



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](#)

치의학석사 학위논문

근관치료에서의 Photodynamic  
therapy 의 가능성과 미래

2015년 2월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

김 근 일

# 근관치료에서의 Photodynamic therapy 의 가능성과 미래

지도교수 최 영 님  
이 논문을 김 근 일 석사학위논문으로  
제출함

2014년 10월

서울대학교 치의학대학원  
치 의 학 과  
김 근 일

김근일의 석사학위논문을 인준함  
2014년 11월

지 도 교 수     최 영 님     (인)  
부 위 원 장     김 각 군     (인)  
위        원     최 봉 규     (인)

# 목차

## 1. Introduction

- 1.1. Photodynamic therapy (PDT) 발전의 역사
- 1.2. 치의학에서의 Photodynamic Therapy의 적용
- 1.3. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy 의 물리적 메커니즘

## 2. Materials and Method

## 3. Result

### 3.1. Root Canal Treatment 에서의 PACT 의 적용

- 3.1.1 기존 근관치료의 특징과 단점.
- 3.1.2 근관 내 PACT를 위해 사용되는 Photosensitizers
- 3.1.3. 근관치료에서의 Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy 의 생물학적 메커니즘

증

### 3.2. 근관치료와 재근관치료에서의 PDT의 효능 차이

3.3. 근관 PACT에서 사용되는 Photosensitizer 의 종류와 농도에 따른 임상적 효능

3.3.1 Phenothiazine chloride

3.3.2. TBO

3.3.3 Methylene blue

### 3.4. 나노 공학 및 Biomimetics 기술이 응용된 새로운 PDT들의 적용

3.4.1. 새로운 photosensitizer 개발 및 PDT 기법의 필요성

3.4.2. Polymer-bound PS

3.4.2.1. PEI/CE6 conjugant

3.4.2.2. Liposome/invasome - conjugated mTHPC (5,10,15,20-tetra (m-hydroxyphenyl)chlorin)

3.4.3. Nanoparticle-bound PS

3.4.3.1 Bioactive Chitosan Nanoparticle

3.4.4. Nanoparticle 에 encapsulation 된 PS

3.4.4.1 PLGA (Polylactico-glycolic acid) based nanoparticle

3.5. 근관 PACT와 기존 근관치료법들간의 새로운 조합에 따른 임상적 효능

3.5.1. Ultrasonic activator를 이용한 photosensitizer 의 분산

3.5.2. EndoVac system 과 Calcium hydroxide, 그리고 PACT 의 조합

## 4. Discussion and Conclusion

## 5. Reference

# 논문 초록

## 1. 국문요약(국문초록)

### 요약(국문초록)

#### 1. 연구목적

Photodynamic therapy (PDT) 는 photosensitizer 라 불리는 광반응성 색소에 특정 파장의 빛을 조사하여 발생하는 활성산소를 이용하여 암세포 및 미생물을 광범위하게 제거하는 비침습적 치료방식이다. 이 리뷰논문에서는 근관치료에서의 PDT 적용 사례와 현재의 적용 테크닉들과 향후 어떤 방향으로 PDT 가 활용되고 단점을 극복할 것인가에 대해 생각해 보고자 한다.

#### 2. 연구대상 및 방법

##### 내용

1988년부터 2014년 까지 발간된 연구와 리뷰논문을 Pubmed와 Google Scholar 에서 Photodynamic therapy, FRET, reactive oxygen species, endodontic treatment, root canal treatment, photosensitizer, *E. faecalis*, canal irrigation, fiber optics등의 다양한 키워드를 이용하여 수집하였다.

#### 3. 결과

빛에 의해 활성화된 photosensitizer 는 그 에너지를 산소로 전달하여 singlet oxygen 이나 free radical 상태로 만든다. 이 물질들은 매우 불안정하며 주변의 단백질, 지질, 핵산, 그리고 여러 가지의 세포구성요소들을 손상시킬 수 있다. 최근 PDT 는 치의학의 여러 분야에 사용되고 있는데 크게 분류하면 1) 악성흑은 악성변이 가능성이 있는 구강종양 및 질환치료 2) 구강 내의 진균류 제거 3) 치주질환 및 충치 원인균의 제거 4) 근관치료시 근관내 미생물 제거 로 볼 수 있다. 이중 근관치료영역에서의 PDT 의 적용 가능성은 높은 편인데 그 이유는 근관이라는 공간이 연조직과 분리되어 있어 독성 활성산소가 다른 조직에 영향을 줄 위험이 적고 기존의 근관세척제로는 완벽하게 유기물질이나 세균을 제거할 수 없기 때문이며 시술이 technique sensitive 하지 않기 때문이다. 그러나 근관내에 photosensitizer 및 산소를 공급하기가 쉽지 않으며 광원을 삽입하기가 어려우며 기존 세척시간에 비해 긴 처리시간을 가지는 등의 단점 또한 존재한다. 이를 해결하기 위해 근관내 환경의 알칼라인화, photosensitizer를 loading 한 나노파티클, fiber optics의 사용 및 FRET technology 와의 결합 등이 연구되고 있다.

**주요어** : Photodynamic therapy, FRET, reactive oxygen species, endodontic treatment, photosensitizer, *E. faecalis*

**학 번** : 2011-22414

## 2. 외국어초록(Abstract)

### Abstract

The future and potential therapeutic capability of photodynamic therapy for endodontic treatment

Kim Keun Il  
School of dentistry  
The Graduate School  
Seoul National University

#### 1. objectives

Photodynamic therapy (PDT) is a non-invasive therapeutic technique that utilizes photo-active dye called "photosensitizer" to create radical oxygen species that can massively destroy cancerous cells and microorganisms. Specific wave length of light can chemically activate the photosensitizer and the excited energy of it can be transferred to oxygen, creating singlet oxygen and free radicals. These substances are very unstable and thus can disintegrate surrounding proteins, lipid, nucleic acid, and various cellular components. In this review study, the current issues in PDT applied to endodontic treatment and perspective studies to improve the efficiency of PDT are discussed.

#### 2. methods

Review and research articles from 1990 to 2014 have been widely collected from Pubmed and Google Scholar using. Photodynamic therapy, FRET, reactive oxygen species, endodontic treatment, root canal treatment, photosensitizer, *E. faecalis*, canal irrigation, fiber optics as key words for the research.

#### 3. results

Recently, PDT has been applied to various dental area such as: 1) Treatment of malignant or benign oral lesions that have potential to develop malignancy 2) Treatment of fungal infections in the oral cavity 3) Removal of microorganisms causing periodontal disease and caries 4) Removal of microorganisms and organic materials in the root canals during endodontic treatment. Among them, the possibility of application of PDT in endodontic treatment is highly feasible due to several reasons. First, the lumen of root canal is well isolated thus is able to minimize unintentional damage on surrounding soft and connective tissues. Second, conventional canal irrigation agents cannot remove 100% of microorganisms in the root canal while PDT can. Third, PDT in endodontic treatment is not technique sensitive. Despite of those advantages, there are several hurdles to overcome: the even distribution of photosensitizer and oxygen throughout the complex root canal is difficult and it is difficult to locate light source inside the root canals.

**keywords** : Photodynamic therapy, FRET, reactive oxygen species, endodontic treatment, photosensitizer, *E. faecalis*

**Student Number:** 2011-22414

# 1. Introduction

## 1.1. Photodynamic therapy (PDT) 발전의 역사

Photodynamic therapy (PDT) 는 특정 파장의 빛을 photosensitizer 라는 광 반응성 화합물질에 조사하여 singlet oxygen 및 radical을 발생시켜 미생물이나 세포를 파괴하는 치료 방법이다(1). PDT 의 개념은 1900 년대 Oscar Raab 이 acridine에 빛을 조사하여 infusoria (*Paramecium caudatum*) 라는 원생동물에 게 독성이 있음을 입증하며 시작되었다(1-2). 이후 1901 년 Niels Finson 은 빛을 이용하여 천연두와 cutaneous tuberculosis를 치료 하였으며 그 공로를 인정받아 photodynamic therapy 로 1903년 노벨상을 수상한다(2). 같은해 Tappeiner 와 Jesionek 은 eosin 색소를 피부 종양에 국소적으로 바른 후 백색광을 조사하여 피부암을 치료하였다(2). 이들은 1907년 처음으로 이 현상을 “photodynamic action” 이라는 용어로 지칭하였다(2-3). Photodynamic action 은 Photochemical reaction 과는 다른 개념인데 Photodynamic action 은 photochemical reaction 중에서 산소를 소모하여 Reactive Oxygen Species(ROS)를 발생시키는 반응만을 지칭한다. Photodynamic action 이 아닌 photochemical reaction 은 산소를 매개하거나 소모하지 않는데 UV 로 인한 DNA 의 photo-addition 반응을 그 예로 들 수 있다(4). PDT에서 광에너지를 산소로 운반하는 역할을 하는 것이 photosensitizer 인데 이 photosensitizer 에 대한 본격적인 연구는 1960년 Lipson 과 Schwartz 가 추출된 hematoporphyrin 원액에 빛이 조사되면 쥐의 피부에 독성을 지니게

