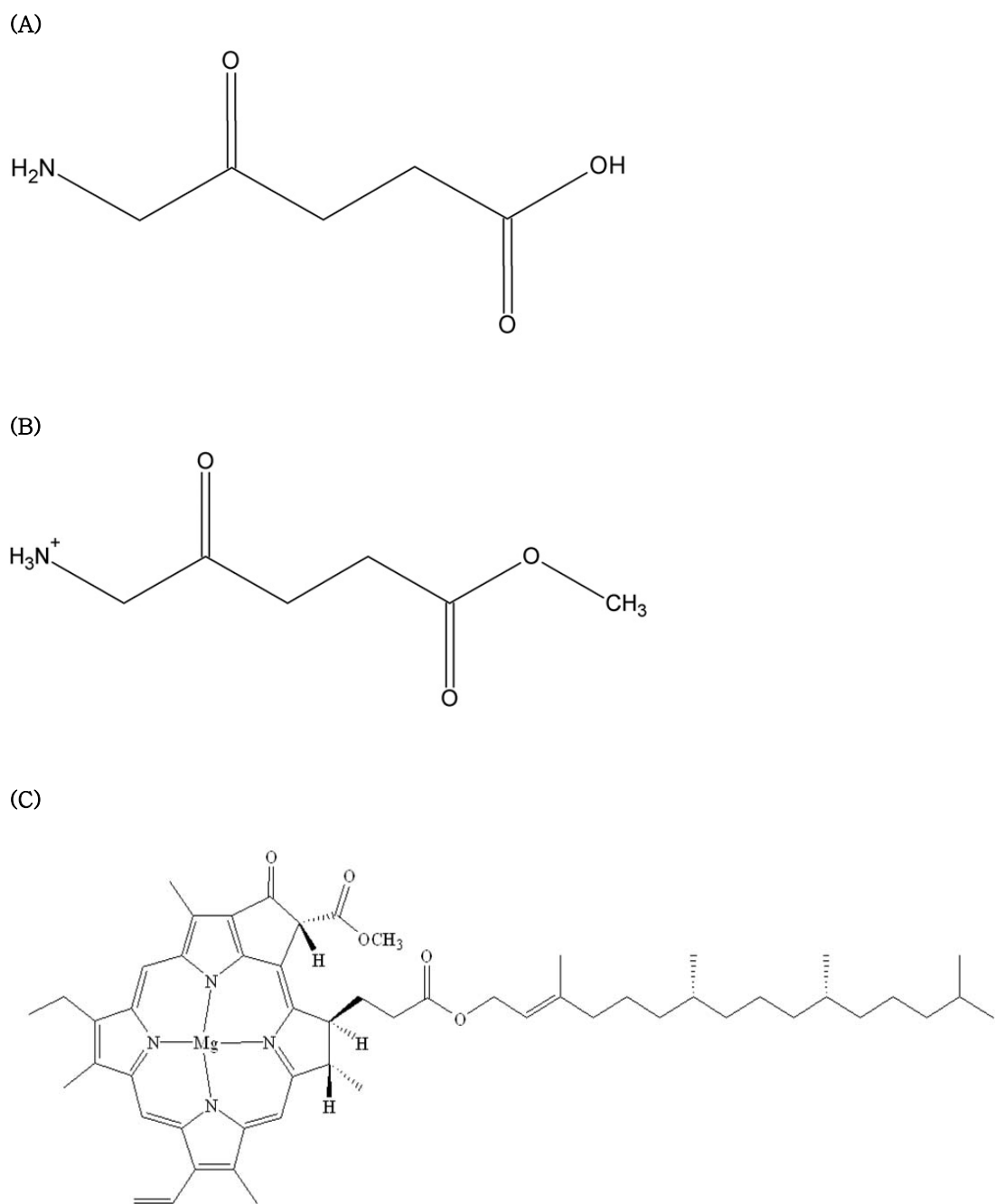


Fig 3. Structure of photosensitizer (A) 5-Aminolevulinic acid, (B) Methyl aminolevulinic acid, (C) Chlorophyll-lipid complex.

II. 재료 및 방법

1. 광감각제 및 광원

광역학 치료에는 세 가지 광감각제를 사용하였다. 첫 번째 광감각제는 5-aminolevulinic acid hydrochloride (5-ALA, Federal State Unitary Enterprise "State Scientific Center" Scientific Research Institute of Organic Intermediates and Dyes, Moscow, Russia)로 알코올(ethanol content = 48% v/v)에 20% (w/v)로 용해하여 사용하였고, 광원은 5-ALA의 광독성 효과가 최대가 되는 635 nm 파장의 semiconductor laser diode (Laxcell T-3000, Biotics, Korea)를 사용하였다.

두 번째 광감각제는 Methyl aminolevulinic acid (MAL)로 16% MAL cream (Metvix[®], PhotoCure ASA, Oslo, Norway)을 사용하였고, 광원은 MAL의 광독성 효과가 최대가 되는 635 nm 파장의 semiconductor laser diode (SLD, Laxcell T-3000, Biotics, Korea)를 사용하였다.

세 번째 광감각제는 Chlorophyll-lipoid complex (CLC)로 해조류인 *Spirulina maxima* 추출물(Vitra-Healer[®], Aseptica, Moscow, Russia)을 사용하였고, 광원은 CLC의 광독성 효과가 최대가 되는 660nm 파장의 3000mW light-emitting diode (LED, AMC7150, Ledparts, Seoul, Korea)를 사용하였다.

SLD는 기기에서 표시되는 출력을 기술하였고, LED는 출력조정기능이 없어서 조사대상간의 거리를 조정하여 출력을 조정하였으며 5 cm거리에서 38 mW/cm², 40 cm거리에서 4.2 mW/cm² 가 되도록 조정하였다. LED 조사량의 계산은 다음의 공식을 이용하였다.

$$\text{Energy (J)} = \text{Electric power (W)} \times \text{Time (s)}$$

2. 생체 외 광역학 치료(Photodynamic therapy *in vitro*) 효과

1) 공시 균주

제주대학교 수의과대학 전염병학 교실에서 분양받은 Multidrug-resistant *Acinetobactererium* (MRA) 및 Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP)를 Trypsin Soy Agar (Difco, USA)에 37℃에서 각각 48시간, 24시간 배양하였고, *Malassezia pachydermatis*는 Sabouraud Dextrose Agar (Difco, USA)에 37℃에서 72시간 동안 배양한 후 각각 하나의 colony를 취하여 멸균 식염수로 1000배 희석용액 1 ml를 만들었다.

2) 집락형성단위 측정 시험

광감작제로 5-ALA를 사용한 실험에서는 A와 C 군은 아무것도 첨가하지 않고 B, D, E, F군은 각각 최종농도가 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 5-ALA를 첨가하였다. A, B, C, D, E, F군은 빛을 차단시켜 4시간동안 37℃에서 정체시킨 후 90 mm petri dish에 유리 spreader를 이용하여 균주 희석용액 100 μl 를 접종하였다. C, D, E, F군은 접종된 90 mm petri dish에 635 nm SLD를 이용하여 250 mW 출력으로 480초 동안 linear probe를 통해 120 J의 광원을 조사하였다(Table 1)(Fig 4. A). 그 후 A, B, C, D, E, F군의 petri dish를 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단하여 각각 37℃에서 MRA, MRSP와 *Malassezia pachydermatis*를 각각 24시간, 48시간과 72시간 배양한 후 집락형성단위를 측정하였다.

Table 1. Conditions of Photodynamic therapy *in vitro* using 5-ALA and semiconductor laser diode (120 J)

| Group | Amount of 5-ALA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | Light |
|-------|---|-------|
| A | – | – |
| B | 10 | – |
| C | – | ○ |
| D | 1 | ○ |
| E | 5 | ○ |
| F | 10 | ○ |

A. Non treatment, B. Photosensitizer only (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA), C. Light only, D. Treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light, E. Treatment with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light, F. Treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light

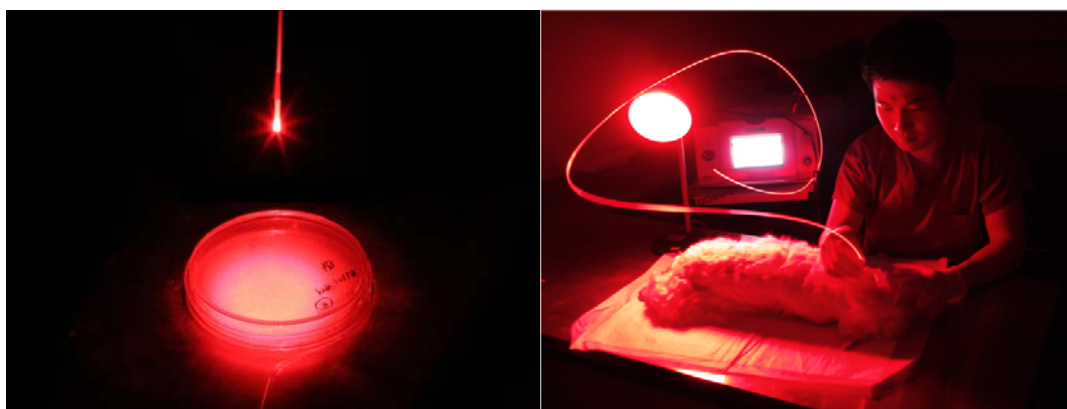


Fig 4. (A) Photodynamic therapy for microorganisms isolated from a dog suffering otitis externa on 90 mm petri dish with semiconductor laser diode. (B) Photodynamic therapy for canine otitis externa with semiconductor laser diode *in vivo*.

광감작제로 CLC를 사용한 실험에서 A와 C 군은 아무것도 첨가하지 않고 B, D, E, F군은 각각 최종농도가 10 mg/ml, 100 μ g/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml가 되도록 CLC를 첨가하였다. A, B, C, D, E, F군은 빛을 차단시켜 30분 동안 37°C에서 정체시킨 후 90 mm petri dish에 유리 spreader를 이용하여 균주 희석용액 100 μ l를 접종하였다. C, D, E, F군은 접종된 90 mm petri dish에 660 nm LED를 이용하여 4.2 mW/cm²의 출력으로 3600초 동안 15 J/cm²의 광원을 조사하였다(Table 2). 그 후 A, B, C, D, E, F군의 petri dish를 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단하여 각각 37°C에서 MRA, MRSP와 *Malassezia pachydermatis*를 각각 24시간, 48시간과 72시간 배양한 후 집락형성단위를 측정하였다.

Table 2. Conditions of Photodynamic therapy *in vitro* using CLC and light emitting diode (15 J/cm²)

| Group | Amount of CLC (mg/ml) | Light |
|-------|-----------------------|-------|
| A | – | – |
| B | 10 | – |
| C | – | ○ |
| D | 0.1 | ○ |
| E | 1 | ○ |
| F | 10 | ○ |

A. Non treatment, B. Photosensitizer only (10 mg/ml CLC), C. Light only, D. Treatment with 100 μ g/ml CLC plus light, E. Treatment with 1 mg/ml CLC plus light, F. Treatment with 10 mg/ml CLC plus light

3) 통계분석

각 항목의 광역학 치료 전과 치료 후 점수와의 유의성을 분석하기 위하여 SPSS통계프로그램(ver 18.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 생체 내 광역학 치료 결과 형성된 집락 수의 비교를 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA test)을 실시하였고, p값은 <0.05, <0.01로 통계적 유의성을 평가하였다.

3. 생체 내 광역학 치료(Photodynamic therapy *in vivo*) 효과

1) 대상동물

제주대학교 부설동물병원에 내원한 난치성 외이도염에 이환된 개 1두와 제주 지역에서 사육중인 개 5두로 총 6두를 대상으로 광역학 치료를 실시하였다. 한 마리의 개(A)는 5-ALA로 1차 치료 후 MAL을 사용하여 2차 치료하였고, 두 마리의 개(B, C)는 좌측 귀는 MAL을 사용하여 치료하였으며 우측 귀는 5-ALA를 사용하여 치료하였다. 세 마리의 개(D, E, F)에서 좌측 귀는 CLC를 사용하여 치료하였고 우측 귀는 멸균 증류수로만 세척하였다.

2) 원인 분리 및 육안 평가

수평 외이도와 수직 외이도의 연접부위에서 분비물 시료를 채취하여 슬라이드 글라스에 도말한 후 modified Wright-Giemsa stain으로 염색하여 세포학 검사를 실시하였다. 광학현미경을 이용하여 x1000 배율로 5곳의 임의 시야에서 관찰한 세균 혹은 진균의 수를 세어서 점수화 한 후(0 = 0 - 5개, 1 = 6 - 10개, 2 = 11 - 15개, 3 = 16개 이상) 평균값을 산출하였다.

또한 세포학 검사 결과 세균의 수가 많은 개체에서는 멸균된 면봉으로 시료를 채취한 후 제주대학교 수의과대학 전염병학 교실에 의뢰하여 균배양 및 항생제 감수성 검사를 실시하였다.

Veterinary dermatology에 소개된 외이염 평가 지수(OTIS, Otitis index

score) 측정 방식에 따라 erythema, edema/swelling, exudate, odor, pain 각 항목에 대하여 증상의 경중을 0에서 3으로 평가하였으며(0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe), erosion/ulceration 항목에 대해서는 전체면적 대비 이환된 부위의 면적 백분율에 따라 0에서 3으로 평가하였다(0 = 0 - 25%, 1 = 25 - 50%, 2 = 50 - 75%, 3 = 75 - 100%). 개체의 이도 삼출물 성상에 따라 갈색 귀지성 및 화농성으로 구분하였다.

부작용 평가는 고통, 발적, 부종, 상피탈락, 색소침착 및 출혈 등에 대한 육안적 검사로 실시하였다.

3) 광역학 치료

5-ALA를 광감작제로 사용한 실험군에서는 외이도 및 이개에 Table 3의 방법과 같이 5-ALA solution을 도포하고, 5-ALA가 목표 세포 내에 흡수되어 PpIX로 변환되는 시간동안 암실에서 5시간 정체시켰다. 그 후 635 nm diode laser의 continuous mode를 이용하여 A 개체에 80 mW 출력으로 900초간 72 J의 에너지를 외이도 및 이개에 조사하였고, B, C 개체의 좌측 외이도 및 이개에 200 mW 출력으로 360초간 72 J의 에너지를 조사하였다(Fig 4. B).

MAL을 광감작제로 사용한 실험군에서는 외이도 및 이개에 Table 3의 방법과 같이 MAL cream을 도포하고, MAL이 목표세포 내에 흡수되어 PpIX로 변환되는 시간동안 암실에서 3시간 정체시켰다. 그 후 A 개체에는 635 nm diode laser의 burst pulse mode를 이용하여 250 mW 출력으로 900초간(pulse on : 50 ms, pulse off : 50 ms, duration on : 5 s, duration off : 1 s) 92 J의 에너지를 조사하였고, B, C 개체의 우측 이도 및 이개에는 continuous mode를 이용하여 200 mW 출력으로 360초간 72 J의 에너지를 외이도 및 이개에 조사하였다. A 개체는 5-ALA를 이용한 1차 광역학 치료 48일 후 MAL을 이용하여 2차 광역학 치료를 하였다. Continuous mode와 burst pulse mode의 조사 방식 차이는 Fig 5에 나타내었다.

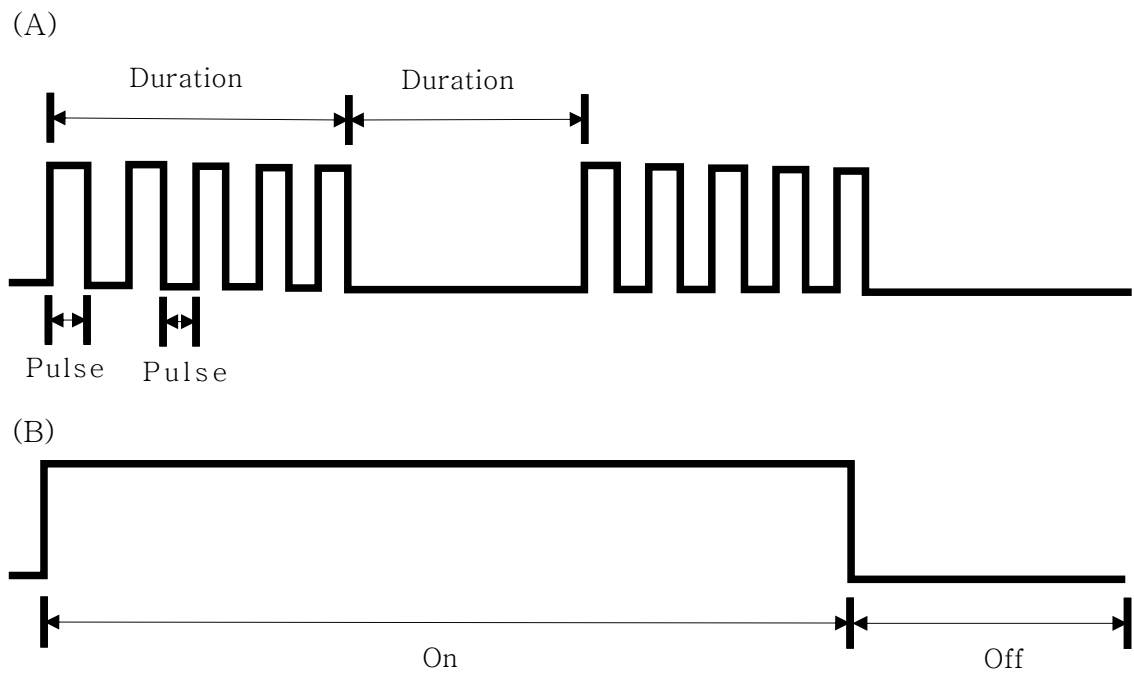


Fig 5. Lighting mode of semiconductor laser diode (A)Burst pulse mode
(B) Continuous mode

CLC를 광감작제로 사용한 실험군에서는 D, E, F 개체의 좌측 이도 및 이개에 Table 3의 조건과 같이 CLC를 도포하고, CLC가 병변부위 내 흡수되는 시간동안 직사광선을 피하여 30분 동안 정채하였다. 그 후 38 mW/cm² 출력의 660 nm LED를 각각 30분, 25분, 20분 간 68.4 J/cm², 57 J/cm², 45.6 J/cm² 씩 외이도 및 이개에 조사하였다. D, E, F 개체의 우측 이도 및 이개는 멸균 식염수로만 세척하였다. 1차 치료 한 달 후 1차 치료와 동일한 방법으로 2차 치료를 하였다.

광역학 치료를 실시한 개체 중 A, B, C 개체는 48시간 동안 직사광선에 대한 노출을 제한시켰고, D, E, F 개체는 2시간동안 직사광선에 대한 노출을 제한시켰다.

4) 세균 집락형성단위(Colony forming unit, CFU) 측정

광역학 치료 전과 치료 일주일 후에 수평 외이도와 수직 외이도의 연접부위에서 멸균 면봉으로 채취한 시료를 멸균 식염수에 2배, 20배, 200배 희석하여 각각 BCP plate counting agar (Eiken chemical, Tokyo, Japan)에 접종 후 37 °C에서 각각 48시간 동안 배양하였다. 여러 희석배수의 plate중 형성된 콜로니의 개수가 30개에서 300개인 희석배수의 plate에서 세균의 집락형성단위를 측정하였다.

Table 3. Parameters used in Photodynamic therapy on the treatment of Canine otitis externa

| Patient | Photosensitizer | Dose of PS | Uptake | Light source | Wavelength | Irradiance | Fluence | Irradiation mode | Frequency |
|---------|-----------------|------------|--------|--------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------|-----------|
| A-ALA | 5-ALA | 12.5 mg/kg | 5 hr | SLD | 635 nm | 160 mW | 72 J | continuous | once |
| B-ALA | 5-ALA | 10 mg/kg | 4 hr | SLD | 635 nm | 200 mW | 72 J | continuous | once |
| C-ALA | 5-ALA | 5 mg/kg | 4 hr | SLD | 635 nm | 200 mW | 72 J | continuous | once |
| A-MAL | MAL | 12.5 mg/kg | 3 hr | SLD | 635 nm | 250 mW | 92 J | burst pulse | once |
| B-MAL | MAL | 10 mg/kg | 3 hr | SLD | 635 nm | 200 mW | 72 J | continuous | once |
| C-MAL | MAL | 5 mg/kg | 3 hr | SLD | 635 nm | 200 mW | 72 J | continuous | once |
| D-CLC | CLC | 3 g | 0.5 hr | LED | 660 nm | 38 mW/cm ² | 68.4 J/cm ² | continuous | twice |
| E-CLC | CLC | 3 g | 0.5 hr | LED | 660 nm | 38 mW/cm ² | 57 J/cm ² | continuous | twice |
| F-CLC | CLC | 3 g | 0.5 hr | LED | 660 nm | 38 mW/cm ² | 45.6 J/cm ² | continuous | twice |
| D-CON | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| E-CON | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| F-CON | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Abbreviations: PS, photosensitizer; 5-ALA, 5-aminoelvulinic acid; MAL, methyl aminolevulinic acid; CLC, Chlorophyll-lipoid complex; SLD, semiconductor laser diode(Laxcell T-3000, Biotics, Korea); LED, light-emitting diode(AMC7150 , Ledparts, Seoul, Korea).

Patient A was treated PDT with 5-ALA and second PDT with MAL a month later. Patient B, C was treated PDT with 5-ALA on left ear and with MAL on right ear. Patient D,E,F was treated PDT with CLC and second PDT with CLC a month later on left ear(D-CLC, E-CLC, F-CLC). Right ear of patient D,E,F was not treated(D-CON, E-CON, F-CON).

Ⅲ. 결 과

1. 생체 외(*In vitro*) 광역학 치료 결과

1) Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*의 집락형성단위 측정결과

5-ALA를 광감작제로 사용한 실험에서 MRSP의 집락형성단위는 광감작제의 농도 의존적으로 그 수가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig 6). 아무것도 처리 하지 않은 군에서는 평균 $1.1(\pm 0.2) \times 10^7/\text{ml}$ 개, 광감작제만 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 군에서는 평균 $7.8(\pm 3.4) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원만 조사한 군에서는 평균 $9.1(\pm 1.4) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 군에서는 평균 $7.6(\pm 0.4) \times 10^6/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다. 광원 및 광감작제 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $3.3(\pm 0.4) \times 10^6/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의한 것으로 나타났고($P < 0.05$), 광원 및 광감작제 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 $3.5(\pm 2.0) \times 10^6/\text{ml}$ 의 집락이 형성 되어 통계학적으로 매우 유의한 것으로 나타났다($P < 0.01$) (Fig 7).

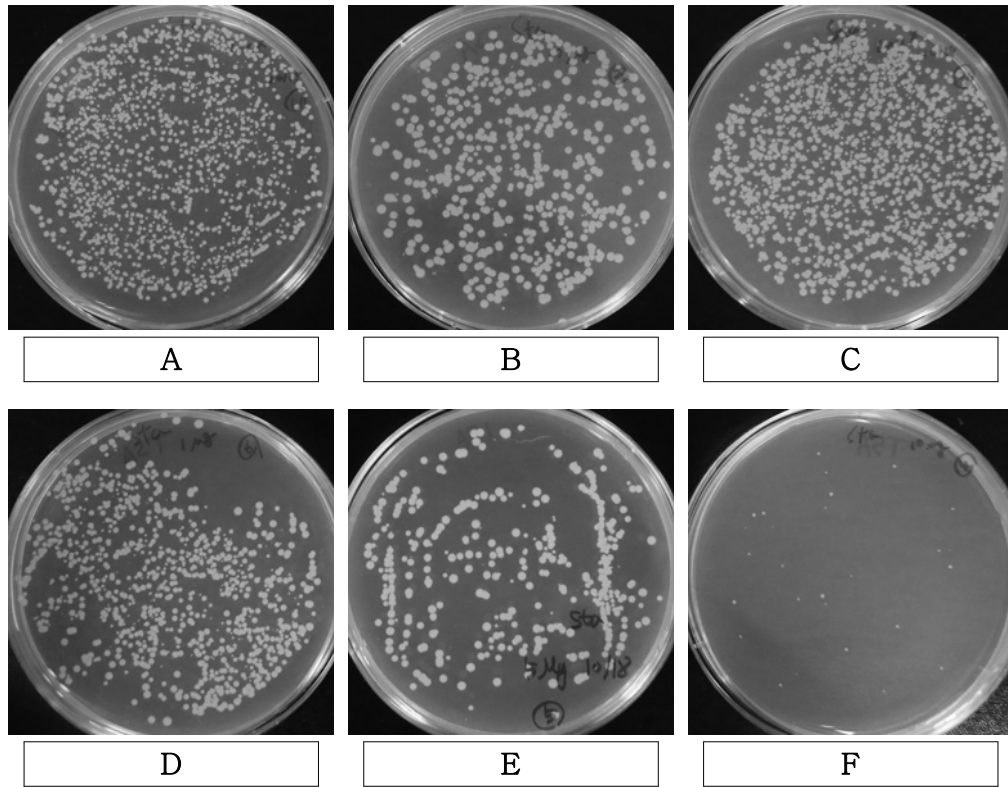


Fig 6. Change in colony forming units of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* on tryptic soy agar after photodynamic therapy using 5-ALA and 635 nm semiconductor laser diode (120 J).