된다는 것을 발견함으로써 시작되었다(5). 이 연구에서 Schwartz 는 hematoporphyrin을 아세트산과 황산과 섞어 사용하였는데 이 혼합물을 hematoporphyrin derivative(HPD) 라고 지칭하였다(2,6,7). 이 때 사용되었던 HPD 에는 여러 종류의 porphyrin 과 다양한 고분자들이 혼합되어 있었는데 여기서 활성도가 적은 porphyrin을 분리해내어 고효성의 porphyrin 만을 정제하였으며 acetylation 과 reduction 과정을 거쳐 화학구조를 일부 변형시켰다. 이 정제된 HPD 는 Photofrin 이라는 상호로 임상에서 사용되었는데 phototoxicity 가 기존 hematoporphyrin 의 두 배였다(8). Photofrin은 당시 PDT 영역에서 가장 많이 사용되었던 photosensitizer 중의 하나였는데 1960년 Lipson 과 Baldes는 이 물질이 종양세포에 축적되는 점을 이용하여 수술시 종양의 위치를 쉽게 시각화 할 수 있는 방법을 개발하였고(2,9) Diamond 는 1972년에 이 photosensitizer를 Glioma 치료에 적용하였다(10). 그러나 PDT를 사용한 Glioma 의 치료는 제한적이었는데 rat 에게 이식된 glioma mass 의 크기가 10~20 일간 감소하는 양상을 보이긴 하였지만 깊은 곳에 위치한 종양은 완전히 제거되지 않아 이내 재발하였다. 이후 1975년 Dougherty 는 HPD 와 투과성이 높은 적외선으로 쥐의 mammary tumor를 완전하게 제거하는 데 성공하였다. 이후 Dougherty는 1978에 최초로 사람에게 통제된 임상실험을 성공시켰다(2,11). 이렇듯 1900년대의 PDT 는 거의 HPD 계열의 photosensitizer - 대표적으로 Photofrin - 을 중심으로 발전되어 왔다(2). 그러나 HPD가 임상에 적용되기에는 여러 문제가 산적해 있었다. Photofrin은 흡수파장이 640 nm 이하(activation wavelength = 630 nm) 이었기 때문에 피부 밑 깊숙한 곳에 위치한



photosensitizer는 활성화 시킬 수 없었다(1). 또한 Photofrin 은 거의 60 가지의 분자들로 이루어져 있는 하나의 mixture 이기 때문에 그 조성을 온전히 재현하는 것이 매우 어려웠다(2). Photofrin 은 Molar absorption coefficient가 매우 낮아 임상적인 효과를 거두려면 매우 높은 농도의 photosensitizer 가 한 구역에 밀집되어 있어야 했는데 종양세포에만 선택적으로 흡수되는 약물이 아니었기에 localization 이 어려워 실제 치료효과는 early stage cancer 에만 국한되어 있었다. 극적인 치료효과를 위해 Photofrin을 고농도로 투여한 경우 정상세포에도 침투해 들어가기 때문에 unselective 한 세포독성을 피하기 위해 환자들을 4~6 주간 태양빛에 노출되지 않도록 해야 했다(6). 이러한 문제점 때문에 2000년대 이후에는 더욱 tissue-specific 하며 효능 및 activation wavelength 가 긴 photosensitizer 가 개발되기 시작한다. 이러한 photosensitizer 의 종류에는 Basal-cell carcinoma 치료에 쓰이는 BPD-MA(상호명: Verteporfin, AW=689 nm), 두경부 종양 및 고환, 췌장암 치료에 쓰이는 m-THPC(상호명: Foscan, AW=652 nm) , 두경부종양 및 basal-cell carcinoma 의 치료와 진단에 쓰이는 5-ALA(상호명: Levulan, AW=635 nm/진단용 AW=375-400 nm), 두경부 종양 및 고환암 치료에 사용되는 Lutetium texaphyrin (상호명:Lutex, AW=732 nm) 등이 있다(1,2,6,8).

## 1.2. 의학에서의 Photodynamic Therapy의 적용

위에서 언급한 다양한 photosensitizer 들의 indication 이 되는 종양의 종류를 보면 두경부에 발생하는 암종이 많은데 특히 구강내

에 발생하는 종양들의 치료에 더욱 효과적이었다(12). Photofrin 의 경우 구강, 입술 및 pharynx에서 발병한 T1/T2 stage 까지 SCC에 대해 거의 100 % 에 가까운 반응성을 보였고 Foscan을 사용했을 때도 마찬가지로 T1/T2 stage 까지의 종양에 100 %의 반응성을 보였다. 그러나 종양이 larynx 에 위치한 경우 Foscan 으로 25 % 의 반응성만을 보였으며 Photofrin 의 경우에도 75 %의 반응성을 보였다(13). 이와 같이 구강 및 두경부에 발생한 SCC의 PDT 반응성이 종양의 위치에 따라 다른 것을 볼 수 있는데 이는 photosensitizer 의 localization 의 용이함, 그리고 light source 접근의 용이함, 그리고 조직특이성 3가지의 이유로 인한 것임을 추측해 볼 수 있다. 구강의 구조는 외부에서의 접근이 용이하고 외부환경에 노출되어 있기 때문에 photosensitizer 의 국소적 적용이 쉽다. 또한 구강은 피부와는 달리 외부의 빛이 차단되는 공간이기 때문에 높은 농도의 photosensitizer를 적용할 수 있다. 앞에서 언급했듯이 구강과는 달리 고농도의 HPD 계열의 photosensitizer를 피부에 적용시키거나 정맥주사한다면 종양세포 뿐 아니라 정상세포에도 비특이적으로 흡수되기 때문에 외부의 빛에 의해 비특이적인 세포독성이 발현될 수 있다. 또한 개구 상태에서 쉽게 광원을 lesion 까지 접근시켜 높은 정확도로 특정 위치에 조사할 수 있기 때문에 구강환경은 PDT 의 임상적 장점을 극대화 할 수 있는 공간이다. 1900 년대의 PDT 는 거의 전신적인 종양의 진단과 치료에만 국한되어 있었으나 구강이라는 특수한 해부학적 이점에 착안해 치의학에서의 PDT 또한 다양한 방향으로 발전하기 시작한다(12). PDT를 이용한 구강암의 치료와 진단, psoriasis 와 actinic keratosis 의 치료 등 다양한 임상사례에서 PDT 가 적용되기 시작했다(12). 그 중 하나는 PDT를 이용

한 구강내의 박테리아 및 균류의 제거인데 이를 Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy(PACT) 라고 한다(14). 실제로 PDT 의 시초가 1900 년대 Oscar Raab 이 acridine에 빛을 조사하여 infusoria에 대한 독성을 확인한 것부터 시작한 점을 생각한다면 PDT의 미생물 살균능력이 그동안 왜 각광받지 못했는지 의문이 들 수 있을 것이다. 그러나 PDT를 이용한 미생물 제거에는 몇 가지 치명적인 단점들이 있다. 조사부위에 발생한 ROS 의 독성이 미생물 뿐 아니라 정상세포에도 치명적이며 따라서 ROS를 발생시킬 수 있는 장소의 넓이가 극히 제한되어 있다. 즉 순환기를 통해 전신적인 감염을 보이는 사례에서는 항생제보다 그 효용이 크게 떨어진다. 즉 PDT 의 antimicrobial effect 는 전신적인 감염이나 신체 심부의 감염보다는 국소적이고 외부에 노출된, 그리고 주변 정상세포들에 대한 영향이 적은 부위에서 가장 효과적으로 작용한다. 또한 photosensitizer 들은 박테리아들이 형성한 biofilm 에 대한 투과성이 매우 높으며 antimicrobial 메커니즘 또한 ROS를 사용한 직접적인 세포막 및 세포소기관 파괴이기 때문에 기존 항생물질에 저항성을 가진 종류의 박테리아도 제거가 가능하다(15). 실제로 최근 methicillin에 저항성을 지닌 *Staphylococcus aureus* 나 vancomycin 저항성을 지닌 *Enterococcus faecalis* 등이 증가하고 있으며 이들에 의한 구강내의 감염 또한 증가하고 있다. 미생물들이 PACT 에 대해 저항성을 띠는 것은 거의 불가능 하다고 볼 수 있는데 그 이유는 ROS 는 미생물의 다양한 세포 소기관과 metabolic pathway 에 관여하기 때문이다(15). 반복적인 PACT 가 미생물의 Superoxide Dismutase (SOD)와 같은 anti-oxidant enzyme의 증가를 유도할 수 있고 따라서 PACT 에 대한 저항성을 획득할 수 있다

는 주장도 제기되었지만 이러한 catalase 및 enzyme 들은 몇가지 oxygen radical을 중화시켜 줄 수는 있어도 siglet oxygen 에는 대응할 수 없다(12,15). 즉 PACT 는 미생물 종류에 무관하게 동등하게 효과적이며 여러번의 PACT 에도 미생물 저항성은 생겨나지 않는다. 이러한 PDT의 antimicrobial action의 특징과 장점을 고려해 볼 때 가장 이상적으로 적용될 수 있는 신체부위는 구강일 것이다.

### 1.3. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy 의 물리적 메커니즘.

Photosensitizer 가 photon을 흡수함에 따라 photosensitizer 는 ground state (singlet state)에서 전기적으로 들뜬 상태(triplet state)로 오래 유지되게 된다. 들뜬 triplet 상태에서는 두 가지 반응이 일어날 수 있다. 첫 번째로 세포막이나 분자 등의 substrate 와 직접적으로 반응하여 electron (수소원자)를 전달하여 radical을 형성시킬 수 있다. 이러한 radical 들은 Type I reaction을 통해 산소와 반응하여 oxygenated product를 생성한다. 또 다른 반응으로 triplet state 의 photosensitizer 는 Type II reaction을 통해 에너지를 직접 산소에게 전달할 수 있다. 에너지를 받은 산소는 singlet oxygen 이 되는데 이를 highly ROS 라고 지칭한다(16). PDT에서 사용되는 거의 모든 photosensitizer 들은 산소의 유무에 의해 반응이 진행되며 따라서 조직 중 산소가 없는 곳에서는 위와같은 반응이 일어나지 않는다. In-vivo 실험에서 clamping을 통해 피부조직을 hypoxic 상태로 만들자 porphyrin을 사용한 PDT 에 의한 ROS 생성이 중단되는 것을 관찰할 수 있었다(17). Type I 과 Type II의 반

응은 거의 동시에 일어나는데 Type I 과 II 가 전체 반응에서 차지하는 비율은 photosensitizer 의 종류와 substrate 의 농도, 산소의 농도, 그리고 photosensitizer 와 substrate 간의 binding affinity 에 따라 달라진다. 생체 내에서 PDT 에 의해 생성된 ROS 의 반감기는 0.04  $\mu$ s 로 매우 짧으며 따라서 하나의 singlet oxygen 이 영향을 줄 수 있는 반경은 0.02  $\mu$ m 이내이다(18). 그러나 PDT 의 영향반경은 photosensitizer 의 종류에 따라 달라지며 해당 photosensitizer 가 세포 내부에 위치하는지, 또 세포 외부에 위치하는지에 따라서도 달라진다. 즉 PDT 의 파괴력은 다음과 같은 요소들에 의해 결정된다(1,2,16-18).