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA)
- C. Light only
- D. Treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light
- E. Treatment with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light
- F. Treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light

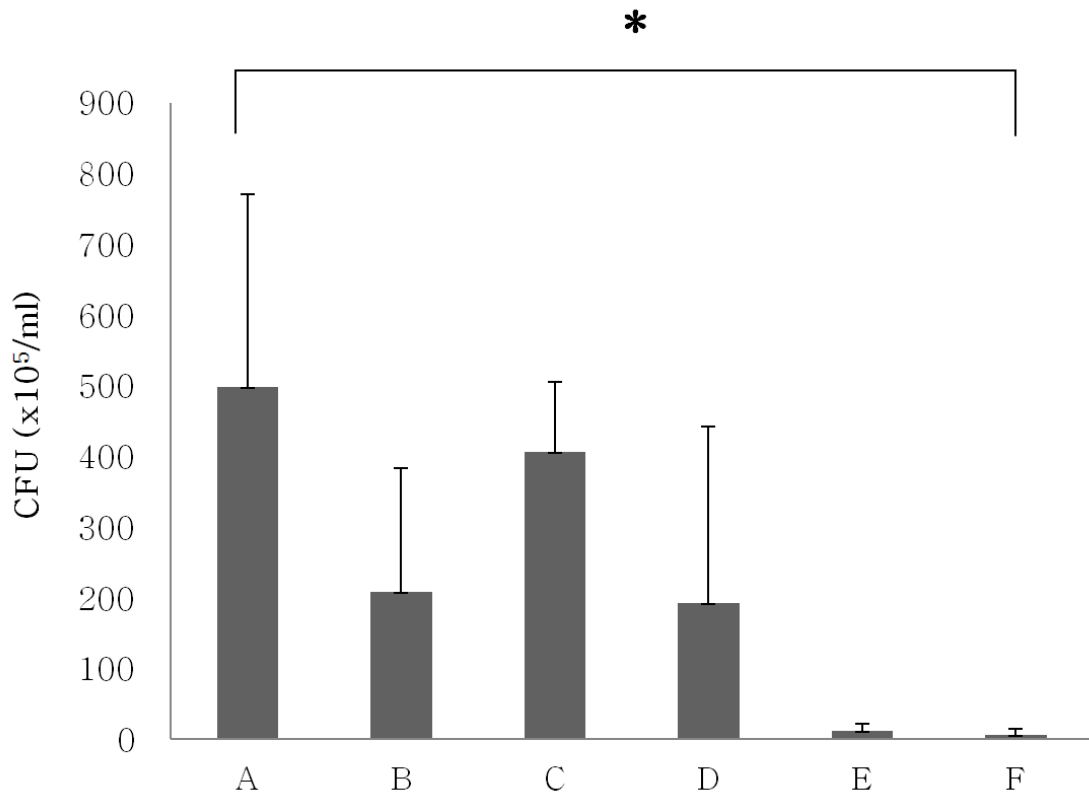


Fig 7. Significance of change in colony forming units of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* on trypsin soy agar after photodynamic therapy using 5-ALA and 635 nm semiconductor laser diode (120 J).

(*; P value < 0.05)

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 $\mu\text{g/ml}$ 5-ALA)
- C. Light only
- D. Treatment with 1 $\mu\text{g/ml}$ 5-ALA plus light
- E. Treatment with 5 $\mu\text{g/ml}$ 5-ALA plus light
- F. Treatment with 10 $\mu\text{g/ml}$ 5-ALA plus light

CLC를 광감작제로 사용한 실험에서 MRSP의 집락형성단위는 광감작제의 농도 의존적으로 그 수가 감소하는 경향을 나타내었고, 광감작제만 첨가한 군에서도 집락형성단위가 감소하였다(Fig 8). 아무것도 처리하지 않은 군에서는 평균 $6.3(\pm 3.1) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원만 조사한 군에서는 평균 $5.4(\pm 1.9) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 군에서는 평균 $6.0(\pm 2.0) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $3.0(\pm 3.4) \times 10^6/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다. 광감작제만 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 첨가한 군에서는 평균 $9.2(\pm 1.4) \times 10^5/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의한 것으로 나타났고($P < 0.05$), 광원 및 광감작제 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 집락이 형성되지 않아 통계학적으로 매우 유의한 것으로 나타났다($P < 0.01$) (Fig 9).

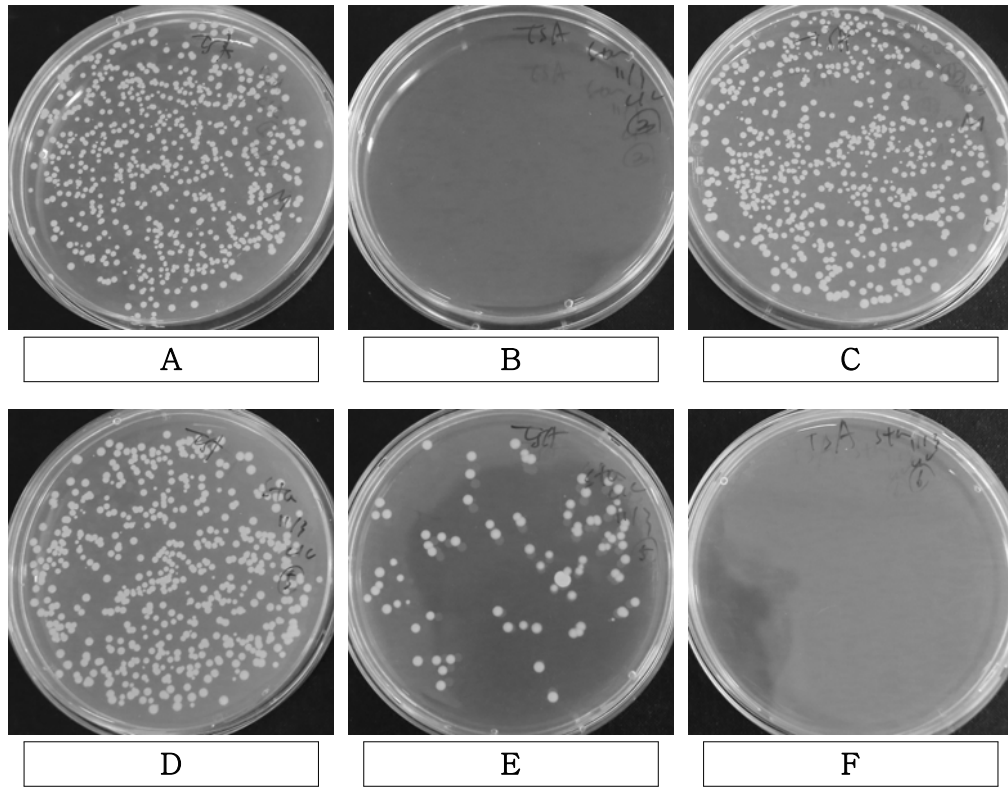


Fig 8. Change in colony forming units of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* on tryptic soy agar after photodynamic therapy using CLC and 660nm light emitting diode (15 J/cm^2).

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 mg/ml CLC)
- C. Light only
- D. Treatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ CLC plus light
- E. Treatment with 1mg/ml CLC plus light
- F. Treatment with 10 mg/ml CLC plus light

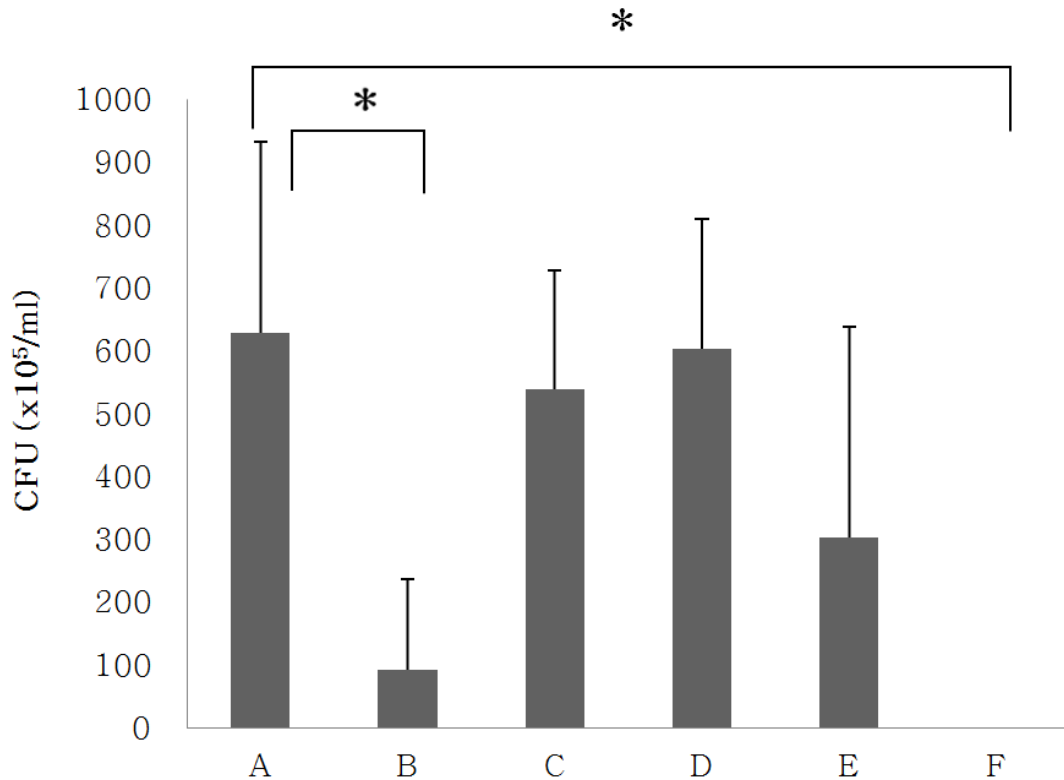


Fig 9. Significance of change in colony forming units of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* on tryptic soy agar after photodynamic therapy using CLC and 660nm light emitting diode (15 J/cm²).

(*; P value < 0.05)

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 mg/ml CLC)
- C. Light only
- D. Treatment with 100 µg/ml CLC plus light
- E. Treatment with 1 mg/ml CLC plus light
- F. Treatment with 10 mg/ml CLC plus light

2) Multidrug-resistant *Acinetobacterium*의 집락형성단위 측정결과

5-ALA를 광감작제로 사용한 실험에서 MRA의 집락형성단위는 광감작제의 농도 의존적으로 그 수가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig 10). 아무것도 처리하지 않은 군에서는 평균 $4.9(\pm 2.7) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광감작제만 첨가한 군에서는 평균 $2.1(\pm 1.8) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원만 조사한 군에서는 평균 $4.1(\pm 1.0) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $1.9(\pm 2.5) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $1.2(\pm 1.1) \times 10^5/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다. 광원 및 광감작제 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $7.3(\pm 7.6) \times 10^4/\text{ml}$ 개의 집락이 형성 되어 통계학적으로 유의한 것으로 나타났다($P < 0.05$) (Fig 11).

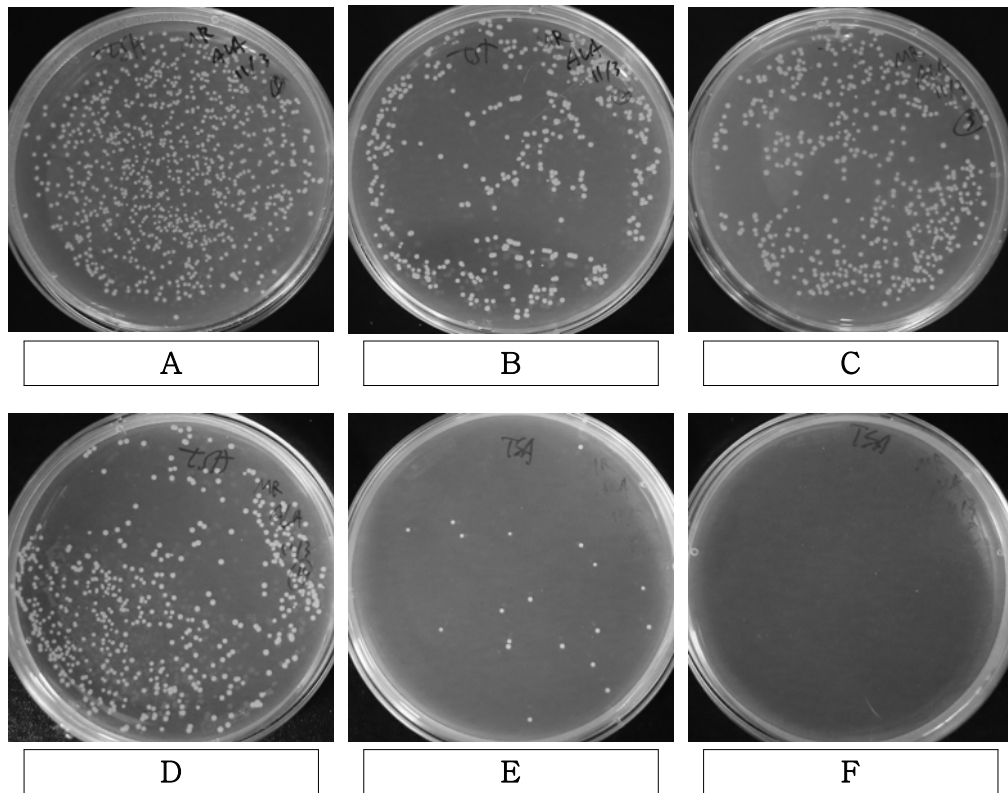


Fig 10. Change in colony forming units of multidrug-resistant *Acinetobacterium* on tryptic soy agar after photodynamic therapy using 5-ALA and 635 nm semiconductor laser diode (120 J).