- 1) Photosensitizer 의 종류
- 2) Photosensitizer 의 위치
- 3) Photosensitizer 의 용량 및 농도
- 4) 전체 조사된 빛의 양 (Photon 의 양)
- 5) Light Fluence Rate
- 6) 주변의 용존산소의 양
- 7) Bio-distribution of photosensitizer
- 8) Photosensitizer 복용 시간과 광조사 시간의 차이.

## 2. Materials and Method

### Focused Question:

이 논문에서 가장 집중적으로 논의하는 것은 근관치료에서의 PDT의 효능 및 기존 PDT가 가지는 문제점을 극복하기 위해 어떤 접근이 행해지고 있는지, 또 그 접근법의 효용성에 대해 비교하는 것이다.

### Eligibility Criteria

1988년부터 2014년 까지 발간된 연구와 리뷰논문을 Pubmed와 Google Scholar에서 Photodynamic therapy, FRET, reactive oxygen species, endodontic treatment, root canal treatment, photosensitizer, *E. faecalis*, canal irrigation, fiber optics등의 다양한 키워드를 이용하여 수집하였다.

출간된 많은 논문들 중 다음과 같은 기준들을 사용해 선택적으로 분석하였다. 먼저 분석된 논문들은 모두 영어로 작성된 논문들이며 1) Original articles 2) experimental studies 3) clinical studies 4) Review논문에 수록된 reference 목록상의 논문들을 분석하였다. 출간되지 않은 데이터들이나 보고는 제외하였다.

## 3. Result

### 3.1. Root Canal Treatment 에서의 PACT 의 적용

#### 3.1.1 기존 근관치료의 특징과 단점

근관의 감염제거는 근관치료에서 가장 중요한 단계이자 요소이다. 감염된 근관 내에는 많은 종류의 박테리아들이 존재하는데 크게 anaerobic, facultative anaerobic, aerobic 박테리아들로 분류할 수 있다. 이들 중 대부분은 근관치료로 제거되지만 근관치료 실패 후 관찰되는 박테리아들의 종류로는 *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* 등이 있으며 이 중 가장 근관치료 실패에 원인이 되는 박테리아는 *Enterococcus faecalis*로 알려져 있다(19). *E. faecalis* 는 host cell 에 부착하여 host cell 로 하여금 다른 종류의 박테리아의 번식을 억제하고 lymphocyte 의 활성을 억제하는 단백질을 생산케 한다(19,20). 실패한 근관치료의 약 77%에서 *E. faecalis* 가 발견되었다(21). 현재 많은 기술들이 근관의 완전한 박테리아 감염제거를 위해 적용되고 있는데 크게 두 가지 방법으로 나누어 볼 수 있다. 첫 번째는 기계적인 힘을 이용한 근관내의 감염원 제거법이 있다. 이 방법은 nikel-titanium (Ni-Ti) rotary system 이나 hand filing, 그리고 Ultrasonic irrigation을 이용하여 근관내부의 유기물질 잔사와 미생물조직을 직접적으로 제거하는 방식이다(22). 두 번째 방법은 화학적인 감염제거인데 근관내부에 NaOCl 이나 EDTA 등을 반복적으로

주입하여 미생물과 유기물질 잔사를 화학적으로 분해하는 방법이다 (23). 이러한 방법들로 인해 근관치료의 성공률은 현재 94%에 달하고 있지만 이 수치는 근관내부가 완전하게 bacteria-free 상태일 때 가능한 수치이다. 박테리아가 근관 내부에 잔류할 때 근관치료의 성공률은 68%까지 감소한다(24). 결국 근관내의 박테리아의 제거 정도에 따라 근관치료의 성공률이 크게 달라지게 되는데 현재 물리적인 박테리아 제거와 화학적인 박테리아 제거를 동시에 사용함에도 불구하고 여러 가지 한계점들 때문에 100% bacteria-free 한 근관을 형성하는 것은 불가능에 가깝다. 첫 번째로 근관의 감염은 3차원적으로 발생한다. 기계적/화학적인 제거로는 수많은 부근관의 내부나 micro-size 의 dentinal tubule 의 내부, file 이 닿지 않는 면의 감염제거에는 한계가 있다. 또한 기계적인 근관형성은 smear layer를 남기게 되어 bacteria가 서식하기 좋은 환경이 된다(25). 실제로도 3차원적인 감염제거를 위해 고안된 NiTi system과 기존의 hand instrument의 근관 미생물 감소량을 비교해 보면 큰 차이가 없다는 보고가 많다(22,26-27). 이는 기계적인 근관형성 기술이 한계에 봉착했다는 것을 보여주는 사례이다. 그렇다면 화학적인 근관 세척은 어떠한가. NaOCl 세척은 현재 근관치료의 기본중의 기본이 되었지만 in-vitro 상에서의 살균효과가 in-vivo 상에서는 크게 감소한다. 근관치료에 사용되는 NaOCl 은 0.2~5%이며 유리되는 free chlorine 이 박테리아를 파괴하는데 이 과정에서 free chlorine 이 급격하게 소모되기 때문에 지속적으로 NaOCl을 공급해 주는 것이 중요하고 살균과정 자체가 느려서 여전히 실제 근관내부에서는 감염원이 남아있을 위험이 존재한다(27). NaOCl 과 함께 사용하는 보조 irrigant 로는 chelating 효과가 있어 smear layer를 제거할 수



있는 EDTA 와 dentin을 통과할 수 있는 것으로 보고되고 있는 iodine potassium iodide (IKI) 가 있다. 근관내의 많은 박테리아들이 EDTA 에 제거되지만 *E. faecalis* 는 EDTA 에 대한 저항성이 있는 것으로 보고되고 있다. 기계적/화학적 방법을 사용하여 근관을 형성했다 하더라도 증식 가능한 박테리아가 근관 내에 40~60% 가량 잔류하게 되며 *E. faecalis* 의 경우 pH 항상성을 유지하는 메커니즘을 사용하여 근관 내에 임시 충전된 Calcium hydroxide 속에서 적어도 10 일간 생존이 가능하다(28). 또한 완벽한 감염제거에 성공하였다 하더라도 충전이 이루어지기 직전에 구강 내부 구조나 타액에 의해 박테리아가 근관에 침투할 수 있다.

### 3.1.2 근관 내 PACT를 위해 사용되는 Photosensitizers

근관 내 PACT를 위해 사용되는 Photosensitizer 의 종류는 다음과 같다(12,14).

- 1) Methylene Blue (MB) 과 Toluidine Blue O (TBO; Tolonium chloride),
- 2) Phthalocyanines 계열
  - Aluminum disulphonated phthalocyanine
  - Cationic Zn(II)-phthalocyanine
- 3) Chlorine 계열
  - Chlorine e6

- Sn(IV)chlorin e6
- chlorin e6-2.5 N-methyl-d-glucamine (BLC1010)
- polylysine and polyethyleneimine conjugates of chlorin e6

#### 4) Porphyrin 계열

- Hematoporphyrin HCl
- Photofrin
- ALA

#### 5) Xanthenes (erythrosin)

#### 6) Monoterpene (azulene)

Bacteria 의 PACT 에 대한 감수성은 photosensitizer 의 종류에 따라 달라진다. PACT 의 결과물로 생성된 ROS 는 bacteria 의 종류에 관계없이 독성을 띠지만 photosensitizer 의 net charge 는 bacteria wall 의 net charge 에 의해 상호작용이 일어나기 때문이다. 일반적으로 중성이거나 negative net charge를 띠는 photosensitizer 는 그람 양성균의 표면에 효과적으로 결합하는데 그람 음성균의 표면에도 일부 부착되긴 하지만 광조사 후 박테리아 비활성화의 효율이 낮다. 그람 양성균의 표면은 좀더 porous 한 층의 peptidoglycan과 lipoteichoic acid 로 이루어져 있기 때문에 photosensitizer 가 침투하기가 쉽다. 그람 음성균에서도 같은 효과를 내고 싶다면 negative net charge를 띠는 photosensitizer 에 cationic 분자를 결합시켜 사용하거나 bacteria의 strain 에 특이적인 antibody 에 photosensitizer를 결합시켜 사용할 수도 있다(12).

### 3.1.3. 근관치료에서의 Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy 의 생물학적 메커니즘

구강 내의 환경은 여러 가지 미생물들이 서로 연계되어 하나의 생태계를 이루고 있다. 여기에는 aerobic/anaerobic, Gram positive/Gram negative, 균류, mycoplasma, protozoa, 그리고 바이러스 등이 포함된다. 미생물들은 다양한 질서를 구축하며 치아 표면이나 근관의 표면 등에 biofilm 이라는 구조물을 형성하는데 이는 숙주와 박테리아에서 생성된 extracellular matrix of polymer (EMP) 로 구성되어 있다. 박테리아들은 이 바이오필름 내에서 번식/생활하는데 외부 환경변화에 대한 stress와 항생제에 대한 저항성이 증가하고 숙주의 면역반응에 대한 저항성도 증가하게 된다(29). PDT 의 살균원리는 singlet oxygen을 이용하는 것이고 그 자체로 매우 높은 화학적 반응성을 띠고 있기 때문에 polysaccharide 로 이루어진 EMP를 분해할 수 있다. biofilm 구조를 붕괴시키는 것만으로도 항생물질 저항성 획득 기회를 차단할 수 있는데 이는 biofilm 내에서 항생물질 저항성을 가진 플라스미드의 교환이 주로 이루어지기 때문이다(12). PACT 는 Gram positive/Gram negative biofilm 모두에게서 효과를 보이며 전자현미경으로 관찰한 결과 Zn(II)-phthalocyanine을 사용한 PACT에서 바이오필름의 구조적인 붕괴를 관찰하였다(29). Poly-L-lysine-chlorine과 e6를 conjugate 시킨 photosensitizer와 적외선을 사용하여 Actinomyces viscosus 가 형성한 biofilm에 treat 한 후 confocal microscopy를 사용하여 분석한 결과 광조사가 시작되자 photosensitizer 의 침투율이 50%

이상 상승하였으며 biofilm 내의 박테리아의 99% 가 제거되었다(30). TBO를 photosensitizer 로 사용하여 helium/neon laser를 조사한 경우 여러 종의 박테리아로 구성된 biofilm 내의 총 박테리아 수가 97% 까지 감소한 보고도 있다(31). 충치원인균으로 알려진 *Streptococcus mutans* 의 경우 photosensitizer 로 Erythrosin, Methylene Blue, 그리고 Photofrin을 주로 사용하며 주로 500~650nm의 activation wavelength를 가지고 있다(12). 특히 Erythrosin 이 MB 나 Photofrin 보다 효과적이다. PACT 의 효율성은 biofilm 의 ‘나이’ 에도 비례한다. biofilm이 형성된 지 오래될수록 효과적임이 밝혀졌다(32). 그러나 TBO를 photosensitizer를 사용한 경우는 형성된 지 얼마 되지 않은 *S. mutans* 바이오필름에 더 효과적이다(33). 이러한 차이가 발생하는 원인은 명확히 규명되지 않았으나 photosensitizer 의 화학적 구조에 따라 바이오필름의 EMP에 침투되는 정도가 달라지기 때문이라고 추정하고 있다. PACT를 이용한 치주염의 치료 뿐 아니라 임플란트주위염이나 근관 치료에도 PACT 가 가지는 biofilm 투과성이 주목받고 있다. 자연치의 근관 내부에 존재하는 *Streptococcus intermedius* 가 형성한 biofilm의 경우 TBO를 photosensitizer로 사용하여 근관치료용 endo-tip 에 633 nm laser diode를 부착하여 조사한 연구에서는 *S. intermedius* 의 수가 극심하게 감소됨을 관찰하였다(34). 또 다른 연구에서는 helium/neon laser를 사용하여 같은 조건에서 실험을 하였더니 *S. intermedius* 의 바이오필름이 일부 불활성화 된 것을 관찰하였다(35). Methylene blue를 photosensitizer 로 하여 적외선(665nm)를 조사한 실험에서는 근관내의 *E. faecalis* biofilm 의 97%가 감소하였다는 보고도 있다(30). 그러나 박테리아에 의해

형성된 biofilm과는 달리 yeast 나 fungal infection 의 경우 biofilm 제거 효율이 크게 줄어듦을 관찰할 수 있었다. *Candida albicans* 가 형성한 biofilm 의 경우 그람 양성균이 형성한 biofilm에 비해 그 두께가 두껍고 세포 자체의 크기가 크고 nuclear membrane을 가지고 있어 PACT의 효율성이 크게 감소한다(36). 따라서 yeast 나 fungal infection 의 경우 박테리아와 동일한 효율을 얻기 위해서는 TBO 의 농도를 증가시키거나 노출시간을 증가시키거나 광조사시간을 증가시켜야 한다.

### 3.2. 근관치료와 재근관치료에서의 PDT의 효능 차이

Bonsor 등은 PDT 와 통상적인 2.5% NaOCl 세척의 박테리아 제거 능력을 비교하였는데 두 가지 방법 모두 근관 내 박테리아 제거에 효과적임을 확인하였다. 이 연구에서는 44개의 감염된 근관이 사용되었는데 PDT를 사용한 그룹에서는 박테리아의 수가 91.3% 감소하였으며 2.5% NaOCl을 사용한 그룹에서는 80.9%가 감소하였다. NaOCl이 사용된 그룹과 PDT를 사용한 그룹을 바꾸어 실험해보아도 동일한 결과가 도출되었다(37). 이후 Garcez 등은 기존의 기계적/화학적 감염제거가 혼합된 근관치료 이후 적용된 PDT 의 효능을 검증하고자 했다. 치수가 괴사된 치아 22개에 access opening을 한 후 일반적인 근관치료를 시행하고 PDT를 추가적으로 시행하였다. 근관 내의 박테리아 샘플은 paper tip을 이용하여 채취되었으며 박테리아의 수는 총 3번 측정되었다. 그 결과 일반적인 근관치료만을 수행했을 때 91% 의 박테리아 수 감소를 보인 반면

PDT가 추가되자 박테리아의 수가 98.1% 까지 감소되었다. 이후 Ca(OH)<sub>2</sub> 로 임시충전을 한 후 1주 후 다시 근관 형성 및 PDT를 수행하자 두 번째 방문 때 감소한 박테리아 수가 첫 번째 치료 때 보다 더욱 증가하였다 (99.9% reduction)(38).

Garcez 등 은 재 근관치료에서의 PDT 의 효과도 검증하였다. 주로 근관 치료의 실패는 근관 내 잔류하는 박테리아가 항생제나 근관치료에 저항성을 지니는 경우 발생한다. 30개의 감염된 근관이 실험군으로 선택되었으며 일반적인 재 근관치료 후 PDT를 추가적으로 시행하였고 3번의 paper point tip을 이용한 박테리아 sample collection 이 이루어졌다. 항생제저항성을 가지고 있는지를 알아보기 위해 access opening 후 바로 박테리아 샘플이 분석되었으며 anti-biogram 결과 모든 환자들이 최소한 1개의 항생제 저항성을 지닌 미생물을 가지고 있었다. 다재내성저항균 또한 발견되었지만 PDT 와 조합한 근관치료 결과 근관내 박테리아의 거의 100%가 제거됨을 관찰할 수 있었다(39). Garcez 등 의 실험은 일반적인 ex-vivo 나 in-vitro 실험이 아닌 인간을 대상으로 하는 in vivo 실험으로 그 가치가 높다. 근관치료에서의 PDT 의 효용성은 매우 높으며 특히 재 근관 치료 시 그 효용성은 기존의 항생제 및 근관 치료 기법에 비해 우세함을 알 수 있다.

### 3.3. 근관 PACT에서 사용되는 Photosensitizer 의 종류와 농도에 따른 임상적 효능

#### 3.3.1 Phenothiazine chloride

구글 학술검색(google scholar) 기준으로 근관소독 목적으로 Phenothiazine chloride를 photosensitizer 로 사용한 논문은 약 15 개 정도였다. 이들 중 90% 이상의 *E. faecalis* 제거효율을 보인 논문은 Bago 등 의 연구였는데 실험에서 쓰인 Phenothiazine chloride 의 농도는 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었으며 660 nm laser 의 조사시간은 약 1분이었고 *E. faecalis* 의 제거효율은 99% 이상이었다(40).

### 3.3.2. TBO

그러나 근관 PACT에서 가장 많이 사용되었던 photosensitizer 는 TBO 와 MB 였는데 대체적으로 Phenothiazine chloride 보다 적은 농도에서 동일한 살균능력을 보였다. Bago 등 의 연구에서 쓰인 Phenothiazine chloride 의 농도는 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이었는데 같은 연구에서 동일한 살균력을 보여주었던 TBO 의 농도는 155  $\mu\text{g}/\text{mL}$  에 불과하였다(40). Vaziri 등 은 TBO 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 농도에서 1분간의 625 nm laser 조사 시 근관내의 *E. faecalis* 의 99% (CFU=  $8.23\text{E}9 \sim 1.3\text{E}3$ ) 제거하였다고 보고하고 있다(41). 이는 2.5% NaOCl 이나 Chlorohexidine 세척을 10분간 행했을 때(CFU= $8.2\text{E}9 \sim 3.7\text{E}4$  for NaOCl,  $8\text{E}3\sim 3.2\text{E}7$  for Chlorohexidine) 보다 우수한 결과였다. 2.5% NaOCl 과 TBO를 이용한 PACT를 둘 다 사용한 그룹에서는 *E. faecalis* 가 100% 제거되었다(41). Poggio 등 은 그의 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 TBO를 사용하였는데 628 nm 의 파장을 사용하였다. 이 연구의 경우 laser 의 파워가 1000  $\text{mW}/\text{cm}^2$  에 달하는데

0.5분과 1.5 분으로 나누어 실험을 진행하였다. 0.5분간 광조사한 그룹에서의 *E. faecalis* 감소량은 87.72% 에 불과했으며 1.5분간 조사한 그룹에서는 91.49%의 감소량을 보였다. 그러나 NaOCl 5% 와 PACT 30초를 병행한 그룹에서는 97.44% 의 bacteria 수 감소가 관찰되었다(42). Schlafer 역시 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 TBO를 사용하여 1000  $\text{mW}/\text{cm}^2$  , 628 nm laser 로 0.5분간 광조사 후 *E. faecalis* 의 감소량을 관찰하였는데 95% 감소를 보였다(43). Vaziri 의 연구에서 사용된 저농도(15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 의 MB 와 비교하여 비교적 높은 농도인 Schlafer 와 Poggio (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 그리고 Bago(155  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 에서 오히려 효율이 비슷하거나 감소한 것은 laser 의 power density 차이 때문이라고 생각된다. Vaziri 의 연구에서는 200  $\text{mW}/\text{cm}^2$  의 power density를 가진 laser 가 사용되었으며 Poggio 과 Schlafer 의 연구에서는 100  $\text{mW}/\text{cm}^2$  의 power density를 가진 laser 가 사용되었다. Poggio 와 Schlafer 의 연구를 비교하면 Poggio 에서는 지름 320  $\mu\text{m}$  의 optical fiber를 사용하였는데 Schlafer 의 연구에서는 지름 4000  $\mu\text{m}$  optical fiber 가 사용되었다. Optical fiber 의 지름이 증가할수록 같은 시간동안 전달되는 에너지의 양이 크고 coverage 도 넓어 효율증대에 기여하는 것이라 생각된다. 그러나 TBO를 사용한 PACT 가 80% 이하의 *E. faecalis* 제거 효율을 보인 연구도 많았는데 Hecker 등 은 635 nm laser 로 MB 를 6분간 excitation 시켰는데 TBO를 주었을 때나 주지 않을 때나 CFU 의 차이가 크지 않았으며 1~3% 의 NaOCl에서 PACT 보다 더욱 효과적인 살균력을 보여주었다. Hecker 등 의 연구에서는 다른 연구에서와는 달리 bovine tooth를 샘플로 사용하였는데 이는 인간의 치아보다 근관의 넓이가 넓어 laser 의 효율이 급감하였기 때문