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA)
- C. Light only
- D. Treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light
- E. Treatment with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light
- F. Treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light

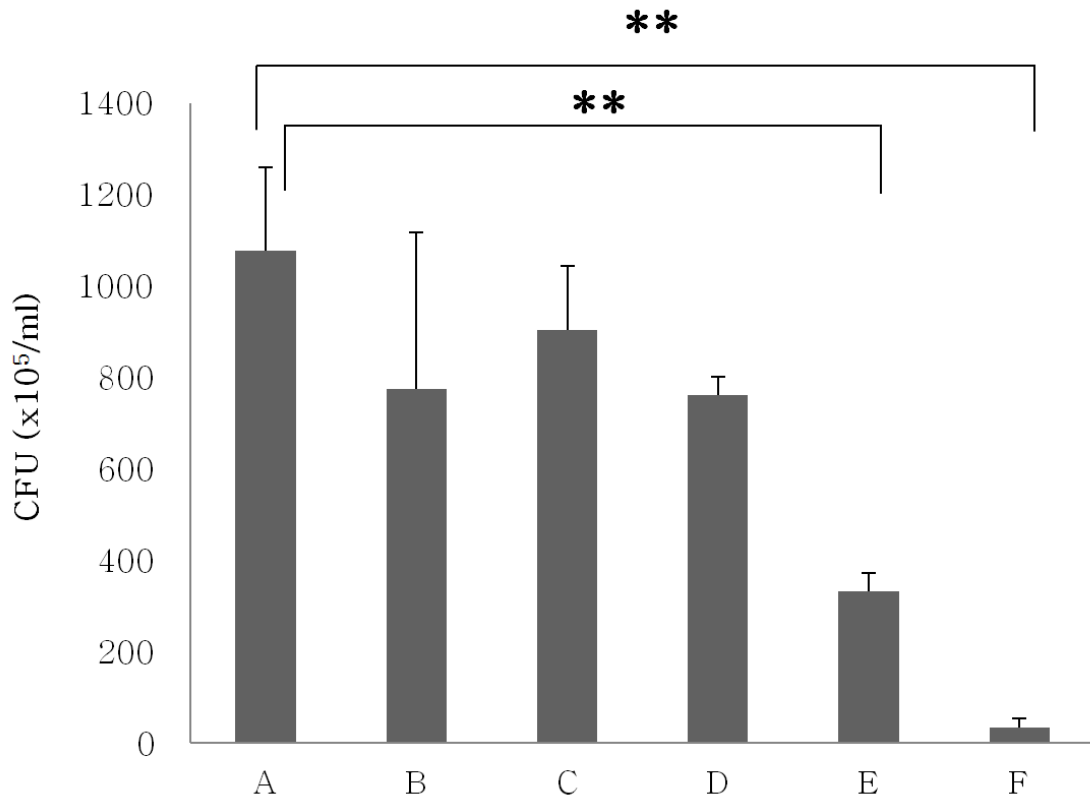


Fig 11. Significance of change in colony forming units of multidrug-resistant *Acinetobacterium* on tryptic soy agar after photodynamic therapy using 5-ALA and 635 nm semiconductor laser diode (120 J).

(**: P value < 0.01)

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 μg/ml 5-ALA)
- C. Light only
- D. Treatment with 1 μg/ml 5-ALA plus light
- E. Treatment with 5 μg/ml 5-ALA plus light
- F. Treatment with 10 μg/ml 5-ALA plus light

CLC를 광감작제로 사용한 실험에서 MRA의 집락형성단위는 광감작제의 농도 의존적으로 그 수가 감소하는 경향을 나타내었고, 광감작제만 첨가한 군에서 도 집락형성단위가 감소하였다(Fig 12). 아무것도 처리 하지 않은 군에서는 평균 $3.0(\pm 0.6) \times 10^7/\text{ml}$ 개, 광원만 조사한 군에서는 평균 $2.0(\pm 0.7) \times 10^7/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다. 광원 및 광감작제 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 군에서는 평균 $1.7(\pm 0.8) \times 10^7/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의한 것으로 나타났고($P < 0.05$), 광감작제만 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 첨가한 군에서는 평균 $1.3(\pm 2.3) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $2.6(\pm 1.9) \times 10^6/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 집락이 형성되지 않아 통계학적으로 매우 유의한 것으로 나타났다($P < 0.01$) (Fig 13).

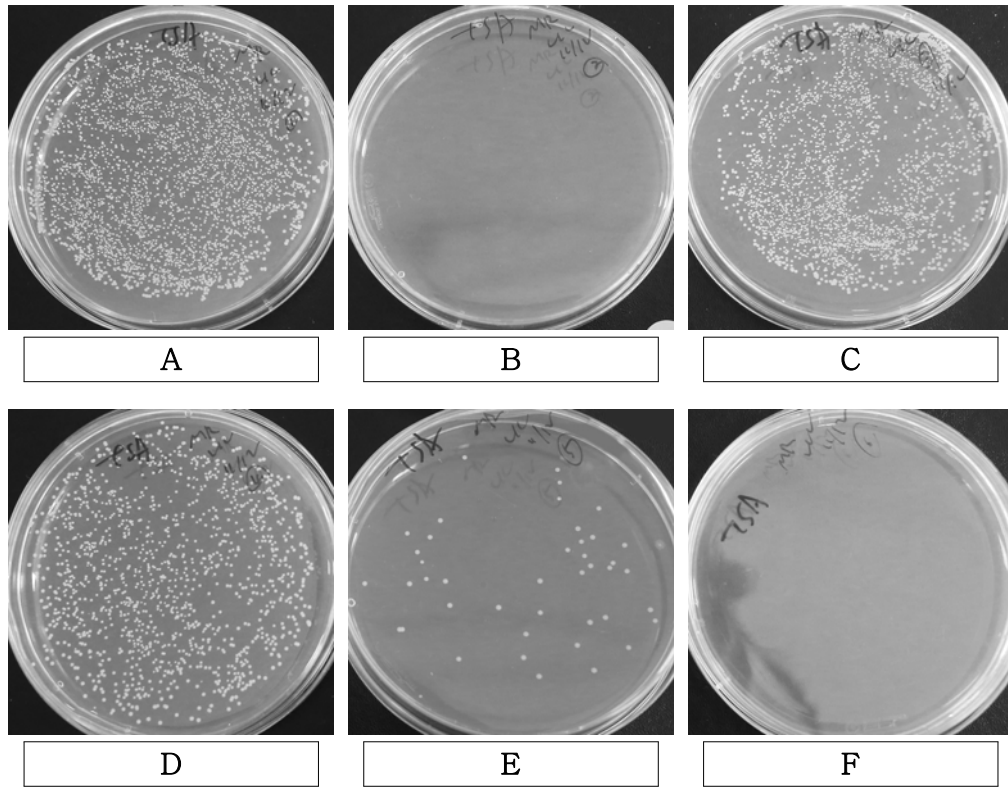


Fig 12. Change in colony forming units of multidrug-resistant *Acinetobacterium* on tryptic soy agar after photodynamic therapy using CLC and 660 nm light emitting diode (15 J/cm^2).

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 mg/ml CLC)
- C. Light only
- D. Treatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ CLC plus light
- E. Treatment with 1 mg/ml CLC plus light
- F. Treatment with 10 mg/ml CLC plus light

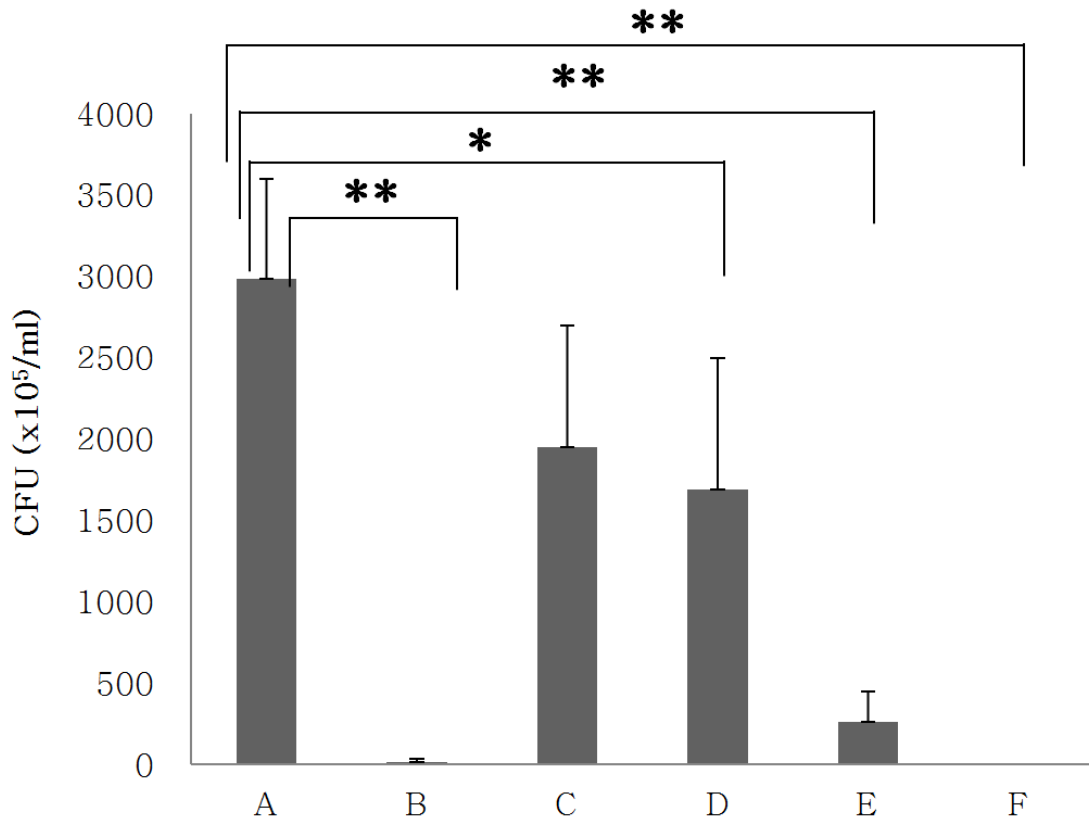


Fig 13. Significance of change in colony forming units of multidrug-resistant *Acinetobacterium* on trypsin soy agar after photodynamic therapy using CLC and 660 nm light emitting diode (15 J/cm²).

(*; P value < 0.05, **; P value < 0.01)

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 mg/ml CLC)
- C. Light only
- D. Treatment with 100 µg/ml CLC plus light
- E. Treatment with 1 mg/ml CLC plus light
- F. Treatment with 10 mg/ml CLC plus light

3) *Malassezia pachydermatis*의 집락형성단위 측정결과

5-ALA를 광감작제로 사용한 실험에서 *Malassezia pachydermatis*의 집락형성단위는 광감작제의 농도 의존적으로 그 수가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig 14). 아무것도 처리하지 않은 군에서는 평균 $5.8(\pm 4.2) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광감작제만 첨가한 군에서는 평균 $5.5(\pm 4.7) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광원만 조사한 군에서는 평균 $5.4(\pm 2.6) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $9.4(\pm 7.8) \times 10^4/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다. 광원 및 광감작제 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $4.8(\pm 5.3) \times 10^4/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 평균 $5.0(\pm 1.2) \times 10^3/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의한 것으로 나타났다($P < 0.05$) (Fig 15).

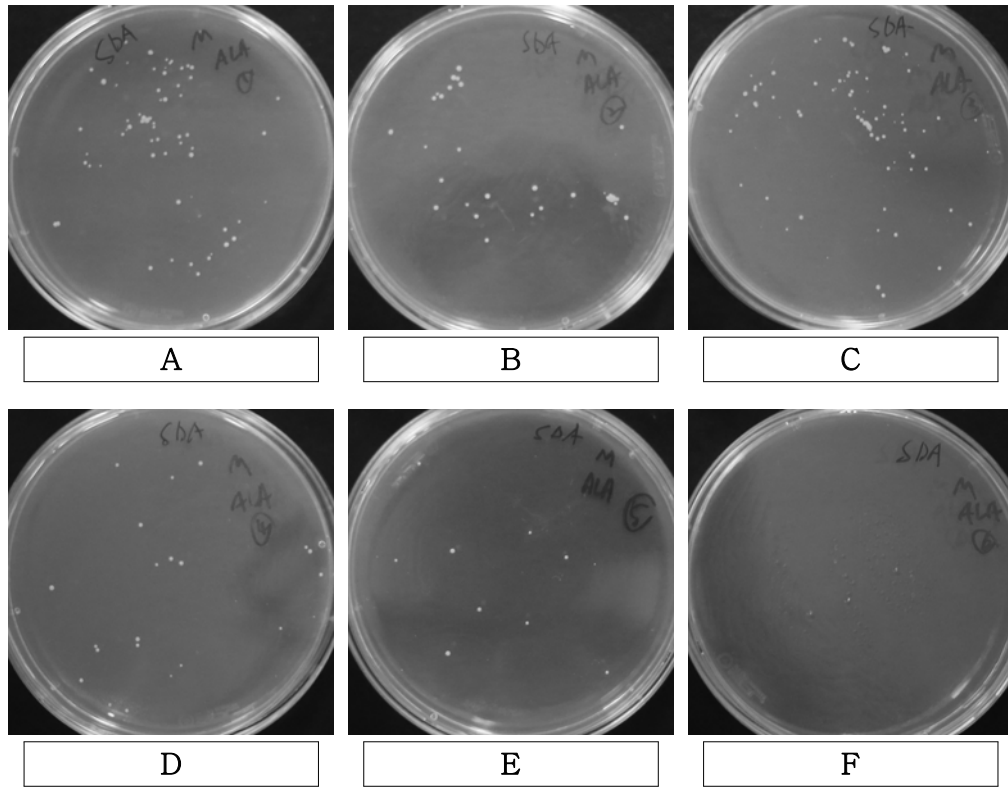


Fig 14. Change in colony forming units of *Malassezia pachydermatis* on sabouraud dextrose agar after photodynamic therapy using 5-ALA and 635 nm semiconductor laser diode (120 J).

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA)
- C. Light only
- D. Treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light
- E. Treatment with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light
- F. Treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-ALA plus light

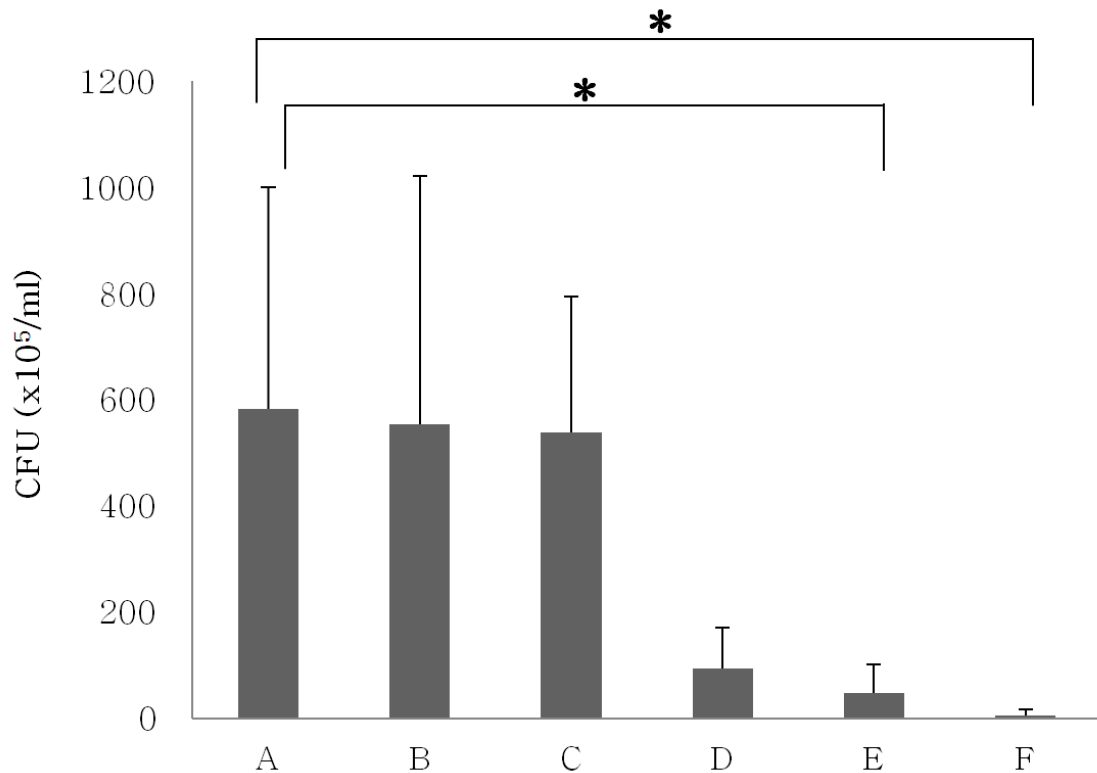


Fig 15. Significance of change in colony forming units of *Malassezia pachydermatis* on sabouraud dextrose agar after photodynamic therapy using 5-ALA and 635 nm semiconductor laser diode (120 J).

(*; P value < 0.05)

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 µg/ml 5-ALA)
- C. Light only
- D. Treatment with 1 µg/ml 5-ALA plus light
- E. Treatment with 5 µg/ml 5-ALA plus light
- F. Treatment with 10 µg/ml 5-ALA plus light

CLC를 광감작제로 사용한 실험에서 *Malassezia pachydermatis*의 집락형성 단위는 광감작제의 농도 의존적으로 그 수가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig 16). 아무것도 처리 하지 않은 군에서는 평균 $1.3(\pm 0.3) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광감작제만 10 mg/ml 첨가한 군에서는 평균 $1.1(\pm 0.3) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광원만 조사한 군에서는 평균 $1.2(\pm 0.2) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 군에서는 평균 $1.6(\pm 0.2) \times 10^5/\text{ml}$ 개, 광원 및 광감작제 1 mg/ml 을 첨가한 군에서는 평균 $1.3(\pm 0.03) \times 10^5/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다. 광원 및 광감작제 10 mg/ml 을 첨가한 군에서는 평균 $1.3(\pm 2.3) \times 10^3/\text{ml}$ 개의 집락이 형성되어 통계학적으로 유의한 것으로 나타났다($P < 0.05$) (Fig 17).

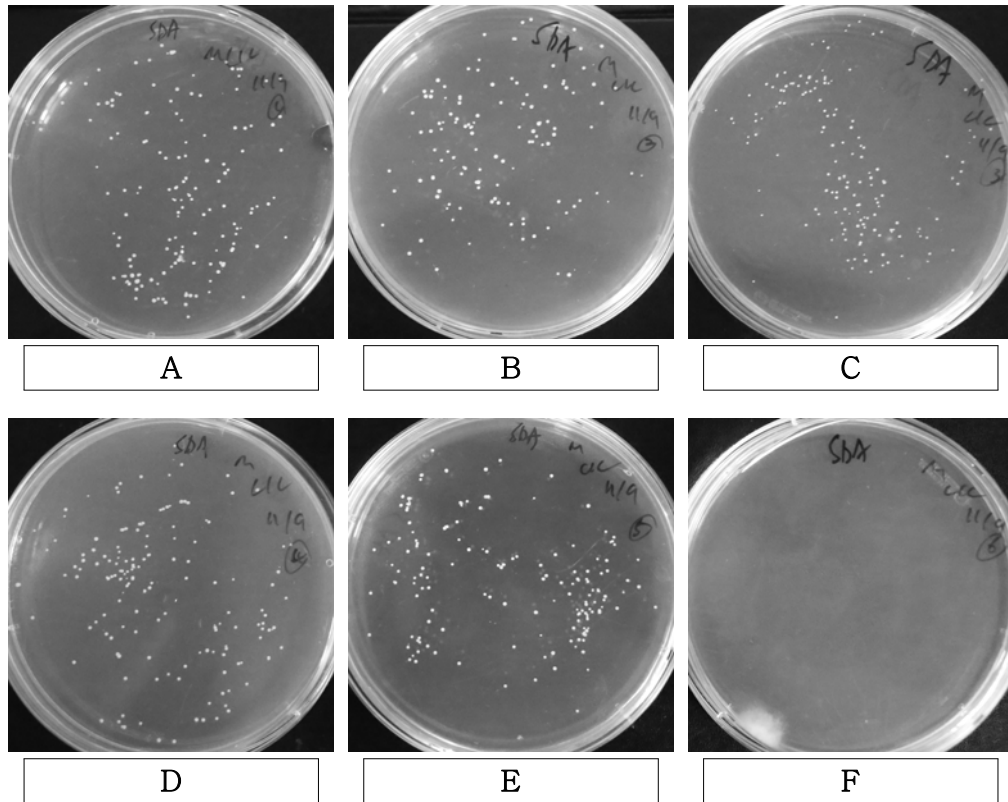


Fig 16. Change in colony forming units of *Malassezia pachydermatis* on sabouraud dextrose agar after photodynamic therapy using CLC and 660 nm light emitting diode (15 J/cm^2).

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 mg/ml CLC)
- C. Light only
- D. Treatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ CLC plus light
- E. Treatment with 1 mg/ml CLC plus light
- F. Treatment with 10 mg/ml CLC plus light

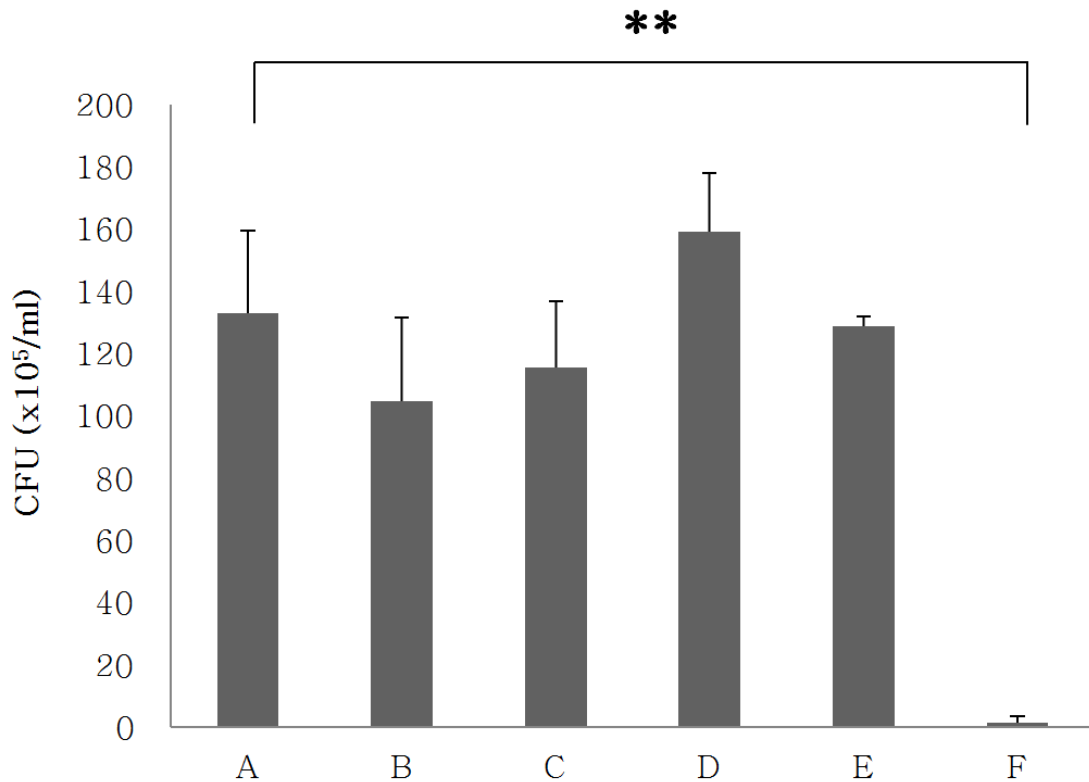


Fig 17. Significance of change in colony forming units of *Malassezia pachydermatis* on sabouraud dextrose agar after photodynamic therapy using CLC and 660 nm light emitting diode (15 J/cm²).