으로 생각된다(44). 실제로 이 연구에서 사용된 optical fiber 의 지름은 216 nm 인데 이는 Schlafer 이 사용하였던 4000  $\mu\text{m}$  optical fiber 이나 Soukos 이 사용한 500 nm optical fiber 에 비하면 매우 작은 사이즈이며 bovine tooth 의 넓은 Root canal 때문에 효율감소가 극대화 되었을 것이다. Souza 의 연구에서도 MB 와 TBO를 모두 사용하였을 때 PACT 의 효과가 크지 않았다고 보고하고 있다. 이 연구에서 *E. faecalis* 의 감소는 colony counting 방식으로 1/100 정도 밖에 관찰되지 않았으며 Solid phase cytometry 상에서는 1/10 감소만이 측정되었다. 이 연구에서도 200 nm optical fiber 가 사용되었는데 대체적으로 작은 diameter 의 optical fiber 일수록 PACT 의 효과가 떨어짐을 생각해 볼 수 있다(45). 실제로 200 nm 의 optical fiber를 사용하고 통계적으로 유의미한 *E. faecalis* 의 감소를 관찰한 연구는 Garcez 등 의 연구가 유일한데 TBO 나 MB 가 아닌 polyethylenimine 과 chlorine 의 복합체를 photosensitizer 로 사용한 경우이다(39).

### 3.3.3 Methylene blue

구글학술검색에서 methylene blue 가 근관치료에서 *E. faecalis* 제거를 위해 사용된 연구는 약 350 개 정도였다. TBO를 사용한 연구가 50 개 정도임을 고려하면 근관치료목적의 PACT에서 압도적으로 주목받고 있는 photosensitizer 임을 알 수 있다. MB를 이용한 연구에서의 공통점은 사용되는 MB 의 농도가 다른 photosensitizer 들과 비교하여 낮은 수준이라는 것이다. Foschi 등 과 Pagonis 등은 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 MB를 사용하였고(46-47) Soukos 등은 25  $\mu\text{g}$

/mL 의 MB를 사용하였다(30). MB를 사용한 경우 TBO 보다 더 긴 광조사 시간을 사용하였는데 Foschi 등 과 Soukos 등 은 5분을, Pagonis 은 10 분의 광 조사 시간을 설정하였다. MB를 사용한 연구에서 주목할 만한 점은 유의미한 *E. faecalis* 의 감소가 관찰된 실험에서의 laser wavelength 가 665 nm 로 동일하다는 점과 *E. faecalis* 의 감소가 관찰되지 않은 실험에서는 660 nm 파장의 광원을 사용하였다는 점이다. Nunes 등 은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 MB를 사용하였고 5 분간 660 nm 의 laser를 지름 216  $\mu\text{m}$ 의 optical fiber 를 통해 활성화 시켰는데 유의미한 결과가 관찰되지 않았다(48). 이 결과가 optical fiber 의 지름에 영향과는 무관할 가능성이 큰 이유는 Cheng 등 의 연구에서는 지름 2000  $\mu\text{m}$  의 optical fiber를 사용하여 200 mW 의 Power output을 가진 광원으로 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 MB 를 1분간 activation 시켰으나 임상적으로 유의미한 *E. faecalis* 의 감소는 관찰되지 않았다(49). 즉 MB 의 경우 TBO 보다 낮은 농도로(6.25~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 적용이 가능하지만 5~10 분간의 충분한 광 조사 시간과 665 nm 의 정확한 파장이 성공적인 PACT를 위해 필요하다고 생각된다.

### 3.4. 나노 공학 및 Biomimetics 기술이 응용된 새로운 PDT들의 적용

#### 3.4.1. 새로운 photosensitizer 개발 및 PDT 기법의 필요성

일반적으로 photosensitizer 들은 porphyrin 이나

phthalocyanine ring 과 같은 화학적으로 중심부에 큰 pi-conjugation domain 들이 있기 때문에 600 nm 파장 이상의 빛을 흡수하여 높은 양자 상태에서 singlet oxygen을 만들어낸다. 즉 거의 모든 photosensitizer 들은 중심부의 pi-conjugate domain 들이 서로 pi-pi stacking을 이루게 되고 소수성그룹들 간의 상호작용까지 더해져 수용액상에서 서로 뭉치기가 쉽다. 상호작용으로 뭉쳐버린 photosensitizer 들은 ROS 생성률이 크게 떨어지게 되는데 이는 뭉친 photosensitizer 들끼리 quenching 작용이 일어나기 때문이다. 즉 고농도의 photosensitizer 가 높은 효율을 위해 필요한 상황에서 뭉침현상 때문에 오히려 저농도의 photosensitizer 보다 ROS 발생 효율이 저하되는 현상이 관찰되고 있다(50). 이러한 문제점을 해결하기 위해 수용액상에서 서로 뭉치지 않는 (well-dispersed) photosensitizer 의 개발의 필요성이 대두되게 되었다. 기존의 photosensitizer 에 polyethylene glycol (PEG) 와 같은 고분자를 conjugate 시키거나 Polyethylene imine (PEI)를 conjugate 시켜 이와 같은 뭉침 현상을 막고 근관과 같은 좁은 공간 내에서의 분산도를 증가시키려는 연구가 행해지고 있다(51). Kataoka 등 은 dendrimeric photosensitizer를 개발하여 수용액상에서 고농도에서도 효율적인 ROS 생산을 보이는 photosensitizer를 개발한 바 있다(52). 그러나 분산도가 높은 photosensitizer 일수록 체내 조직 및 순환기로의 흡수가 빠르고 안정적이어서 지속적인 phototoxicity를 가지게 되고 전신적으로 부작용을 초래할 수 있다. 근관치료의 경우 근첨단의 조직들은 혈관이 풍부하고 물질의 교류가 활발하게 이루어지는 만큼 photosensitizer 의 전신적인 전이 또한 고려해야 할 문제 중 하나이다. 위와 같은 문제점들을 해결하기 위해 다양한 나

노기술 및 생체모방기술과 결합된 새로운 photosensitizer 들이 개발되고 있다.

### 3.4.2. Polymer-bound PS

용해도가 낮고 net charge 가 negative 인 photosensitizer는 수용액 내 분산도와 ROS 생산효율, 그리고 박테리아 세포벽과의 affinity 가 낮기 때문에 PEI 나 PEG 등의 positive net charge를 가진 고분자와 결합시켜 수용액내 분산도를 높이고 세포벽과의 affinity를 향상시키는 방법이 많이 쓰이고 있다.

#### 3.4.2.1. PEI/CE6 conjugant

PEI/CE6는 기존의 chlorine photosensitizer 에 PEI를 화학적으로 결합시킨 것이다. 결합되는 PEI 의 종류는 다양한데, 주로 여러 개의 가지를 지니는 branched PEI 와 가지가 없는 linear PEI 로 나뉜다. 또한 PEI 는 분자량이 증가함에 따라 분산효율과 cationic zeta potential 이 증가하게 되지만 이에 따라 세포독성도 증가하게 되어 적용되는 부위와 조직의 특성에 따라 PEI 분자량과 branched/linear 형태가 차등 적용되어야 한다. Garcez 등 은 2008 년 20명의 환자를 무작위로 선발하여 pulp necrosis 와 periapical periodontitis가 있는 전치부를 발치, PEI/ce6 ( $60 \mu\text{mol/L} = 19 \mu\text{g/mL}$ )를 사용하여 ex-vivo 실험을 진행하였다. 광원으로는 660 nm 파장, 40 mW 의 diode laser가 사용되었으며 광조사 시간은 240

초였다. K-file을 이용해 #40-45 까지 근관을 확장한 다음 2.5% NaOCl 로 근관세척을 시행하고 17% EDTA 와 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 로 세척하여 기존의 근관치료단계를 수행한 뒤 PEI/ce6를 이용한 PACT를 진행하였다. Ca(OH)<sub>2</sub> 로 임시 충전한 1주 후 분석한 결과 *E. faecalis* 를 포함한 모든 종류의 bacteria 가 99.99% 제거됨을 확인할 수 있었다(38).