(**: P value < 0.01)

- A. Non treatment
- B. Photosensitizer only (10 mg/ml CLC)
- C. Light only
- D. Treatment with 100 µg/ml CLC plus light
- E. Treatment with 1 mg/ml CLC plus light
- F. Treatment with 10 mg/ml CLC plus light

2. 생체 내(*In vivo*) 광역학 치료 결과의 육안 관찰 및 개체상태 평가

1) 원인균 분리 및 육안 평가

이도에서 채취한 시료의 광학현미경 관찰에 의한 세포학적 검사 결과 A 개체에서는 간균 및 구균이 발견되었다. 제주대학교 수의과대학 전염병학교실에 의뢰한 균주 분리 검사 결과에서는 *Acinetobacter* spp., gram negative *short bacillus*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. 가 분리되었다. 항생제 감수성 검사 결과 *Acinetobacter* spp.의 경우에는 Amoxicillin, Cephalothin, Cefoxitin, Gentamycin, Tobramycin, Ofloxacin, Norfloxacin, Enrofloxacin 등 대부분의 검사 항목에서 항생제 저항성을 나타내어 항생제 다제내성균(Multidrug resistant bacteria)으로 확인되었다. 광역학 치료 직후에 실시한 세포학 검사에서는 거의 어느 시야에서도 세균이 발견되지 않았고, 치료 2주일 후에는 간균 및 구균이 발견되었다. 광역학 치료 후 채취한 시료로 의뢰한 균주 분리 및 항생제 감수성 검사에서는 *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp.가 분리 되었지만 항생제 다제 내성균인 *Acinetobacter* spp.는 검출되지 않았다. B, C, D, E, F 개체에서 채취한 시료에서는 광학현미경 관찰에 의한 세포학적 검사 결과 간균, 구균 및 효모균이 발견 되었으며, 광역학 치료 후 그 수가 감소하는 경향을 보였다(Fig 18, 19).

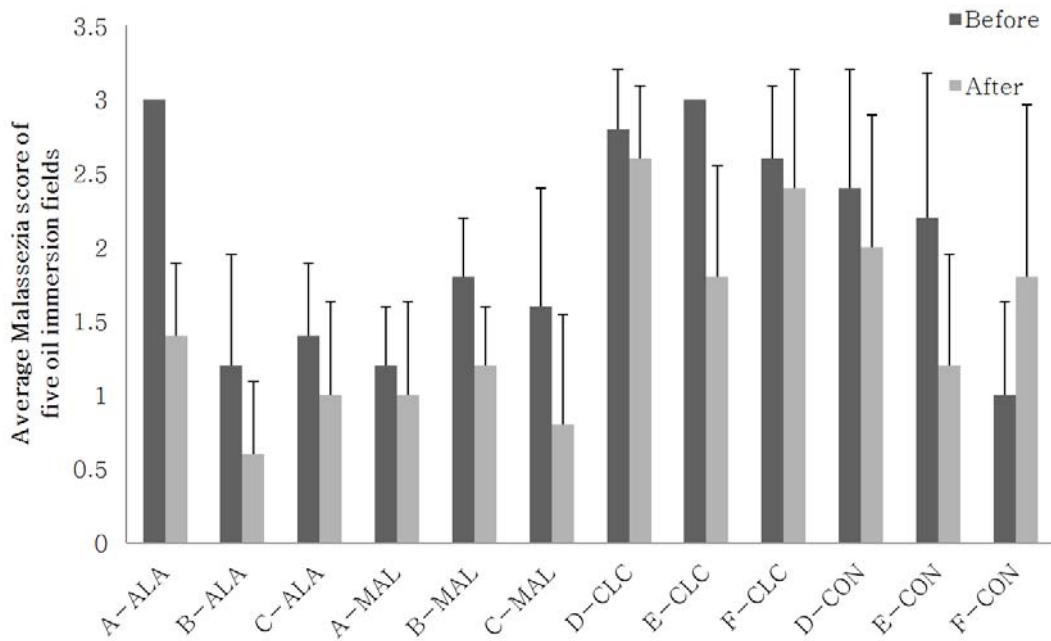


Fig 18. Mean *Malassezia* count score.

Thin smear on a slide glass was made of exudates from junction of vertical and horizontal ear canal and cytology test was performed. *Malassezia* count score (0 = 0 – 5 of *Malassezias* per oil immersion field, 1 = 6 –10 of *Malassezias* per oil immersion field, 2 = 11–15 of *Malassezias* per oil immersion field, 3 = ≥ 16 of *Malassezias* per oil immersion field) was evaluated in five oil immersion fields before PDT and 2 weeks after PDT then mean score was recorded .

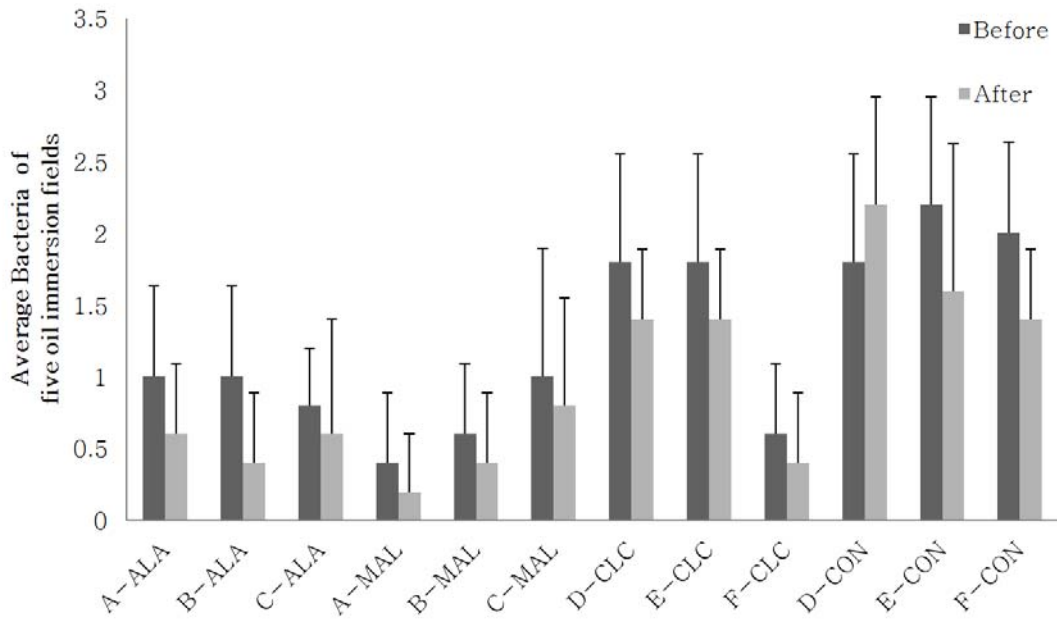


Fig 19. Mean bacteria count score.

Thin smear on a slide glass was made of exudates from junction of vertical and horizontal ear canal and cytology test was performed. Bacteria count score (0 = 0 – 5 of bacterias per oil immersion field, 1 = 6 –10 of bacterias per oil immersion field, 2 = 11–15 of bacterias per oil immersion field, 3 = ≥ 16 of bacterias per oil immersion field) was evaluated in five oil immersion fields before PDT and 2 weeks after PDT then mean score was recorded .

광역학 치료 전과 치료 후의 외이도염 평가지수(OTIS)를 평가한 후 각 항목의 점수를 합하여 Fig 20에 나타내었다. 치료 전과 비교 시 치료 후의 외이도염 평가지수는 감소하는 경향을 나타내었다.

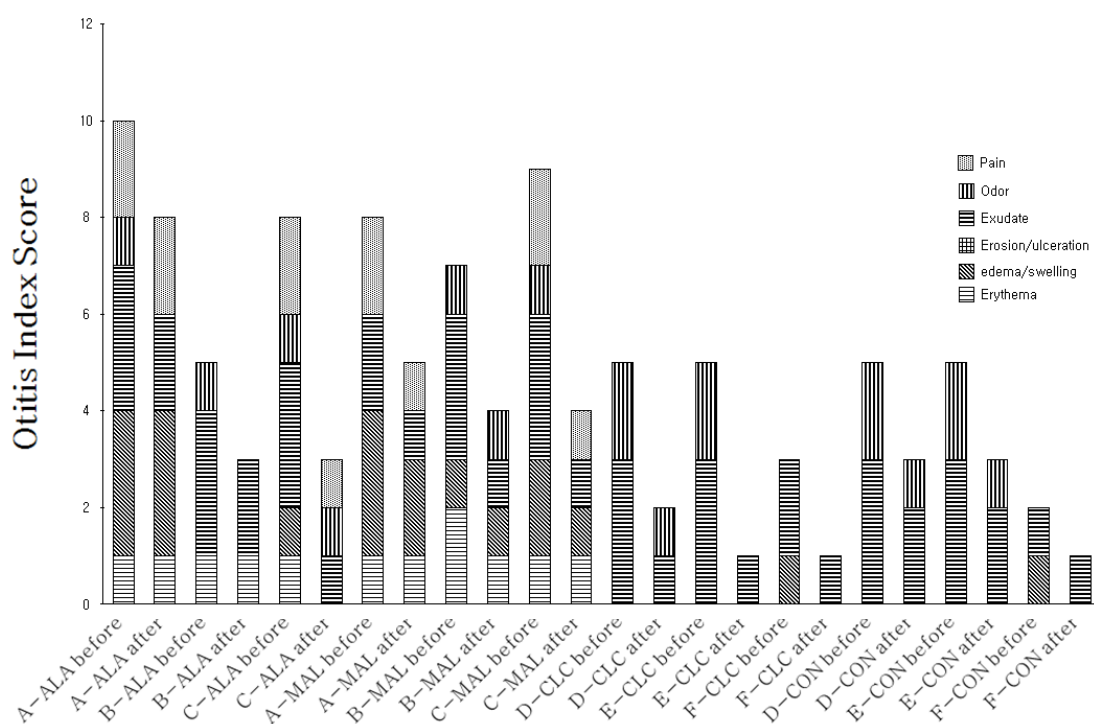


Fig 20. Otitis index score (OTIS)

All dogs were evaluated OTIS (0 to 3) assessment in erythema, edema/swelling, exudate, odor, pain (0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe), erosion/ulceration (0 = 0~25% of assessed surface area affected, 1 = 25~50% of assessed surface area affected, 2 = 50~75% of assessed surface area affected, 3 = 75~100% of assessed surface area affected) before and after photodynamic therapy and total score was summed up in each parameters.

A 개체는 3년간 만성 외이도염의 지속된 치료와 재발로 인하여 이도 및 이개에 테션화가 진행된 상태였고, 부종이 심하여 수직이도가 완전히 협착되어 있으며 촉진시 상당한 정도로 경화되어 있었다. 이도 및 이개에는 화농성 분비물이 배출되고 있었다. 경미한 발적이 있었으며 환부 촉진 시 상당한 고통을 호소하였다. ALA를 이용한 1차 치료 직후부터 일주일까지는 다량의 화농성 분비물이 분비 되었고 한 달 후에는 화농성 분비물이 거의 분비되지 않았으나 발적, 부종의 정도는 크게 호전되지 않았다. MAL을 이용한 2차 치료 한 달 후에는 이도의 협착이 상당히 완화되었고, 화농성 분비물도 거의 배출되지 않았다. A 개체는 5-ALA를 이용한 1차 치료와는 달리 MAL을 이용한 2차 치료 후에는 각질층이 일부분 박리되었고, 치료 2주 후에는 회복되었다. MAL을 이용한 치료 후에는 경도의 색소침착이 발생하였고 출혈은 관찰되지 않았다.

B 개체는 갈색의 귀지가 다량 관찰되었고, 약간의 악취가 났으며, 경도의 발적, 부종이 관찰되었다. 궤양은 관찰되지 않았다. 치료 한 달 후 ALA를 이용해 치료한 좌측 이도 및 MAL을 이용한 우측 이도에서 분비물의 분비량이 줄어들었고 우측 이개 및 이도에서 분비물 감소량이 더 많았다.

C 개체는 이도 및 이개에 경도의 부종이 있었으며, 갈색의 귀지가 다량 관찰되었고, 약간의 악취가 났다. 궤양은 관찰되지 않았으며 촉진 시 중증도의 고통을 호소하였다. 치료 한 달 후 ALA를 이용해 치료한 좌측 이도 및 MAL을 이용한 우측 이도에서 분비물의 분비량이 줄어들고 발적이 완화되었으며 부종 또한 완화되었다.

5-ALA와 MAL을 사용하여 광역학 치료를 실시한 A, B, C 개체는 치료 도중 고통을 호소하여 진정제를 투여한 후 치료를 하였다. 치료 직후에는 발적과 부종이 관찰되었으며 뒷발을 이용하여 귀를 계속 긁는 모습을 보여 칼라를 씌어 주었고, 치료 일주일 후에는 발적 및 부종이 많이 줄어들었으며 4주 후에는 완전히 사라졌다.

D 개체는 갈색의 귀지가 다량 관찰되었고, 약간의 악취가 났으며 발적, 부종, 궤양은 관찰되지 않았다. 치료 한 달 후 갈색 분비물의 양 및 악취가 줄어들었다.