### 3.4.2.2. Liposome/invasome – conjugated mTHPC (5,10,15,20-tetra (m-hydroxyphenyl)chlorin)

mTHPC 는 2세대 photosensitizer 로 potency 가 매우 높아 현재까지 종양치료에 주력으로 사용되고 있었다(53). 그러나 mTHPC 는 hydrophobic 한 성질로 인해 polar solution 내에서 aggregation 이 일어나 분자의 크기가 증가, dentinal tubule 내로의 distribution 이 저해된다. 또한 이 aggregation으로 인해 self-quenching 이 발생하고 photo-toxicity 가 감소하는 단점이 있었다(53). Anna Ossmann 등 은 mTHPC 에 liposome 과 invasome을 감싼 뒤 50  $\mu$ M 의 농도로 근관 내로 전달하였다. 652 nm 파장에서 100 J/cm<sup>2</sup> 의 density 로 425 초간 GaAs diode laser를 조사한 뒤 ISO-50에서 ISO-110 까지 뿔어있는 dentinal tubule section 들에게서 ISO-10 간격으로 잔류 *E. faecalis* CFU를 측정하였다(54). 결과 CHX 와 NaOCl irrigation 은 ISO-60에서 1.21 log<sub>10</sub> 의 박테리아 수 감소를 보였지만

LIP/INV-mTHPC 는 동일 위치에서 3.2 log<sub>10</sub>/3.6 log<sub>10</sub> 의 박테리아 수 감소를 보였다(54). Kranz 등 은 liposome을 사용해 mTHPC를 코팅하여 *E. faecalis* 에 대한 감수성을 실험하였다. Ex-vivo 가 아닌 in-vitro에서 진행되었으며 50  $\mu$ M 의 mTHPC를 652 nm, 100 J/cm<sup>2</sup> 의 에너지로 15분(900초)간 조사하면 *E. faecalis* 가 100% 제거되는 것을 확인하였다. 동일시간에서 liposome 보다 flexible invasome 이 더욱 많은 bacteria reduction을 보이는 것으로 보아 invasome을 사용하면 동일농도에서 더욱 짧은 조사시간으로 *E. faecalis*를 모두 제거할 수 있을 것으로 보인다. 또한 Kranz 등의 실험이 in vitro에서 진행되었다는 것을 고려하면 in vivo 나 ex-vivo 상에서의 차이는 더욱 커질 것으로 생각된다(55).

### 3.4.3. Nanoparticle-bound PS

#### 3.4.3.1 Bioactive Chitosan Nanoparticle

기존의 근관치료는 근관내의 바이오필름을 완벽하게 제거할 수 없는데 그 원인 중 하나는 dentinal tubule 내의 콜라겐섬유 때문이다. 근관치료가 끝난 다음 근관에 잔존하는 박테리아들은 알려지지 않은 어떤 물질들을 분비하고 이 물질에 노출된 host cell은 collagenase를 분비하여 dentinal tubule 내의 콜라겐섬유를 녹이기 시작한다. 노출된 dentinal tubule 내로 박테리아가 침입하여 근관치료가 실패하기 쉬우며 근관치료가 성공적이라 할지라도 콜라겐섬유가 파괴된 dentin 은 그 강도가 약해져 파절되기 쉽다(56). 그러나 PDT 의 경우 발생된 ROS가 dentinal wall 상에 있는 콜라겐섬유를

cross-link 시켜 강한 결합을 유도하는데 이는 collagenase 와 같은 enzymatic attack 에 높은 저항성을 가지게 해 준다. 이와 더불어 dentin 은 외부에서 주입되는 biopolymer 에 의해서도 강화될 수 있는데 chitosan 은 자연적으로 존재하는 친수성 cationic 고분자로 콜라겐의 분해를 저해하고 다른 유기조직과 결합하여 강도를 증가시킨다는 보고가 있다(57). 또한 chitosan 은 그 자체로도 넓은 항균효과가 있으며 생체적합성 또한 뛰어나다. Anousheh 등 은 rose benegal을 photosensitizer 로 사용하였는데 rose benegal 에 chitosan을 coating 하여 nano-photosensitizer를 개발하였다. 실험 결과 PDT 처리 후 chitosan 처리를 하지 않은 rose benegal 보다 chitosan 처리를 한 그룹에서 콜라겐분해가 7배 적게 일어났다. 또한 주위의 콜라겐의 cross-linking이 증가한 것도 관찰할 수 있었으며 bacterial collagenase activity 도 감소하였다(58).

Shrestha 등 은 chitosan 의 zeta potential, 그리고 membrane permeabilization 기능에 주목했다. 근관형성이 끝난 근관 내에는 유기물질 잔사와 박테리아 잔사가 남게 되는데 이러한 유기물질 조각들이 photosensitizer 의 zeta potential 과 정전기적 반응을 하게 된다. 이러한 조직 잔사들을 Tissue Inhibitor 라고 하는데, 이 tissue inhibitor 에는 pulpal tissue, serum, dentin matrix, lipopolysaccharide 등이 포함되어 있다. Positive charge를 가지는 MB, 혹은 Phenothiazine 은 negative charge를 가진 RB 나 xanthenes 보다 tissue inhibitor와의 반응이 덜 일어나게 된다. 강한 positive charge를 지닌 chitosan 에 negative charge를 지닌 photosensitizer를 화학적으로 결합시킨다면 더욱 PDT 의 효율을 증대시킬 수 있다. 또한 chitosan 의 강한 positive charge 는 박테

리아의 세포벽을 느슨하게(permeabilize)하는 효과가 있어 100 nm 크기 이하의 nano-particle이 박테리아 내부로 더욱 잘 침투할 수 있으며 박테리아 외부에서 발생한 ROS 가 박테리아 내부로 투과하기가 용이해진다. 이 실험에서는 Chitosan 에 RB를 결합시켰고 MB 와 PDT 효율을 비교하였다. Tissue inhibitor 와 *E. faecalis* 를 혼합하여 15분간 암실에 보관하고 Chitosan-RB, Rb, MB 세 가지 그룹으로 나누어 각각 1.66 분 과 3.33분 동안 5 J 과 10 J/cm<sup>2</sup> 레이저로 activation 시켰다. Tissue inhibitor 가 없는 그룹에서는 Chitosan-RB 가 광조사 즉시 *E. faecalis*를 100% 제거했으며 Tissue inhibitor 가 있는 조건에서는 24시간 후에 100%의 박테리아 감소를 보였다. 특히 광조사가 없는 그룹의 chitosan-RB 의 경우에도 40~60% 의 박테리아 감소를 보였다(59).

### 3.4.4. Nanoparticle 에 encapsulation 된 PS

#### 3.4.4.1 PLGA (Polylactico-glycolic acid) based nanoparticle

위에서 언급한 chitosan과 RB를 결합한 nano-particle과는 다소 다르게 PLGA를 이용한 photosensitizer delivery system 은 photosensitizer 가 나노파티클과 화학적으로 결합하는 것이 아니라 photosensitizer 자체를 PLGA를 이용하여 코팅하는 방식이다. 이러한 encapsulation 방식의 장점들은 다음과 같다(60).



1) 더욱 큰 용량의 photosensitizer를 전달할 수 있다. 실제로 chitosan-RB 나노파티클의 경우 RB 분자 하나당 chitosan 1개의 -COOH 그룹과 결합해야 하기 때문에 많은 양의 photosensitizer를 담을 수 없다. 그러나 photosensitizer를 encapsulation 하는 방식은 특정한 molar ratio 의 화학결합이 필요 없기 때문에 동일한 크기에서 더 많은 photosensitizer를 담을 수 있다.

2) 세포에게 흡수된 독성물질을 다시 밖으로 pump-out 하는 박테리아의 항생제 저항기전에 영향을 받지 않는다.

3) nano-particle 표면은 bioactive 한 화학물질들로 이루어져 있기 때문에 다양한 target molecule를 fabrication 하기에 용이하다. 특정세포나 미생물에게 selectively uptake 하게 할 수 있는 receptor 나 ligand를 conjugate 하여 정상세포나 조직에 독성이 적은 photosensitizer를 설계하는 것이 가능하다.

4) nano-particle 구성분자들은 생친화적이며 생분해적이다. 고분자로 설계된 nano-particle의 경우 작은 분자량을 가진 monoblock들이 생체 내의 반응으로 cleave 될 수 있는 결합으로 연결된 형태이기 때문에 systemic 하게 흡수되어도 renal tubule을 통해 배출될 수 있다. 특히 PLGA 의 경우 FDA 의 승인을 받은 물질로서 우수한 생친화성을 자랑한다.

5) Phototoxicity를 조절 가능한 장점이 있다. PLGA 에 의해 Photosensitizer 가 encapsulation되면 quenching 현상이 일어나 빛이 조사되어도 독성을 띠지 않게 된다. 이후 타겟 세포나 미생물의 안으로 흡수된 후 세포 내의 redox potential change 에 의해 PLGA 코팅이 분해되면 다시 phototoxicity를 가질수 있게 된다. 이는 즉 Time dependent activation 이 가능하다는 것을 의미한다.

앞에서 언급했듯이 PDT 는 photosensitizer 가 목표하는 지점에 distribution 되는 시간에 맞춰 빛을 조사하는 것이 중요하다. 이 최적 시간은 photosensitizer 마다 다르고 장기나 조직마다 다르며 circulation 의 영향이나 Tissue inhibitor 등의 외부영향이 개입할 때 더욱 예측이 복잡해진다. 그러나 photosensitizer 의 phototoxicity를 일정 기간동안 억누를 수 있다면 이러한 문제에 PDT 의 효능이 소실되거나 의도하지 않은 부위에서 ROS 가 발생하는 문제점을 최소화 할 수 있다. Selective quenching을 photosensitizer 에 적용시키려는 시도는 PLGA 코팅 외에도 여러 가지 방면으로 연구되어 왔다. Zheng 등 은 molecular beacon을 사용하였다. Photosensitizer 와 ROS quencher를 특수한 bonding 으로 결합시키는 것인데 이 bonding은 target으로 하는 질병에 특이적인 peptide 에 반응하여 cleave 되도록 설계되었다(61). 즉, 질병부위가 아닌 다른 부위에서는 이 ROS quencher 때문에 ROS 가 발생하지 않다가 질병부위에서 분리되어 ROS 가 발생하게 된다.

Panogis 등 은 methylene blue를 PLGA로 코팅하여 *E. faecalis* 에 흡수되는 양상을 관찰하였다. 결과 PLGA 로 코팅된 MB 는 그렇지 않은 MB 보다 3배 높은 농도로 *E. faecalis* 의 cell wall에 결합하였으며 이로 인해 1/10-1/100로 *E. faecalis*를 제거할 수 있음을 보였다. 효율을 높이기 위해 oxidizer emulsion(Oxygen carrier)을 추가로 로딩하면 ROS 의 생산효율이 급증하는 것도 관찰하였다 (unpublished data)(62).

### 3.5. 근관 PACT와 기존 근관치료법들간의 새로운 조합에 따른 임상적 효능

#### 3.5.1. Ultrasonic activator를 이용한 photosensitizer 의 분산

상기에서 언급했듯 photosensitizer 의 분산은 PACT 의 효율에 큰 영향을 미친다. 이것은 photosensitizer 의 aggregation 에 국한된 문제가 아니라 dentinal tubule 내부까지 균일 농도의 photosensitizer 가 침투할 수 있는 깊이와도 관련되어 있다(62) Dentinal tubule 내에 서식하는 *E. faecalis* 가 통상적인 irrigation 방법으로는 제거가 불가능하기 때문에 기존에는 Passive Ultrasonic Irrigation (PUI) 라는 방식을 사용하여 기존에 사용되는 irrigant 의 효능을 증가시키는 방법이 연구되었다 (64,65). Ghinzelli 등 은 이 PUI를 기존의 irrigation 이 아니라 PDT 와 결합하여 사용하였다. PS 로는 0.01 % MB 가 사용되었고 660-690 nm, 9 J/cm<sup>2</sup> 레이저로 90초간 광조사 한 후 일반적인 초음파 스케일러를 사용하여 PS irrigation을 실시하였다. 단순 PDT를 시행한 그룹(3.60 log<sub>10</sub> CFU) 보다 PDT 와 US activation을 동시에 수행한 그룹에서 잔여 *E. faecalis* 의 수가 더 적게 나타났다 (3.17 log<sub>10</sub> CFU)(66). US activation 이 PDT 의 효용성 증대에 영향을 주는 이유는 초음파가 bacterial wall을 약화시키는 경향이 있는데 이 때문에 permeability 가 증가한 bacterial wall 내부로 MB 가 높은 농도로 침착될 수 있기 때문이며 또 PS를 dentinal tubule 내부로 더욱 효율적으로 전달

할 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 또한 PDT 의 효용성은 주변 산소농도에 의해 영향을 받는데 초음파를 통한 wave 로 인해 산소 용해도가 균일하게 분포되었기 때문일 가능성도 있다.

### 3.5.2. EndoVac system 과 Calcium hydroxide, 그리고 PACT 의 조합

복잡한 근관구조 내부로 세척액을 잘 침투시키기 위해 개발된 EndoVac은 aspiration 과 irrigation 기능이 동시에 구현되는 형태로 과도한 세척압으로 인해 세척액이 apical 로 새어나가는 것을 막아 준다. 또한 aspiration 시 음압이 걸리는데 이 음압이 근관 내의 debris를 제거하는 데 효율적임이 여러 연구에서 증명된 바 있다 (67). 근관내의 PACT 의 효율이 떨어지는 원인 중 하나는 바로 이 복잡한 근관구조 내로 photosensitizer가 균일한 농도로 잘 확산되지 못하기 때문인데 단순한 syringe를 사용한 photosensitizer 주입 보다 EndoVac system을 이용한 주입이 이 점에서 더욱 효과적일 것이라 생각되었다. Miranda 등 은 EndoVac 과 Methylene Blue, 그리고 optical fiber를 사용하여 근관 PACT를 시행한 후 Calcium hydroxide paste를 적용하고 근관내의 *E. faecalis* 의 CFU를 구했다(68). 그러나 가설과는 달리 근관내의 *E. faecalis* reduction 은 기존의 NaOCl 화학살균법과 크게 다르지 않았으며 오히려 PACT를 함께 적용하자 EndoVac 만 사용하였을 때 보다 효율이 조금 감소하였다. 그러나 EndoVac+PACT 그룹에서는 근관 세척이 끝난 후에도 지속적으로 *E. faecalis* 의 양이 감소하여 근관형성 후의 근관내

*E. faecalis* 살균에 효과가 있음을 알 수 있었다(68). EndoVac 과 PACT 조합이 기대했던 것 보다 크게 효과가 명확하지 않은 것은 근관, 부근관, 그리고 dentinal tubule 내의 산소농도가 높지 않기 때문으로 생각된다. PACT를 통한 ROS 발생에는 용존산소농도가 광조사량만큼 중요하여 해부학적으로 고립되어있는 구조인 근관인 경우 이 점이 PACT 에 있어 가장 치명적인 약점일 것이다.

## 4. Discussion and Conclusion

PDT를 이용하여 근관내 *E. faecalis* 제거 및 근관치료의 효율은 높히려는 연구는 현재 활발하게 진행되고 있으며 실제로 이 리뷰에서 논의한 연구논문의 약 80%(24/30)에서 PDT를 기존의 근관치료에 adjunctive 로 사용하면 기존의 근관치료만 수행할 때 보다 높은 *E. faecalis* 제거효율을 보여주었다. 특히 재근관치료와 polymicrobial infection 환경에서 기존의 근관치료보다 월등한 효율은 보여주었는데, 이는 PACT의 살균방식이 박테리아가 저항성을 획득할 수 없는 방식이며 발생된 ROS가 바이오필름의 구성성분을 손상시키기 때문이다. 그러나 이러한 근관 PACT 연구들로 효용성을 결론내기에는 각 연구들이 사용한 laser의 파장이나 조사시간, 광섬유의 지름, 근관구조의 차이 등의 실험조건에 차이가 많아 부정확한 면이 있다.

그러나 실험조건의 차이에서 몇 가지 경향성을 발견할 수 있는데 먼저 광원의 측면에서 광섬유의 지름이 증가할수록 PACT의 효율이 증가하며 광원의 Power ( $W/cm^2$ )가 강할수록 PACT의 효율이 증가함을 알 수 있다. 효율적인 PACT를 위해 요구되는 광섬유의 지름과 광원의 power는 근관의 크기와 비례하는데 근관의 크기가 큰 bovine 치아를 사용한 실험의 경우 (44) 작은 지름의(216 nm) 광섬유를 사용하자 사람의 근관에 200 nm 대의 광섬유를 사용한 연구(42,45)보다 PACT 효능이 급감하였다. 이는 결국 광원에서 배출되는 Photon의 양이 근관 내에 얼마나 잘 분산되는지, 또 얼마나 높은 강도로 photosensitizer와 접촉하는지에 따라 PACT의 효율

이 달라짐을 의미한다.

또한 조사시간이 증가함에 따라 효율이 증가하는데 일정 시간 이상 조사 시 효율변화량은 줄어들음을 알 수 있었다. 동일 농도의 Methylene blue를 사용한 두 실험(Foschi 과 Pagonis)에서 조사시간만 5분과 10분으로 달랐는데, 박테리아 수 감소에 있어 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 1분 동안 조사했을 때 보다는 1/1000 이상의 박테리아 수 감소 차이를 보였다 (Cheng 등). 이것은 근관 내의 용존산소가 충분치 못하고 MB 의 경우 조사 시간이 5 분~10 분을 초과하게 되면 근관 내 산소를 모두 소진하여 ROS의 발생이 감소하기 때문으로 생각된다.

Photosensitizer 의 종류에 따른 근관 PACT 효율도 큰 편차를 보였는데 크게는 net charge 가 positive 인 TBO, MB 와 negative charge 인 unmodified RB로 분류하여 비교해 보면 positive charge를 띠는 photosensitizer 가 더욱 효능이 좋았다. 이것은 박테리아의 표면이 negative charge 인 경우가 많고 따라서 charge interaction을 통한 박테리아 내의 photosensitizer 축적이 가능하기 때문이다. 그렇다면 RB 와 같은 negative charge 의 photosensitizer 들의 장점은 무엇일까. 근관 내에는 만곡된 형태와 구조물이 많고 빛의 직선경로를 방해하기 때문에 투과성이 좋은 저파장의 광원을 사용하는 것이 효율적이다. 5500 nm 이하의 저파장에 반응하는 photosensitizer인 RB 는 이러한 점에서 650 nm 이상의 파장을 사용해야 하는 MB나 mTHPC, TBO 에 비해 장점이 있다. RB의 저파장 excitability 의 특징을 보존한 채 박테리아 표면과의 interaction을 증강시키는 형태의 연구들이 차세대 photosensitizer 개발의 한 주제인데 Chitosan 과 RB를 화학적으로

결합시킨 photosensitizer 들은 positive net charge를 가진 photosensitizer 만큼의 효율을 보였다.

차세대 photosensitizer 들의 개발동향을 정리한 결과(Table 1)를 보면 크게 1) Chitosan 과 같은 부가적 항균 기능이나 collagenase inhibition 기능을 가진 고분자 물질을 도입하는 방향이나(58,59) 2) PEI, PEG, invasome, liposome 등과 같은 분산도가 높은 고분자물질과 기존 photosensitizer를 결합시키는 방향이나(38,54,55) 3) biodistribution 과 cellular uptake 에 의해 활성화 되는 PLGA, ROS quencher 등의 기능성 고분자를 활용하는 방향(61,62), 그리고 4) Chitosan 과 같은 강한 positive charge를 가진 고분자를 도입하여 근관내의 Tissue inhibitor 에 의한 영향을 최소화하고 박테리아의 표면을 permeable 하는 방향(58,59) 등으로 행해지고 있었다.

Photosensitizer의 화학/구조적인 변화 뿐 아니라 photosensitizer 의 전달 방법 또한 많은 연구가 필요하다. 초음파 irrigation 과 PACT를 병행한 경우는 *E. faecalis* 제거에 효과적이었지만(66) EndoVac과 병행한 경우 그 효과가 유의하지 않았다(68).