E 개체는 이도 및 이개에 경도의 부종이 있었으며, 갈색의 분비물이 다량 관

찰되었고, 약간의 악취가 났다. 발적, 궤양은 관찰되지 않았으며 치료 한 달 후 분비물의 양이 감소하였다.

F 개체는 갈색의 분비물이 관찰되었고, 경미한 부종이 관찰되었다. 발적, 궤양은 관찰되지 않았으며 치료 한 달 후 분비물의 양이 감소하였다.

D, E, F 개체는 세척만 실시한 우측 이도 및 이개에서 분비물의 양이 변함없거나 줄어들었으나 그 차이가 광역학 치료를 한 좌측 이도 및 이개에서의 분비물 감소량보다는 적었다.

CLC를 사용하여 광역학 치료를 실시한 D, E, F 개체는 치료 도중 고통을 호소하지 않았고, 치료 후 경미한 발적이 있었으나 3시간 후에는 회복되었다. 부종 및 상피탈락, 색소침착, 출혈은 관찰되지 않았다.

2) 세균 집락형성단위 측정

CLC를 이용하여 치료한 F 개체를 제외한 모든 개체에서 치료 전 측정된 집락형성단위 대비 치료 후 측정된 집락형성단위가 감소하는 경향을 나타내었다(Fig 21).

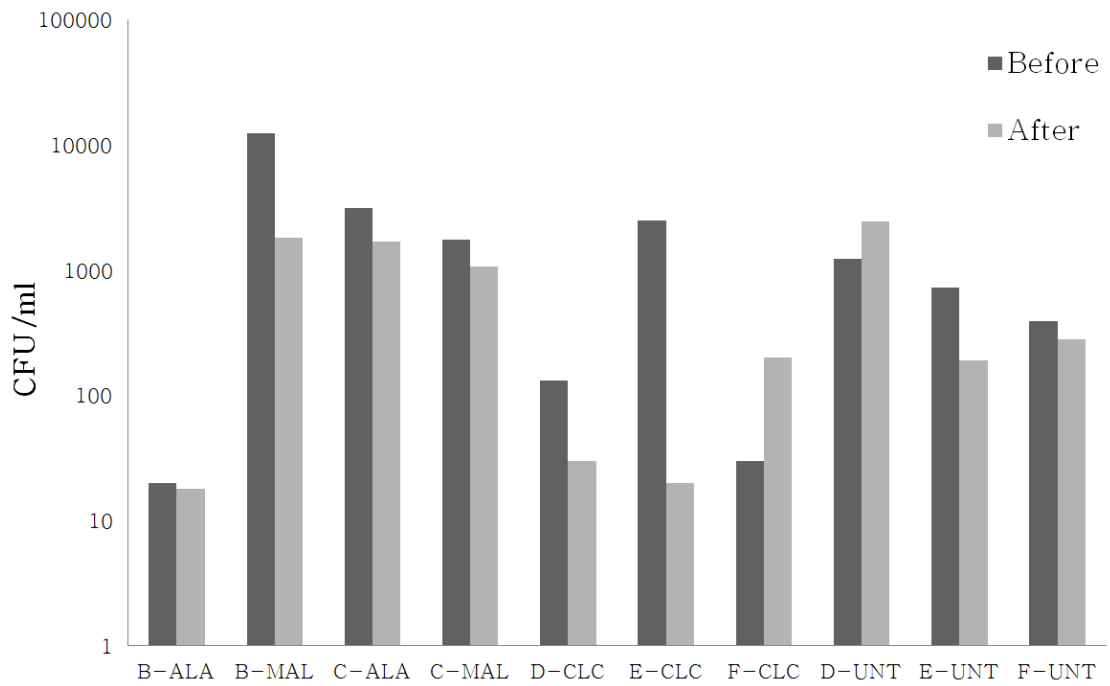


Fig 21. Colony forming units count after photodynamic therapy for 5 dogs with 5-ALA, MAL and CLC.

Specimen from junction of vertical and horizontal ear canal were culture and CFU was measured.

IV. 고 찰

1900년대 초반에 개발된 광역학 치료는 미생물의 비활성화에 대하여 그 효과를 입증하였다. 1928년 Alexander Fleming에 의하여 페니실린이라는 획기적인 항생제가 발견된 후 인류는 세균감염을 정복한 듯하였으나, 항생제를 사용함에 따라 이에 대한 항생제 내성 또한 급격히 발달하여 1950년대에는 60% 이상의 포도상구균이 페니실린에 내성을 가지게 되는 결과를 가져 왔다. 1960년대에 이를 치료하기 위한 methicillin이 개발되었으나 1961년도에 methicillin에 내성을 가지는 포도상구균(MRSA)이 등장하였고, 이를 치료하기 위한 vancomycin이 개발되었지만 2002년도에 vancomycin에 내성을 가지는 포도상구균(VRSA)이 등장하였다. 최근에는 여러 항생제에 내성을 가지는 MRAB (Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*)까지 등장한 상태이다(28). 2007년 한 연구에 의하면 외이염에 이환된 개에서 분리된 그람 음성 간균을 대상으로 검사한 결과 68.4%가 methicillin에 내성을 가지고 있고 89.5%가 oxacillin 및 teicoplanin에 약제내성을 보인다고 보고하였다(29). MRSP는 특히 개와 고양이에서 문제가 되고 있는 항생제 내성 구균으로 2006년부터 대두되기 시작했고, 2010년 우리나라에서 보고된 바에 따르면 외이도염 및 농피증을 앓는 개에서 분리된 *Staphylococcus pseudintermedius* 중 33.8%에서 methicillin내성에 대한 유전자지표(genetic marker)인 *mec A*가 발견되었다고 보고되었을 정도로 이미 미생물의 항생제내성은 동물과도 관련이 깊은 문제이다(30, 31). 본 연구의 대상동물 중 한 마리에서도 여러 항생제에 내성을 가지는 간균인 *Acinetobacterium*이 분리되었다.

광역학 치료는 항생제 내성문제에 대한 대안으로서 재조명 받게 되었고, 1999년 5-ALA가 미국 FDA에서 피부암에 대한 승인을 얻으며 새로운 전기를 마련하여 종양 및 세균, 진균, 바이러스 등의 치료분야에서 두각을 나타내고 있다. 광역학 치료는 항생제 내성의 대표적인 세균인 MRSA에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(32). 본 연구의 생체 외 광역학 치료 결과 광역학 치료는 MRSP 및 MRA에 살균효과가 있는 것으로 밝혀졌고, 생체 외 광역학 치료에서도 효과가

있는 것으로 나타났다. 특히 개에서 문제시 되는 항생제 내성균 중 가장 높은 비율로 발생하는 MRSP의 광역학 치료에 대한 연구가 전 세계적으로 드문 가운데 본 연구 결과는 의의가 있다고 생각된다. 따라서 광역학 치료는 항생제 내성균 감염으로 인해 약물요법의 효과가 좋지 않은 개체에 대한 좋은 치료방법이 될 수 있을 것이다.

*Malassezia pachydermatis*는 외이도염의 원인균 중 *Staphylococcus intermedius* (58.8%)에 이어 두 번째로 높은 비중(30.9%)을 차지하는 진균이고 외이도염으로 진단된 개의 70%에서 *Malassezia pachydermatis*가 분리될 정도로 개의 외이도염과 관계되는 가장 흔한 진균이다(10, 29). *Malassezia pachydermatis*는 정상 피부에 상재하는 균으로 건강한 개의 이도에서도 발견되지만 숙주의 면역이 떨어지게 되면 병원성을 띄게 된다(3). 이의 치료를 위해서azole류 항진균제(fluconazole, itraconazole 등) 및 amphotericin B 등이 다양한 제제로서 사용된다. 하지만 반복적인 항진균제 및 면역억제제의 사용으로 인한 진균의 항진균제에 대한 내성 증가 및 신장독성, 신경독성 같은 항진균제에 대한 부작용 등의 이유로 항진균 요법은 종종 효과적이지 못한 경우가 있다(33, 34). 본 연구에서 광역학 치료는 생체 내 및 생체 외 시험에서 *Malassezia pachydermatis*를 효과적으로 사멸시키는 것으로 나타났고, 항진균제의 내성문제 및 부작용에 대한 대안이 될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구 결과에서 A개체에 대한 MAL을 이용한 광역학 치료가 5-ALA를 이용한 광역학 치료 대비 효과가 더 좋았는데 이는 MAL의 높은 침투성에 의한 결과라 여겨진다. 5-ALA는 친수성 분자로서 세포막 및 간질세포로의 침투력에 한계를 가지는 반면 MAL은 5-ALA를 ester화 시킨 물질로서 친유성이 증가되어 보다 높은 세포 침투성과 목표세포 특이성을 가진다(21). 특히 A개체는 이도 및 이개가 비후되어 있는 상태이어서 광감작제의 침투력의 차이가 치료효과의 차이에 주는 영향이 더 컸으리라 사료된다. 발적, 각질 박리 등의 부작용은 MAL을 이용한 광역학 치료에서 더 많이 나타났으나, 개체가 호소하는 고통에 있어서는 기존에 보고된 바와 같이 5-ALA를 이용한 치료 보다 MAL을 이용한 치료 시에 더 적은 고통을 호소하였다(35).

광역학 치료가 세균을 사멸시키는 원리는 활성산소 및 단일항 산소 생성에 의

한 세균 내 지질, 단백질, DNA의 손상이다(36). 미토콘드리아 및 세포막 단백질의 손상은 ATP 합성효소 및 전자전달계에 손상을 입혀 ATP 생산을 감소시키며, 세포막 지질의 손상은 cytochrome C나 칼슘이 유리시켜 세포자멸사(apoptosis)가 유발된다(36). 광역학 반응에 의해 DNA의 구조가 변화되면 프로그래밍된 세포기전이 세포의 괴사(necrosis)나 세포자멸사(apoptosis)를 유발시킬 수 있다(36-39). 한편 사람의 정상조직 세포 또한 영향을 받을 수 있으나, 정상 조직세포가 손상되는 수준의 광량 및 광감작제의 용량과 세균 및 진균이 사멸되는 수준의 광량 및 광감작제의 용량 사이에는 안전역이 넓어(wide safety margin) 세균과 진균이 사멸되는 조건하의 광역학 치료에서도 정상세포는 영향이 적고, 설사 영향이 있더라도 빠르게 회복되는 것으로 알려져 있다(40). 그 이유는 사람의 정상조직세포의 크기는 세균의 크기에 비해 25에서 50 배 이상 크고, 정상조직세포의 핵에 존재하는 핵막이 또 하나의 장벽으로 작용하여 세포의 괴사를 초래하기 위해서는 미생물의 사멸에 필요한 에너지보다 훨씬 많은 에너지가 필요하기 때문이다. 이는 정상세포가 아닌 미생물만을 선택적으로 치료할 수 있게 한다(40, 41). 최근 연구된 바에 따르면 광감작제와 특정 미생물에 대한 항체를 결합하는 기술도 개발되었는데 이를 이용하면 정상조직의 손상 없이 세균만 선택적으로 사멸시킬 수 있다(42).

한편, 광역학 치료 시 광원을 과다 조사하여 열 효과(thermal effect)가 일어난다면 수포생성, 궤양형성, 피부괴사 같은 부작용이 생길 수 있다고 보고되어 있다(43, 44). 본 연구에서는 이와 같은 부작용은 관찰할 수 없었지만, 92 J광량의 SLD와 MAL 12.5 mg/kg를 사용한 A 개체에서 각질이 박리되는 모습을 관찰할 수 있었다. CLC와 LED를 이용한 광역학 치료에서는 눈에 띄는 부작용을 관찰할 수 없었다. 5-ALA 및 MAL과 SLD를 이용한 광역학 치료 과정에서는 광원 조사 시 개체가 고통을 호소하여 진정제를 투여한 후 치료를 하였다. A 개체의 5-ALA를 이용한 첫 번째 광역학 치료 후 경미한 발적을 관찰할 수 있었는데 이는 시술 이주일 후에는 완전히 회복되었다. A 개체의 두 번째 시술에서는 조직의 열손상(thermal damage)을 최소화하기 위해 연속 방사 모드(continuous wave)가 아닌 버스트 펄스 모드(burst pulse mode)를 이용하여 시술하였다. 연속 조사 모드는 설정된 시간 동안 일정한 출력의 빛을 연속하여

조사하는 방식이고 버스트 펄스 모드는 일정시간 동안 on과 off를 반복하는 on duty period와 off를 계속 유지하는 off duty period를 설정된 조사시간 동안 반복하는 방식이다(Fig 5). 버스트 펄스 모드로 빛을 조사하는 경우 시술 사이에 냉각시간을 두어 과도한 광 에너지 축적으로 인한 조직의 열 손상을 방지 할 뿐만 아니라 조직 내에 산소가 공급되는 시간을 확보하여 광역학 효과로 인한 조직 내 산소 고갈로 활성산소의 생성률이 떨어지는 것을 방지할 수 있다(45). 따라서 광역학 치료 시 부작용을 막기 위해서는 미생물은 사멸되지만 정상세포에는 위해가 되지 않는 적절한 광량을 설정하여야 하고, 조사모드는 연속조사모드 보다는 버스트 펄스 모드를 사용하는 것이 바람직 할 것이다.

5-ALA, MAL, CLC는 각각 400nm 파장대의 푸른빛과 600nm파장대의 붉은 빛에서 최대의 흡광도를 가지는데 400nm파장대의 빛에서 흡광도가 더 높다. 그러나 빛의 파장이 작아질수록 피부 투과도가 낮아져 피부 깊은 층까지 빛이 충분히 이르지 못하는 단점이 있어 600nm파장대의 빛이 흡광도가 더 낮음에도 본 연구에서는 600nm 파장대의 붉은 빛을 사용하였다(16, 46).

MRSP 및 MRA에 대한 CLC를 이용한 생체 외 광역학 치료 결과 중 광감작제만 투여하고 광원은 적용하지 않은 실험군에서 집락형성단위가 감소한 결과가 나왔는데 이는 CLC의 기체에 포함되어 있는 에탄올이 영향을 끼쳤을 것이라 사료된다. 그러나 에탄올의 *Malassezia pachydermatis*에 대한 살균효과는 유의하지 않다고 보고되어 있고, 본 연구 결과에서도 광감작제만 투여하고 광원은 적용하지 않은 실험군의 집락형성단위가 대조군과 유의적 차이가 없는 것으로 보아 *Malassezia pachydermatis*에 대한 생체 외 광역학 치료에서 광원 및 광감작제를 함께 적용한 군에서 집락형성단위가 감소한 결과는 유의하다고 할 수 있을 것이다(26, 27).

일부 개체의 CLC를 이용한 광역학 치료에서 치료 후의 집락형성단위가 치료 전의 집락형성단위보다 많은 것으로 나타났는데, 육안소견으로는 외이도염 증상이 완화된 것으로 미루어 보아 이는 이도에서의 시료채취 방법이 일정하지 않았던 것이 이유로 생각된다.

ALA 및 MAL을 적용한 개체는 중증의 외이도염을 앓고 있었고 CLC를 이용한 개체는 그보다는 경증의 이도염을 앓고 있었으므로 그 치료 효과에 대한

ALA, MAL 및 CLC간의 비교는 한계점이 있다고 본다. 향후 연구에서는 비슷한 정도의 외이도염을 가진 개체를 대상으로 치료하고 치료개체의 수 또한 증가시켜야 할 것으로 생각된다.

이번 연구에서 CLC와 함께 사용한 광원으로서 LED의 한계는 이도 깊숙이 균질한 빛을 공급해 주지 못한다는 점과 광량을 정밀하게 조절하지 못한다는 점이다. 본 연구에서 사용한 semiconductor laser diode 기기는 광원의 출력, 조사 시간, 조사간격을 조정 할 수 있고 광섬유를 이용하여 조사 부위를 특정할 수 있지만 광원의 파장이 635nm이기 때문에 ALA 및 MAL과 달리 660nm에서 활성화 되는 CLC에는 사용하지 못하여 LED를 제작하여 사용하였다. 따라서 조사대상과 LED간의 거리를 조정하여 출력을 조절하였는데, 향후 연구에서는 660nm 파장의 광원을 조사하는 정밀기기를 사용하면 더욱 의미 있는 결과를 도출 할 수 있을 것이라 생각된다.

반려동물에 광역학 치료를 적용한 연구는 세계적으로 드물고, 특히 MAL 및 CLC를 이용한 연구는 저자가 아는 한 거의 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 생체를 대상으로 한 광역학 치료시 광감작제의 최소 유효량 또한 정립되지 않은 상태이다. 본 연구에서 ALA 및 MAL은 SLD를 사용한 72 J의 광량 하에 5 mg/kg 용량에서 치료효과를 보였고, 12.5 mg/kg 용량에서 발적 이외에 부작용을 보이지 않았으므로 5 mg/kg 에서 12.5 mg/kg 용량은 정상조직에 손상을 끼치지 않고 미생물만을 사멸시키는 용량으로 사료된다. CLC의 경우 LED를 사용한 68.4 J/cm²의 광량 하에서 상업제품의 1회 포장용량인 3g의 CLC를 사용하였을 경우 정상조직에는 영향을 끼치지 않고 미생물만을 사멸시키는 것으로 나타났다. CLC의 경우 ALA 및 MAL와 동등한 살균효과를 내기 위해서는 더 많은 용량의 광감작제 및 광량을 필요로 했다. 이는 CLC의 생체 외 적용시 광감작제의 용량과 광량 및 치료 빈도를 결정하는데 참고가 될 수 있을 것이다. 한편 1회 치료 시 필요한 CLC의 가격은 5-ALA 및 MAL의 2~10% 밖에 되지 않아 비용대비 효율에 대한 장점이 있다고 할 수 있을 것이다.

V. 결 론

광감작제 5-ALA, MAL, CLC를 이용한 생체 외 및 생체 내 광역학 치료를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 광역학 치료는 생체 외 실험에서 개에서 문제시 되는 항생제 내성균 중 가장 높은 비율로 발생하는 methicillin-resistant *Staphylococcus psedintermedius* 및 다제항생제 내성균인 multidrug-resistant *Acinetobacterium*에 대해 살균효과를 나타내었다.
2. 광역학 치료는 생체 외 실험에서 개의 외이도염과 가장 관계 깊은 진균인 *Malassezia pachydermatis*에 대해서도 살균효과를 나타내었다.
3. Semiconductor laser diode 72 J 광원을 이용한 개의 외이도염 광역학 치료시 효과를 보이는 ALA 및 MAL의 최소 용량은 5 mg/kg이었으며, 12.5 mg/kg의 용량 적용시 수포생성, 궤양형성, 피부괴사 등의 광독성 현상에 의한 부작용을 나타내지 않았다.
4. Light emitting diode 와 CLC 3 g을 이용한 개의 외이도염 광역학 치료시 효과를 보이는 최소 광량은 45.6 J/cm²이었으며, 68.4 J/cm²의 광량 적용시 수포생성, 궤양형성, 피부괴사 등의 광독성 현상에 의한 부작용을 나타내지 않았다.

이상의 결과에서 광역학 치료는 기존 항생제 및 항진균제의 억제내성을 보이는 재발성 개 외이도염 환자 치료에 효과적인 방법이라 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Angus JC. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34:411-24.
2. Rosser EJ, Jr. Causes of otitis externa. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34:459-68.
3. MaryAnn G, Radlinsky. Diane, E, Mason. Diseases of the ear. In: Ettinger SJ FE, editor. *Textbook of veterinary internal medicine.* Philadelphia: Saunders; 2010. p. 1015-24.
4. Griffin C. Otitis externa and otitis media. In: Griffin C, editor. *Current veterinary dermatology.* St Louis: Mosby; 1998. p. 245-62.
5. Rosser EJ, Jr. Diagnosis of food allergy in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;203:259-62.
6. Stout-Graham M, Kainer RA, Whalen LR, Macy DW. Morphologic measurements of the external horizontal ear canal of dogs. *Am J Vet Res.* 1990;51:990-4.
7. Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med Mycol.* 2002;40:115-21.

8. Nardoni S, Mancianti F, Rum A, Corazza M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. *J Feline Med Surg.* 2005;7:141-5.
9. Morris DO. Medical therapy of otitis externa and otitis media. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34:541-55, vii-viii.
10. Kang Dj, Chung Bh, Kang Cb. Drug sensitivities to fungi and bacteria from otitis externa in dogs. *Journal of Agriculture&Life Sciece.* 2007;41:11-5.
11. Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Vet Dermatol.* 2007;18:341-7.
12. Von Tappeiner H, Jodblauer A. Uber die wirkung der photodynamischen (fluorescierenden) stoffe auf protozoan und enzyme [On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes]. *Dtsch Arch Klin Med.* 1904;427-87.
13. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg.* 1991;61:340-8.
14. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992;55:145-57.
15. Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.*

1991;51:5993-6.

16. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:380-7.
17. Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des H₂-matoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes. *Dtsch Arch Klin Med*. 1913:476-503.
18. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61:250-81.
19. Sroka R, Beyer W, Gossner L, Sassy T, Stocker S, Baumgartner R. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic-acid-induced porphyrins in tumour-bearing mice. *J Photochem Photobiol B*. 1996;34:13-9.
20. Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol*. 1997;65:235-51.
21. Gold MH. Therapeutic and Aesthetic Uses of Photodynamic Therapy Part five of a five-part series: ALA-PDT and MAL-PDT What Makes Them Different. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2009;2:44-7.
22. Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N. 5-Aminolevulinic acid and its

- derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B.* 2000;54:72–80.
23. Cellamare BM, Fini P, Agostiano A, Sortino S, Cosma P. Identification of ROS produced by photodynamic activity of chlorophyll/cyclodextrin inclusion complexes. *Photochem Photobiol.* 2013;89:432–41.
 24. Krasnovsky AA, Neverov KV, Egorov S, Roeder B, Levald T. Photophysical studies of pheophorbide a and pheophytin a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence. *J Photochem Photobiol B.* 1990;5:245–54.
 25. Hendry GAF, Houghton JD, Brown SB. THE DEGRADATION OF CHLOROPHYLL — A BIOLOGICAL ENIGMA. *New Phytologist.* 1987;107:255–302.
 26. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999;12:147–79.
 27. Váci P, Čonková E, Mártonová M, Sihelská Z. Efficacy of antiseptics against the yeast *Malassezia pachydermatis*. *Folia veterinaria.* 2014;58:47–52.
 28. Song JH. Antimicrobial Resistance in Gram-positive Cocci: Past 50 Years, Present and Future. *Infect Chemother.* 2011;43:443–9.

29. Lyskova P, Vydrzalova M, Mazurova J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Journal of veterinary medicine A, Physiology, pathology, clinical medicine.* 2007;54:559–63.
30. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology.* 2010;140:418–29.
31. Yoo JH, Yoon JW, Lee SY, Park HM. High prevalence of Fluoroquinolone- and Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine pyoderma and otitis externa in veterinary teaching hospital. *Journal of microbiology and biotechnology.* 2010;20:798–802.
32. Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, Mylonakis E, Hamblin MR. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. *Lasers in surgery and medicine.* 2010;42:38–44.
33. Miceli MH, Lee SA. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. *Mycoses.* 2011;54:e666–78.
34. Alexander BD, Perfect JR. Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implications for therapy and new approaches. *Drugs.* 1997;54:657–78.
35. Ko DY, Kim KH, Song KH. Comparative Study of Photodynamic

- Therapy with Topical Methyl Aminolevulinate versus 5-Aminolevulinic Acid for Facial Actinic Keratosis with Long-Term Follow-Up. *Annals of dermatology*. 2014;26:321-31.
36. Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B*. 1998;42:89-95.
37. Bertoloni G, Salvato B, Dall'Acqua M, Vazzoler M, Jori G. Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *Photochem Photobiol*. 1984;39:811-6.
38. Kwon PS. Antibacterial effects of photodynamic therapy on *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis*. Dankook University; 2005.
39. Bertoloni G, Zambotto F, Conventi L, Reddi E, Jori G. Role of specific cellular targets in the hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of microbial cells. *Photochem Photobiol*. 1987;46:695-8.
40. Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM. Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes in vitro. *The British journal of dermatology*. 2003;148:229-32.
41. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers in surgery and medicine*. 1996;18:253-9.

42. Berthiaume F, Reiken SR, Toner M, Tompkins RG, Yarmush ML. Antibody-targeted photolysis of bacteria in vivo. *Bio/technology* (Nature Publishing Company). 1994;12:703-6.
43. McCaughan JS, Guy JT, Hicks W, Laufman L, Nims TA, Walker J. Photodynamic therapy for cutaneous and subcutaneous malignant neoplasms. *Archives of surgery* (Chicago, Ill : 1960). 1989;124:211-6.
44. Lim HS. Reduction of thermal damage in photodynamic therapy by laser irradiation techniques. *BIOMEDO*. 2012;17:128001-.
45. STRATONNIKOV A, DOUPLIK A, Yu A, et al. Oxygen consumption and photobleaching in whole blood incubated with photosensitizer induced by laser irradiation. New York, NY, ETATS-UNIS: Springer; 2003. 21 p.
46. Steinbauer JM, Schreml S, Kohl EA, Karrer S, Landthaler M, Szeimies R-M. Photodynamic therapy in dermatology. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2010;8:454-64.