미래의 근관 PDT의 발전방향은 시술방법이 간단하고 (광섬유를 사용하지 않아도 되는 투과성 좋은 초저주파나 Near infra-red 의 파장을 활용할 수 있는 photosensitizer 의 개발) 박테리아의 표면에 선택적으로 결합할 수 있고 (PLGA 나 Chitosan 등으로 코팅한 photosensitizer 위에 ligand 나 receptor를 결합시킨 photosensitizer의 개발) 근관 내 산소농도를 높게 유지시켜 줄 수 있는 (O<sub>2</sub> microbubble을 liposome 에 코팅하여 photosensitizer 와 같이 전달하거나 photosensitizer 자체에 NIR, 초음파 등의 외부자



극에 의해 산소가 유리되는 물질을 결합) 장비의 개발 등이 조화롭게 이루어져야 할 것이다.

Table 1. Root canal treatment 에 사용된 새로운 photo-sensitizer 들의 특성과 활성화 조건 및 이유.

Author	Type	Wavelength(nm)	Conc.	Energy Fluence	Irradiation Time (sec)	E. faecalis Reduction	Advantage
Garcez et al.	PEI/CE6	660		unknown (40mW)	240	99.99%	상품화됨.
Anna Ossmann et al.	Invasome-mTHPC	652	50mM	100J/cm <sup>2</sup>	425	3.6log10	저출력에서 우수한 광독성, 우수한 Dentinal tubule penetration
Anousheh et al.	Chitosan-RB nano-particle	540	10uM	40J/cm <sup>2</sup>	900	n/a	Bacterial Collagenase inhibition, Dentinal wall collagen protection
Shrestha et al.	Chitosan-RB nano-particle	540/660	300ug/ml	5J/cm <sup>2</sup>	100	55% with Tissue Inhibitor	Tissue inhibitor에 의한 영향 최소화, 광조사 없이도 박테리아에 독성
				10J/cm <sup>2</sup>	200		
Panagis et al.	PLGA-MB	665	50ug/ml	30J/cm <sup>2</sup>	300	1.5log10	저농도/저출력, Bacterial cell wall penetration 가능
			6.25ug/ml	60J/cm <sup>2</sup>	300	2log10	
Foschi et al.	MB only	665	-	222J/cm <sup>2</sup>	300	3log10	

## 5. Reference

- 1) Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW. Photodynamic Therapy. Journal National Cancer Institute 1998;90:889–905
- 2) Dennis EJ, Dolmans GJ, Fukumura D, Rakesh KJ. Photodynamic therapy for cancer. Nature Reviews Cancer 2003;3:380–387
- 3) Blum HF. Photodynamic action and diseases caused by light. New York: Reinhold 1941
- 4) Epstein JH. Phototoxicity and photoallergy. Seminars in cutaneous medicine and surgery 1999;18:274–284
- 5) Lipson RL, Baldes EJ. The Photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Archives of Dermatology 1960;82:508–516
- 6) Schwartz S, Winkelman JW, Lipson RL. Photodynamic therapy. New York: Marcel Dekker Inc 1992:1–15
- 7) Schwartz SK, Abolon K, Vermund H. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. Univ. Minn. Med. Bull 1955;27:7–8
- 8) Dogherty TJ. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. Journal Clinical Laser Medicine 1961;42:623–629
- 9) Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. Journal Thoracic and Cardiovascular Surgery 1996;14:219–221
- 10) Diamond I et al. Photodynamic therapy of malignant tumours. Lacet 1972;2:1175–1177
- 11) Dougherty TJ, Grindey GB. Photoradiation therapy – Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. Journal of Nature

Cancer Inst 1975;55:115–121

- 12) Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in Dentistry. *Journal Dental Research* 2007;8:694–707
- 13) Allison et al. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers – a review of applications and outcomes. *Photodiagn Photodyn Therapy* 2005;2:205–222
- 14) Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998;42:13–28
- 15) Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents – circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegrad* 2004;53:119–126
- 16) Henderson BW, Dougherty TJ et al. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology* 1992;55:145–157
- 17) Gomer CJ, Razum NJ. Acute skin response in albino mice following porphyrin photosensitization under oxic and anoxic conditions. *Photochemistry and Photobiology* 1984;40:435–439
- 18) Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 1991;53:549–553
- 19) Shoaib HS. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: A systematic literature review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2013;10:632–643
- 20) Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* 2001;34:399–405
- 21) Rocas IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of enterococcus

- faecalis with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics* 2004;34:399–405
- 22) Vanessa C, Georgios AK, Tom CP. The Effect of Photodynamic Therapy in Root Canal Disinfection: A Systemic Review. *Journal of Endodontics* 2014;40:891–898
- 23) Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal* 1985;18:35–40
- 24) Sjogren U. Success and failure in endodontics. Thesis: Umea University, Sweden, 1996
- 25) Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *Journal of Endodontics* 1987;13:147–157
- 26) Dalton BC, Orstavik D, Phillips C. Bacterial reduction with nickel–titanium rotary instruments. *Journal of Endodontics* 1998;24:763–767
- 27) Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 2000;26:331–334
- 28) Charles HS, Scott A, Schwartz et al. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics* 2006;32:93–98
- 29) Wood S, Nattress B, Kirkham J et al. An invitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *Photochemistry and Photobiology* 1999;50:1–7

- 30) Soukos NS, Chen PS, Morris JT et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of Endodontics* 2006;32:979–984
- 31) O’Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Laser Surgery Medicine* 2002;31:86–90
- 32) Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:680–684
- 33) Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005;56:324–330
- 34) Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection PAD used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *Journal of Dentistry* 2006;34:363–371
- 35) Seal GJ, Ng YL, Spratt D et al. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *International Endodontic Journal* 2002;35:268–274
- 36) Lee CF, Lee CJ et al. delta-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial therapy on *Pseudonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. *Photochemistry and Photobiology* 2004;75:21–25
- 37) Bonsor SJ, Nichol R et al. An alternative regimen for root canal disinfection. *British Dental Journal* 2006;201:101–105

- 38) Garcez A, Nunez S, Hamblin M et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *Journal of Endodontics* 2008;34:138–142
- 39) Garcez A, Nunez S, Hamblin M et al. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *Journal of Endodontics* 2010;36:1463–1466
- 40) Bago I, Plecko V, Gabric PD et al. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International Endodontic Journal* 2013;46:339–347
- 41) Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R, Nazari NA, Naseri M. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against enterococcal faecalis in root canals: an in vitro study. *Dental Research Journal* 2012;9:613–618
- 42) Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F et al. Photoactivated disinfection in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *The International Journal of Artificial Organs* 2011;34:889–897
- 43) Schlafer S, Vaeth M, Frandsen EV. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 2010;109:634–641
- 44) Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S, Mader T et al. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic

- therapy. *International Endodontic Journal* 2013;46:449—457
- 45) Souza LC, Brito PR, Oliveira JC, Alves FR et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of enterococcus faecalis. *Journal of Endodontics* 2010;36:292—296
  - 46) Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine* 2007;39:782—787
  - 47) Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Endodontics* 2010;36:322—328
  - 48) Nunes MR, Mello I, Franco GC, Medeiros JM et al. Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in-vitro study. *Photomedicine and Laser Surgery* 2011;29:803—808
  - 49) Cheng X, Guan S, Chen X et al. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:Yag, Er:Yag, Er, Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy in experimentally infected root canals. *Lasers In Surgery And Medicine* 2012;44:824—831
  - 50) Y. Koo, W. Fan, H. Hah et al. Photonic explorers based on multifunctional nanoplatforms for biosensing and photodynamic therapy. *Journal for Biomedical Optics* 2007;46:1924—1930
  - 51) Stefano P, Prokopovich P. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy. *Photochemical Photobiological Sciences* 2011;10:712—720
  - 52) Nubuhiro N. Design and development of dendrimer



- photosensitizer– incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009;61:327–338
- 53) Senge MO, Brandt JC. Temoporfin Foscan(R), 5,10,15,20–tetra(m–hydroxyphenyl) chlorin—a second–generation photosensitizer. *Photochemical Photobiological Sciences* 2011;87:1240–1296.
- 54) Anna O. Photodynamic killing of *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules using mTHPC incorporated in liposomes and invasomes. *Clinical Oral Investigations* 2014
- 55) Stefan KI. Photodynamic Suppression of *Enterococcus faecalis* Using the Photosensitizer mTHPC. *Lasers in surgery and Medicine* 2011;43:241–248
- 56) Ferrari M, Mason PN, Goracci C. Collagen degradation in endodontically treated teeth after clinical function. *Journal of Dental Research* 2004;83:414–419
- 57) Shrestha A, Friedman S, Kishen A. Photodynamically crosslinked and chitosan incorporated dentin collagen. *Journal of Dental Research* 2011;90:1346–1351
- 58) Anousheh P. Bioactive chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation in Vitro. *Journal of Endodontics* 2014;40:703–709
- 59) Annie S. Antibacterial efficacy of photosensitizer functionalized biopolymeric nanoparticles in the presence of tissue inhibitors in root canal. *Journal of Endodontics* 2014;40:566–570
- 60) Ricci–Junior E, Marchetti JM. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *Internaitonal Journal*

of Pharmacology 2006;310:187–195

- 61) Gang Z. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. National Acad Sciences 2006;104:8989–8994
- 62) Tom C. Pagonis. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. Journal of Endodontics 2010;36:322–328
- 63) George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. Journal of Endodontics 2005;31:867–872
- 64) Plotino G, Pameijer C, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. Journal of Endodontics 2007;33:81–95
- 65) Grundling GL, Zechin JG, Jarduim WM, Oliveira SD, Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in bovine tooth model. Journal of Endodontics 2011;37:1128–1133
- 66) Guilherme CG. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis* – an in vitro study. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2014;579:1–7
- 67) Desai P, Himel V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. Journal of Endodontics 2006;35:545–549
- 68) RG Miranda. Ex-vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. International Endodontic Journal 2012;46:499–505